



**Universidad  
de La Laguna**

Departamento de Medicina Física y Farmacología

Facultad de Ciencias de la Salud

Sección Medicina

**Estudio del control de la infección por virus VIH-1 y Zika:  
HDAC6 como factor antiviral en virus ARN+**

Memoria de tesis para optar al Grado de Doctor  
por la Universidad de La Laguna, defendida por

**Silvia Pérez Yanes**

Director de tesis doctoral:

Dr. Agustín Valenzuela Fernández

Codirectora de tesis doctoral:

Dra. Judith Estévez Herrera

Curso académico: 2022-2023





Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado

**Estudio del control de la infección por virus VIH-1 y Zika:  
HDAC6 como factor antiviral en virus ARN+**

Silvia Pérez Yanes

Tesis doctoral presentada para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de La Laguna

Programa de doctorado:  
Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Desarrollo y Calidad de Vida

Dirigida por:  
Dr. Agustín Valenzuela Fernández y la Dra. Judith Estévez Herrera  
Profesores de Farmacología de la Universidad de La Laguna







El Dr. Agustín Valenzuela Fernández y la Dra. Judith Estévez Herrera, Profesores de Farmacología del Grupo Inmunología Celular y Viral del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna,

### **CERTIFICAN**

Que Silvia Pérez Yanes ha realizado el trabajo titulado “**Estudio del control de la infección por virus VIH-1 y Zika: HDAC6 como factor antiviral en virus ARN+**”, bajo nuestra dirección y que presenta para optar al grado de doctor por la Universidad de La Laguna.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en San Cristóbal de La Laguna a 23 de marzo del 2023

**Dr. Agustín Valenzuela Fernández**  
Profesor Titular de Farmacología

**Dra. Judith Estévez Herrera**  
Profesora Ayudante Doctor de  
Farmacología



## **Agradecimientos a Instituciones Públicas**

El desarrollo de la presente tesis doctoral se ha podido llevar a cabo gracias a la financiación del “contrato predoctoral M-ULL para la formación de Doctores de la convocatoria 2019”, por parte del Ministerio de la Ciencia, Innovación y Universidades y la Universidad de La Laguna, del cual la doctoranda ha sido beneficiaria.

Además, Silvia Pérez Yanes ha sido adjudicataria de la “Beca de Investigación Fundación Canaria Doctor Manuel Morales” en los años 2019-2020, para el desarrollo de un proyecto de investigación bajo la dirección de investigadores de prestigio en centros especializados fuera de las Islas Canarias, gracias a la cual realizó una estancia de un año de duración en el “Institut de Recerca de la Sida-Caixa, IrsiCaixa”.



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis. Agustín, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar contigo y con el grupo, tanto en el TFM como en la tesis doctoral. Por haber confiado en mí durante todos estos años y transmitirme tu conocimiento y entusiasmo por la ciencia. Judith, gracias por ser mi codirectora, pero también mi compañera y amiga. Por tu serenidad y apoyo, por escucharme y buscar una solución en los momentos de estrés. Por nuestras charlas y divagaciones sobre los experimentos de las que tanto he aprendido y voy a echar de menos. Eres una grandísima profesional, pero sobre todo mejor persona, siempre contagiando tu felicidad a los que te rodean. Gracias a los dos por acompañarme en este camino y permitirme crecer profesionalmente.

Al resto de jefes del departamento, Ricardo, David y Federico, por ofrecerme vuestra ayuda siempre que lo he necesitado. Ricardo, gracias por preocuparte por mí y darme ánimos con tus bromas y canciones. David, gracias por haber formado parte del desarrollo de esta tesis y de mi progreso como científica, siempre dispuesto a socorrerme y enseñarme. Estoy muy agradecida por tus opiniones y consejos, y tu colaboración en el laboratorio que en tantos momentos nos ha salvado.

Al Dr. Julià Blanco, por aceptarme en tu equipo y hacerme sentir bienvenida desde el primer instante. Gracias por todo lo que he aprendido trabajando bajo tu dirección y por tu confianza en mí, permitiendo que la estancia de seis meses se convirtiera en un año. Un año inolvidable profesional y personalmente gracias a todos vosotros. También quiero agradecer a todos mis compañeros, por tratarme como una más del grupo y ayudarme en todo lo que necesitaba. En especial a Silvia, por estar pendiente de mí y explicarme todo lo que sabe con amabilidad y paciencia; y a los doctorandos, por integrarme en los planes tanto de dentro como de fuera del laboratorio. Y en general, a todas las personas que forman parte de IrsiCaixa con las que coincidí, por siempre tratarme todos con tanto cariño y haberme adoptado durante ese tiempo en la familia que habéis construido.

A Begoña, por ser tan atenta con nosotros y llenarnos de calma y tranquilidad cada vez que estás cerca. A Mireya, por tu ternura y afecto, por confortarme cuando estaba más cansada o desanimada. A Ana y Rocío, por transmitirme vuestra buena energía siempre que os veo.

Romina, mi compañera de mesa, de experimentos y de viajes, mi mentora y mi pilar en el laboratorio. Gracias por estar para mí siempre, en los momentos más duros y en los muchos momentos de risas. Te admiro como profesional, por tu inteligencia y tu capacidad de trabajo, pero sobre todo como persona, por tu alegría y empatía; gracias por ser mi compañera y haberte convertido también en una gran amiga.

A Jonay e Iria, que, aunque hayamos compartido menos tiempo juntos, me alegro de haber coincidido con vosotros. Viendo vuestra implicación en el trabajo, estoy segura de que vais a tener un bonito y largo recorrido en la ciencia.

Ana, entramos prácticamente a la vez en el departamento y desde entonces has sido una pieza fundamental en este camino. Mi otro pilar en el laboratorio, incluso estando en grupos diferentes. Gracias por tu positividad, soporte y amistad. Tu forma de ser y tu pasión por lo que haces te va a llevar muy lejos, y espero tener la suerte de seguir estando presente en tu vida para verlo. Noemí, ha sido un placer compartir estos dos últimos años contigo, de los que me llevo grandes momentos con vosotras. Ya sabes, que cualquier cosa que necesites, aquí me tienes.

Al resto de compañeros del departamento, Pablo, Ayoze, Dani, Javi, Sergio, Alicia, Laura, Israel, Marcial y Natalia. Gracias por haberme acogido tan bien desde que llegué. Ayoze por tus bromas y anécdotas, y a Pablo por tus detalles y conversaciones durante todos estos años que han amenizado muchos días. Israel, Dani, Javi y Sergio, gracias por vuestro humor y vuestra ayuda. Marcial y Natalia, por vuestro interés y ánimo.

A mis amigas del colegio, Betania y Tibisay, por estar a mi lado incluso en la distancia. Sois como hermanas para mí, siempre escuchándome y dándome consejos, confiando en mí más que yo misma. Mi padre siempre me dice que los verdaderos

amigos se cuentan con los dedos de una mano, y yo tengo la gran fortuna de poder contar con vosotras. A mi sobrino Dariel, por llenarme de energía cada vez que lo veo, por perdonarme los planes fallidos por tener que trabajar en la tesis y regalarme sus sonrisas y cariño.

A mi segunda familia, mi familia catalana-castellonense-canariona, María, Ledes, Patri y Sonia. Me fui a estudiar la carrera a Barcelona sin conocer a nadie allí, pero desde que nos encontramos me hicisteis sentir como en casa. Desde hace ya 11 años tengo la suerte de teneros en mi vida, de poder contar con vuestro apoyo siempre que lo necesito, de tener recuerdos inolvidables y de seguir creando nuevos. A la madre de Ledes, por ser mi segunda madre durante los años que he vivido en Barcelona. A Aixa, mi compañera de piso durante los dos primeros años de carrera, y desde ahí, una persona imprescindible en mi vida. Gracias por regalarme tantos momentos de diversión y risas cuando estoy contigo y transmitirme tu luz y tu locura.

A Lara, Ana Belén y Aitor, porque, aunque estemos cada uno en un lado del planeta, siempre estáis pendientes de como estoy. Porque cuando nos vemos no parece que llevemos meses o años sin vernos, todo sigue igual, con nuestras conversaciones interminables y nuestros planes de viajes. Gracias por estar ahí para mí.

A mis abuelos, que gracias a su esfuerzo he podido tener grandes oportunidades que ellos de jóvenes no tuvieron. En especial a mi abuela Maribel y mi abuelo Domingo, por ser un ejemplo para mí de trabajo y superación. Por enseñarme a tener siempre una sonrisa incluso en las adversidades y a buscar el lado positivo en todas las circunstancias. Gracias por todo el cariño que me disteis, sé que estaríais muy orgullosos de mí por haber llegado hasta aquí, y eso es lo que más feliz me hace.

A Noa, mi apoyo incondicional desde que llegó a la familia. A mi tío Berto por tener tanta fe en mí e impulsarme a intentar conseguir todo lo que me propongo. Al tío Pablito y Pili, por creer en mi futuro como doctora.

Pero, sobre todo, gracias a mis padres, Sioni y Francisco. Mi inspiración, mis referentes en todo lo que hago. Gracias por alentarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por siempre estar a mi lado para sostenerme, por darme la libertad de crecer y los valores para hacerlo de la manera correcta. Por estar en primera fila en mis logros y mis fracasos, para celebrarlos conmigo y para ayudarme a aprender de ellos. Porque sigo aspirando a algún día parecerme más a vosotros. Sois mi fuerza y mi mayor orgullo. Ojalá cuando tenga hijos sientan por mí el amor y admiración que yo siento por los dos. Os quiero muchísimo.

Durante estos últimos cinco años he podido descubrir la ciencia, conocer grandes personas, aprender a nivel profesional y evolucionar a nivel personal. Gracias a todos por acompañarme en este camino que ha sido tan duro y a la vez tan bonito.



## **MANIFESTACIÓN DEL DOCTORANDO Y DEL DIRECTOR Y CODIRECTORA DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE DERECHOS DE OTROS AUTORES CITADOS EN LA TESIS Y USO DE IMÁGENES**

Manifestamos, al firmar la tesis doctoral titulada “**Estudio del control de la infección por virus VIH-1 y Zika: HDAC6 como factor antiviral en virus ARN+**”, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director y la codirectora de la tesis y que se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando ha recurrido a publicaciones donde presentan resultados.

Del mismo modo, manifestamos que las imágenes presentadas en la tesis doctoral no responden a ninguna finalidad de uso comercial, sino que se presentan solo en el contexto académico del documento de la tesis doctoral, que será defendida ante el tribunal designado con vistas a la obtención del título de Doctor.

En San Cristóbal de La Laguna, a 23 de marzo del 2023

**Dr. Agustín Valenzuela**

**Fernández**

Profesor Titular de  
Farmacología en la  
Universidad de La  
Laguna

**Dra. Judith Estévez**

**Herrera**

Profesora Ayudante  
Doctor de Farmacología  
en la Universidad de La  
Laguna

**Silvia Pérez Yanes**

Doctoranda del  
Programa de Doctorado  
Ciencias Médicas y  
Farmacéuticas,  
Desarrollo y Calidad de  
Vida



## Trabajos publicados en revistas indexadas JCR (Q1):

### Año 2019:

1. Marrero-Hernández, S., Márquez-Arce, D., Cabrera-Rodríguez, R., Estévez-Herrera, J., **Pérez-Yanes, S.**, Barroso-González, J., Madrid, R., Machado, J. D., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2019). HIV-1 Nef Targets HDAC6 to Assure Viral Production and Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 10:2437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02437>
2. Cabrera-Rodríguez, R., Heilmann, V., Marfil, S., Pernas, M., Marrero-Hernández, S., Cabrera, C., Urrea, V., Casado, C., Olivares, I., Márquez-Arce, D., **Pérez-Yanes, S.**, Estévez-Herrera, J., Clotet, B., Espert, L., López-Galíndez, C., Biard-Piechaczyk, M., Valenzuela-Fernández, A., & Blanco, J. (2019). HIV-1 envelope glycoproteins isolated from Viremic Non-Progressor individuals are fully functional and cytopathic. *Scientific Reports*, 9(1):5544. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42075-3>

### Año 2021:

3. Estévez-Herrera, J., **Pérez-Yanes, S.**, Cabrera-Rodríguez, R., Márquez-Arce, D., Trujillo-González, R., Machado, J. D., Madrid, R., & Valenzuela-Fernández, A. (2021). Zika Virus Pathogenesis: A Battle for Immune Evasion. *Vaccines*, 9(3):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030294>
4. Cabrera-Rodríguez, R., **Pérez-Yanes, S.**, Estévez-Herrera, J., Márquez-Arce, D., Cabrera, C., Espert, L., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2021). The Interplay of HIV and Autophagy in Early Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12:661446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661446>
5. Pradenas, E., Trinité, B., Urrea, V., Marfil, S., Ávila-Nieto, C., Rodríguez de la Concepción, M. L., Tarrés-Freixas, F., **Pérez-Yanes, S.**, Rovirosa, C., Ainsua-Enrich, E., Rodon, J., Vergara-Alert, J., Segalés, J., Guallar, V., Valencia, A., Izquierdo-Users, N., Paredes, R., Mateu, L., Chamorro, A., Massanella, M., Carrillo, J., Clotet, B., & Blanco, J. (2021). Stable neutralizing antibody levels 6 months after

mild and severe COVID-19 episodes. *Med (N Y)*, 2(3):313-320.e4.  
<https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.01.005>

## **Año 2022:**

6. Valenzuela-Fernández, A., Cabrera-Rodríguez, R., Ciuffreda, L., **Pérez-Yanes, S.**, Estevez-Herrera, J., González-Montelongo, R., Alcoba-Florez, J., Trujillo-González, R., García-Martínez de Artola, D., Gil-Campesino, H., Díez-Gil, O., Lorenzo-Salazar, J. M., Flores, C., & Garcia-Luis, J. (2022). Nanomaterials to combat SARS-CoV-2: Strategies to prevent, diagnose and treat COVID-19. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:1052436. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1052436>
7. Valenzuela-Fernández, A., Cabrera-Rodríguez, R., Casado, C., **Pérez-Yanes, S.**, Pernas, M., García-Luis, J., Marfil, S., Olivares, I., Estévez-Herrera, J., Trujillo-González, R., Blanco, J., & Lopez-Galindez, C. (2022). Contribution of the HIV-1 Envelope Glycoprotein to AIDS Pathogenesis and Clinical Progression. *Biomedicines*, 10, 2172. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092172>
8. Cabrera-Rodríguez, R., **Pérez-Yanes, S.**, Montelongo, R., Lorenzo-Salazar, J. M., Estévez-Herrera, J., García-Luis, J., Íñigo-Campos, A., Rubio-Rodríguez, L. A., Muñoz-Barrera, A., Trujillo-González, R., Dorta-Guerra, R., Casado, C., Pernas, M., Blanco, J., Flores, C., & Valenzuela-Fernández, A. (2022). Transactive Response DNA-Binding Protein (TARDBP/TDP-43) Regulates Cell Permissivity to HIV-1 Infection by Acting on HDAC6. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11):6180. <https://doi.org/10.3390/ijms23116180>
9. **Pérez-Yanes, S.**, Pernas, M., Marfil, S., Cabrera-Rodríguez, R., Ortiz, R., Urrea, V., Rovirosa, C., Estévez-Herrera, J., Olivares, I., Casado, C., Lopez-Galindez, C., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2022). The Characteristics of the HIV-1 Env Glycoprotein Are Linked With Viral Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 13:763039. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.763039>

## **Trabajos en elaboración:**

**Pérez-Yanes, S.**, Cabrera-Rodríguez, R., Machado, J. D., García-Luis, J., Trujillo-González, R., Madrid, R., Estévez-Herrera, J.\* & Valenzuela-Fernández, A.\* *“The interplay between the NS5 protein of Zika Virus and cellular HDAC6 determines NS5 stability and cell-distribution and IFN-I production”*.



## ÍNDICE





---

<b>RESUMEN.</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>7</b>
1.1. Virus emergentes y reemergentes. ....	7
1.2. Virus ARN cadena positiva. ....	11
1.3. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1). ....	17
1.3.1. Generalidades del virus VIH. ....	17
1.3.1.1. Origen y clasificación del VIH. ....	17
1.3.1.2. Situación actual de la infección por VIH-1 en el mundo. ....	19
1.3.1.3. Patogénesis y curso natural de la infección por VIH-1. ....	22
1.3.1.4. Reservorio viral: uno de los grandes obstáculos para erradicar el VIH. ....	26
1.3.1.5. Terapia antirretroviral. ....	29
1.3.2. Morfología y estructura del VIH-1. ....	32
1.3.3. Ciclo de vida del VIH-1. ....	36
1.3.3.1. Infección viral: mecanismo de fusión y entrada del VIH-1. ....	38
1.3.4. Pacientes con diferente progresión de la infección por VIH-1. ....	39
1.4. Virus ZIKA. ....	41
1.4.1. Generalidades del virus ZIKA. ....	41
1.4.1.1. Epidemiología y clasificación del virus ZIKA. ....	41
1.4.1.2. Situación actual de la infección por ZIKV en el mundo. ....	44
1.4.1.3. Patogénesis y curso natural de la infección por ZIKV. ....	49
1.4.2. Morfología y estructura del ZIKV. ....	57
1.4.2.1. La proteína no estructural 5 (NS5) del ZIKV. ....	61
1.4.2.1.1. Estructura y función. ....	61
1.4.2.1.2. Localización subcelular de NS5 de ZIKV en la infección. ....	63
1.4.3. Ciclo de vida del ZIKV. ....	65
1.4.4. Modulación de la respuesta inmunitaria por el virus ZIKA. ....	68
1.4.4.1. Respuesta inmunitaria innata antiviral: Interferón. ....	68
1.4.4.2. Modulación de la vía del Interferón por el virus ZIKA. ....	73
1.4.4.3. Función de la proteína NS5 en la modulación de la vía del IFN. ....	74

1.5.	Respuesta inmunitaria frente a virus ARN: factores de restricción. ....	77
1.6.	HDAC6, un factor antiviral. ....	83
1.7.	El citoesqueleto de microtúbulos y su relación con HDAC6. ....	91
1.8.	Papel del citoesqueleto de microtúbulos en la infección viral. ....	96
1.9.	Autofagia e infección viral. ....	99
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. ....</b>	<b>111</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS. ....</b>	<b>115</b>
3.1.	Reactivos. ....	115
3.2.	Anticuerpos. ....	115
3.3.	Cultivo de las líneas celulares y células primarias. ....	117
3.3.1.	Líneas celulares y células primarias. ....	117
3.3.2.	Cultivo celular. ....	119
3.3.3.	Obtención de células T CD4+ primarias a partir de muestras sanguíneas de donantes sanos. ....	121
3.3.4.	Transfección. ....	123
3.4.	Biología molecular. ....	125
3.4.1.	Constructos (plásmidos) codificantes para cuerpo y proteínas virales, proteínas celulares y ARN de interferencia. ....	125
3.4.2.	Producción de plásmidos. ....	129
3.5.	Ensayos de entrada e infección viral. ....	131
3.5.1.	Análisis filogenético del complejo de envoltura de VIH-1. ....	131
3.5.2.	Análisis del nivel de expresión del complejo de envoltura del virus VIH-1 en la superficie de la membrana celular mediante la técnica de citometría de flujo. ....	133
3.5.3.	Ensayo de fusión célula-célula mediado por la envoltura del VIH-1. ....	135
3.5.4.	Ensayo de transferencia viral célula-célula: estudio de la capacidad de unión del complejo Env a CD4. ....	136
3.5.5.	Análisis de la infectividad viral. ....	137
3.5.5.1.	Cuantificación de pseudovirus producidos. ....	137
3.5.5.2.	Ensayo de infectividad viral. ....	137
3.6.	<i>Western Blot</i> . ....	139

---

3.6.1. Lisis celular. ....	139
3.6.2. Técnica de <i>western blot</i> . ....	140
3.7. Empleo de inhibidores químicos. ....	143
3.7.1. Regulación de la actividad desacetilasa de HDAC6: Tubacina/A-485. ....	143
3.7.2. Inhibidores de diferentes vías de degradación. ....	144
3.7.3. Inhibición del importe nuclear: Ivermectina. ....	144
3.8. Estudios de coimmunoprecipitación. ....	145
3.9. Estudios de silenciamiento de HDAC6 por RNA interferente. ....	147
3.10. Fraccionamiento celular. ....	148
3.11. Ensayos para cuantificar la activación de la vía del IFN. ....	149
3.12. Inmunofluorescencia. ....	149
3.13. Estadística empleada en los diferentes estudios. ....	151
<b>4. RESULTADOS. ....</b>	<b>155</b>
4.1. Análisis filogenético de las secuencias de los complejos de envoltura viral. ....	155
4.2. Estudio de la relación entre la eficiencia de expresión de los complejos de envoltura y la infectividad viral. ....	159
4.3. Análisis de la capacidad de fusión de membranas célula-célula y transferencia viral de los complejos de envoltura de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico. ....	161
4.3.1. Evaluación de la capacidad de las envolturas a unirse a CD4 y promover la fusión de membranas. ....	161
4.3.2. Evaluación de la capacidad de los complejos de envoltura viral a transferir material viral célula-célula. ....	163
4.4. Caracterización de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico, en su capacidad infectiva durante las primeras etapas del ciclo viral. ....	165
4.5. Análisis de las secuencias de aminoácidos de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes con distinto perfil clínico. ....	167
4.6. Correlación entre las características virales de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico. ....	172
4.7. Estudio de la localización celular de NS5: distribución en estructuras nucleares particulares. ....	175

4.8. Estudio de la proteína NS5 del ZIKV como reorganizador y estabilizador del citoesqueleto de tubulina. ....	180
4.9. Estudio de la asociación de HDAC6 con la proteína NS5 del ZIKV. ....	188
4.10. Estudio del efecto de HDAC6 sobre la estabilidad de la proteína viral NS5. ....	189
4.11. Estudio de la vía degradativa por la que HDAC6 induce la degradación de NS5 del ZIKV. ....	192
4.12. Estudio de la implicación de la actividad desacetilasa de HDAC6 en la degradación autofágica de NS5. ....	199
4.13. Estudio de la implicación funcional de la actividad desacetilasa de HDAC6 en la distribución nuclear de NS5. ....	201
4.14. Estudio del efecto de la proteína viral NS5 en la vía del IFN. ....	202
4.15. Estudio del efecto protector de la proteína viral NS2B3 frente a la degradación autofágica de NS5 mediada por HDAC6. ....	205
<b>5. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>211</b>
5.1. La funcionalidad del complejo viral Env es clave en determinar la infectividad del VIH-1. ....	211
5.2. Efecto bidireccional funcional entre la proteína NS5 del ZIKV y la enzima celular HDAC6. ....	218
5.3. HDAC6 como factor de restricción viral sobre virus de ARN: VIH-1 y ZIKV. ....	231
<b>6. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>239</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>243</b>

## ABREVIATURAS.

3-MA	3-Metiladenina
3p-hpRNA	" <i>triphosphate hairpin RNA</i> "
$\gamma$ TuRC	" <i><math>\gamma</math>Tubulin Ring Complex</i> "; estructura tipo anillo de $\gamma$ Tubulina
+ssRNA	" <i>+ single strand RNA</i> "; ARN monocatenario positivo
+ssRNA-RT	" <i>+ single strand RNA, retrotranscribed</i> "; ARN monocatenario positivo retrotranscrito
-ssRNA	" <i>- single strand RNA</i> ", ARN monocatenario negativo
A-485	N-[(4-fluorophenyl)methyl]-2-[(3R)-6-(methylcarbamoylamino)-2',4'-dioxospiro[1,2-dihydroindene-3,5'-1,3-oxazolidine]-3'-yl]-N-[(2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl]acetamide
aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIDP	" <i>Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy</i> "; polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda
Akt/PKB	" <i>Protein Kinase B</i> "; proteína quinasa B
AMAN	" <i>Acute Motor Axonal Neuropathy</i> "; neuropatía axonal motora aguda
AMSAN	" <i>Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy</i> "; neuropatía axonal sensorial y motora aguda
APOBEC3G (A3G)	" <i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic subunit 3G</i> "
APS	" <i>Ammonium Persulfate</i> "; Persulfato amónico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ART	" <i>Antiretroviral Treatment</i> "; terapia antirretroviral
ATAT1	" <i><math>\alpha</math>-Tubulin Acetyltransferase 1</i> "
ATG	" <i>Autophagy-related gene</i> "; genes/proteínas relacionadas con la autofagia
BUZ	" <i>Binder of Ubiquitin Zinc finger</i> "; dominio de unión a ubiquitina con dedo de zinc
C	Cápside ZIKV
CA	Cápside VIH-1
CARD	" <i>Caspase Activation and Recruitment Domains</i> "; dominios de activación y reclutamiento de caspasa
CCR5	" <i>C-C chemokine receptor type 5</i> "
cGAS	" <i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> "; GMP-AMP sintetasa cíclica
CHIKV	" <i>Chikungunya virus</i> "; virus Chikungunya
CoIP	Coinmunoprecipitación
COVID-19	" <i>Coronavirus Disease</i> "
CPN	Células Progenitoras Neurales
CV	Carga Viral
CXCL10	" <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i> "

## Abreviaturas

CXCR4	<i>"C-X-C chemokine receptor type 4"</i>
D	Ácido aspártico
DD	Dominio Desacetilasa
DENV	<i>"Dengue virus"</i> ; virus del Dengue
dm	Doble mutante
DMEM	<i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium"</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
dsDNA	<i>"double strand DNA"</i> ; ADN bicatenario
dsRNA	<i>"double strand RNA"</i> ; ARN bicatenario
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Envoltura del ZIKV
E-64d	Aloxistatina
EC	<i>"Elit Controller"</i> ; controlador de élite
EDTA	<i>"Ethylenediaminetetraacetic acid"</i> ; ácido etilendiaminotetraacético
EJ	virus de la Encefalitis Japonesa
EN	Enfermedades Neurodegenerativas
Env	Complejo de Envoltura del VIH-1
ESCRT	<i>"Endosomal sorting complexes required for transport"</i> ; complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
FBS	<i>"Fetal bovine serum"</i> ; suero fetal bovino
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i> ; administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FIP200	<i>"FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa"</i>
FVR	virus de la fiebre del Valle de Rift
GALT	<i>"Gut-Associated Lymphoid Tissue"</i> ; tejido linfoide asociado al intestino
GDP	<i>"Guanosine Diphosphate"</i> ; guanosín difosfato
GFP	<i>"Green Fluorescent Protein"</i> ; proteína verde fluorescente
GHSS	<i>"Global Health Sector Strategies"</i> ; estrategias mundiales del sector de la salud
GMP	<i>"Guanosine Monophosphate"</i> ; guanosín monofosfato
gp	Glicoproteína
GTasa	Guanililtransferasa
GTP	<i>"Guanosine Triphosphate"</i> ; guanosín trifosfato
H	Histidina
HA	<i>"Human influenza hemagglutinin"</i> ; hemaglutinina del virus Influenza humano
HAART- TARGA	<i>"Highly Active Antiretroviral Therapy"</i> ; Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad
HAT	Histona acetiltransferasa
hBMEC	<i>"human Brain Microvascular Endothelial Cells"</i> ; células endoteliales microvasculares del cerebro humanas
HDAC	Histona Desacetilasa

HLA	<i>"Human Leukocyte Antigen"</i> ; antígenos leucocitarios humanos o complejo mayor de histocompatibilidad en humanos
Hsc70	<i>"Heat shock cognate 70"</i> ; proteína de shock térmico de 70kDa
HSP90	<i>"Heat shock protein 90"</i> ; proteína de shock térmico de 90kDa
HSV-1	<i>"Herpes Simplex Virus type 1"</i> ; virus del herpes simple tipo 1
ICP34.5	<i>"Infected Cell Protein 34.5"</i>
IFITM	<i>"Interferon-Inducible Transmembrane Proteins"</i> ; proteínas transmembranas inducidas por interferón
IFN	Interferón
IFNAR	<i>"Interferon-<math>\alpha/\beta</math> receptor"</i> ; receptor de interferón $\alpha/\beta$
IFNGR	<i>"Interferon-<math>\gamma</math> receptor"</i> ; receptor de interferón $\gamma$
Ig	Inmunoglobulina
IKK $\epsilon$	<i>"I-kappa-B Kinase épsilon"</i>
IN	Integrasa
IRF	<i>"Interferon Regulatory Factor"</i> ; factor regulador de interferón
ISG	<i>"IFN-Stimulated Genes"</i> ; genes estimulados por interferón
ISRE	<i>"Interferon-sensitive Response Element"</i> ; elementos de la respuesta estimulada por interferón
JAK	<i>"Janus Kinase"</i> ; quinasa Janus
JEV	<i>"Japanese Encephalitis Virus"</i> ; virus de la encefalitis japonesa
JUNV	<i>"Junin virus"</i> ; virus Junín
K	Lisina
LC3	<i>"Microtubule-associated protein light chain 3"</i>
Loop V	<i>"Loop"</i> /bucle Variable
Loop C	<i>"Loop"</i> /bucle Constante
LPG2	<i>"Laboratory of Genetics and Physiology 2"</i>
LTNP	<i>"Long Term Non-Progressors"</i> ; no progresores a largo tiempo
LTNP-EC	<i>"Long Term Non-Progressors Elite Controlers"</i> ; no progresores a largo tiempo, controladores de élite
LTNP-NC	<i>"Long Term Non-Progressors, viremic Non-Controlers"</i> ; no progresores a largo tiempo, virémicos no controladores
LTR	<i>"Long Terminal Repeat"</i> ; largas repeticiones terminales
M	Membrana
MA	Matriz
MAP	<i>"Microtubule Associated Proteins"</i> ; proteínas asociadas a los microtúbulos
MAVS	<i>"Mitochondrial Antiviral Signaling"</i> ; señalización antiviral mitocondrial
MCL	<i>"Maximum Composite Likelihood"</i> ; Máxima Verosimilitud Compuesta
MDA5	<i>"Melanoma Differentiation-Associated protein 5"</i> ; proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma
MERS-CoV	<i>"Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus"</i> ; síndrome respiratorio de Oriente Medio por Coronavirus
MFS	<i>"Miller-Fisher Syndrome"</i> ; síndrome de Miller Fisher
MG132	Z-Leu-Leu-Leu-al

## Abreviaturas

MHC	<i>"Major Histocompatibility Complex"</i> ; complejo mayor de histocompatibilidad en mamíferos
MPXV	<i>"Monkeypox virus"</i> ; virus de la viruela del simio
MRCA	<i>"Most Recent Common Ancestor"</i> ; ancestro común más reciente
MT	Microtúbulos
MTasa	Metiltransferasa
MTOC	<i>"Microtubule-Organizing Center"</i> ; centro de organización de microtúbulos
mTOR	<i>"mammalian Target of Rapamycin"</i> ; diana de rapamicina en células de mamífero
mTORC1	<i>"mammalian target of rapamycin complex 1"</i>
Mx	<i>"Myxovirus resistance"</i>
MYD88	<i>"Myeloid Differentiation primary response 88"</i> ; respuesta primaria 88 de diferenciación mieloide
N	Asparagina
NAD <sup>+</sup>	<i>"Nicotinamide Adenine Dinucleotide"</i> ; dinucleótido de nicotinamida y adenina
NB	<i>"Nuclear Bodies"</i> ; cuerpos nucleares
NC	Nucleocápside
Nef	<i>"Negative regulatory factor"</i> ; factor regulador negativo
NES	<i>"Nuclear Export Signal"</i> ; señal/secuencia de exporte nuclear
NF-κB	<i>"Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"</i> ; <i>factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas</i>
NK	<i>"Natural Killers"</i>
NLR	<i>"Nucleotide-binding oligomerization domain-containing-like receptors"</i>
NLS	<i>"Nuclear Localization Signal"</i> ; señal/secuencia de localización nuclear
NP40	<i>"Nonidet P40 Substitute"</i>
NS	<i>"Non-structural"</i> ; no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA; UNAIDS	<i>"United Nations Programme on HIV/AIDS"</i> ; Organización de las Naciones Unidas para el estudio del VIH/SIDA
P	Progresores
p62/SQSTM1	<i>"Sequestosome 1"</i>
PAMP	<i>"Pathogen-associated Molecular Patterns"</i> ; patrones moleculares asociados a patógenos
PAZ	<i>"Polyubiquitin-Associated Zinc finger"</i> ; estructura tipo dedo de zinc asociado a poliubiquitinas
PBMC	<i>"Peripheral Blood Mononuclear Cells"</i> ; células mononucleares de sangre periférica
PBS	<i>"Phosphate Buffered Saline"</i> ; solución salina tamponada con fosfato
PC	Perímetro Cefálico



PE	<i>"Phycoerythrin"</i> ; ficoeritrina
PepsA	Pepstatina A
PFA	Paraformaldehido
PML	<i>"Promyelocytic Leukaemia"</i> ; leucemia promielocítica
PMSF	<i>"Phenylmethylsulfonyl Fluoride"</i> ; fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNG	<i>"Potential N-linked glycosylation sites"</i> ; sitios potenciales de N- glicosilación
PR	Proteasa
PRR	<i>"Pattern-Recognition Receptor"</i> ; receptores de reconocimiento de patrones
PrEP	Profilaxis Preexposición
PrM	Precursor de membrana
PVDF	<i>"Polyvinylidene Difluoride"</i> ; Fluoruro de polivinilideno
R	Arginina
R5	CCR5 trópicos
RdRp	<i>"RNA dependent RNA polymerase"</i> ; ARN polimerasa dependiente de ARN
RE	Retículo Endoplasmático
Rev	Regulador de empalme de ARN
RIG-I	<i>"Retinoic acid-Inducible Gene 1"</i> ; gen I inducible por ácido retinoico
RLR	<i>"Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors"</i> ; receptores parecidos al gen I inducible por ácido retinoico
RP	<i>"Rapid Progressors"</i> ; progresores rápidos
RPMI	<i>"Roswell Park Memorial Institute medium"</i>
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	<i>"Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"</i>
S	Serina
SAM	S-adenosil metionina
SAMHD1	<i>"Steril Alpha Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1"</i>
SARS	<i>"Severe Acute Respiratory Syndrome"</i> ; síndrome respiratorio severo agudo
SARS-CoV	<i>"Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus"</i> ; Coronavirus del síndrome respiratorio severo agudo
SDS	<i>"Sodium Dodecyl Sulfate"</i> ; dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	<i>"Sodium DodecylSulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis"</i> ; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sfRNA	<i>"Subgenomic flavivirus RNA"</i> ; ARN subgenómicos de flavivirus
SGB	Síndrome Guillain-Barré
shARN	<i>"Short Hairping RNA"</i>
siRNA	<i>"Small Interfering RNA"</i> ; ARN interferente
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

## Abreviaturas

SIM	<i>"SUMO-Interacting Motifs"</i> ; motivos de interacción con SUMO
SIRT2	Sirtuina 2
SIV	<i>"Simian Immunodeficiency Virus"</i> ; virus de la Inmunodeficiencia del Simio
SNC	Sistema Nervioso Central
ssDNA	<i>"Single Strand DNA"</i> ; ADN monocatenario
STAT	<i>"Signal Transducer and Activator of Transcription"</i> ; Transductor de señal y activador de transcripción
STING	<i>"Stimulator on Interferon Genes"</i> ; genes estimulados por interferón
Tat	Proteína Transactivadora
TBK1	<i>"TANK-Binding Kinase 1"</i> ; quinasa de unión a TANK1
TBS	<i>"Tris-Buffered Saline"</i> ; solución salina tamponada con Tris
TEMED	Tetrametilenaamina
TICD50	<i>"Median Tissue Culture Infectious Dose"</i> ; dosis media infecciosa del cultivo de tejidos
TLR	<i>"Toll-Like Receptors"</i> ; receptores de tipo Toll
TRIF	<i>"TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon-<math>\beta</math>"</i> ; dominio TIR que contiene el adaptador inducible por interferón $\beta$
TRIM	<i>"Tripartite Motif"</i>
TUBA1A	<i>"Tubulin <math>\alpha</math> 1A"</i>
TUBB2B	<i>"Tubulin <math>\beta</math> 2B"</i>
TUBB3	<i>"Tubulin <math>\beta</math> 3B"</i>
TYK2	<i>"Tyrosine Kinase 2"</i> ; tirosina quinasa 2
Ub	Ubiquitina
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Ulk1	<i>"Unc-51-like autophagy activating Kinase 1"</i> ; quinasa 1 activadora de autofagia similar a unc-51
UPS	<i>"Ubiquitin-Proteasome System"</i> ; sistema ubiquitina-proteasoma
UTR	<i>"Untranslated Region"</i> ; región no traducida
Vif	<i>"Viral infectivity factor"</i> ; factor de infectividad viral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vLTNP	<i>"Viremic Long Term Non-Progressors"</i> ; virémicos no progresores a largo tiempo
Vpr	<i>"Viral protein R"</i> ; proteína viral R
Vpu	<i>"Viral protein U"</i> ; proteína viral U
Vpx	<i>"Viral protein X"</i> ; proteína viral X
WNV	<i>"West Nile virus"</i> ; virus West Nile
wt	<i>"wild type"</i>
X4	CXCR4 trópicos
Y	Tirosina
YFV	<i>"Yellow Fever Virus"</i> ; virus de la Fiebre Amarilla
ZAP	<i>"Zinc finger Antiviral Protein"</i>
ZIKV	<i>"Zika virus"</i> ; virus Zika

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Resumen y ejemplos de los diversos factores que influyen en la emergencia y re-emergencia de enfermedades infecciosas. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Fármacos contra el VIH-1 autorizados por la FDA. ....	30
<b>Tabla 3.</b> Resumen y ejemplos de los diversos factores de restricción sobre virus ARN. ....	83
<b>Tabla 4.</b> Reactivos utilizados en la preparación de soluciones. ....	115
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos. ....	116
<b>Tabla 6.</b> Soluciones para el cultivo celular. ....	120
<b>Tabla 7.</b> Soluciones y kits para la purificación de células T CD4+ primarias. ....	123
<b>Tabla 8.</b> Soluciones y kits necesarios en la producción de plásmidos. ....	131
<b>Tabla 9.</b> Buffers de lisis celular. ....	140
<b>Tabla 10.</b> Soluciones y kits para la técnica de <i>western blot</i> . ....	142
<b>Tabla 11.</b> Soluciones y kits para el ensayo de coinmunoprecipitación. ....	147
<b>Tabla 12.</b> Soluciones para microscopía de epifluorescencia. ....	151
<b>Tabla 13.</b> Características epidemiológicas y clínicas de las Env virales y características de los pacientes. ....	156
<b>Tabla 14.</b> Características moleculares de Env de VIH-1: longitud de la secuencia y sitios potenciales de glicosilación en N (PNG) en los bucles variables (Vn) de la subunidad gp120. ....	169



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Comparación entre las tasas de mutación viral de las diferentes clases de virus, ajustadas al tamaño del genoma. ....	15
<b>Figura 2.</b> Número de personas infectadas con VIH en cada país en el año 2021. ....	20
<b>Figura 3.</b> Cobertura estimada de la terapia antirretroviral entre las personas que tenían VIH en 2021 (%). ....	21
<b>Figura 4.</b> Curso natural de la infección por VIH-1. ....	24
<b>Figura 5.</b> Reservorios del VIH-1. ....	27
<b>Figura 6.</b> Estructura del virión maduro infeccioso y del genoma del virus VIH-1. ....	36
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida del VIH-1. ....	38
<b>Figura 8.</b> Mapa histórico de la emergencia del virus ZIKA (ZIKV). ....	44
<b>Figura 9.</b> Distribución de los casos reportados de Zika durante las semanas epidemiológicas de los años 2021 y 2022 en América. ....	45
<b>Figura 10.</b> Incidencia acumulativa de casos de ZIKA por 100.000 habitantes en América en 2022. ....	46
<b>Figura 11.</b> Áreas con riesgo de ZIKA. ....	47
<b>Figura 12.</b> Vías de transmisión del virus ZIKA. ....	50
<b>Figura 13.</b> Relación de ZIKV con microcefalia en mujeres embarazadas. ....	52
<b>Figura 14.</b> Transmisión vertical de ZIKV. ....	53
<b>Figura 15.</b> Tejidos y células susceptibles a la infección por ZIKV. ....	57

<b>Figura 16.</b> Estructura del virión maduro infeccioso, material genético y poliproteína del ZIKV. ....	61
<b>Figura 17.</b> Estructura de la proteína viral NS5 de ZIKV. ....	62
<b>Figura 18.</b> Ciclo viral de ZIKV. ....	67
<b>Figura 19.</b> Producción de Interferón (IFN) tras la infección por ZIKV. ....	70
<b>Figura 20.</b> Vía de señalización del Interferón (IFN) tras la infección por ZIKV. ....	72
<b>Figura 21.</b> Modulación de la vía del IFN por ZIKV. ....	74
<b>Figura 22.</b> Estructura de la proteína HDAC6. ....	85
<b>Figura 23.</b> Estructura, polimerización y dinámica de los microtúbulos. ....	93
<b>Figura 24.</b> Vías de autofagia y agresoma-autofagia. ....	104
<b>Figura 25.</b> Esquema de separación de las diferentes células sanguíneas mediante gradiente de densidad. ....	121
<b>Figura 26.</b> Esquema del modelo experimental utilizado para el análisis de la expresión de Env, la fusión célula-célula mediada por Env, la transferencia e infectividad viral. ...	134
<b>Figura 27.</b> Esquema del ensayo de infectividad. ....	138
<b>Figura 28.</b> Análisis filogenético de las secuencias de las Env que se relaciona con el ancestro común más reciente (MRCA). ....	158
<b>Figura 29.</b> Análisis de la expresión de las diferentes Env de pacientes LTNP-EC, vLTNP y P. ....	160
<b>Figura 30.</b> Análisis de las características fenotípicas de fusión de membranas de las Env de VIH-1 aisladas de individuos LTNP-EC, vLTNP y P. ....	162

---

<b>Figura 31.</b> Análisis de la transferencia viral de célula a célula mediada por el complejo Env del VIH-1. ....	164
<b>Figura 32.</b> Análisis de la infectividad viral de las Env VIH-1. ....	166
<b>Figura 33.</b> Análisis de la longitud de los bucles de la subunidad gp120 del complejo Env de virus aislados de los diferentes grupos de pacientes. ....	171
<b>Figura 34.</b> Correlación de la expresión, fusión, transferencia, infectividad y distancia genética y agrupación de las características de Env. ....	173
<b>Figura 35.</b> Localización subcelular de NS5. ....	177
<b>Figura 36.</b> La proteína viral NS5 distribuye en cuerpos nucleares enriquecidos en la proteína SUMO. ....	179
<b>Figura 37.</b> Incremento del nivel de acetilación en la subunidad $\alpha$ -tubulina de los MT en células que expresan NS5. ....	185
<b>Figura 38.</b> NS5 estabiliza los niveles de expresión de la proteína p62. ....	187
<b>Figura 39.</b> HDAC6 promueve la degradación de NS5. ....	190
<b>Figura 40.</b> La degradación de NS5 se evita por acción de inhibidores de la proteólisis por la vía de la autofagia. ....	194
<b>Figura 41.</b> La degradación de NS5 ocurre por la vía de la autofagia, de forma HDAC6 dependiente implicando a su dominio BUZ. ....	196
<b>Figura 42.</b> NS5 colocaliza con Ub-GFP en estructuras citosólicas tipo agresoma. ....	198
<b>Figura 43.</b> La actividad catalítica desacetilasa de HDAC6 es clave en la degradación autofágica de NS5 del ZIKV. ....	200
<b>Figura 44.</b> NS5 de ZIKV promueve la acetilación de RIG-I inhibiendo la respuesta del IFN. ....	204

**Figura 45.** NS2B3 y la lisina 330 de NS5 son claves en el escape de la degradación de NS5. ....207



**RESUMEN**



**Resumen.**

Los virus emergentes y reemergentes causan brotes epidémicos que representan crisis globales impactando en la salud de las personas y, por tanto, en el desarrollo económico de los países, constituyéndolos como un problema de salud pública mundial. El principal agente causante son los virus ARN como el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y el virus ZIKA (ZIKV), por lo que el estudio del proceso de infección y la patología asociada es fundamental para combatir y/o erradicar estos virus. En este contexto se ha descrito a los microtúbulos (MT) como una pieza fundamental en el ciclo viral de gran cantidad de virus, en concreto durante la etapa de entrada del virus VIH-1 y la etapa de replicación del ZIKV; en ambos casos interviniendo en procesos claves en la infección viral. Por otro lado, la histona desacetilasa 6 (HDAC6) interviene en el mecanismo de estabilización de MT, así como también actúa sobre la vía degradativa de autofagia, lo que convierte a esta proteína celular en un potencial factor de restricción viral. Por ello, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es el estudio y la descripción de la proteína celular HDAC6 como un posible factor de restricción viral sobre virus ARN+.

Anteriormente se ha identificado un grupo de pacientes capaces de controlar por sí solos la infección por VIH-1 (*“Long Term Non-Progressors”*, LTNP) en ausencia de tratamiento antirretroviral, por lo que su estudio podría ayudar en la búsqueda de nuevas estrategias para la erradicación del virus. Dicha capacidad se ha asociado tanto a la inmunología y genética del paciente como al virus en sí. En concreto nuestro laboratorio, en colaboración con otros grupos de investigación, había identificado previamente al complejo de envoltura (Env) como una estructura viral clave en el control de la infección viral de pacientes pertenecientes a un *“cluster”* fundador/transmisor. En esta parte de la tesis doctoral se ha propuesto una correlación entre la capacidad funcional de los complejos de envoltura viral de virus aislados de individuos infectados por VIH-1 y el perfil clínico del paciente, jugando un papel fundamental su capacidad o discapacidad de señalización en la célula diana a través del receptor celular CD4 para evitar o facilitar la actuación del factor de restricción viral HDAC6. Para ello se han llevado a cabo diferentes ensayos funcionales de la Env, donde se ha analizado la

capacidad de unión al receptor celular CD4, fusión, infección y transmisión de material viral de las Env de diferentes grupos de pacientes con distintos perfiles clínicos no pertenecientes a un “cluster”. Los resultados obtenidos mostraron que las Env procedentes de este grupo LTNP fueron deficientes en su capacidad de unión a CD4, fusión, transmisión e infección; en cambio por otro lado, las Env de los grupos progresores (pacientes con alta carga viral y necesidad de tratamiento para evitar el avance de la enfermedad) tuvieron una correcta funcionalidad. Por lo cual, la capacidad funcional de los complejos de envoltura viral de virus aislados de individuos VIH-1+ correlaciona con su perfil clínico, siendo las Env de los pacientes progresores capaces de unirse al receptor celular y señalar a través de CD4, estabilizando la red de MT y evitando la restricción del factor antiviral HDAC6; y por el contrario las Env de los pacientes LTNP tienen una menor capacidad de unión y señalización y como consecuencia una deficiente fusión, transmisión de material viral e infección.

En relación con el ZIKV, como se ha comentado al principio, otros grupos de investigación han descrito previamente una reorganización del citoesqueleto por parte del ZIKV con el fin de crear los sitios de replicación viral. En esta parte de la tesis doctoral se ha propuesto a la proteína viral no estructural NS5 como una proteína reguladora del citoesqueleto y del flujo autofágico, ambas funciones en las que interviene HDAC6, y por ello, también se ha propuesto a HDAC6 como un factor antiviral sobre ZIKV. Para ello se ha caracterizado la vía por la que NS5 promueve la estabilización de MT, su efecto sobre la vía autofágica y la respuesta inmunitaria innata a través de la vía del Interferón (IFN). De igual modo, también se ha estudiado la capacidad de HDAC6 de degradar la proteína viral NS5 y el mecanismo por el cuál lo lleva a cabo. Así como la importancia de la localización subcelular de NS5 en los procesos nombrados anteriormente. Los resultados de los diferentes experimentos llevados a cabo revelaron que NS5 era capaz de reorganizar el citoesqueleto de MT promoviendo su estabilización, reflejándose en un aumento de la acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina. Además, se produjo una “parada” del flujo autofágico al observarse una acumulación de la proteína celular p62 y a nivel de inmunofluorescencia la formación de estructuras tipo agresoma. Mediante la utilización de inhibidores químicos sobre células transfectadas con la proteína viral NS5, se describió un efecto de dicha proteína viral sobre HDAC6 como la causa de la

estabilización de MT y el defecto en la vía degradativa autofágica. A su vez, también se observó el efecto de HDAC6 sobre NS5 al promover su degradación vía autofagia. En concreto, al transfectar las células con mutantes de HDAC6, se describió la implicación de los dominios desacetilasas de la enzima celular, y con menor efecto el dominio de unión a ubiquitina (BUZ), en dicho proceso degradativo. Cabe destacar que se demostró que la localización subcelular de NS5 es clave en su estabilidad, la acumulación de NS5 a nivel nuclear mostró un efecto de protección sobre la proteína viral. Respecto a la degradación promovida por HDAC6 sobre NS5, dicho proceso afectó a la estructura nuclear característica de NS5 que se ha relacionado con su capacidad de evasión de la respuesta inmunitaria por la vía del IFN. En este sentido, aparte de demostrar que NS5 afectó a la acetilación de  $\alpha$ -tubulina, también se demostró su actuación sobre otro sustrato de HDAC6 como es RIG-I (*“Retinoic acid-Inducible Gene 1”*), promoviendo su acetilación y con ello inhibiendo la respuesta del IFN. Por lo que NS5 actúa sobre HDAC6, regulando el citoesqueleto de MT y el flujo autofágico, así como también la respuesta del IFN, pero a su vez, HDAC6 promueve la degradación vía autofágica de NS5, describiendo así una relación bidireccional entre la proteína viral NS5 y la proteína celular HDAC6.

Estos estudios ponen de manifiesto posibles nuevas dianas farmacológicas contra el VIH-1, que, aunque actualmente existe tratamiento, no tiene cura definitiva; y el ZIKV, evitando la enfermedad congénita y neurológica característica del virus. Los resultados de ambas partes de la tesis doctoral respaldan las hipótesis propuestas y muestran a HDAC6 como un factor de restricción sobre los virus ARN+, VIH-1 y ZIKV.



# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1. Introducción.

### 1.1. Virus emergentes y reemergentes.

Las enfermedades antiguamente denominadas como λοιμός (*loimos*), “plagas” o “pestilencias” y actualmente como enfermedades infecciosas emergentes, han generado momentos históricos clave en la humanidad desde hace siglos, produciendo millones de muertes y pérdidas socioeconómicas. Como por ejemplo la Peste Negra producida por la bacteria *Yersinia pestis* (Siglo XIV), la pandemia del virus Influenza de 1918 o la viruela (Siglo XV) cuya importación a Latinoamérica contribuyó al final de las civilizaciones Inca y Azteca (Taubenberger & Morens, 2006; Morens & Fauci, 2007; Kennedy et al., 2009; Glatter & Finkelman, 2021). O las epidemias más recientes como el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) generado por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o la COVID-19 (“*coronavirus disease*”), enfermedad respiratoria causada por el Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Severo Agudo (SARS-CoV-2) que tantas pérdidas humanas, socioeconómicas y culturales ha producido estos últimos años a nivel mundial (Morens & Fauci, 2020; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). Actualmente se encuentra el ejemplo del virus de la viruela del mono (Monkeypox virus (MPXV)), el cual se restringía en áreas de África occidental y central y en los últimos meses se han producido casos en Europa y América del Norte (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2023), e incluso en las Islas Canarias (Alcoba-Florez et al., 2022).

Estos casos epidemiológicos expuestos anteriormente se encuentran clasificados en el grupo de enfermedades recién emergentes dentro del término de enfermedades infecciosas emergentes, que a su vez también engloba las enfermedades reemergentes y deliberadamente emergentes (Morens et al., 2004). Las enfermedades infecciosas recién emergentes son aquellas en las que se identifica al ser humano como hospedador por primera vez, es decir, que no se había descrito anteriormente su infección en humanos. Por otro lado, las enfermedades infecciosas reemergentes son enfermedades que ya han sido descritas como infecciosas en humanos, pero aumenta su incidencia, tienen una nueva localización geográfica o poseen nuevas resistencias a su tratamiento

(Fauci & Morens, 2012). Por último, las infecciones deliberadamente emergentes, las cuales han sido desarrolladas por el ser humano, engloban tanto microorganismos no modificados (ántrax) como microorganismos modificados genéticamente con el fin de causar el mayor daño posible (Morens et al., 2004).

El salto de especies por parte del virus es un proceso complejo en el que existen cuatro circunstancias indispensables: la exposición del nuevo hospedador al virus, que el virus tenga la capacidad de infectar el nuevo hospedador, que el virus se transmita de forma exitosa en la nueva población y por último que el virus sea capaz de adaptarse al nuevo hospedador (Woolhouse et al., 2005; Parrish et al., 2008). A su vez, existen diversos factores que definen el éxito o fracaso del salto de especie y como consecuencia, de la emergencia del virus. Se podrían agrupar en función del agente causal en factores humanos, factores ambientales y ecológicos y factores virales.

El ser humano juega un papel muy importante en la emergencia de las enfermedades infecciosas a diferentes niveles. A lo largo de los años se ha producido un aumento demográfico a nivel mundial, incrementando el movimiento de personas de zonas rurales y aisladas hacia pueblos o ciudades donde la densidad poblacional es muy alta y es más difícil obtener unas correctas condiciones y medidas sanitarias (Louten, 2016). Por ejemplo, el almacenamiento de aguas en los núcleos con mayor densidad de población es un punto clave en este sentido, ya que, entre otras consecuencias, influye en la población de mosquitos, vectores de diversas enfermedades como la fiebre hemorrágica Dengue (DENV), el virus de la Fiebre Amarilla (YFV, "*Yellow Fever Virus*"), Chikungunya (CHIKV) o Zika (ZIKV) (Monath T. P, 1993; Morse, 1995; Morens & Fauci, 2020). Dicho aumento del número de mosquitos en las áreas de riesgo ha conllevado a definir el control de vectores como una estrategia de prevención de diversos agentes patógenos como los flavivirus.

Otro cambio que se ha producido en las últimas décadas es la globalización, que ha proporcionado grandes ventajas a la sociedad tanto económicamente como a nivel sociocultural. Pero también tiene sus desventajas como, por ejemplo, que facilita la transmisión de enfermedades entre los diferentes países y continentes a través del

comercio y los viajes internacionales, como ocurrió con el brote de 2003 por el síndrome respiratorio severo agudo (SARS) producido por un nuevo coronavirus (SARS-CoV) o la COVID-19 originado también por un coronavirus (SARS-CoV-2) o el Virus West Nile (WNV) (Peiris et al., 2003; Louten, 2016; Morens & Fauci, 2020). Además, la globalización ha permitido el intercambio sociocultural entre poblaciones, modificando en cierta manera el comportamiento humano. Ciertas actividades sexuales o el uso de drogas intravenosas han facilitado la transmisión de virus como el VIH-1 o la Hepatitis. También, la introducción de ciertas especies como animal doméstico, la alimentación de carne de caza o el comercio de los animales silvestres, como pasó con el SARS-CoV-2 o el brote en 2015 por el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV, “*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*”) producido por otro coronavirus (Morens et al., 2004; Louten, 2016; Azhar et al., 2019; Morens et al., 2020; Morens & Fauci, 2020).

Por último, dentro del factor humano, encontramos la susceptibilidad a ser infectado por el virus, circunstancia que cobra importancia en personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, niños o ancianos. Un ejemplo es la coexistencia de *Mycobacterium tuberculosis* con el VIH-1 en personas en fase SIDA (Morse, 1995; Morens et al., 2004; Louten, 2016).

También existen factores ambientales y ecológicos que influyen en la emergencia, y muchos de ellos son producidos por el ser humano. El hombre ha modificado la ecología en su propio beneficio para el desarrollo agrícola y económico, modificando hábitats que anteriormente estaban intactos y facilitando la interacción con el virus u hospedadores intermediarios que anteriormente no tenían contacto con el hombre (Louten, 2016). Algunos ejemplos de ello son la enfermedad de Lyme, producida por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, el virus Junín (JUNV), el virus de la encefalitis japonesa (EJ) o el virus Nipah (Barbour & Fish, 1993; Jhonson, 1993; Morse, 1995; Lam & Chua, 2002). De igual modo, el ser humano ha contribuido al cambio climático, causando cambios en el clima como la temperatura, la humedad, las precipitaciones y la velocidad del viento entre otros, que promueven la aparición de enfermedades emergentes. Como podría suceder al provocar un aumento en la población de mosquitos o roedores, vectores del

virus de la fiebre del Valle de Rift (FVR) y el Hantavirus respectivamente (Monath T. P, 1993; Morse, 1995; Louten, 2016).

Adicionalmente, es indispensable tener presente los factores virales. Para producir una enfermedad emergente, el virus tiene que adaptarse al nuevo hospedador para ser capaz de infectar y transmitirse entre la población. Para ello puede llevar a cabo reordenamientos en su material genético, es decir, dos o más virus que infectan una célula hospedadora intercambian información genética, como sucede con el virus de la Influenza. También puede adquirir cambios genéticos mediante recombinación, es decir, cuando su polimerasa transfiere una secuencia de ácidos nucleicos de una cepa viral a otra, produciendo variabilidad genética, como el virus VIH-1 (Parrish et al., 2008). Por último, pueden adquirir mutaciones debido a fallos que introducen en el material genético las polimerasas. Las ARN polimerasas dependientes de ARN no poseen la capacidad de corrección que sí tienen las ADN polimerasas dependientes de ADN, lo que aumenta la posibilidad de introducir 1 error por  $10^9$  bases a 1 error por  $10^5$  bases; y como consecuencia los virus ARN son los virus más comunes en causar una enfermedad emergente en humanos (Morse, 1995; Parrish et al., 2008; Louten, 2016), como el SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS, Ébola, Dengue y Zika entre otros (Morens & Fauci, 2020). Al igual que ocurre con las retrotranscriptasas como la del VIH-1 que posee una ratio de mutación de  $2,5 \times 10^{-5}$  sitio/generación (Shriner et al., 2004; Neher & Leitner, 2010). Este hecho convierte a los virus ARN como los agentes causales más comunes en producir enfermedades emergentes y reemergentes.

**Tabla 1:** Resumen y ejemplos de los diversos factores que influyen en la emergencia y re-emergencia de enfermedades infecciosas.

Factor	Sub-factor	Virus
<b>Humano</b>	Cambio Demográfico/Urbanización	DENV, YFV, CHIKV, ZIKV
	Viajes Internacionales/Comercio	SARS-CoV, SARS-CoV-2, WNV
	Cambios en el Comportamiento Humano	VIH-1, Hepatitis, SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV
	Susceptibilidad a la infección	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>Ambiental y Ecológico</b>	Cambios ecológicos producidos por el ser humano	<i>Borrelia burgdorferi</i> , JUNV, EJ, virus Nipah
	Tiempo y Cambio Climático	FVR, Hantavirus
<b>Viral</b>	Reordenamiento	Influenza
	Recombinación	VIH-1
	Mutación	SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, Ébola, DNV, ZIKV

Existen tres factores que intervienen en la emergencia y reemergencia de las enfermedades infecciosas: el factor humano, la ecología y el ambiente, y el factor viral (columna izquierda). Dentro de estos factores encontramos diversos sub-factores (columna central) que a lo largo de los años han influido en la emergencia y reemergencia de diversos patógenos como podemos observar en los ejemplos de la columna derecha.

## 1.2. Virus ARN cadena positiva.

Como se ha comentado anteriormente, los virus ARN son el grupo más común en causar enfermedades emergentes, sobre todo enfermedades zoonóticas (enfermedades transmitidas de animales a seres humanos) (Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005; K. E. Jones et al., 2008; Carrasco-Hernandez et al., 2017).

Los virus pueden poseer genomas de ADN o ARN. En base a dicha característica se creó el sistema de clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971) en el que se agrupan a los virus según la relación del genoma vírico con su ARN mensajero (ARNm):

- Clase I: Genoma de ADN bicatenario (dsDNA, “double strand DNA”)
- Clase II: Genoma de ADN monocatenario (ssDNA, “single strand DNA”)
- Clase III: Genoma de ARN bicatenario (dsRNA, “double strand RNA”)
- Clase IV: Genoma de ARN monocatenario positivo (+ssRNA, “+ single strand RNA”)
- Clase V: Genoma de ARN monocatenario negativo (-ssRNA, “- single strand RNA”)

- Clase VI: Genoma de ARN monocatenario que se replica con un intermediario de ADN (+ssRNA-RT, “+ *single strand RNA, retrotranscribed*”)
- Clase VII: Genoma de ADN monocatenario que se replica con un intermediario de ARN

Además de la composición de su material genético, los virus ARN también poseen otras características que los diferencian de los virus ADN. A nivel estructural, los virus ARN tienen genomas más frágiles y pequeños en comparación con los virus ADN (~3-41 Kb), y codifican menor número de proteínas (Collier et al., 2011; Y. I. Wolf et al., 2018; Chaitanya, 2019). Así como a nivel de ciclo viral, en algunos virus ARN el propio genoma actúa como ARNm (+ssRNA), mientras que en otros virus ARN y en virus ADN dicho ARNm se sintetiza en base al material genético viral al entrar en la célula. Además, los virus ARN replican sus genomas con polimerasas ARN dependiente de ARN o retrotranscriptasas (RT) en el caso de los retrovirus, dichas polimerasas son sintetizadas o empaquetadas por el propio virus; mientras que la mayoría de los virus ADN solo necesitan generar el ARNm ya que utilizan las ADN polimerasas dependientes de ADN celulares. Asimismo, tras el inicio de la transcripción del ARNm, los virus ADN y algunos dsRNA utilizan enzimas celulares para introducir en su extremo 5' una estructura CAP, la cual, por otro lado, es introducida en la mayoría de los virus +ssRNA y algunos -ssRNA por enzimas propias del virus como la polimerasa (Rampersad & Tennant, 2018). La mayoría de los virus ARN también tienen una cola poly-A en el extremo 3' y regiones no traducionales (UTR, “*Untranslated Region*”) en ambos extremos terminales necesarias para la replicación y la estabilidad del ARNm (Payne, 2017; J.-H. Chen et al., 2018).

Esta tesis doctoral se centrará en dos virus ARN de cadena positiva, el virus Zika (clase IV) y el virus VIH-1 (clase VI).

Los virus +ssRNA (clase IV) son virus con envoltura, la cual rodea el cuerpo viral en cuyo interior se encuentra el genoma viral. Dicha envoltura produce la fusión con la membrana celular o la internalización a través de endosomas y posterior fusión con la membrana del endosoma, permitiendo la entrada viral y la exposición del genoma en el citoplasma (Rampersad & Tennant, 2018; Bohan & Maury, 2021). El genoma consiste en

una única cadena de ARN con polaridad positiva, que se caracteriza por tener el extremo 5' unido a un CAP metilado o unido covalentemente a una proteína viral y una cola poli-A en el extremo 3'. Esto le permite evitar el reconocimiento del genoma viral por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, "*Pattern-Recognition Receptors*") evadiendo la respuesta inmunitaria celular y la degradación por parte de las 3'-5' exonucleasas celulares y funcionar directamente como ARNm en la célula (Madigan et al., 2009; D. W. Leung & Amarasinghe, 2016; J.-H. Chen et al., 2018), del cual se traduce directamente a través de los ribosomas celulares una única poliproteína (en gran parte de los casos) que será cortada en sitios específicos por proteasas celulares o virales, generando las proteínas virales estructurales y no estructurales como la polimerasa (Collier et al., 2011). Esta polimerasa viral, permite la transcripción desde el extremo 3' del ARN viral, sintetizando una cadena de ARN complementaria que sirve como molde para la síntesis de nuevo genoma viral. En la síntesis de la nueva cadena, se genera un dsRNA intermediario que puede ser detectado por el sistema inmunitario, por lo que la replicación se produce en factorías de replicación asociadas a membranas para evitar dicho reconocimiento (Rampersad & Tennant, 2018). Todo ello conlleva a la generación de miles de copias del genoma viral en pocas horas tras la infección. Estas proteínas estructurales junto con algunas no estructurales son incorporadas en el ensamblaje del virión, que una vez formado se liberará de la célula mediante "*budding*" (Collier et al., 2011).

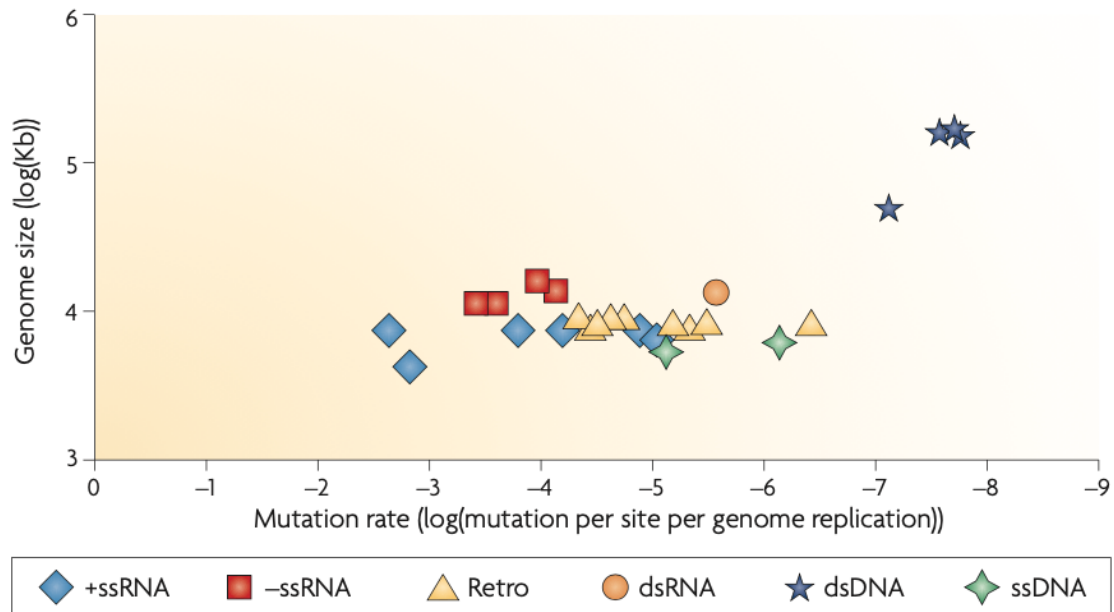
Por otro lado, los retrovirus (clase VI) son viriones con envoltura que contienen el genoma viral, el cual consiste en dos cadenas idénticas de ARN monocatenario con polaridad positiva. También contiene varias enzimas como la retrotranscriptasa (RT) y un ARN de transferencia específico. El retrovirus infecta la célula al producirse un contacto de la envoltura viral con receptores celulares que provoca la fusión de las membranas celular y viral, liberando la nucleocápside al citoplasma celular. Donde tiene lugar la retrotranscripción o transcripción inversa, es decir el paso de +ssRNA a dsDNA lineal gracias a la actividad de la RT viral. La RT es imprescindible para llevar a cabo el ciclo viral, ya que, aunque el genoma del retrovirus posee la cadena con polaridad + y con sus extremos que contienen el CAP y la cola poli-A como los virus +ssRNA (clase IV), no se utiliza directamente como ARNm. La RT utiliza como cebador un ARN de

transferencia específico para cada virus codificado por la célula hospedadora de la que proviene el retrovirus. Este ARN de transferencia junto a la capacidad de la RT de sintetizar ADN a partir de ARN y ADN a partir de ADN, así como su actividad ribonucleasa H (actividad enzimática que degrada la hebra de ARN de un híbrido ADN-ARN), permiten la síntesis de dsDNA viral. El producto final de la RT tiene largas repeticiones terminales (LTR, “*Long Terminal Repeat*”) en ambos extremos. Estos LTR contienen promotores de la transcripción y participan junto con la integrasa viral en el proceso de integración del dsDNA viral en el genoma celular. Una vez los promotores de las LTR son activados, el ADN viral es transcrito por una ARN polimerasa de la célula hospedadora. Los transcritos son modificados con la adición de CAP y colas poli-A en sus extremos, y pueden empaquetarse como genoma viral o traducirse a proteínas. Dichos productos se ensamblarán formando los viriones en el citoplasma celular que serán posteriormente liberados de la célula (Madigan et al., 2009).

Los ciclos virales explicados anteriormente conllevan a tiempos de generación excepcionalmente cortos, que, junto con los altos ratios de evolución, hacen que los virus ARN tengan mayores probabilidades de infectar nuevas especies hospedadoras (Carrasco-Hernandez et al., 2017).

Los virus ARN tienen una gran capacidad de rápida evolución y adaptación al nuevo hospedador. Dicha evolución se debe a sus altas tasas de mutación, medida del número de cambios genéticos (mutaciones puntuales, inserciones o deleciones) que se acumulan en el tiempo, que les ayuda a superar la presión selectiva que ejerce el hospedador a través del sistema inmunitario y de factores de restricción (proteínas celulares que restringen el ciclo viral) o agentes externos como fármacos antivirales. Los virus poseen un rango de tasa de mutación muy amplio, siendo los virus ARN de cadena simple los virus más mutagénicos y los virus de ADN de doble cadena los de menor grado (S. Duffy et al., 2008; Sanjuán & Domingo-Calap, 2016; Carrasco-Hernandez et al., 2017) (Figura 1).





**Figura 1: Comparación entre las tasas de mutación viral de las diferentes clases de virus, ajustadas al tamaño del genoma.** Virus de ARN monocatenario (+ssRNA): fago de ARN Q $\beta$ , poliovirus y virus del mosaico del tabaco; (-ssRNA): virus de la estomatitis vesicular, virus de la Influenza A y virus del sarampión; para Retrovirus (Retro): virus de la necrosis del bazo, virus de la leucemia murina, virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) y virus de la leucemia bovina; para virus de doble cadena de ARN (dsRNA): bacteriófago  $\phi$ 6; para virus de doble cadena de ADN (dsDNA): bacteriófagos  $\lambda$ , T2 and T4, y virus del herpes simple tipo 1; y para virus de cadena simple de ADN (ssDNA): bacteriófagos M13 y  $\phi$ X174. La figura incluye múltiples estimaciones independientes de varios virus. Figura extraída de (S. Duffy et al., 2008).

Esto se debe principalmente a la falta de la capacidad de corrección de las ARN polimerasas dependientes de ARN y las RT que carecen de actividad exonucleasa, y que por otra parte sí poseen las ADN polimerasas (C. Castro et al., 2005; Carrasco-Hernandez et al., 2017). Pero estos errores en la replicación viral tienen un límite, lo que se denomina tasa de error viral, si se produce un aumento en la tasa de error, el virus no será capaz de realizar su ciclo viral de manera correcta llevándolo a la extinción (Lauring & Andino, 2010; Novella et al., 2014; Carrasco-Hernandez et al., 2017). Del mismo modo, existen otros factores que se asocian a la variabilidad de la tasa de mutación como el tamaño del genoma (cuanto más pequeño, mayor tasa de mutación), el tiempo de replicación (cuanto menor tiempo de replicación, es decir, cuanto más rápido es el proceso, mayor será la tasa de mutación). También se ha observado que la oxidación y la metilación de las bases también afecta, así como la desaminación de bases nitrogenadas desapareadas (S. Duffy et al., 2008).

Otros mecanismos que aportan un aumento en la variabilidad genómica y diversidad viral son los mecanismos de recombinación y reordenamiento. El proceso de recombinación es un proceso en el que se forman nuevas secuencias de ARN en un segmento genómico a partir de dos genomas diferentes. Por otro lado, el reordenamiento ocurre en virus con genomas segmentados, cuando al empaquetar el genoma dentro del virión introduce segmentos de diferentes virus que han infectado la misma célula (Simon-Loriere & Holmes, 2011; Carrasco-Hernandez et al., 2017).

Al igual que ocurre en la tasa de mutación, la tasa de recombinación también varía entre las diferentes clases de virus (Simon-Loriere & Holmes, 2011). Siendo los retrovirus los que producen recombinaciones con mayor frecuencia, sobre todo en el virus VIH-1, con una tasa de recombinación entre  $1,38 \times 10^{-4}$  y  $1,4 \times 10^{-5}$  por sitio y por generación (Shriner et al., 2004; Neher & Leitner, 2010; Simon-Loriere & Holmes, 2011; Pérez-Losada et al., 2015). También se produce con frecuencia dicho proceso en virus monocatenarios de cadena positiva (+ssRNA), aunque dentro de esta clase encontramos mayor variabilidad en la frecuencia. Es decir, aunque es común que se originen recombinaciones en este tipo de virus, también podemos encontrar familias como *Flaviviridae* en las que sucede en ocasiones puntuales o incluso como la familia *Barnaviridae* en las que no se originan (Taucher et al., 2010; Simon-Loriere & Holmes, 2011; Pérez-Losada et al., 2015). Mientras los virus ARN monocatenarios de cadena negativa (-ssRNA) tienen una menor frecuencia de recombinación en comparación con las clases virales anteriores (Chare et al., 2003; Simon-Loriere & Holmes, 2011).

Todos estos cambios a nivel genético pueden generar virus más patogénicos como observaron con el virus Ébola en el que la mutación de la glicoproteína (GP-A82V) incrementó la mortalidad al tener una mayor capacidad de infectar células de primates (incluidas las células dendríticas humanas) (Diehl et al., 2016); más transmisibles como el virus Influenza A que debido a su tasa de mutación, recombinación y reordenamiento genómico ha adquirido la capacidad a lo largo de los años de infectar diversos animales entre los que se incluyen aves y mamíferos, inclusive el ser humano (Joseph et al., 2017; Shao et al., 2017) o el CHIKV en el que la mutación en el gen de la envoltura (E1-A226V) favoreció la transmisión del virus al favorecer la infección en *Ae. Albopictus* (Tsetsarkin

et al., 2007); con menor capacidad de reconocimiento por parte del sistema inmunitario del hospedador como ocurre con la envoltura del SARS-CoV-2 (Harvey et al., 2021), etc. Además, como consecuencia a su alta capacidad de mutación, se están creando resistencias a ciertos fármacos, dificultando el tratamiento de ciertas enfermedades. Por ejemplo, se ha observado que con una sola mutación el virus VIH-1 adquiere un alto nivel de resistencia a inhibidores no nucleósidos de la RT (Lucas, 2005; Carrasco-Hernandez et al., 2017; H. Wang et al., 2022).

Por todo lo nombrado anteriormente, los virus ARN son una gran preocupación en la salud global y cada vez más grupos e instituciones invierten en el estudio de esta clase de virus y en la búsqueda de posibles medidas de tratamiento, cura o erradicación. Un campo importante en este sentido son los factores de restricción, proteínas celulares que restringen el ciclo viral, ayudando a controlar o limitar la infección de virus emergentes como el VIH-1 y ZIKV.

### **1.3. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1).**

#### **1.3.1. Generalidades del virus VIH.**

##### **1.3.1.1. Origen y clasificación del VIH.**

En 1981, se reconoció una nueva enfermedad, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Michael S. Gottlieb publicó cinco casos en tres hospitales diferentes de Los Ángeles, de hombres jóvenes homosexuales con neumonía por *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* (*Pneumocystis jirovecii*), una infección bastante poco usual (CDC, 1981a; Thomas & Limper, 2007). Además, también tenían o habían sufrido infección de citomegalovirus y candida unido a que sus niveles de linfocitos T eran muy bajos. Con todo ello, Gottlieb propuso una nueva enfermedad que debilitaba el sistema inmunitario predisponiendo a la persona a sufrir infecciones oportunistas (CDC, 1981a). Unas semanas más tarde, Alvin Friedman-Kien describió 26 casos de sarcoma Kaposi, un tipo de cáncer poco común, en hombres homosexuales de Nueva York y California (CDC, 1981b). Friedman relacionó estos casos con los anteriores descritos por Gottlieb. Pero

no fue hasta 1983, cuando se descubrió el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causante del SIDA (Hemelaar, 2012).

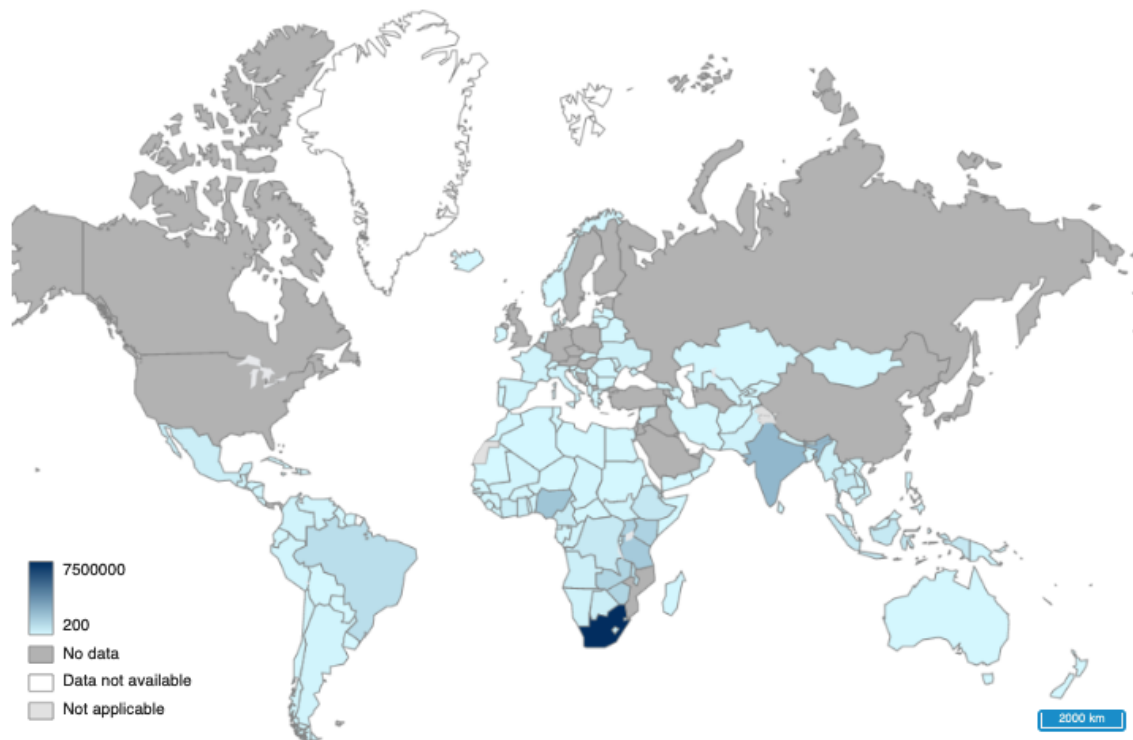
Sin embargo, el VIH se originó mucho antes. En base a la organización del genoma y la relación filogenética, se diferencian dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2. Ambos tipos son lentivirus zoonóticos cuyo ancestro es un Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV, “*Simian Immunodeficiency Virus*”). El VIH-1 proviene del SIV que infecta a chimpancés (*Pan troglodytes*) (SIVcpz), mientras que el VIH-2 proviene del SIV que infecta al mangabey gris (*Cercocebus atys*) (SIVsm). Posiblemente el salto de especie se debió a la exposición directa del ser humano con la sangre o secreciones del simio infectado como consecuencia de actividades como la caza, el comercio de estos animales o su ingesta (Hirsch et al., 1989; Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000; Sauter & Kirchhoff, 2019). Se cree que el VIH-1 se originó en África Central antes de 1940 y el VIH-2 antes de 1960 en África Occidental (Hirsch et al., 1989; Hahn et al., 2000; Sharp et al., 2001). Actualmente, mientras que el VIH-2 se encuentra restringido en la zona de África Occidental, el VIH-1 es la causa más común de SIDA a nivel mundial (Sharp & Hahn, 2011; Hemelaar, 2012).

El VIH-1 se subdivide en base a la similitud de sus secuencias en 4 subgrupos M, N, O y P, los cuales surgieron de eventos de saltos de especie independientes (Mourez et al., 2013). El grupo M es el primero que se descubrió y el causante de la pandemia global de VIH, al contrario de los otros subgrupos está ampliamente distribuido por todo el planeta causando la mayoría de los casos (Mourez et al., 2013; Peeters et al., 2014). Asimismo, el grupo M tiene 9 subtipos denominados por letras (A-D, F-H, J, K), sub-subtipos dentro de los subtipos A y F (A1-A4, F1 y F2) y más de 40 formas recombinantes circulantes (B. S. Taylor et al., 2008; Sharp & Hahn, 2011; Peeters et al., 2014). El grupo O solo representa menos del 1% de las infecciones globales en África Centro Occidental (Charneau et al., 1994; Gürtler et al., 1994; Sharp & Hahn, 2011). Por otro lado, el grupo N tiene menos prevalencia que el grupo O y los pocos casos identificados son de personas de Camerún (F. Simon et al., 1998; Gao et al., 1999; Sharp & Hahn, 2011). Por último, el grupo P se ha descubierto recientemente en 2009, solamente en 2 personas también de Camerún (Hahn et al., 2000; Plantier et al., 2009; Sharp & Hahn, 2011; Vallari et al., 2011).

### 1.3.1.2. Situación actual de la infección por VIH-1 en el mundo.

Desde el inicio de la epidemia se han infectado 84,2 millones de personas con VIH (Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA), n.d.). A lo largo de los años se ha mejorado el acceso al diagnóstico y al tratamiento de la infección por VIH, así como también a su prevención, mejorando la calidad de vida de las personas infectadas y aumentando su esperanza de vida. A pesar de todo ello, no existe una cura total, por lo que sigue siendo uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial ya que ha sido la causa de 40,1 millones de muertes desde el inicio de la epidemia. De hecho, en 2021 murieron 650.000 personas por causas relacionadas con el VIH (ONUSIDA, n.d.; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2022).

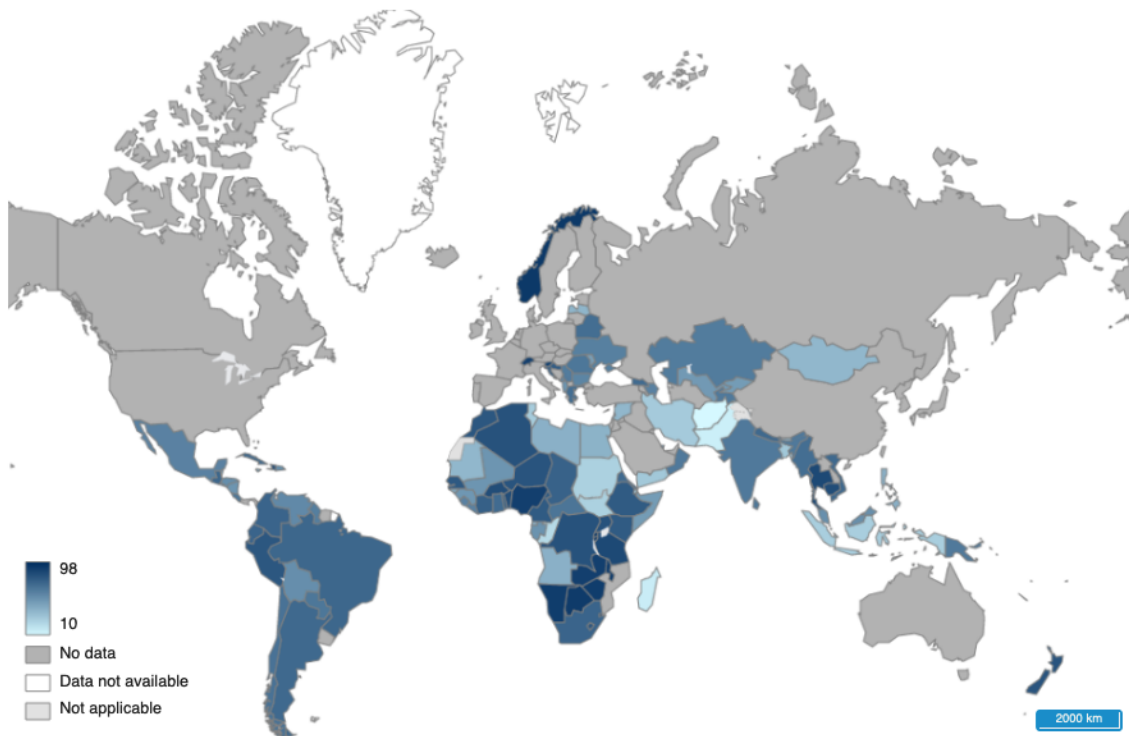
Aunque cada vez se tiene más conocimiento sobre la enfermedad y los métodos para prevenirla, se siguen produciendo miles de infecciones cada año. Durante el año 2021 se infectaron 1,5 millones de personas, llegando a tener a finales de 2021 aproximadamente 38,4 millones de personas infectadas con VIH a nivel mundial, siendo dos tercios de este grupo habitantes de África (ONUSIDA, n.d.; OMS, 2022; World Health Organization (WHO), n.d.-c) (**Figura 2**). Aunque cabe decir, que desde el pico de infecciones que se produjo en 1996, se ha reducido el número de nuevas infecciones en un 54% (ONUSIDA, n.d.).



**Figura 2: Número de personas infectadas con VIH en cada país en el año 2021.** En el mapa se muestra el número de personas infectadas con VIH en los diferentes países en 2021. África sigue siendo la zona más afectada, representando más de dos tercios de las personas infectadas en todo el mundo. La imagen pertenece a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, n.d.-b).

En cuanto al diagnóstico, también ha mejorado la situación con respecto al inicio de la epidemia. En 2021 el 85% de las personas infectadas con VIH sabían que vivían con el virus, lo que supone una ventaja para comenzar su tratamiento y mejorar su futura calidad de vida (ONUSIDA, n.d.).

Con respecto al tratamiento, como se ha comentado anteriormente, a lo largo de los años se ha mejorado su acceso, un punto clave que ha supuesto dificultades en algunos grupos no privilegiados en el pasado. En 2021 el 75% de las personas con VIH recibieron terapia antirretroviral (ART) (WHO, n.d.-a). Esto ha contribuido a la disminución del número de muertes relacionadas con el VIH, que desde el pico de 2004 se ha reducido en un 68% (ONUSIDA, n.d.) (Figura 3).



**Figura 3: Cobertura estimada de la terapia antirretroviral entre las personas que tenían VIH en 2021 (%).** En el mapa se muestra la cobertura de ART en los diferentes países en 2021. En 2021 el 75% de las personas con VIH recibieron terapia antirretroviral (ART). La imagen pertenece a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, n.d.-a).

Estos dos últimos años han estado marcados por la pandemia de COVID-19, que ha influido también en otras enfermedades y el VIH no es una excepción. Debido a la interrupción en el servicio sanitario durante la pandemia, en muchos países se redujeron drásticamente las pruebas de diagnóstico de VIH y las derivaciones para su tratamiento, planteando así un posible futuro escenario muy desfavorable en el que se podrían producir 7,7 millones de muertes relacionadas con el VIH en los próximos 10 años (OMS, 2022). Por ello, en la 75ª Asamblea Mundial de la Salud se definieron nuevas estrategias a nivel mundial del sector de la salud sobre el VIH, las hepatitis virales y las infecciones de transmisión sexual para el período 2022-2030 (GHSS) y se aprobó su implementación para los próximos 8 años. Con dichas estrategias quieren poner fin a las epidemias y promover la cobertura sanitaria universal, la atención primaria de la salud y la seguridad sanitaria para que todas las personas tengan acceso a servicios de salud de alta calidad (WHO, n.d.-c).

### 1.3.1.3. Patogénesis y curso natural de la infección por VIH-1.

El VIH-1 es un virus que se transmite principalmente por vía sexual, aunque también se puede transmitir a través del uso de drogas intravenosas, por transfusión sanguínea y por transmisión vertical (Moir et al., 2011; Shaw & Hunter, 2012; United Nations program on HIV/AIDS (UNAIDS), 2010; CDC, 2020).

Una vez transmitido el virus, el principal efecto del VIH-1 en el organismo es la destrucción de linfocitos T CD4+ “naïve” y de memoria, generando una disfunción del sistema inmunitario (Miedema et al., 1990; Douek et al., 2003; Stevenson, 2003; Mehandru et al., 2004; V. Simon et al., 2006).

La replicación del VIH-1 se produce de una manera dinámica durante el transcurso de la enfermedad generando tres fases: la fase aguda, la fase latente y la fase SIDA (Figura 4).

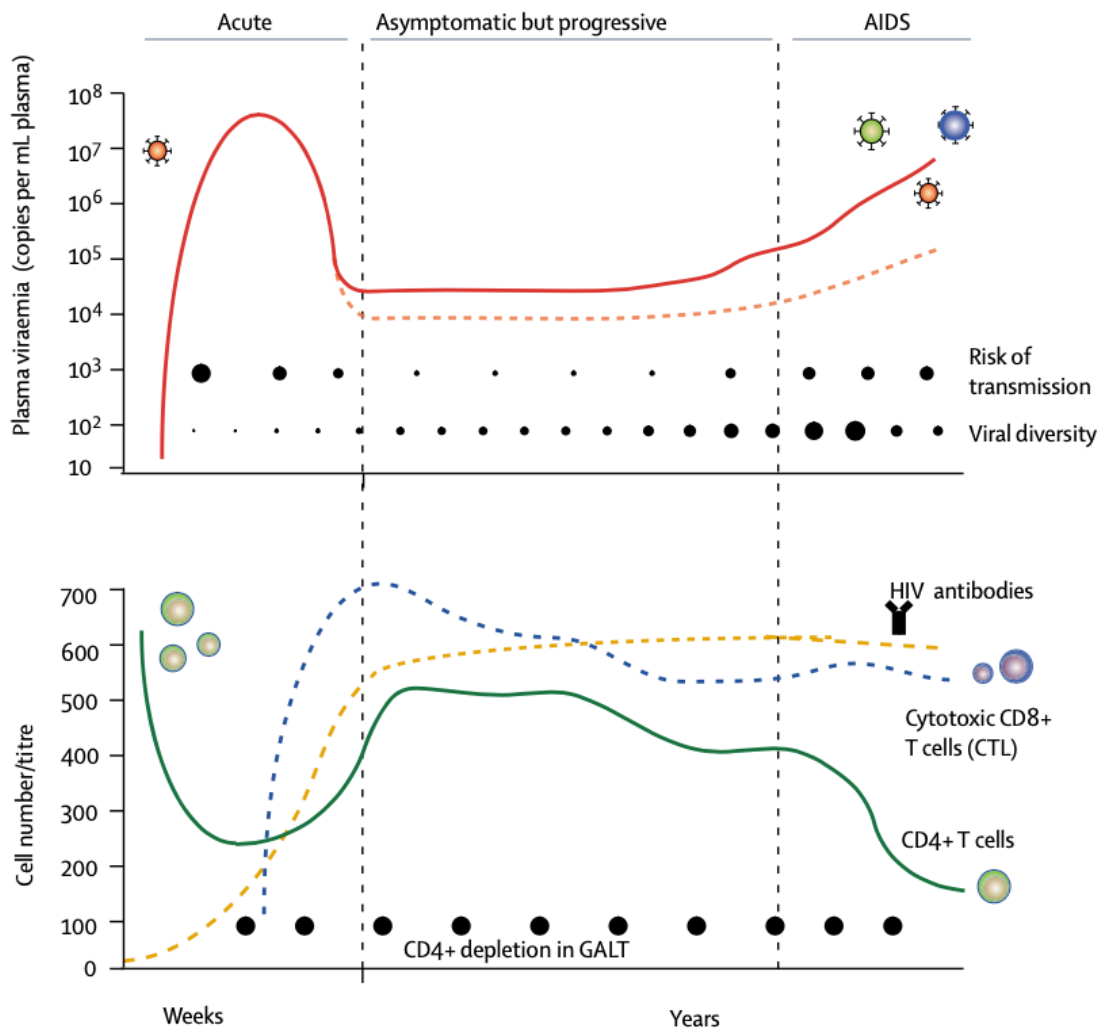
Durante la fase aguda, tras atravesar la mucosa, se produce una pequeña amplificación del virus en los órganos y tejidos linfoides (principalmente en el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT, “Gut-Associated Lymphoid Tissue”) y en los nódulos linfáticos), seguidamente tanto los viriones como los linfocitos T infectados pasan al torrente sanguíneo donde circulan y se transportan a otros órganos o tejidos, como el tracto gastrointestinal, el bazo o la médula ósea, infectando masivamente nuevas células (Brenchley et al., 2004; Mehandru et al., 2004; V. Simon et al., 2006; Moir et al., 2011). Esta infección masiva de las células inmunitarias y su alta tasa de replicación, producen un alto nivel de viremia en plasma, alcanzando niveles de 10 millones de copias/mL, llegando a su pico a las 3-4 semanas post infección en ausencia de terapia antirretroviral (ART, “Antiretroviral Treatment”) e identificando a esta etapa como la etapa con mayor riesgo de transmisión. Se ha asociado este pico de viremia a los síntomas similares a la gripe o a la fiebre glandular (Síndrome Agudo de VIH) que pueden mostrar las personas entre 2-4 semanas después de la infección. Tras alcanzar el pico de viremia, disminuyen los niveles de VIH-1 en sangre durante varios meses, alcanzando un estado estacionario o punto de ajuste de la carga viral (Leone, 2006; V.



Simon et al., 2006; J. B. Carter & Saunders, 2007; Moir et al., 2011). La reducción del pico de la viremia se ha atribuido a la respuesta específica de los linfocitos T CD8+ (V. Simon et al., 2006).

Por otro lado, durante la fase aguda también se produce una importante depleción de células T CD4+ en la sangre periférica que puede invertirse un poco en el estado estacionario de la viremia o fase latente (Moir et al., 2011).

La fase latente suele transcurrir sin generar ningún síntoma, pero la infección sigue progresando hasta alcanzar la fase SIDA sin ART. Esta última fase SIDA se caracteriza por un alto nivel de carga viral en plasma y un alto nivel de inmunosupresión (<200mm<sup>3</sup> de células T CD4+) que propicia la infección de los individuos con patógenos oportunistas (El-Atrouni et al., 2006; J. B. Carter & Saunders, 2007; Moir et al., 2011; Naif, 2013). También se relaciona esta fase SIDA al desarrollo de enfermedades cerebrales y/o cáncer (Grulich et al., 1999; McArthur et al., 2005; Biggar et al., 2007; Bilgrami & O'keefe, 2014). La progresión hacia la fase SIDA difiere en cada persona, pero normalmente progresa muy lentamente, tardando aproximadamente 8-10 años en alcanzarla (A. Muñoz et al., 1989; Hendriks et al., 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Naif, 2013).



**Figura 4: Curso natural de la infección por VIH-1.** En el panel superior se encuentra la dinámica de la viremia durante el transcurso de la enfermedad: durante la fase aguda aumenta hasta llegar a su pico máximo en las primeras semanas de la infección y a medida que transcurre la infección disminuye hasta alcanzar un punto de ajuste de la carga viral durante la fase latente o asintomática, que finalmente se contrapone en la última fase de la enfermedad (fase SIDA). Los puntos de referencia de la carga viral varían entre los individuos (líneas rojas continua y discontinua). La diversidad viral aumenta a lo largo de la enfermedad (segunda línea de círculos del panel superior), mientras que el riesgo de transmisión es mayor cuando la viremia alcanza su punto máximo en las primeras semanas (primera línea de círculos del panel superior). En el panel inferior se observa la dinámica del sistema inmunitario durante la infección: los linfocitos T CD4+ siguen un modelo inverso a la carga viral, durante la fase aguda disminuyen drásticamente debido a la alta carga viral, mientras que en la fase latente disminuyen un poco, pero se mantienen relativamente constantes y finalmente en la fase SIDA vuelven a disminuir a niveles de inmunosupresión (línea verde). Por otro lado, los linfocitos citotóxicos T CD8+ aumentan durante la fase aguda y comienzan a disminuir durante la fase latente (línea discontinua azul). Por último, los anticuerpos específicos contra el VIH-1 empiezan a generarse y a aumentar durante la fase aguda, después de la cual se mantienen constante en las siguientes fases (línea discontinua naranja). Figura extraída de (V. Simon et al., 2006).

Como se ha comentado, la infección por VIH-1 causa la pérdida progresiva de células T CD4+. El balance entre la proliferación de las células progenitoras y la muerte de la

progenie define la población de células T CD4+. Este balance se ve afectado tras la infección por HIV-1, que no sólo acelera la destrucción de la progenie de células T CD4+, sino que también afecta a la producción de dichas células (Gorochov et al., 1998; Moses et al., 1998; Hazenberg et al., 2000; McCune, 2001). Se cree que las causas de la depleción constante del reservorio de células T CD4+ son la activación del sistema inmunitario y los diferentes mecanismos de depleción celular (Ascher & Sheppard, 1988; Giorgi et al., 1999; Hazenberg et al., 2000; V. Simon et al., 2006; Appay & Sauce, 2008; Vidya Vijayan et al., 2017).

A medida que progresa la infección, disminuye la cantidad de células T “naïve” en reposo y aumenta la cantidad de células T efectoras y de memoria activadas (Hazenberg et al., 2000; McCune, 2001; Grossman et al., 2002). En relación con los mecanismos de depleción, existen evidencias de que la depleción de células T se produce tanto de forma directa como indirecta. Es decir, el VIH-1 produce la disminución de linfocitos T CD4+ mediante su infección y muerte directa de las células, pero también se ha observado muerte por apoptosis de células no infectadas (Meyaard et al., 1992; Finkel et al., 1995; Stevenson, 2003; J. B. Carter & Saunders, 2007; Vidya Vijayan et al., 2017). La vía principal por la que se produce la muerte de las células T CD4+ es la apoptosis, aunque también se puede producir por muerte celular autofágica programada (autofagia tardía) y por muerte celular parecido a la necrosis programada (Plymale et al., 1999; Varbanov et al., 2006; Nardacci et al., 2017; Cabrera-Rodríguez et al., 2021). En todos los casos, esta pérdida se debería compensar aumentando la producción de nuevas células que reemplazan las destruidas, pero se ha descrito la supresión de la hematopoyesis de los diferentes tipos celulares del sistema inmunitario y al timo como un órgano diana del VIH-1. Aparte de en el timo, también se han descrito alteraciones en los órganos linfoides periféricos y la médula ósea, generando grandes daños en las células T progenitoras (Moses et al., 1998; McCune, 2001).

Además, aparte de la depleción de linfocitos T CD4+, también se produce en paralelo la depleción de linfocitos T CD8+ durante la fase progresiva asintomática (Meyaard et al., 1992; Roederer et al., 1995; Hazenberg et al., 2000; Stevenson, 2003) (Figura 4).

A su vez, debido a que el VIH-1 utiliza el receptor CD4 para infectar la célula, así como los correceptores CCR5 y CXCR4, el virus es capaz de infectar otras células diferentes a los linfocitos T CD4+ como son las células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) (Koenig et al., 1986; Patterson & Knight, 1987; Spiegel et al., 1992; Stevenson, 2003). Al presentar el antígeno a las células T CD4+, estas células favorecen la transmisión viral entre células como consecuencia de su contacto cercano con las células diana del VIH-1 (McCune, 2001).

El uso de un correceptor u otro define el tropismo de las cepas de VIH-1. Al principio de la infección la mayoría de los virus son CCR5 trópicos (R5), pero durante el avance de la infección, en los últimos estadios, se produce un cambio de variante mayoritaria a virus CXCR4 trópicos (X4). Esta última variante se ha relacionado con el incremento de la patogenicidad y la progresión de la enfermedad (Connor et al., 1997; V. Simon et al., 2006; J. B. Carter & Saunders, 2007; Naif, 2013). Otra característica que le permite al virus diseminarse por el organismo y crear reservorios virales, es su capacidad de generar diversas variantes del virus infectivo inicial como consecuencia de los mecanismos explicados en el [apartado 1.2](#). Al principio del curso viral de la infección, la población viral es muy homogénea, pero a medida que avanza la infección se crean quasiespecies resistentes a los anticuerpos de neutralización generando reservorios de VIH-1 (V. Simon et al., 2006; J. B. Carter & Saunders, 2007; Moir et al., 2011) (**Figura 4**).

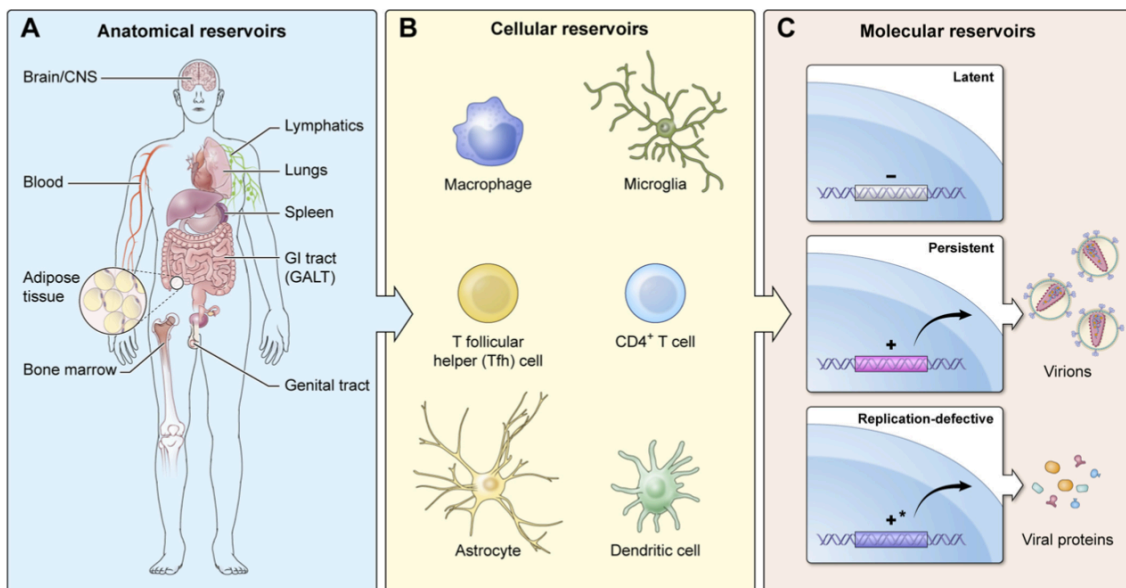
#### **1.3.1.4. Reservorio viral: uno de los grandes obstáculos para erradicar el VIH.**

Un gran impedimento para conseguir la cura del VIH-1 es la formación de reservorios del virus que permiten restablecer la viremia de dos a tres semanas aproximadamente tras la parada de ART (T.-W. Chun et al., 1997; Davey et al., 1999).

Se define reservorio viral como los tipos celulares y sitios anatómicos donde se acumulan y persisten formas virales competentes para la replicación y con una mayor estabilidad en las propiedades cinéticas en comparación a las formas de replicación activa del virus, a pesar de encontrarse suprimida la viremia por ART (Blankson et al.,

2002; Eisele & Siliciano, 2012). Aunque algunas definiciones incluyen provirus que intervienen en la patogénesis a pesar de no ser replicativamente competentes (Avettand-Fènoël et al., 2016).

Los reservorios se pueden clasificar en tres tipos: anatómico, celular y molecular (Figura 5).



**Figura 5: Reservorios del VIH-1.** Resumen de los tipos de reservorios de VIH-1, que se pueden diferenciar en anatómico (panel A), celular (panel B) y molecular (panel C). Localizando el VIH-1 en diferentes órganos y tejidos del cuerpo humano, infectando diferentes tipos celulares e integrándose en sus genomas produciendo reservorios latentes, persistentes o replicativamente defectivos a nivel molecular. Figura extraída de (Henderson et al., 2020).

A nivel molecular encontramos: los reservorios latentes, en los cuáles encontramos el material genético del virus integrado en el ADN celular y transcripcionalmente silenciado; los reservorios persistentes, en los que el provirus está integrado y transcripcionalmente activo siendo capaz de producir viriones; y finalmente, los reservorios defectivos en replicación, en los que encontramos el provirus integrado y transcripcionalmente activo pero no son capaces de replicar debido a mutaciones en el genoma viral, generando proteínas virales aisladas en vez de viriones (Henderson et al., 2020).

Por otro lado, a nivel celular, el mayor reservorio lo encontramos en los linfocitos T CD4+ de memoria, especialmente en los linfocitos T CD4+ de memoria central (Chomont et al., 2009; Buzon, Sun, et al., 2014; Kulpa & Chomont, 2015) y las células T “*helper*” foliculares (Moukambi et al., 2017; Aid et al., 2018). También se han propuesto como reservorio a células mieloides como macrófagos (Koenig et al., 1986; Zalar et al., 2010; Honeycutt et al., 2017; Kruize & Kootstra, 2019), monocitos (Delobel et al., 2005; Gibellini et al., 2008) y células dendríticas foliculares (Spiegel et al., 1992; Alexaki et al., 2008; Keele, Tazi, et al., 2008). Así como células del sistema nervioso central (SNC) como la microglía (Wallet et al., 2019) y los astrocitos (G.-H. Li et al., 2016; Valdebenito et al., 2021).

Por último, a nivel anatómico, podemos encontrar diferentes órganos y tejidos como reservorios de VIH-1. Células del SNC (D. Williams et al., 2014; Henderson et al., 2019; Wallet et al., 2019; Valdebenito et al., 2021), los tejidos linfáticos (Rothenberger et al., 2015) como GALT (T. Chun et al., 2008) o los nódulos linfáticos (Günthard et al., 2001; Perreau et al., 2013; Dave et al., 2018) pueden ser infectados por el VIH-1. También podemos encontrar células que actúan como reservorio en pulmones (Cribbs et al., 2015), hígado (Kruize & Kootstra, 2019), riñones (C. M. Wyatt & Klotman, 2007; Canaud et al., 2014), médula ósea (C. C. Carter et al., 2010; McNamara et al., 2013), tracto gastrointestinal (Zalar et al., 2010; Mzingwane & Tiemessen, 2017), sistema genitourinario (Mzingwane & Tiemessen, 2017; Cantero-Pérez et al., 2019), sangre (Yukl et al., 2013; Barton et al., 2016), piel (Barton et al., 2016) y tejido adiposo (Damouche et al., 2015; Couturier et al., 2015).

Se cree que los reservorios del VIH-1 se establecen rápidamente durante la fase aguda de la infección, impidiendo la curación a pesar del tratamiento (Vanhamel et al., 2019; Ta et al., 2022). Aun así, se ha observado que el inicio temprano de ART disminuye el tamaño de los reservorios (Strain et al., 2005; Hocqueloux et al., 2013; Josefsson et al., 2013; Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014).

### 1.3.1.5. Terapia antirretroviral.

El Tratamiento Antirretroviral (ART, “*Antiretroviral Treatment*”) (combinación de tres o más antirretrovirales), ha supuesto un gran avance en la epidemia del SIDA, suponiendo un cambio de un desenlace fatal a una enfermedad crónica, reduciendo la mortalidad y la morbilidad.

Gracias al ART, la replicación viral disminuye, así como la proliferación celular, permitiendo alcanzar niveles de viremia indetectables en plasma en pocas semanas y la mejora del sistema inmunitario, estabilizando de nuevo las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ (D. D. Ho et al., 1995; Wei et al., 1995; Lempicki et al., 2000; V. Simon et al., 2006; Moir et al., 2011).

Prácticamente todos los tratamientos antirretrovirales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, “*Food and Drug Administration*”) actúan sobre la RT o la proteasa viral. Podemos encontrar inhibidores análogos nucleósido y no nucleósido de la RT, inhibiendo así la replicación viral. Por otro lado, existen inhibidores de la proteasa viral que impide la maduración de los viriones, y como consecuencia se crean partículas virales no infectivas. También se han aprobado otros tratamientos con otras dianas terapéuticas como la fusión entre el virión y la célula, antagonistas del correceptor CCR5, inhibidores de la fijación y post fijación de la envoltura e inhibidores de la transferencia de cadenas de la integrasa como se resume en la **Tabla 2** (V. Simon et al., 2006; HIVinfo, n.d.; HIVinfo, 2022; Food and Drug Administration (FDA), 2020).

**Tabla 2: Fármacos contra el VIH-1 autorizados por la FDA.**

Clase de Medicamento	Nombre genérico	Año de autorización
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos</b>	Zidovudina	1987
	Zalcitabina	1992
	Estavudina	1994
	Lamivudina	1995
	Abacavir	1998
	Didanosina	2000
	Fumarato de disoproxilo de tenofovir	2001
	Emtricitabina	2003
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos</b>	Nevirapina	1996
	Delaviridina	1997
	Efavirenz	1998
	Etravirina	2008
	Rilpivirina	2011
	Doravirina	2018
<b>Inhibidores de la Proteasa</b>	Ritonavir	1996
	Indinavir	1996
	Nelfinavir	1997
	Amprenavir	1999
	Atazanavir	2003
	Fosamprenavir	2003
	Saquinavir	2004
	Tipranavir	2005
	Darunavir	2006
<b>Inhibidores de la Fusión Antagonistas del correceptor CCR5</b>	Enfuvirtida	2003
	Maraviroc	2007
<b>Inhibidor de la transferencia de cadenas de la integrasa</b>	Raltegravir	2007
	Dolutegravir	2020
	Cabotegravir	2021
<b>Inhibidores de la fijación de la envoltura</b>	Fostemsavir	2020
<b>Inhibidores de la postfijación de la envoltura</b>	Ibalizumab-uiyk	2018
<b>Potenciadores farmacocinéticos</b>	Cobicistat	2014

Antirretrovirales autorizados por la FDA cuya combinación se utiliza para tratar el VIH-1. En la columna izquierda encontramos los diferentes grupos en base al mecanismo de acción, en la central los nombres genéricos de los medicamentos que pertenecen a cada grupo y en la derecha el año en que se autorizó cada antirretroviral.

Las resistencias a los diferentes fármacos son un gran problema en la actualidad. Debido al alto grado de replicación del VIH-1, así como su alta capacidad de mutagénesis y de recombinación, el virus es capaz de generar una amplia diversidad viral capaz de evitar los anticuerpos neutralizantes y de resistir a los tratamientos. Se han descrito resistencias a todos los fármacos antirretrovirales, definiendo al VIH-1 como un problema de salud pública. Esto ha conllevado al concepto de combinar diferentes medicamentos para disminuir la replicación viral a un nivel donde se dificulta la creación de variantes resistentes al tratamiento. Este concepto que se le denominó Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) (HAART, “*Highly Active Antiretroviral Treatments*”), pero que actualmente conocemos como ART, ha supuesto una gran



disminución en la mortalidad y morbilidad en países industrializados (Hogg, 1998; Mocroft et al., 1998; V. Simon et al., 2006).

Un punto clave y con bastante controversia es el momento del inicio de ART. Por un lado, la diversidad viral y el efecto del VIH-1 en los órganos y tejidos necesarios para la regeneración de las células del sistema inmunitario conducen a la idea de comenzar lo antes posible. Pero, por otro lado, los tratamientos, aunque favorecen el control de la infección, generan toxicidad y cambios metabólicos que reducen la calidad de vida de los individuos (Calza, 2003; V. Simon et al., 2006; C. M. Wyatt & Klotman, 2006). Tanto los inhibidores de la RT no nucleósido como los inhibidores de la proteasa se han relacionado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (DAD Study Group et al., 2007; DAD Study Group et al., 2008; Moir et al., 2011). Así como también sus costes son un punto en contra al inicio temprano del tratamiento (V. Simon et al., 2006).

Otro tipo de tratamiento que se ha “viralizado” en los últimos años es la Profilaxis Preexposición (PrEP). Basado en una combinación de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos para prevenir la infección del VIH-1 que toman personas con riesgo de infección (relaciones sexuales, consumo de drogas inyectables...) (CDC, 2022a).

En cualquier caso, ninguna de las opciones terapéuticas disponibles conduce a la erradicación del virus y además el tratamiento es de por vida, ya que, si se interrumpe, se vuelven a alcanzar altos niveles de viremia. Esto conlleva a la búsqueda de otras estrategias como podrían ser las vacunas. Actualmente no existen vacunas, debido a la amplia variabilidad genética viral y la falta de conocimiento sobre las respuestas inmunitarias necesarias en la protección contra el VIH-1 (Ng’uni et al., 2020). Pero durante toda la epidemia de VIH-1 se han desarrollado diversos estudios con el fin de superar estos obstáculos. Muchos se han centrado en la capacidad de generar anticuerpos neutralizantes, pero debido a la alta diversidad y de glicosilación de la envoltura ha sido complicado (R. Wyatt & Sodroski, 1998; Pantophlet & Burton, 2006; V. Simon et al., 2006). Estudios más recientes se han centrado en la activación de la respuesta inmunitaria celular (Barouch et al., 2002; A. McMichael & Hanke, 2002; Shiver

et al., 2002; V. Simon et al., 2006). Aunque a pesar de los años no se ha aprobado ninguna vacuna, se piensa que la clave para conseguirla es que sea capaz de promover la activación de ambas respuestas del sistema inmunitario, la respuesta humoral y la respuesta celular (V. Simon et al., 2006).

### 1.3.2. Morfología y estructura del VIH-1.

Las partículas virales del VIH-1 están formadas por una envoltura lipídica que rodea una estructura proteica que posee una morfología cónica, dentro de la cuál encontramos el material genético compuesto por dos moléculas de ARN de cadena positiva de un tamaño menor a 10 Kb y proteínas virales claves para realizar su ciclo viral (Frankel & Young, 1998; Briggs, 2003; Z. Ambrose & Aiken, 2014; V. Simon et al., 2006).

A partir de dicho material genético, se generan 15 proteínas virales. Por un lado, tenemos las poliproteínas estructurales Gag y Env, que sufren una proteólisis produciendo diferentes proteínas individuales. Gag dará lugar a las proteínas de la matriz (MA), de la cápside (CA), de la nucleocápside (NC) y p6; mientras Env dará lugar a la proteína de superficie (gp120) y la proteína transmembrana (gp41). Por otro lado, encontramos tres proteínas enzimáticas que se generan a partir de la proteólisis de la poliproteína Pol, la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN). El VIH-1 también codifica dos proteínas reguladoras, Tat y Rev y cuatro proteínas accesorias con diversas funciones en el ciclo viral, Vif, Vpr, Nef y Vpu (Frankel & Young, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007) (**Figura 6**). Todas ellas actuando sinérgicamente para llevar a cabo el ciclo viral como se explica a continuación.

- Env (gp160: gp120/gp41): la proteólisis de la Env (gp160) genera las glicoproteínas de superficie gp120 y transmembrana gp41 que se unen no covalentemente formando trímeros. La gp120 es la responsable de la unión al receptor CD4 celular y al correceptor CCR5 o CXCR4 provocando un cambio conformacional que permite la inserción del péptido de fusión, que se encuentra en el extremo N-terminal de gp41, en la membrana celular promoviendo la

fusión de las membranas y la entrada viral (Helseth et al., 1991; Frankel & Young, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Engelman & Cherepanov, 2012).

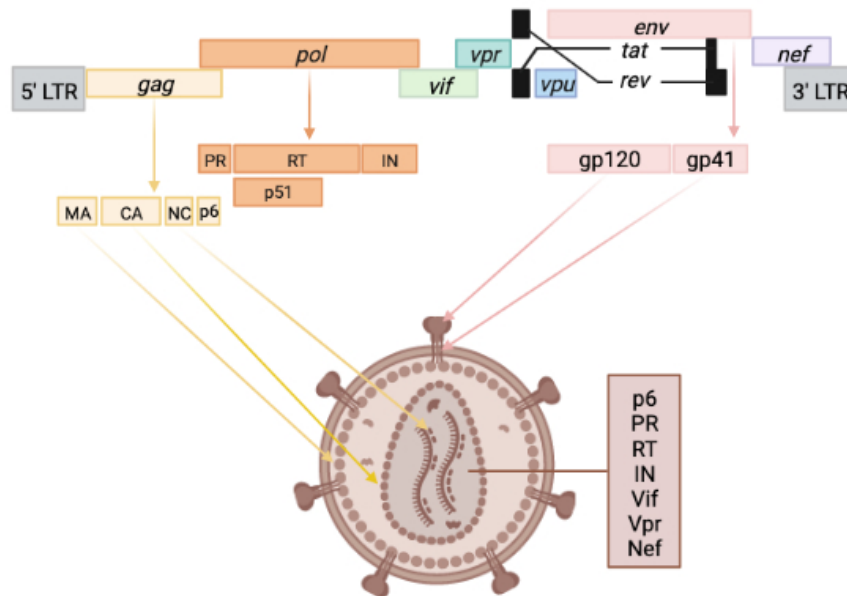
- Gag: tras la traducción del ARNm se generan dos poliproteínas precursoras, Gag (55 kDa) y Gag-Pol (160 kDa) que sufren una proteólisis generando diversas proteínas. El precursor Gag está formado por MA, CA, NC y p6, así como dos péptidos espaciadores SP1 y SP2. En el extremo N-terminal de Gag encontramos el dominio MA responsable de dirigir las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol hacia la membrana plasmática y de promover la incorporación de las glicoproteínas Env en las partículas virales. En los viriones maduros, en los cuales se ha producido la proteólisis, MA se encuentra en la superficie interna de la membrana del virión. El siguiente dominio que encontramos es CA, cuyo extremo C-terminal es clave en la dimerización de CA y en la oligomerización de Gag durante la fase de ensamblaje del ciclo viral. Además, también se ha observado la implicación de su extremo N-terminal en la fase de “*uncoating*” viral. En los viriones maduros forma el núcleo de las partículas virales. El dominio NC es el encargado de reclutar el genoma viral en los viriones mediante su unión, así como también facilita el proceso de ensamblaje viral. En los viriones maduros NC recubre el material genómico dentro del núcleo viral. Y, por último, encontramos el dominio p6 que está implicado en el proceso de salida viral, ya que recluta el complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT, “*Endosomal sorting complexes required for transport*”) que cataliza la fisión de la membrana. Además, se ha observado que se une a la proteína viral Vpr por su extremo C-terminal incorporándola a los viriones (Frankel & Young, 1998; Sundquist & Krausslich, 2012; Freed, 2015; Valera et al., 2015; Marrero-Hernández et al., 2019).
- Pol: a partir de la poliproteína precursora Gag-Pol, en concreto de la parte Pol, se generan tres proteínas con diferentes capacidades enzimáticas. En el extremo 5' se encuentra el dominio PR, una aspartil-proteasa encargada de procesar las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol en diferentes sitios, liberando las proteínas finales MA, CA, NC y p6 por parte de Gag y PR, RT e IN por parte de Pol.

Esto ocasiona el cambio de las partículas virales inmaduras a partículas virales maduras capaces de infectar. A continuación, se encuentra el dominio RT, una ADN polimerasa dependiente de ADN y ARN que transcribe la cadena simple de ARN con polaridad positiva en una doble cadena de ADN que se integrará en la célula. RT está formada por dos polipéptidos p66 y p51 (resultado del procesamiento proteolítico de p66), y se cree que forman un dímero estable entre ellas generando la estructura natural de la RT. Además de poseer la función polimerasa también posee la actividad ARNasa H que degrada la cadena ARN del híbrido ADN-ARN que se genera durante el proceso de retrotranscripción. Por último, encontramos en el extremo 3' el dominio IN, encargado de la integración del ADN viral en el ADN cromosómico celular, preferentemente en genes transcripcionalmente activos. Este proceso ocurre gracias a sus dos actividades catalíticas, el procesamiento del extremo 3' y la transferencia de la cadena de ADN viral (Loeb et al., 1989; Starnes & Cheng, 1989; Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012; Krishnan & Engelman, 2012).

- Tat: Tat es una proteína reguladora que está implicada en la transactivación de genes virales y celulares. Promueve la transcripción del promotor del VIH-1 (LTR) regulando la actividad de la ARN polimerasa II y favoreciendo la elongación de la cadena genómica viral (Frankel & Young, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Romani et al., 2010).
- Rev: Rev es una proteína reguladora implicada en la exportación del ARNm que no ha sufrido "*splicing*" o que ha sufrido un "*splicing*" parcial, desde el núcleo hacia el citoplasma. Como es el caso de los transcritos Env, Gag, Pol, Vif, Vpr y Vpu (Frankel & Young, 1998; R. J. Miller et al., 2000; J. B. Carter & Saunders, 2007).
- Vif: Vif es una proteína accesoria clave en la producción de partículas virales infecciosas. Evita la incorporación del factor de restricción APOBEC3G ("*Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic subunit 3G*") (A3G) en los viriones nacientes, bloqueando su actividad. A3G es una citidina desaminasa

celular que se incorpora en los viriones provocando daños en el material genético viral ya que desamina los residuos de citosina durante la retrotranscripción promoviendo así su degradación. También se cree que podría estar implicado en la síntesis de ADN y en el proceso de ensamblaje y/o maduración (Frankel & Young, 1998; Goff, 2003; J. B. Carter & Saunders, 2007; Strebel, 2013; Valera et al., 2015; Marrero-Hernández et al., 2019).

- Vpr: Vpr es una proteína accesoria imprescindible para una eficiente infección viral. Su función principal es el transporte del complejo de integración del citoplasma hacia el núcleo. También está implicada en la coactivación de la transcripción viral y celular, en la parada del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub> y en la apoptosis de las células T, contribuyendo así a la patogénesis de la infección (Frankel & Young, 1998; Kogan & Rappaport, 2011).
- Nef: Nef es una proteína accesoria que influye en la patogénesis y que se ha observado que juega un papel en la progresión hacia la fase SIDA. Promueve la rápida endocitosis del receptor CD4 expresado en la superficie celular y su degradación lisosomal. También afecta a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en mamíferos y denominado HLA en humanos, induciendo su endocitosis y degradación, y con ello impidiendo la lisis celular a través de los linfocitos T citotóxicos (Rhee & Marsh, 1994; Schwartz et al., 1996; Foti et al., 1997; Frankel & Young, 1998; Chaudhuri et al., 2007; J. B. Carter & Saunders, 2007; Valera et al., 2015; Marrero-Hernández et al., 2019).
- Vpu: al igual que Nef, Vpu afecta al tráfico intracelular del receptor CD4, pero en este caso induce la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático (RE), evitando su expresión en la membrana celular y favoreciendo el transporte de Env hacia la membrana celular para su incorporación en los viriones. También desregula la expresión en la superficie celular del MHC-I/HLA (Willey et al., 1992; Bour et al., 1995; Frankel & Young, 1998; Schubert et al., 1998).



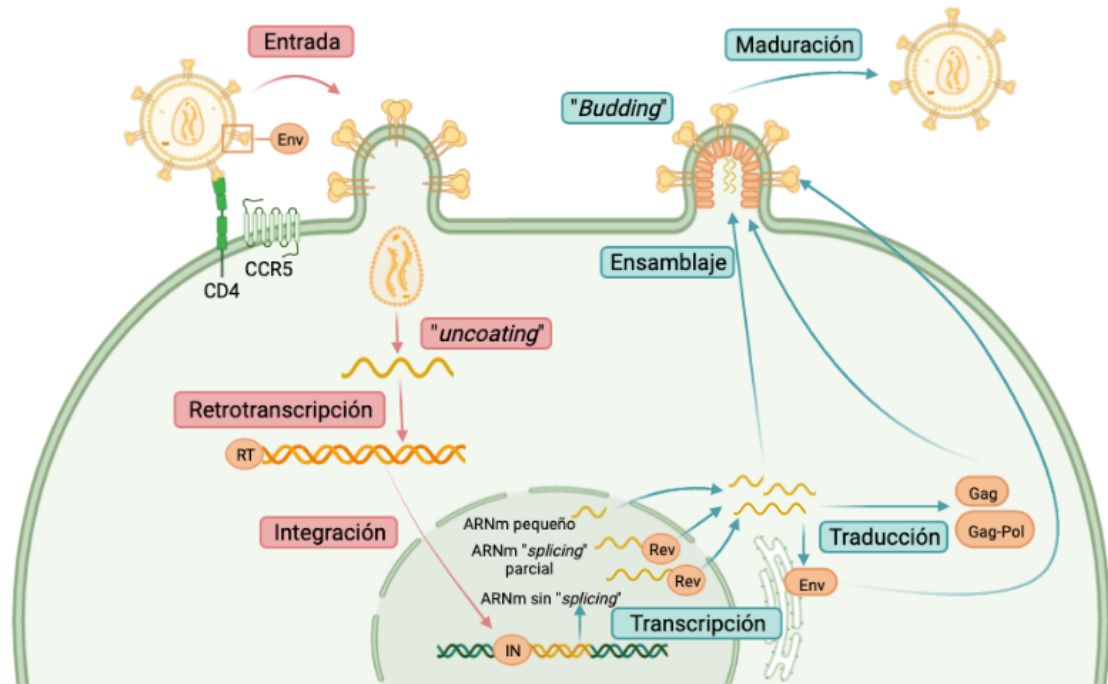
**Figura 6: Estructura del virión maduro infectivo y del genoma del virus VIH-1.** Los viriones maduros infectivos tienen una morfología cónica, dentro de la cuál encontramos el material genético compuesto por dos moléculas de ARN de cadena positiva y proteínas virales claves en su ciclo viral. Dicho material genético está formado por 9 genes que codificarán 15 proteínas, 6 estructurales (a partir de *gag*: MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6; a partir de *env*: gp120 y gp41), 3 proteínas enzimáticas a partir de *pol* (PR (proteasa), RT (retrotranscriptasa) que mediante un proceso proteolítico genera p51 e IN (integrasa)), 2 proteínas reguladoras Tat y Rev y 4 proteínas accesorias Vif, Vpr, Vpu y Nef. Figura creada en BioRender.com

### 1.3.3. Ciclo de vida del VIH-1.

El primer paso que ocurre en la infección de la célula por parte del VIH-1 es el contacto entre la proteína de la envoltura gp120 y el receptor celular CD4. Este contacto permite la exposición del sitio de unión de la envoltura hacia el correceptor celular (CCR5 o CXCR4) produciendo un cambio conformacional que genera la inserción del péptido de fusión del extremo N-terminal de la proteína transmembrana gp41 en la membrana celular y como consecuencia produciendo la fusión de la membrana viral con la membrana celular, liberando el “núcleo viral” en el citoplasma (Frankel & Young, 1998; R. Wyatt & Sodroski, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Engelman & Cherepanov, 2012; Wilen et al., 2012). Una vez en el interior de la célula, se produce el proceso de “*uncoating*”, es decir, se disgregan las proteínas de la cápside liberando el complejo viral de nucleoproteína, formado por el material genético ARN y las proteínas asociadas MA, IN, RT y Vpr, al citoplasma (Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012; Z. Ambrose & Aiken, 2014). El ARN es retrotranscrito por la proteína viral RT a una doble

cadena lineal de ADN (Starnes & Cheng, 1989; Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012), ya producido el cambio de ssRNA a dsDNA, el siguiente paso es la translocación al núcleo y la integración del dsDNA al genoma celular, preferentemente en genes transcripcionalmente activos. Este proceso lo lleva a cabo principalmente la proteína viral IN que procesa los dominios LTR de los extremos de las cadenas de ADN viral, corta las cadenas de ADN del cromosoma y une a sus extremos el ADN viral. También intervienen enzimas celulares que reparan los “*gaps*” de las cadenas simples (Frankel & Young, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Engelman & Cherepanov, 2012; Krishnan & Engelman, 2012). Este paso es el que indica el cambio de la fase temprana del ciclo viral hacia la fase tardía (Engelman & Cherepanov, 2012; Freed, 2015).

En dicha fase tardía, se transcribe el ADN viral desde su dominio 5' LTR. Además, la proteína viral Tat favorece la eficiencia en la elongación aumentando la ratio de transcripción (Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012). El ARNm creado, forma diferentes tipos en función de los “*splicing*” que ha sufrido. Los ARNm pequeños son exportados al citoplasma mediante exporte celular, en cambio, los ARNm que no han sufrido “*splicing*” o que han sufrido un “*splicing*” parcial son exportados con la ayuda de la proteína viral Rev. Una vez en el citoplasma se traducen o se empaquetan en los viriones (Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012). El ARNm se traduce en el citoplasma, excepto el ARNm de Env que se traduce en el RE, y las poliproteínas precursoras Gag, Gag-Pol y Env resultantes se transportan hacia la membrana plasmática donde se ensamblan, Gag y Gag-Pol en la parte interna de la membrana plasmática y Env en la superficie. Este ensamblaje de los precursores junto con el ARN y las proteínas virales Nef, Vif y Vpr generan un virión inmaduro que se libera de la célula mediante el proceso de “*budding*” en el que interviene el complejo ESCRT (Frankel & Young, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Engelman & Cherepanov, 2012; Sundquist & Krausslich, 2012; Freed, 2015). El último paso del ciclo viral es la maduración del virión. Este paso es llevado a cabo por la proteasa viral (PR), que procesa las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol generando las proteínas estructurales y enzimáticas virales, lo que supone un cambio estructural de los viriones y su paso de partículas virales no infectivas a partículas virales infectivas (Frankel & Young, 1998; Engelman & Cherepanov, 2012; Sundquist & Krausslich, 2012; Freed, 2015) (Figura 7).



**Figura 7: Ciclo de vida del VIH-1.** El ciclo viral del VIH-1 se compone de diferentes pasos que se pueden agrupar en dos etapas, la etapa temprana (cuadrados rosados) que consta de la entrada viral, “uncoating”, retrotranscripción del material genético viral y su integración en el genoma celular preferentemente en genes transcripcionalmente activos; y la etapa tardía en la que se encuentra la transcripción y la traducción del ARN viral, el ensamblaje de las proteínas virales en la membrana celular, la salida viral mediante “budding” y la maduración del virión tras el procesamiento de las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Figura creada en BioRender.com

### 1.3.3.1. Infección viral: mecanismo de fusión y entrada del VIH-1.

El virión al ensamblarse en la membrana plasmática celular adquiere proteínas de superficie celular como moléculas de adhesión que favorecen la unión de Env al receptor celular CD4 y correceptores CXCR5 y/o CCR4 (R. Wyatt & Sodroski, 1998; Wilen et al., 2012).

Como se ha explicado anteriormente, la Env (gp160) está formada por dos subunidades, gp120 y gp41. gp120 es la subunidad que se une al receptor celular CD4 y posteriormente al correceptor. La subunidad gp120 está formada por 5 dominios conservados (C1-C5) y 5 dominios variables que poseen una estructura de “loop” (V1-V5). Estos dominios variables se encuentran mayoritariamente en la superficie de la subunidad jugando un papel importante en la unión al correceptor, sobre todo el dominio V3 (Frankel & Young, 1998; R. Wyatt & Sodroski, 1998; J. B. Carter & Saunders,



2007; Engelman & Cherepanov, 2012; Wilen et al., 2012). El “*loop*” V3 es determinante en la correcta unión entre el receptor CD4 y Env (Trkola et al., 1996; Speck et al., 1997; Valenzuela et al., 1997) y en el tropismo viral (Cocchi et al., 1996; Isaka et al., 1999). Tras dicha interacción, se produce un cambio conformacional en la Env que conlleva a la inserción del péptido hidrofóbico de fusión del extremo N-terminal de la subunidad gp41 en la membrana celular y con ello la fusión de la membrana viral y la membrana citoplasmática celular, dando lugar así a la infección de la célula diana (Frankel & Young, 1998; R. Wyatt & Sodroski, 1998; J. B. Carter & Saunders, 2007; Engelman & Cherepanov, 2012; Wilen et al., 2012).

Para que se lleve a cabo de manera eficiente el proceso descrito y con ello la formación del poro de fusión y la subsecuente entrada viral, es necesario que se produzca la correcta señalización a través de la unión de Env con CD4 que conlleva a la reorganización del citoesqueleto celular (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; García-Expósito et al., 2013; Santos et al., 2014; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). Concretamente, promueve la acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina y la reorganización del citoesqueleto de actina induciendo la formación de un pseudópodo o “*capping*” en la membrana plasmática celular donde se agregan e interaccionan los receptores CD4 y correceptores CCR5/CXCR4, lo cual produce una eficiente formación del poro de fusión e infección viral (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Valenzuela-Fernández et al., 2008; Barrero-Villar et al., 2009; Y. Liu et al., 2009; García-Expósito et al., 2013; Santos et al., 2014; Casado et al., 2018; Cabrera-Rodríguez et al., 2019). De hecho, se ha descrito que para que una infección por VIH-1 sea eficiente, se deben formar pseudópodos en al menos el 20-30% de las células (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; García-Expósito et al., 2013; Casado et al., 2018).

#### **1.3.4. Pacientes con diferente progresión de la infección por VIH-1.**

Existen diferentes grupos de pacientes infectados por VIH-1 según su perfil clínico. En concreto, se han definido diferentes grupos de individuos infectados por VIH-1 en función del control de la infección viral y el tiempo de progresión a la fase SIDA, aunque

la nomenclatura de los cuales no se encuentra del todo estandarizada (Gurdasani et al., 2014). El grupo más común es el grupo de progresores o progresores crónicos (P), en el que encontramos los pacientes que en ausencia de ART no son capaces de controlar la carga viral y progresan a la fase SIDA tras 10 años aproximadamente desde la seroconversión (Pereyra et al., 2008; Casado et al., 2010; Deeks et al., 2015). También existe un grupo que en ausencia de ART, no es capaz de controlar la infección, pero progresan a la fase SIDA mucho más rápido, tras 3 años desde la seroconversión, denominados progresores rápidos o “*rapid progressors*” (RP) (Casado et al., 2010; Gurdasani et al., 2014; Cabrera-Rodríguez et al., 2019; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). Otro perfil clínico, menos común que los P, es el grupo “*Long-Term Non-Progressors*” (LTNP), estos pacientes tienen la capacidad de controlar la replicación viral en ausencia de ART y con ello impidiendo o retrasando lentamente el progreso hacia la fase SIDA (Deeks & Walker, 2007; Gurdasani et al., 2014; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). Este grupo se caracteriza por no haber sido nunca tratados con ART y controlar la infección con niveles de carga viral indetectables, de forma asintomática y con altos niveles de linfocitos CD4+ (Buchbinder et al., 1994; Grabar et al., 2009; Hunt, 2009; Okulicz et al., 2009; Gurdasani et al., 2014; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). Aunque nosotros los nombramos así LTNP, también se ha denominado a este grupo como progresores lentos o “*slow progressors*” y controladores VIH o “*HIV Controllers*”, entre otros nombres (Lambotte et al., 2005; Gurdasani et al., 2014). A su vez, dentro del grupo LTNP, podemos encontrar tres subgrupos en función de la carga viral, los LTNP virémicos no controladores (LTNP-NC), los LTNP virémicos (vLTNP) o controladores virémicos, y los LTNP controladores de élite (LTNP-EC) (Hunt, 2009; Okulicz et al., 2009). Los individuos del grupo LTNP-NC poseen una carga viral superior a 2000 copias/mL, por otro lado, los pertenecientes al grupo vLTNP tienen una carga viral entre 50-2000 copias/mL, y, por último, encontramos el grupo LTNP-EC con una carga viral inferior a 50 copias/mL (Pereyra et al., 2008; Grabar et al., 2009; Hunt, 2009; Okulicz et al., 2009; Casado et al., 2010; Casado et al., 2020). Observando así, en un extremo el fenotipo RP que sin ART progresan rápidamente a la fase SIDA, y en el otro extremo el fenotipo LTNP-EC que poseen un control natural de la infección en ausencia de ART, evitando la progresión clínica.

Esta capacidad de controlar la infección viral por VIH-1 de forma natural, es poco común y se ha convertido en un punto clave de investigación en el ámbito del VIH-1. Se han descrito tanto factores genéticos de los individuos LTNP-EC, como su respuesta inmunitaria frente al VIH-1 y diversos factores virales, como las causas de dicho control (Deeks & Walker, 2007; Casado et al., 2010). A nivel genético, se ha descrito la implicación de ciertos alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (HLA) en el control de la infección, como HLA-B\*5701 (Migueles et al., 2000; Fellay et al., 2007), HLA-B\*35:01 (Kuse et al., 2021), HLA-B27 (Almeida et al., 2007) y HLA-C (Nehete et al., 1998; Fellay et al., 2007). También se han encontrado individuos resistentes a la infección por VIH-1 debido a una delección homocigótica del gen *CCR5* (R. Liu et al., 1996; Samson et al., 1996; Hütter et al., 2009; Gupta et al., 2019). A nivel de sistema inmunitario, se ha observado en este grupo de pacientes una fuerte respuesta inmunitaria específica contra el VIH-1 (Y. Cao et al., 1995), con una potente respuesta de los linfocitos T citotóxicos (Hogan & Hammer, 2001; Migueles et al., 2002; Sáez-Cirión et al., 2007) y el mantenimiento de la capacidad proliferativa de los linfocitos T (O'Connell et al., 2009). Por otro lado, también intervienen las características del virus, por ejemplo, se descubrió una cohorte de individuos LTNP australianos que tienen delecionado el gen viral *nef* y son capaces de controlar la infección (Rhodes et al., 2000; Hogan & Hammer, 2001). Así como también se ha observado mutaciones de *vpr* (Rodés et al., 2004) o la incorrecta funcionalidad de Env (Lassen et al., 2009; Cabrera-Rodríguez et al., 2019; Pérez-Yanes et al., 2022; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022), que contribuyen al control viral.

## **1.4. Virus ZIKA.**

### **1.4.1. Generalidades del virus ZIKA.**

#### **1.4.1.1. Epidemiología y clasificación del virus ZIKA.**

El virus Zika es un virus de ARN de cadena simple positiva que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* que se transmite a través de mosquitos (Kuno & Chang,

2007; Bollati et al., 2010) y puede causar daños a nivel neurológico (Araujo et al., 2016; L. S. Muñoz et al., 2017).

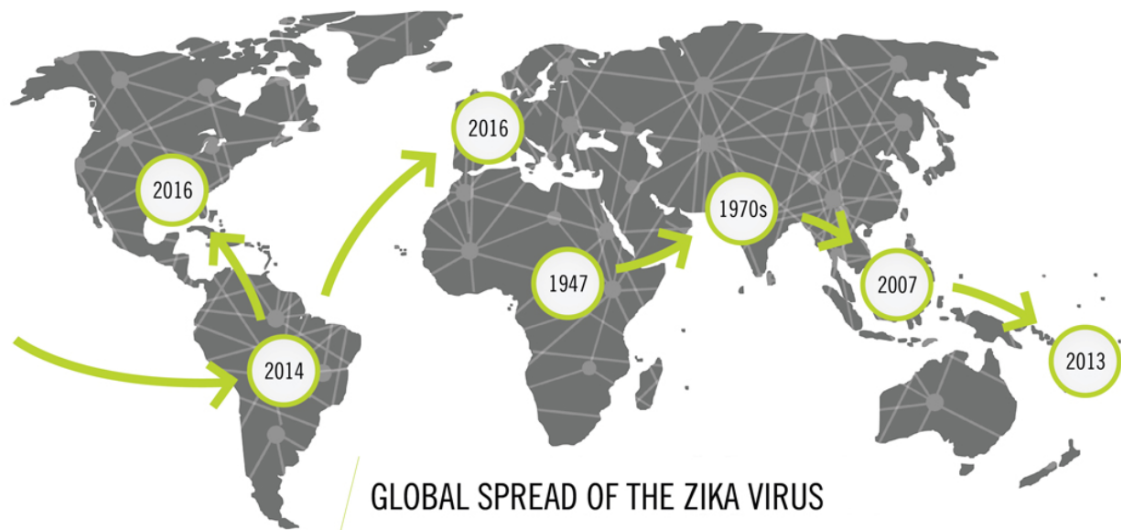
La primera vez que se aisló el virus Zika fue, en 1947 en el bosque Zika de Uganda, de un macaco Rhesus (Dick et al., 1952). Un grupo de científicos ingleses (Dick *et al.*) que trabajaban en el “*Yellow Fever Research Laboratory*” aislaron un macaco Rhesus (Rhesus 766) que tenía fiebre. Días más tarde, al no observar mejoría, le extrajeron suero y se lo inocularon por vía intracerebral a ratones. Diez días después, todos los ratones enfermaron y aislaron del cerebro de los ratones el virus, al cual denominaron virus Zika (ZIKV) (Dick et al., 1952; Dick, 1952; Hayes, 2009).

Cinco años después, en 1952, se identificaron las primeras infecciones en humanos en Uganda, República Unida de Tanzania e India (Smithburn et al., 1954; Kindhauser et al., 2016; WHO, 2016b). Pero fue en 1954 cuando se aisló por primera vez el ZIKV de un humano, concretamente de una niña nigeriana de 10 años que pensaban que había enfermado por Fiebre Amarilla (MacNamara, 1954; Vue & Tang, 2021). Durante los años 50, se detectó serológicamente el virus en humanos en diferentes países del continente africano y asiático (Sather et al., 1958; Pond, 1963; Kindhauser et al., 2016), y entre 1969 y 1983 el ZIKV se distribuyó hacia Asia Ecuatorial (García et al., 1969; Olson et al., 1981; Darwish et al., 1983). En ambos casos sin causar brotes en la población y con síntomas leves (Kindhauser et al., 2016). El primer brote en humanos se produjo en 2007 en la isla de Yap en los Estados Federados de Micronesia, se estima que se infectó el 73% de la población mayor de 3 años con los principales síntomas siendo exantema, conjuntivitis y artralgia (Lanciotti et al., 2008; M. R. Duffy et al., 2009).

En 2012, a partir de estudios genéticos de secuencias de las cepas víricas del ZIKV aisladas en Camboya, Malasia, Nigeria, Senegal, Tailandia y Uganda, se construyó un árbol filogenético que las relacionaba y dando como resultado la diferenciación de dos linajes geográficamente distintos, el africano y el asiático, dentro de los cuales se incluyen diversas cepas (Haddow et al., 2012). Ambos linajes emergieron del este de África, se estima que fue en 1920 aproximadamente (con un intervalo de confianza de 1892 a 1947), y en concreto, el linaje asiático se originó mediante la transmisión del virus desde

África hacia el Sudeste Asiático alrededor de 1945 (con un intervalo de confianza de 1920 a 1960), donde se detectó por primera vez en Malasia en 1960 (Garcia et al., 1969; Gatherer & Kohl, 2016; Vue & Tang, 2021). Siendo el linaje africano el ancestral, del que se derivó el linaje asiático (Vue & Tang, 2021).

Entre 2013 y 2014, se produjeron brotes en otras islas del Pacífico, en la Polinesia Francesa, la Isla de Pascua, las islas Cook y Nueva Caledonia (Cao-Lormeau et al., 2014; Roth et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Tognarelli et al., 2016). A partir del brote en la Polinesia Francesa en 2013, se comenzó a relacionar la infección de ZIKV con síntomas más severos, con complicaciones autoinmunes y neurológicas, así como con malformaciones congénitas (Ioos et al., 2014; Oehler et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016). Durante el año 2015 se produjeron brotes en el continente americano (Campos et al., 2015; Brasil, Calvet, et al., 2016; Lowe et al., 2018; Pan American Health Organization (PAHO), 2016) y el Ministerio de Sanidad de Brasil reportó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la asociación entre la infección por ZIKV con el síndrome Guillain-Barré (SGB), y con microcefalia. Este hecho, junto con la coincidencia geográfica-temporal del brote más importante de ZIKV y los juegos olímpicos de Brasil 2016, así como el aumento de brotes en diferentes partes del mundo; llevó a la OMS a declarar el 1 de febrero de 2016 una Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional debido a la asociación entre la infección de ZIKV con la microcefalia y otras enfermedades neurológicas (Calvet et al., 2016; de Siqueira et al., 2016; Kindhauser et al., 2016; Kleber de Oliveira et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016; Styczynski et al., 2017; WHO, 2016a; WHO, 2016e).



**Figura 8: Mapa histórico de la emergencia del virus ZIKA (ZIKV).** Mapa en el que se muestra el año y la localización de eventos de gran importancia relacionados con ZIKV, mostrando su dispersión a nivel mundial a lo largo de los años. Figura extraída de (Public Health Landscape, 2016).

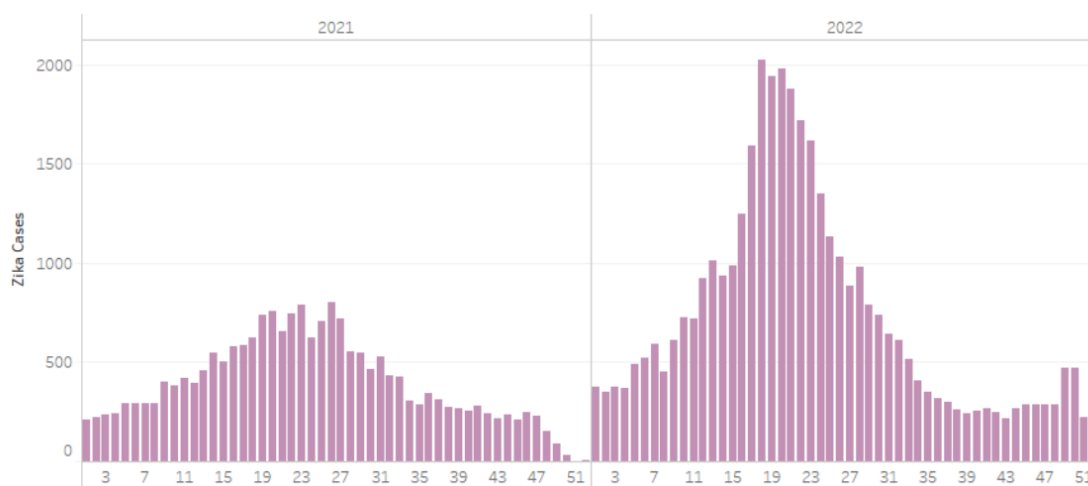
#### 1.4.1.2. Situación actual de la infección por ZIKV en el mundo.

En diciembre de 2021, 89 países tenían evidencias de la transmisión de ZIKV vía mosquito de manera autóctona, tanto en África, como América, Sudeste Asiático y el Oeste del Pacífico. Por otro lado, 61 países y territorios poseen el vector de ZIKV, *Aedes aegypti*, pero no se han registrado casos de transmisión del virus de manera autóctona en ellos. Asimismo, se ha descrito en otros países la presencia de *Aedes albopictus*, mosquito que también es capaz de transmitir el ZIKV, suponiendo un riesgo para la población. La información sobre la incidencia de ZIKV en regiones de la OMS como África, Sudeste Asiático o el Oeste del Pacífico, es limitada ya que algunos países no han actualizado sus datos (WHO, 2022a).

África es la región donde se originó el ZIKV, siendo una región clave en la historia del virus. Se ha observado transmisión autóctona en diferentes países africanos, incluyéndose recientemente en esta lista a Kenia, tras su confirmación a través de estudios serológicos. Aparte de África, el sudeste asiático también ha sido una región importante en la evolución y transmisión del ZIKV, y donde se han producido brotes a lo largo de la historia del virus. Además, es una zona con gran riesgo debido a la alta

densidad de población del vector del virus. Cabe destacar, que en 2021 se produjo un brote en el Estado de Kerala, India, siendo el primer brote en el Sudeste Asiático desde 2018. Con respecto al Oeste del Pacífico, solo se han registrado casos esporádicos de ZIKV desde mitad de 2019. Mientras en el Mediterráneo Oriental no se ha registrado transmisión autóctona de ZIKV, aunque se ha detectado a *Aedes aegypti* en diversos países de la región (WHO, 2022a).

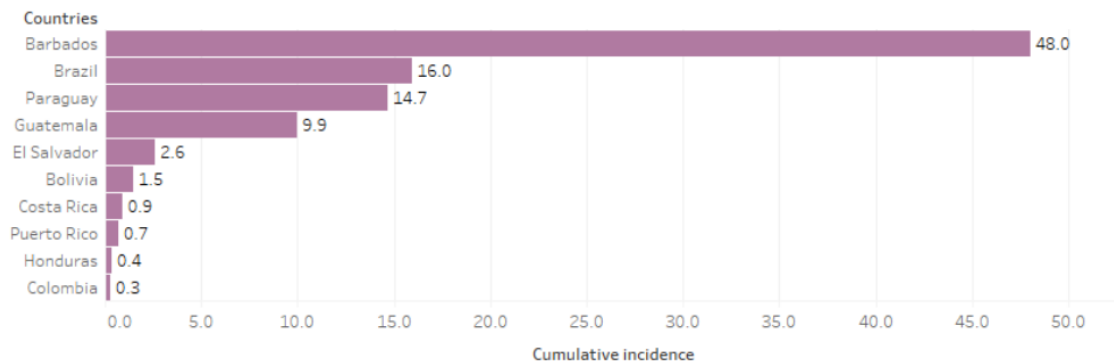
América es la región de la OMS con mayor número de casos por ZIKV de forma anual. El pico de brotes por ZIKV se obtuvo en la primera mitad de 2016 y descendió en la mayoría de los países del continente desde 2017 hasta 2020. En 2020, se reportaron 22.885 casos de ZIKV en América, de los cuales, el 12% fueron confirmados mediante técnicas de laboratorio (WHO, 2022a) y en 2022 se registró una incidencia acumulativa de 40.249 casos de ZIKV, de los cuales el 8,1% fueron confirmados mediante técnicas de laboratorio (PAHO, n.d.-b) (Figura 9). Además, durante el año 2022 se registraron 2 muertes relacionadas con ZIKV (PAHO, n.d.-b).



**Figura 9: Distribución de los casos reportados de Zika durante las semanas epidemiológicas de los años 2021 y 2022 en América.** Datos sobre los casos reportados de ZIKV durante los años 2021 y 2022 incorporados en “Health Information Platform for The Americas (PLISA, PAHO/WHO)” por los ministerios e institutos de salud de los países y territorios del continente americano. Figura extraída de (PAHO, n.d.-a).

Barbados fue el país con mayor incidencia acumulativa en 2022, seguido de Brasil, Paraguay y Guatemala (PAHO, n.d.-a) (Figura 10). Se ha descrito la transmisión autóctona de ZIKV en todos los países del continente americano, excepto Bermuda, San

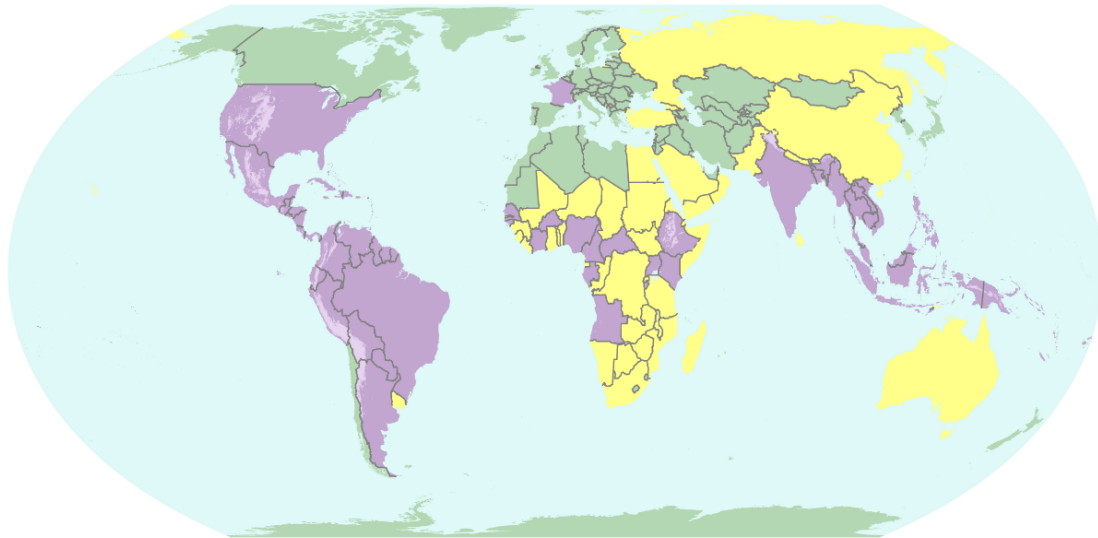
Eostaquio y Saba, Chile continental, Uruguay y Canadá. En general, se observa la persistencia de transmisión de ZIKV en América, pero a bajos niveles y de forma heterogénea a lo largo de los diferentes países del continente (WHO, 2022a).



**Figura 10: Incidencia acumulada de casos de ZIKA por 100.000 habitantes en América en 2022.** Datos sobre la incidencia de casos de ZIKV durante el año 2022 incorporados en “*Health Information Platform for The Americas (PLISA, PAHO/WHO)*” por los ministerios e institutos de salud de los países y territorios del continente americano. Figura extraída de (PAHO, n.d.-a).

En Europa no se habían detectado casos autóctonos de transmisión de ZIKV por mosquito, sino casos de infecciones por ZIKV en europeos que habían viajado a países endémicos del virus. Hasta finales de 2019, cuando se identificó transmisión autóctona en Francia. En Europa también se ha informado de la presencia en algunos países del vector *Aedes aegypti* (WHO, 2022a).





**Figura 11: Áreas con riesgo de ZIKA.** Mapa mundial donde se muestra el grado de riesgo de infección por ZIKV en base a colores. En rojo: país o territorio con brote de ZIKV actual. En violeta oscuro: país o territorio que alguna vez ha notificado casos de ZIKV, tanto en el pasado como en la actualidad. En violeta claro: áreas con baja probabilidad de infección por ZIKV debido a la altura (más de 2000 metros). En amarillo: país o territorio donde se ha establecido el vector, pero no hay casos de ZIKV reportados. Y por último en verde: país o territorio donde no se ha establecido el vector. Datos obtenidos hasta la fecha del 25 de Julio de 2022. Figura extraída de (CDC, 2022b).

Debido a que la mayoría de los casos de infección por ZIKV cursa de forma asintomática o con sintomatología leve, y a la falta de recursos en algunos países para la vigilancia de enfermedades de este tipo, resulta complicado la obtención de los datos reales sobre esta enfermedad. Este hecho, la vigilancia de la enfermedad se ha visto agravado durante la pandemia de SARS-Cov-2, durante la cual se han destinado gran cantidad de recursos para dicha enfermedad que anteriormente se utilizaban entre otras cosas para la vigilancia de infecciones por arbovirus. Además, debido al cambio de comportamiento y medidas sanitarias que se llevaron a cabo durante la pandemia, como el confinamiento, se redujo el cuidado de ciertos ambientes que favorecen la cría de mosquitos promoviendo la transmisión de esta clase de virus (WHO, 2022a).

También, conviene enfatizar que actualmente no existen vacunas, tratamiento ni diagnóstico específico contra el ZIKV (CDC, 2019; WHO, 2022b).

Con relación al diagnóstico, la similitud evolutiva de los flavivirus ha conllevado a la reactividad cruzada de ZIKV y DENV, varios grupos investigadores han descubierto una

respuesta de anticuerpos anti-DENV que genera una reacción cruzada con ZIKV, mejorando su infección y aumentando su patogenia (Dejnirattisai et al., 2016; J. Wen & Shresta, 2019). Esta reacción, junto a la superposición de la distribución geográfica de ambos virus y la sintomatología común, hacen difícil el diagnóstico de la infección por ZIKV. De hecho, la única prueba capaz de diferenciar la infección entre ZIKV y DENV es la detección de ARN en muestras de suero, plasma, orina, saliva y líquido amniótico, mediante RT-PCR (“*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*”) durante la fase aguda de la infección. Además, esta prueba requiere de personal e instalaciones capacitadas dificultando el diagnóstico en ciertas áreas (Corman et al., 2016; Waggoner & Pinsky, 2016).

Tampoco existe un tratamiento específico contra el ZIKV. Debido al tropismo neurológico y placentario del ZIKV, se dificulta en gran medida el hallazgo de un fármaco capaz de traspasar la barrera hematoencefálica y transplacentaria sin causar efectos negativos sobre el paciente y/o el feto. Los estudios llevados a cabo hasta ahora se han centrado principalmente en la investigación de análogos de los nucleósidos y no nucleósidos que dificulten la actividad de la polimerasa viral, inhibidores de la actividad metilasa de la misma polimerasa, inhibidores de la proteasa y del proceso de fusión de membranas viral y endosomal que se produce durante la entrada viral (Bernatchez et al., 2020).

Aunque no existen vacunas contra el ZIKV en el mercado, sí que se han realizado ensayos cuyos resultados han sido prometedores. Se han desarrollado diferentes vacunas para el ZIKV, vacunas de virus vivos atenuados, virus inactivados, ácidos nucleicos y vectores de adenovirus y virus del sarampión; estas últimas basadas en los genes de proteínas las estructurales como *PrM* (precursor de membrana) y *E* (envoltura) (Pattnaik et al., 2020; Adam et al., 2023). La vacuna de virus vivos atenuados se ha expuesto como la mejor estrategia contra la infección por ZIKV, al inducir una potente producción de anticuerpos neutralizantes y una respuesta específica de células T CD4+ y CD8+ en ratones. Esta respuesta inmunitaria frente a dicho tipo de vacuna ha supuesto una protección en ratones frente a las enfermedades inducidas por ZIKV y la transmisión vertical (Shan, Muruato, Jagger, et al., 2017; Shan, Muruato, Nunes, et al., 2017; X. Xie

et al., 2018; Adam et al., 2021; Adam et al., 2023). Pero no han sido aceptadas en ensayos clínicos por causas de seguridad, sobre todo en mujeres embarazadas (Adam et al., 2021; Adam et al., 2023). Además, la reactividad cruzada de anticuerpos entre ZIKV y DENV es un factor a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas (Dejnirattisai et al., 2016; J. Wen & Shresta, 2019). Este hecho como ya se ha comentado, también ha contribuido a la falta de ensayos de diagnóstico sensibles y específicos contra el ZIKV, lo que aparte de dificultar el diagnóstico también afecta al desarrollo de vacunas (Bernatchez et al., 2020). A su vez, la dificultad de reclutar sujetos para los ensayos y la disminución de los casos que ha conllevado a la pérdida de interés social sobre el virus, han supuesto un impedimento en el avance en este campo. De hecho, de las 45 vacunas candidatas que se encontraban bajo estudio poco después del brote de 2015-2016, en 2020 solo 8 proyectos continuaban en investigación (Bernatchez et al., 2020; Pattnaik et al., 2020).

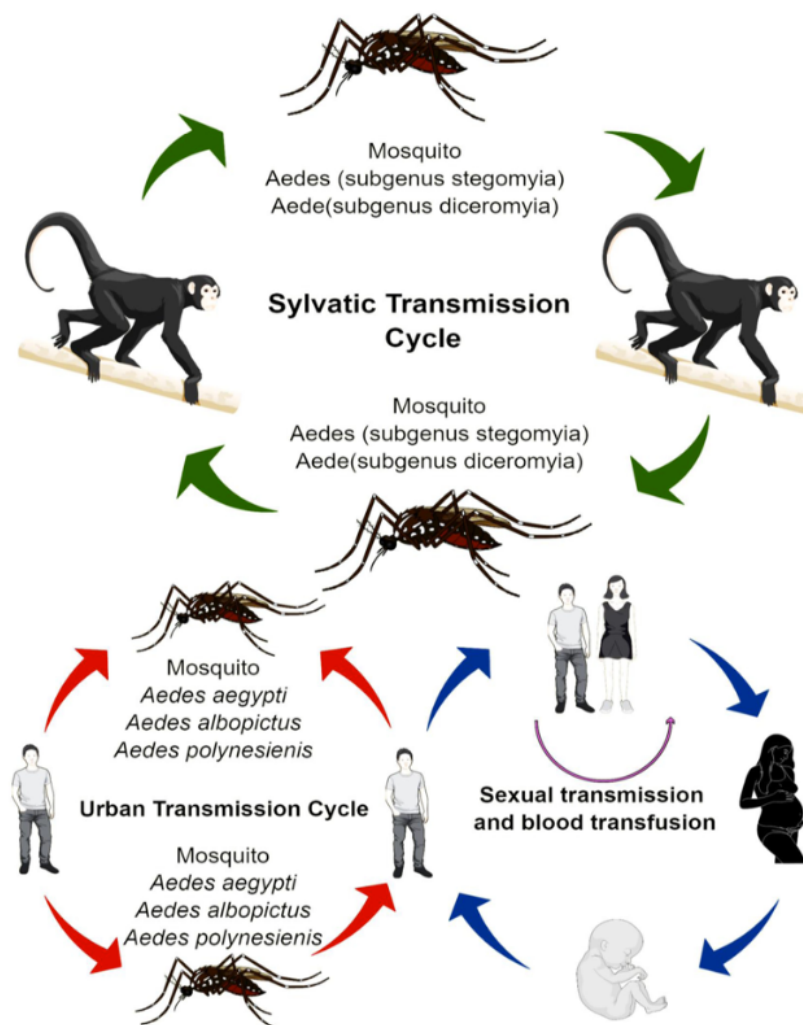
Por todo lo anteriormente expuesto, la gran cantidad de países con transmisión autóctona y/o con la presencia del vector, la escasa vigilancia de la enfermedad y la falta de vacunas, tratamiento y diagnóstico específico, existe un alto riesgo de emergencia y re-emergencia del ZIKV a nivel mundial.

#### **1.4.1.3. Patogénesis y curso natural de la infección por ZIKV.**

La principal vía de transmisión de ZIKV es a través de la picadura de mosquito, sobre todo por el género *Aedes* (*Stegomyia*), y concretamente la especie *Aedes aegypti* (Garcia et al., 1969; M. I. Li et al., 2012; Plourde & Bloch, 2016). Aunque también se transmite por otras especies como *Aedes albopictus*, *Aedes africanus* y *Aedes hensilli* entre otras (Haddow et al., 1964; Diallo et al., 2014; Grard et al., 2014; Ledermann et al., 2014). El mosquito adquiere el virus cuando pica e introduce en su organismo la sangre de un primate infectado por ZIKV. Una vez se encuentra en el mosquito, el virus infecta y se replica en las células epiteliales del mosquito, circula a través de la sangre hasta la glándula salival y continúa la transmisión del virus picando a otro primate no humano o a humanos infectándolos con el virus a través de su saliva. Con ello continuando el ciclo

de transmisión selvático o comenzando el ciclo de transmisión urbano respectivamente, como podemos observar en la **Figura 12** (Rather, Lone, Bajpai, Paek, et al., 2017).

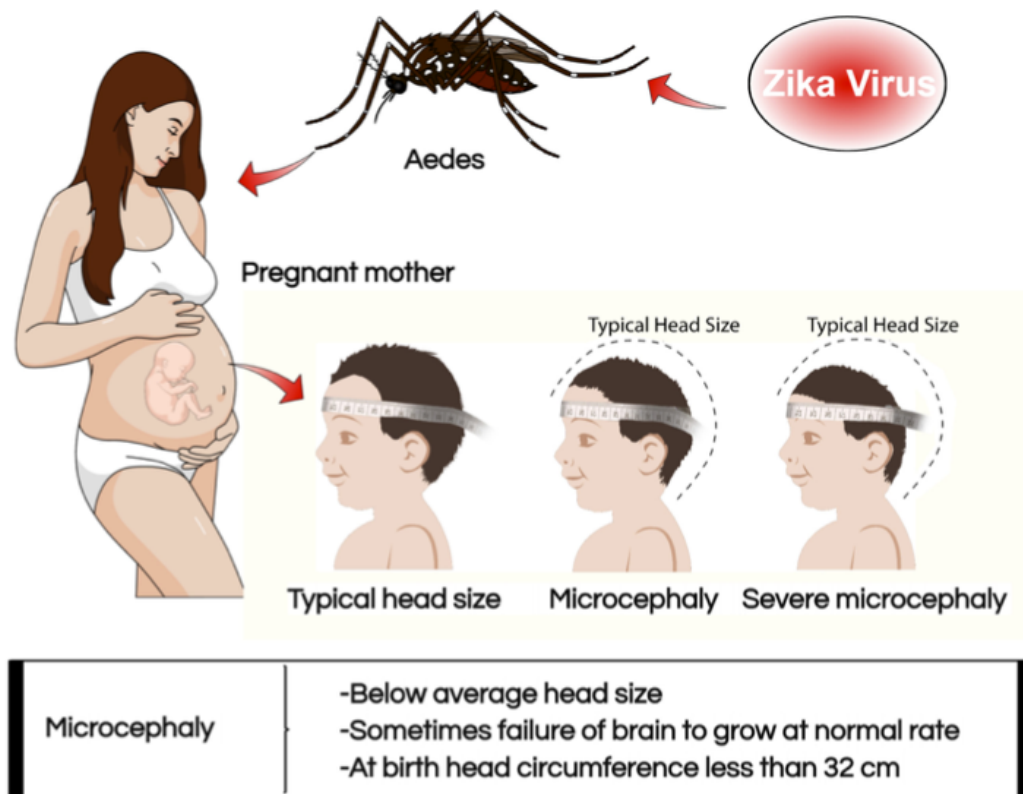
Además, se han descrito otras vías de transmisión como la congénita (Martines, Bhatnagar, Keating, et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016), perinatal (Besnard et al., 2014; Miner et al., 2016) y sexual (Foy et al., 2011; Musso et al., 2015; Sakkas et al., 2018). Por otro lado, aunque de manera menos común, también se han observado casos de transmisión del ZIKV a través de transfusión de sangre (Musso et al., 2014; FDA, 2018) y sudor (Menezes-Neto et al., 2020).



**Figura 12: Vías de transmisión del virus ZIKA.** El ZIKV se transmite a través de diferentes clases de ciclos. Por un lado, puede transmitirse entre primates no humanos a través de varias especies de mosquito *Aedes*, dando lugar a un ciclo de transmisión selvático. Por otro lado, también se puede transmitir el virus entre humanos a través de diversas especies de mosquito *Aedes*, siendo este caso un ciclo de transmisión urbano. Por último, también se ha demostrado la transmisión sexual, vertical y por transfusiones sanguíneas de ZIKV. Figura extraída de (Rather, Lone, Bajpai, Paek, et al., 2017).

El periodo de incubación de la infección por ZIKV es de entre 3 y 12 días (Ioos et al., 2014). Lo más común, en el 80% de los casos aproximadamente, es que se produzca una infección asintomática, pero cuando se presenta sintomatología, esta suele ser leve e inespecífica (Ioos et al., 2014; Petersen et al., 2016; Plourde & Bloch, 2016), similar a infecciones por otros arbovirus: erupción cutánea (maculopapular y pruriginoso en la mayoría de los casos, que comienza desde la cara y se extiende hasta las extremidades), edema en las extremidades, fiebre, dolor de cabeza, vértigo, trastornos digestivos, artralgia, mialgia y conjuntivitis (Ioos et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Musso et al., 2015; Zammarchi et al., 2015). Desafortunadamente, se ha asociado al ZIKV con enfermedades más graves relacionadas con el sistema nervioso como la microcefalia (Kleber de Oliveira et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016) y el síndrome Guillain-Barré (SGB) (Oehler et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016).

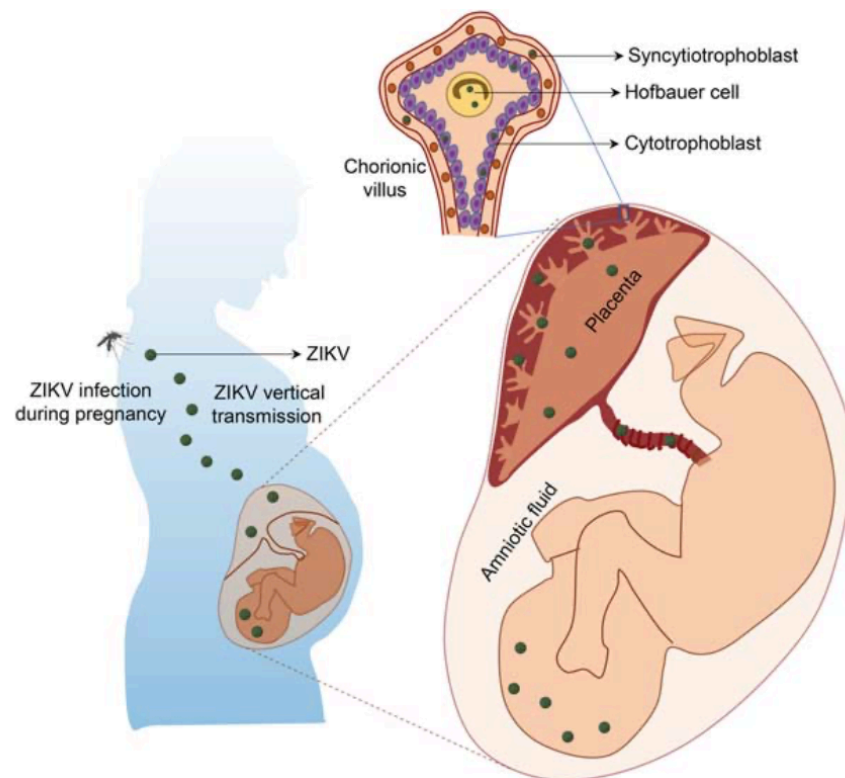
La microcefalia es un desorden del desarrollo neurológico caracterizado por la reducción del tamaño del perímetro cefálico (PC) o circunferencia craneal al nacer (2-3 desviaciones estándar por debajo de la media), un crecimiento más lento que el promedio en el PC tras el nacimiento y discapacidad intelectual debido a la incapacidad de proliferación y la muerte celular de las células progenitoras corticales y su progenie neuronal (Barbelanne & Tsang, 2014; Mlakar et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Wen et al., 2017) (**Figura 13**). La microcefalia severa se caracteriza por convulsiones, retraso en el desarrollo del habla y dificultad para sentarse, levantarse y caminar. También pueden tener problemas de alimentación, pérdida auditiva y deterioro de la visión (CDC, 2022c). La causa de la microcefalia puede ser una variación genética, la exposición a agentes teratogénicos o infecciones congénitas (Ashwal et al., 2009; de Araújo et al., 2016).



**Figura 13: Relación de ZIKV con microcefalia en mujeres embarazadas.** Ilustración de la microcefalia, enfermedad congénita producida por ZIKV, en niños recién nacidos. Figura extraída de (Rather, Lone, Bajpai, & Park, 2017).

Se ha identificado, que este fallo en el desarrollo neurológico del feto se produce con mayor frecuencia cuando la madre se infecta durante el primer trimestre (J. Dang et al., 2016; Rather, Lone, Bajpai, & Park, 2017). A través de diferentes estudios donde se ha detectado el ARN viral en el líquido amniótico y tejidos de la placenta de embarazadas infectadas por ZIKV, así como también en los tejidos cerebrales de los fetos, se cree que la infección se produce a través de las células de la placenta, rompiendo así la barrera de protección que le proporciona al feto (Martines, Bhatnagar, Keating, et al., 2016; Noronha et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016; Bhatnagar et al., 2017) (Figura 14). Esta ruta transplacentaria de transmisión del ZIKV también se ha demostrado *in vivo* (Cugola et al., 2016; Miner et al., 2016; K.-Y. Wu et al., 2016). Además, se ha descrito a los macrófagos de la placenta (células Hofbauer) y a los trofoblastos como células diana de ZIKV (Bayer et al., 2016; Quicke et al., 2016). La infección por ZIKV de estos dos tipos celulares de la placenta provoca una respuesta inflamatoria, así como también la infección de los trofoblastos produce su apoptosis y un daño vascular generando una insuficiencia placentaria. Tanto la respuesta

inflamatoria como la insuficiencia placentaria podrían ser responsables del incorrecto desarrollo fetal (Bayer et al., 2016; Miner et al., 2016; Quicke et al., 2016; Wen et al., 2017).



**Figura 14: Transmisión vertical de ZIKV.** El ZIKV se transmite a una mujer embarazada por ejemplo mediante una picadura de mosquito *Aedes*, y una vez infectada puede transmitir el virus al feto mediante transmisión vertical, infectando los trofoblastos y las células de Hofbauer de la placenta, permitiendo la infección del sistema nervioso del feto. Figura extraída de (Z. Wen et al., 2017).

De igual modo, también se ha observado que las células progenitoras neurales (CPN) del tejido cortical son muy susceptibles a la infección por ZIKV, mientras que las neuronas inmaduras son menos susceptibles (Cugola et al., 2016; Tang et al., 2016; Wen et al., 2017). En las CPN, el virus detiene el ciclo celular, reduciendo la proliferación celular e impidiendo la neurogénesis, y también aumenta la muerte celular, aumentando la activación de caspasas y el mecanismo de apoptosis (Cugola et al., 2016; J. Dang et al., 2016; Tang et al., 2016). En ambas capas (neuronal y CPN) se ha observado una mayor delgadez por la infección de ZIKV y en los organoides cerebrales un menor tamaño y plegamiento de superficie, manifestaciones similares a la microcefalia (Cugola et al., 2016; J. Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016; Qian et al., 2016).



El ZIKV también infecta astrocitos y microglía, células fundamentales en el neurodesarrollo (Reemst et al., 2016; Retallack et al., 2016), así como células precursoras de oligodendrocitos, células madre neuroepiteliales neocorticales y de la médula espinal, las cuales son las primeras poblaciones de células madre neuronales residentes presentes en el neurodesarrollo, y a las células de la cresta neural craneal, a partir de las cuales se originan la mayoría de los huesos craneales (Bayless et al., 2016; Onorati et al., 2016; Retallack et al., 2016; Wen et al., 2017).

Aparte de la microcefalia, la infección por ZIKV también genera otras malformaciones congénitas como atrofia cerebral, calcificaciones en la placa cortical y subcortical, daño axonal, nódulos microgliales y gliosis (Driggers et al., 2016; Martines, Bhatnagar, de Oliveira Ramos, et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Wen et al., 2017).

Además, como se ha expuesto anteriormente, también es un agente causal del síndrome Guillain-Barré (SGB). El SGB es un trastorno autoinmune que causa anomalías a nivel sensorial, disfunción autonómica y debilidad, ya que ocasiona un daño a nivel periférico o de la raíz nerviosa (Sejvar et al., 2011; Dirlikov et al., 2017). Se caracteriza por una debilidad bilateral simétrica de las extremidades e hiporreflexia o arreflexia y una rápida progresión, ya que alcanza su máxima gravedad en solamente 4 semanas aproximadamente (R. A. Hughes & Cornblath, 2005; van Doorn et al., 2008; Yuki & Hartung, 2012), siendo los primeros síntomas: entumecimiento, parestesia, debilidad, dolor en las extremidades o la combinación de estos (Yuki & Hartung, 2012). Tras la fase de progresión, le prosigue una fase de meseta que dura 7 días de media aproximadamente (rango de 2 días a 6 meses) y por último la fase de recuperación (Fokke et al., 2014).

El síndrome se desencadena por infecciones previas con patógenos específicos como *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr, *Mycoplasma pneumoniae* o el virus Zika, entre otros (Jacobs et al., 1998; Hadden et al., 2001), las cuales activan la producción de anticuerpos que en este caso tienen una reacción cruzada con los gangliósidos de las membranas nerviosas, produciendo un daño a nivel



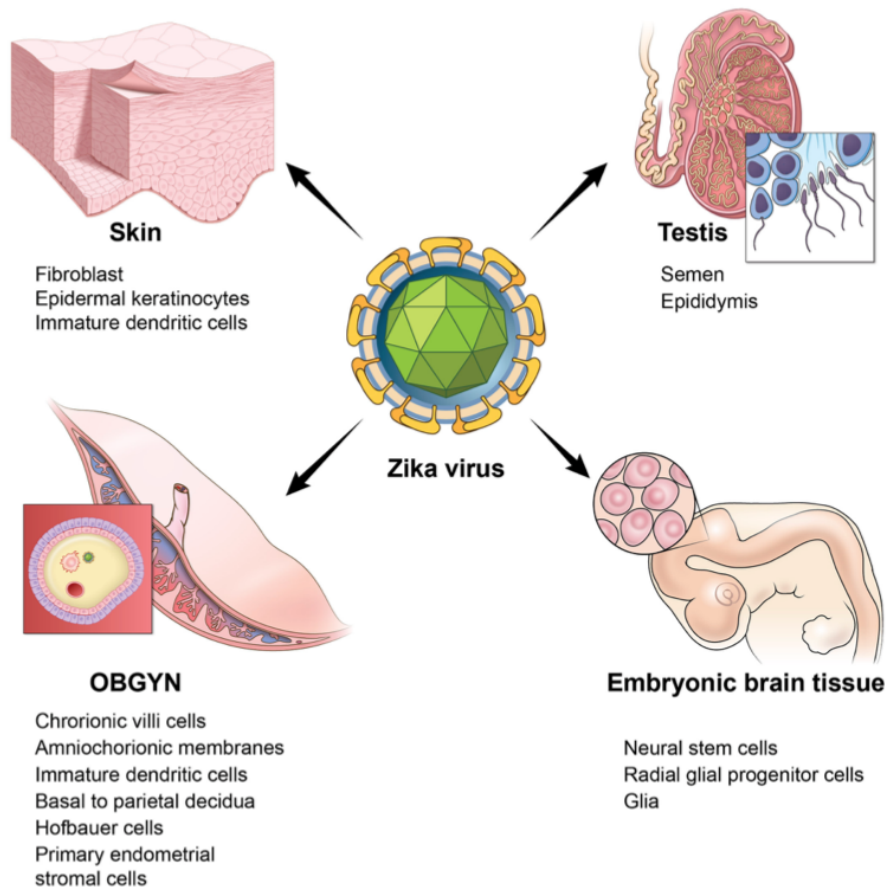
nervioso que conlleva la desmielinización, daño axonal o ambos (Kusunoki et al., 2008; Sejvar et al., 2011). En base al agente infeccioso y la especificidad de los anticuerpos antigangliósidos se define el curso clínico del síndrome y el subtipo de SGB (van der Meché et al., 2001; van Doorn et al., 2008), que difieren a nivel clínico, electrofisiológico e histológico (T. W. Ho et al., 1995; van der Meché et al., 2001; R. A. Hughes & Cornblath, 2005).

Los dos más comunes y conocidos son la Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Aguda (AIDP, "*Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*") y la Neuropatía Axonal Motora Aguda (AMAN, "*Acute Motor Axonal Neuropathy*"). AIDP es una forma sensoriomotora de SGB causada por una demielinización que genera déficits de nervios craneales, disfunción autonómica y dolor (Albers et al., 1985; R. A. Hughes & Cornblath, 2005; van den Berg et al., 2014). Por otro lado, AMAN es una forma motora de SGB, y se caracteriza en que la polineuropatía axonal no se acompaña de déficits sensoriales; afecta a las fibras de los nervios motores sin afectar a la mielina (Griffin, Li, Macko, et al., 1996; Hafer-Macko et al., 1996; van den Berg et al., 2014). También existe un subtipo de GBS axonal denominado Neuropatía Axonal Sensorial y Motora Aguda (AMSAN, "*Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy*") donde encontramos lesiones axonales en ambas fibras, sensoriales y motoras (Griffin, Li, Ho, et al., 1996; R. A. Hughes & Cornblath, 2005). A su vez, también se puede producir el síndrome de Miller Fisher (MFS, "*Miller-Fisher Syndrome*"), un subtipo poco común que se caracteriza por la sintomatología de oftalmoplejía, ataxia y arreflexia (Fisher, 1956; Mori & Kuwabara, 2011).

En un estudio de metaanálisis del fenotipo clínico y electrofisiológico del SGB causado por ZIKV, se observó que generalmente se produce el subtipo AIDP, que causa frecuentemente parálisis facial y avanza hacia un estado grave de la enfermedad que suele requerir ingreso en la UCI (Leonhard et al., 2020).

Por último, resaltar que el ZIKV es capaz de infectar otros tipos celulares además de los anteriormente expuestos. En la mayoría de los casos, el individuo se infecta tras la picadura de un mosquito, por lo que la infección inicial probablemente se producirá en

las células de la piel, afectando a los fibroblastos dérmicos, los queratinocitos epidérmicos y las células dendríticas inmaduras (Hamel et al., 2015). En relación con la transmisión por vía sexual, se ha detectado ARN de ZIKV en el epidídimo (órgano donde maduran y almacenan los espermatozoides), se ha descrito a las células epiteliales del epidídimo y los leucocitos luminales como dianas del ZIKV, así como también se ha detectado ARN viral en espermátidas inmaduras (Uraki et al., 2017; McDonald et al., 2018; Sheng et al., 2021; Vogt et al., 2021). También se ha detectado ARN viral en el semen incluso 6 meses después de la infección, todavía no se sabe con certeza cuál es el reservorio celular, aunque se ha detectado ARN viral y antígenos de ZIKV en espermatozoides. En un estudio en ratones, observaron que las partículas virales se encontraban sobre todo en el fluido seminal de forma libre y que las células epiteliales del epidídimo podrían ser las principales células productoras de viriones (Nicastri et al., 2016; McDonald et al., 2018; Mead et al., 2018; Petridou et al., 2019).



**Figura 15: Tejidos y células susceptibles a la infección por ZIKV.** Ilustración de los diferentes tejidos y tipos celulares susceptibles a la infección por ZIKV. La piel está representada por un dibujo de un fibroblasto; los tejidos de OBGYN (“*Obstetrician-Gynecologist*”) por un dibujo de la vellosoidad de la placenta; los tejidos del cerebro embrionario por un dibujo de un cerebro embrionario donde se resaltan las células progenitoras neurales; y los testículos por un dibujo de su estructura interna donde se resaltan los espermatozoides. Figura extraída de (Gorshkov et al., 2019).

#### 1.4.2. Morfología y estructura del ZIKV.

El ZIKV es un virus con simetría icosaédrica y con envoltura, en cuyo interior encontramos el material genético (Pierson & Diamond, 2012; Y. Shi & Gao, 2017; B. Wang et al., 2018; Hasan et al., 2018). El material genético consiste en una cadena de ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 11 Kb de longitud, que contiene un “*cap*” metilado en la región UTR del extremo 5’ (~107 nucleótidos), un UTR 3’ (~428 nucleótidos) que carece de una cola poliA, pero en su lugar tiene  $CU_{OH}$  al final de una horquilla de ARN conservada relacionada con la evasión del sistema inmunitario; y además posee un único “*Open Reading Frame*” (Y. Shi & Gao, 2017; B. Wang et al., 2018; Göertz et al., 2018; H.-H. Lin et al., 2018). Actúa como un ARNm a partir del cual se

traduce una única poliproteína que será procesada por las proteasas viral y del hospedador, generando tres proteínas estructurales: la cápside (C), el precursor de membrana (prM) y la envoltura (E), y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Hamel et al., 2015; Y. Shi & Gao, 2017; Hasan et al., 2018) (**Figura 16**).

- **Cápside (C):** la cápside es una de las tres proteínas estructurales del virus. Las proteínas C se unen al ARN viral para formar la nucleocápside de los viriones, la cuál será envuelta por una membrana lipídica que contiene las proteínas virales prM y E. Además, también se ha descrito que actúa en el proceso de infección interaccionando con proteínas celulares, modulando el metabolismo celular y la apoptosis (S. Hou et al., 2017; Fontaine et al., 2018; Shang et al., 2018; T. Y. Tan et al., 2020; Zeng et al., 2020).
- **Precursor de membrana (prM)/ membrana (M):** la proteína prM es la precursora de la proteína M. Durante la maduración de las partículas víricas, la proteasa furina del hospedador corta prM en la proteína M y el péptido Pr. prM protege la glicoproteína Envoltura (E) de una fusión prematura durante el transporte del virión inmaduro desde el RE hacia la red del trans-Golgi donde se produce la maduración del virión. Tanto la proteína M como E forman parte de la envoltura o superficie viral que recubre la nucleocápside del virión maduro (Kostyuchenko et al., 2016; Sirohi et al., 2016; Prasad et al., 2017; Nambala & Su, 2018; G. Li et al., 2019).
- **Envoltura (E):** la envoltura es la glicoproteína que se encarga de la unión a los receptores celulares y la posterior entrada en la célula hospedadora. Asimismo, la proteína viral E se ha asociado con la patogénesis, el reconocimiento del sistema inmunitario y la adaptación al hospedador (Dai et al., 2016; Fontes-Garfias et al., 2017; Giraldo et al., 2020; Shan et al., 2020; M. Guo et al., 2021).
- **NS1:** la proteína NS1 existe en dos tipos de formas oligoméricas, como dímero unido a la membrana del RE y/o a la membrana citoplasmática (NS1m), y como

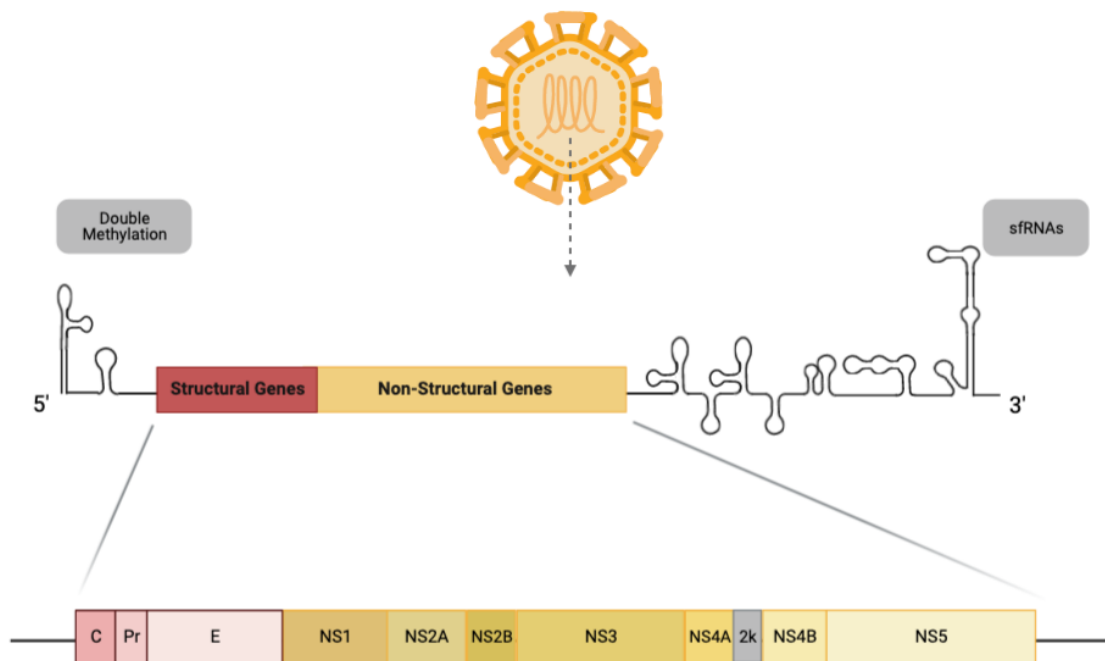
hexamérica (NS1s), secretada por la célula infectada. Estas formas oligoméricas NS1m y NS1s presentan funciones diferentes. NS1m actúa a nivel de la infección y replicación viral, tiene la capacidad de inducir la remodelación de las membranas del RE necesaria para la formación de los sitios de replicación. Mientras NS1s interviene en la evasión del sistema inmunitario y en la inducción de la permeabilidad de los tejidos. Se ha descrito a NS1 como una de las proteínas no estructurales que actúa sobre la ruta del interferón (IFN) evitando la respuesta inmunitaria contra el virus (Hilgenfeld, 2016; Song et al., 2016; Watterson et al., 2016; Y. Wu et al., 2017; Xia et al., 2018; Puerta-Guardo et al., 2019; Ci et al., 2020).

- NS2A: NS2A es una proteína que se encuentra anclada en la membrana del RE. NS2A recluta el material genético y el complejo de envoltura prM/E en el sitio de ensamblaje del virión, así como también tiene un papel en la remodelación de las membranas durante el ensamblaje, mostrando un papel fundamental en este paso del ciclo viral. Asimismo, se ha descrito su papel en la replicación viral, en la evasión del sistema inmunitario y en la patogénesis, degradando proteínas adherentes de unión y como consecuencia impidiendo la neurogénesis cortical en mamíferos (J. Y. Leung et al., 2008; K.-J. Yoon et al., 2017; Márquez-Jurado et al., 2018; Xia et al., 2018; Ngueyen et al., 2019; X. Zhang, Xie, Xia, et al., 2019; X. Zhang, Xie, Zou, et al., 2019).
- NS2B: al igual que NS2A, NS2B es una proteína transmembrana que se encuentra en el RE. Actúa como factor para reclutar a NS3 al RE y para que el dominio proteasa de NS3 pueda ejecutar su actividad catalítica. Está compuesto por tres partes: el extremo N-terminal, una región central hidrofílica y el extremo C-terminal, siendo la región hidrofílica la responsable de su actividad como cofactor de NS3 (D. Leung et al., 2001; Xing et al., 2020).
- NS3: NS3 junto a NS5 son las únicas proteínas no estructurales no asociadas a membrana. En este caso NS3 de forma natural se encuentra en la mitocondria, por lo que necesita el cofactor NS2B para localizarse en el RE, en el

compartimento de replicación donde lleva a cabo su función. Está formada por dos dominios con diferente actividad enzimática, el dominio proteasa en su extremo N-terminal y el dominio helicasa en su extremo C-terminal. Es una proteasa de serina que tras la traducción del RNA viral, NS2B3 corta la poliproteína en diferentes sitios de corte que incluyen las regiones de unión de: C-prM, NS2A-2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4B-NS5 en el lado citosólico del RE. Por otro lado, durante la replicación viral, el dominio helicasa de NS3 es el encargado de separar el dsRNA viral en ssRNA para que actúen como cadenas molde y seguir sintetizando nuevo material genético viral, lo cual ocurre en el compartimento de replicación. En otros flavivirus como el Dengue, NS3 aparte de tener actividad ARN helicasa y serina proteasa, también tiene actividad ARN trifosfatasa en el extremo C-terminal necesaria para comenzar el proceso de “*capping*” del nuevo ARN viral sintetizado (Wengler & Wengler, 1993; H. Li et al., 1999; Benarroch et al., 2004; Selisko et al., 2014; Kang et al., 2017; H. Lee et al., 2017; Majerová et al., 2019; Xing et al., 2020; Knyazhanskaya et al., 2021; Q. Li & Kang, 2021).

- NS4A: NS4A es una proteína asociada a membrana, a la que en diversos flavivirus se ha involucrado en diferentes procesos como la replicación viral, la remodelación de membranas, antagonismo de la respuesta celular del IFN o la inducción de la autofagia (S. Miller et al., 2007; McLean et al., 2011; R. L. Ambrose & Mackenzie, 2015; J. Ma et al., 2018; Klaitong & Smith, 2021).
- NS4B: NS4B es una proteína de membrana involucrada en la replicación viral, la evasión del sistema inmunitario, la desregulación de la célula hospedadora y la remodelación de la membrana del RE (Muñoz-Jordán et al., 2005; Chatel-Chaix et al., 2015; Q. Liang et al., 2016; Y. Wu et al., 2017; Hoffmann et al., 2021; X. Han et al., 2021).
- NS5: NS5 es la proteína no estructural más larga. Consta de dos dominios con diferentes actividades enzimáticas, el extremo N-terminal con actividad metiltransferasa (MTasa) dependiente de S-adenosil metionina (SAM) y el

extremo C-terminal con actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, “RNA dependent RNA polymerase”). Además de tener un papel clave en la replicación viral también es importante en el “capping” y la evasión de la respuesta inmunitaria mediante la supresión del IFN (H. Dong et al., 2014; Best, 2017; B. Wang et al., 2017; B. Zhao et al., 2017; Upadhyay et al., 2017).



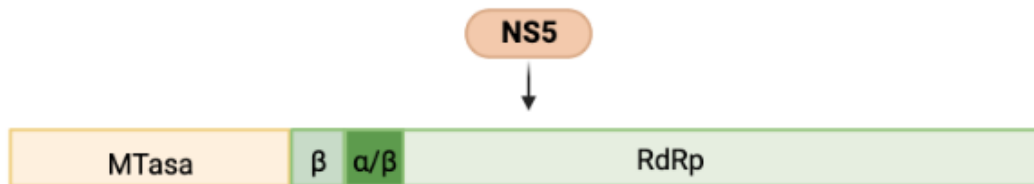
**Figura 16: Estructura del virión maduro infeccioso, material genético y poliproteína del ZIKV.** El virión de ZIKV tiene una estructura icosaédrica y posee en su superficie una Envoltura y en su interior su material genético, una cadena simple de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb. Este ARN monocatenario codifica una poliproteína que se escinde en el retículo endoplasmático por las proteasas virales y/o de la célula hospedadora, liberando tres proteínas estructurales (C, prM y E, recuadros rojos) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, recuadros amarillos). La región 5' no traducida (UTR) es susceptible a una doble metilación específica (recuadro gris izquierdo) llevada a cabo por el dominio metiltransferasa de NS5 con el fin de comportarse como un ARN mensajero y reclutar factores del hospedador necesarios en la traducción y también para evitar el reconocimiento y degradación celular del ARN viral. Los “loops” UTR en el extremo 3' son ARN subgenómicos (sfRNA, recuadro gris derecho) importantes en la evasión de la respuesta inmunitaria. Figura modificada de (Estévez-Herrera et al., 2021).

#### 1.4.2.1. La proteína no estructural 5 (NS5) del ZIKV.

##### 1.4.2.1.1. Estructura y función.

NS5 es la proteína más grande (~900 aminoácidos (aa)) y conservada entre los flavivirus, a nivel de secuencia es un 68% y 66% idéntica a NS5 del virus de la encefalitis

japonesa (JEV; “*Japanese Encephalitis Virus*”) y DENV3 respectivamente (Best, 2017; C. Wang et al., 2017). Está formada por dos dominios, el dominio metiltransferasa (MTasa) que se encuentra en el extremo N-terminal y el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) en su extremo C-terminal como se puede observar en la **Figura 17**.



**Figura 17: Estructura de la proteína viral NS5 de ZIKV.** La polimerasa viral NS5 de ZIKV posee dos dominios funcionales, en el extremo N-terminal se encuentra el dominio MTasa con actividad metiltransferasa y en el extremo C-terminal el dominio RdRp con actividad ARN polimerasa dependiente de ARN. En el inicio del dominio RdRp, se encuentra una secuencia de importe nuclear imprescindible en su localización subcelular nuclear. Figura creada en BioRender.com

Analizando la disposición estructural de ambos dominios se pueden observar diferencias entre ellos. El dominio MTasa posee una estructura clásica de sándwich  $\alpha/\beta/\alpha$ . En el centro encontramos el sitio activo con la tétrada catalítica K61-D146-K182-E218 que se conserva entre los diferentes flavivirus. A la izquierda del sitio catalítico se encuentra el bolsillo de unión a GTP y a la derecha el sitio de unión al cofactor donante de metilos SAM (B. Zhao et al., 2017; B. Wang et al., 2018). NS5 RdRp está formado por tres subdominios de “*Thumb*”, “*Palm*” y “*Fingers*”. El subdominio “*Thumb*” contiene el bucle cebador que parece que promueve la iniciación de la síntesis y su elongación, el subdominio “*Palm*” actúa como centro catalítico y el subdominio “*Fingers*” regula la actividad RdRp *de novo*. Los tres subdominios forman en conjunto tres túneles para el acceso del ARN molde, la entrada de nucleótidos y la salida del ARN sintetizado. Además, NS5-RdRp contiene dos iones de zinc, cuya función no está definida, pero se cree que podría estabilizar el pliegue estructural (Yap et al., 2007; Selisko et al., 2012; Selisko et al., 2014; Surana et al., 2014; B. Zhao et al., 2017; B. Wang et al., 2018).

NS5-RdRp utiliza la cadena de +ssRNA viral como molde de síntesis de nuevo material genético. La síntesis es mediante un mecanismo *de novo*, es decir, comienza desde el extremo 3' sin necesidad de utilizar un “*primer*”, produciendo la cadena complementaria -ssRNA y obteniendo como resultado una doble cadena de ARN



(dsRNA) (Ackermann & Padmanabhan, 2001; Kao et al., 2001; Knyazhanskaya et al., 2021). A continuación, NS3 con su actividad helicasa separa las dos hebras de ARN, permitiendo actuar otra vez a NS5. NS5-RdRp sintetizará de nuevo otra cadena de ARN, pero en este caso utilizará -ssRNA como molde generando un nuevo dsRNA que servirá para generar nuevas copias de +ssRNA. Se ha descrito una asimetría en la síntesis de ARN de los flavivirus, en la que se genera un mayor número de copias de +ssRNA que de -ssRNA (Knyazhanskaya et al., 2021).

La nueva cadena de ARN viral se debe metilar y formar la caperuza tipo 1 ( $7^{\text{Me}}\text{GpppA}_{2'\text{OMe}}$ ) en el extremo 5' para evitar su degradación por las 5' exoribonucleasas y para mejorar el inicio de la traducción. El dominio MTasa de NS5 actúa como N-7 guanina metiltransferasa y 2'-O metiltransferasa (Ray et al., 2006; Egloff et al., 2007; Issur et al., 2009; B. Wang et al., 2018; Knyazhanskaya et al., 2021). Para ello, de nuevo vuelve a actuar en conjunto con NS3. La NS3 hidroliza el extremo 5'-trifosfato con su actividad trifosfatasa generando un extremo 5'-difosfato (H. Li et al., 1999; Bartelma & Padmanabhan, 2002). NS5 transfiere GMP al extremo 5'-difosfato del ARN actuando como una guanililtransferasa (GTasa) (Issur et al., 2009; Jia et al., 2022). Tras lo cual, el dominio MTasa actúa como una N-7 guanina metiltransferasa, transfiriendo un grupo metilo desde el cofactor SAM al ARN con caperuza en la posición N7 de la guanina. Para finalizar, actúa como una 2'-O metiltransferasa, transfiriendo un grupo metilo desde SAM a la ribosa de la posición 2'-OH del primer nucleótido de ARN (Ray et al., 2006; B. Wang et al., 2018).

Además de tener un papel clave en la replicación y “*capping*” del ARN viral, también interviene en la evasión del sistema inmunitario.

#### **1.4.2.1.2. Localización subcelular de NS5 de ZIKV en la infección.**

Aunque NS5 lleva a cabo las actividades de replicación y “*capping*” en los compartimentos de replicación que se encuentran en el lado citoplasmático del RE, NS5 de ZIKV se localiza predominantemente en el núcleo (Buckley et al., 1992; Pryor et al.,

2007; W. Hou et al., 2017). Como se observa en la **Figura 17**, en la región N-terminal del dominio RdRp se halla una secuencia bipartita de importe nuclear (NLS, “*Nuclear Localization Sequence*”),  $\beta$ NLS y  $\alpha/\beta$ NLS, que define su localización a nivel nuclear mayoritariamente (C. Wang et al., 2017; W. Hou et al., 2017; Ji & Luo, 2020).

Estudios recientes, han demostrado que las secuencias NLS de NS5 de ZIKV y DENV interaccionan con mayor afinidad a la importina  $\alpha$  en comparación a la importina  $\beta$ 1, transportando activamente a NS5 hacia el núcleo a través de los complejos de poro nuclear (Pryor et al., 2007; Ng et al., 2019). Pero ambas secuencias,  $\beta$ NLS y  $\alpha/\beta$ NLS, son necesarias para el eficiente importe nuclear (Ng et al., 2019), siendo los aa 11-90 y 370-406 responsables de la localización celular y la lisina de la posición 390 (K390), las argininas de las posiciones 391 y 393 (R391 y R393) y la prolina de la posición 392 (P392) residuos claves en dicho importe (Z. Zhao et al., 2021). Así como también, se ha descrito en la proteína NS5 de ZIKV un sitio de interacción con SUMO (SIM, “SUMO-Interacting Motifs”) que también es necesario en su localización nuclear (Conde et al., 2020). Además, se ha observado que el importe de NS5 al núcleo es clave en su estabilidad, ya que, si se impide su entrada al núcleo, NS5 se degrada y se inhibe la replicación viral (Ji & Luo, 2020).

También se ha relacionado en NS5 de DENV el estado de fosforilación de los residuos de serina y treonina con su localización celular, NS5 hiperfosforilado se encuentra en el núcleo, mientras que NS5 hipofosforilado se sitúa en el citoplasma. Además, en este último estado de fosforilación puede interaccionar con NS3 a través de los dominios C-terminal de NS3 y N-terminal de NS5, en concreto, en la misma región con la que NS5 interacciona con la importina  $\beta$  y siendo el residuo asparagina de la posición 5070 (N570) de NS3 y la lisina de la posición 330 (K330) de NS5 claves en la interacción entre ambas proteínas (Kapoor et al., 1995; Johansson et al., 2001; Brooks et al., 2002; Tay et al., 2016).

A nivel de perfil de distribución, al contrario que otros flavivirus como DENV en el que se encuentra a NS5 con un patrón disperso confinado al compartimento nuclear, el NS5 de ZIKV se sitúa formando estructuras discretas punteadas o cuerpos nucleares (NB,

“*Nuclear Bodies*”) (Grant et al., 2016; W. Hou et al., 2017; Conde et al., 2020). En un estudio de Ng et al., describieron con mayor resolución este nivel de organización, como estructuras prominentes carentes de membrana con forma de anillo donde se encuentra mayor concentración de NS5 en los extremos y mucha menor concentración en el medio, y que además aumentan el tamaño con respecto al tiempo de infección. Así como también demostraron su colocalización con la importina  $\alpha$  en los NB (Ng et al., 2019; Conde et al., 2020). Todavía no se sabe exactamente qué proteínas celulares forman parte de los NB ni la función que lleva a cabo NS5 en ellos. En general, los NB son subcompartimentos que encontramos dentro de regiones de la intercromatina del nucleoplasma, y existen diferentes NB como el nucléolo, los cuerpos de Cajal, los SUMO NB o los PML NB (PML, “*Promyelocytic Leukemia Protein*”) (Conde et al., 2020). Se han relacionado estas estructuras donde se encuentra NS5 con los cuerpos de Cajal, siendo NS5 la causa de la modificación de estos NB relacionados con la formación de partículas de ribonucleoproteína involucradas en el “*splicing*”, la biogénesis de los ribosomas y el mantenimiento de los telómeros (Machyna et al., 2013; Coyaud et al., 2018). NS5 reduce el nivel del factor de “*splicing*” SC35 y promueve su translocación del núcleo al citoplasma, sugiriendo que NS5 podría estar jugando un papel en el “*splicing*” genético en la célula hospedadora (de Maio et al., 2016; W. Hou et al., 2017). También se ha descrito la localización de NS5 en estos cuerpos nucleares como un paso clave en la modulación del sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria de diferentes células susceptibles a la infección por ZIKV (M. J. A. Tan et al., 2019; Ng et al., 2019; Conde et al., 2020).

### **1.4.3. Ciclo de vida del ZIKV.**

La proteína E del virión maduro de ZIKV reconoce y se une al receptor celular induciendo la endocitosis mediada por clatrina del virión (Lindenbach & Rice, 2003; Hackett & Cherry, 2018). La identificación del receptor celular es un punto controvertido. Se han descrito diversas proteínas de la superficie celular como posibles receptores; los receptores de la familia tirosina-quinasa AXL, TYRO3 y MER o el receptor de lectina tipo C DS-SIGN entre otros (Lindenbach & Rice, 2003; Perera-Lecoin et al., 2013; Hamel et al., 2015; Nowakowski et al., 2016; F. Li et al., 2017; Meertens et al.,

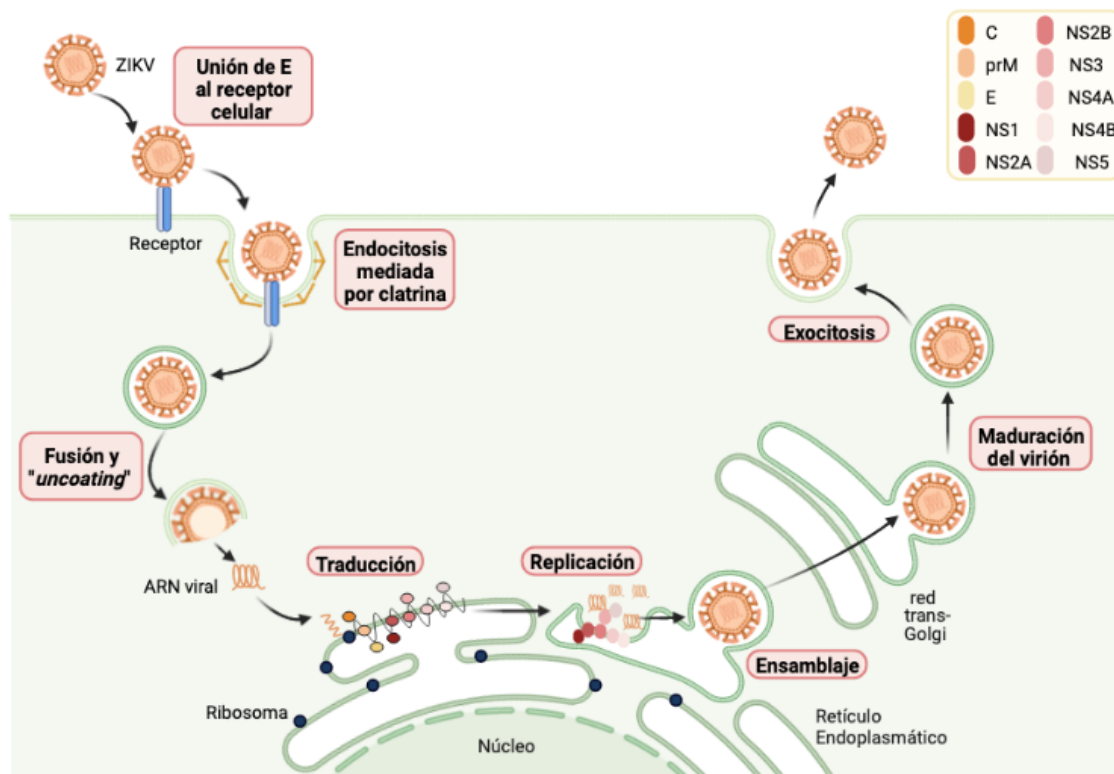
2017; Z.-Y. Wang et al., 2017; Laureti et al., 2018; Persaud et al., 2018; M. Guo et al., 2021).

Tras la endocitosis, debido al bajo pH del endosoma, la proteína E sufre un cambio conformacional pasando de tener una estructura de dímero a trímero con disposición en forma de horquilla, lo cual expone el bucle de fusión e induce la fusión de la membrana viral y la membrana endosomal permitiendo el “*uncoating*” del virión y la liberación del ARN al citoplasma (Lindenbach & Rice, 2003; Bressanelli et al., 2004; Stiasny et al., 2007; Smit et al., 2011; Carro & Cherry, 2020).

Una vez se encuentra el ARN viral en el citoplasma, se traduce por los ribosomas celulares en una poliproteína viral que se encuentra integrada en la membrana del RE y que será cortada por las proteasas celulares y viral NS2B3 generando las diferentes proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales remodelan la membrana del RE para formar los sitios de replicación viral donde se llevará a cabo la replicación del ARN viral gracias también a las proteínas no estructurales que junto a otras proteínas celulares forman el complejo de replicación (Klema et al., 2015; Barrows et al., 2018; Hu & Sun, 2019; M. Guo et al., 2021; Knyazhanskaya et al., 2021). Es necesaria la localización de las proteínas no estructurales en estos complejos de replicación para que se lleve a cabo la replicación del ARN viral. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son proteínas integrales del RE, NS1 se localiza en el lumen del RE y NS3 y NS5 al localizarse en el lado citoplasmático deben ser reclutadas a estos complejos de replicación (X. Xie et al., 2013; Klema et al., 2015; Barrows et al., 2018; Xing et al., 2020).

A continuación, se lleva a cabo el proceso de ensamblaje en el que la proteína prM interacciona con la proteína E en el RE, la proteína C y el nuevo ARN sintetizado se empaquetan en el lumen del RE formando la nucleocápside que se envuelve en una bicapa lipídica que contiene las proteínas virales prM y E generando los viriones inmaduros (Kaufmann & Rossmann, 2011; Nambala & Su, 2018; Shang et al., 2018; Hu & Sun, 2019). Estos viriones inmaduros son transportados a través de la red trans-Golgi donde debido al cambio de pH se expone el sitio de corte de la proteína prM que será

procesado por la proteasa celular furina formando la proteína M y el péptido pr, y se origina un cambio conformacional en la envoltura viral que pasa de una forma trimérica (prM-E) a una forma de heterodímeros (M-E) ocasionando la maduración de los viriones (Perera et al., 2008; Yu et al., 2008; Pierson & Diamond, 2012; Shang et al., 2018; Hu & Sun, 2019). Por último, los viriones maduros son liberados de la célula mediante exocitosis (Kaufmann & Rossmann, 2011; B. Wang et al., 2018; Hu & Sun, 2019).



**Figura 18: Ciclo viral de ZIKV.** El ZIKV infecta y entra en la célula a través de la unión de la proteína viral E (Envoltura) y el receptor celular induciendo la endocitosis mediada por clatrina. Como consecuencia del bajo pH del endosoma, se produce la fusión de la membrana viral y de la membrana del endosoma, generando el “uncoating” del virión y liberando el material genético viral al citoplasma. Tras lo cual, se traduce el ARN viral en los ribosomas celulares generando una poliproteína que se integra en la membrana del retículo endoplasmático que será cortada por la proteasa viral NS2B3 y las proteasas celulares en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Las proteínas no estructurales remodelan la membrana del retículo endoplasmático para formar el sitio donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral gracias a la actuación en conjunto de diferentes proteínas virales. Posteriormente, el nuevo ARN y la proteína viral C forman la nucleocápside en el lumen del retículo endoplasmático, que será envuelta en una bicapa lipídica en la que se encuentran las proteínas prM y E, creando los viriones inmaduros. Estos viriones inmaduros se transportan a través de la red trans-Golgi y con el cambio del pH la proteasa celular furina corta la proteína viral prM y la proteína E sufre un cambio conformacional, produciendo la maduración de los viriones. Por último, los viriones maduros son liberados de la célula mediante exocitosis. Figura creada en Biorender.com.

#### **1.4.4. Modulación de la respuesta inmunitaria por el virus ZIKA.**

##### **1.4.4.1. Respuesta inmunitaria innata antiviral: Interferón.**

Uno de los pasos clave en la respuesta inmunitaria innata antiviral es la producción de IFN y la consecuente activación de la cascada de señalización del IFN para activar los genes estimulados por IFN (ISG, “*IFN-Stimulated Genes*”) que generan un ambiente antiviral en la célula hospedadora (Chang et al., 2006; Becquart et al., 2010; Jiang et al., 2010; Crosse et al., 2018).

Existen tres tipos de IFN en base a sus características genéticas, estructurales y funcionales, y el tipo de receptor que utilizan (S. Li et al., 2018; Lazear et al., 2019): IFN tipo I que incluye diferentes subtipos IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  e IFN $\omega$  (Platanias, 2005; A. J. Lee & Ashkar, 2018), IFN tipo II con un solo subtipo IFN $\gamma$  (Platanias, 2005; A. J. Lee & Ashkar, 2018) e IFN tipo III también con un solo subtipo IFN $\lambda$  (Wack et al., 2015; Stanifer et al., 2020). Mientras que el IFN I se produce en la mayoría de las células, el IFN II se genera sobre todo en células del sistema inmunitario y el IFN III en las células epiteliales y células dendríticas (Lazear, Nice, et al., 2015; McNab et al., 2015; Wack et al., 2015). Sin embargo, las diferentes clases de IFN comparten la cascada de señalización y sus componentes.

El mecanismo de producción y señalización de IFN I comienza con el reconocimiento de los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP, “*Pathogen-Associated Molecular Patterns*”) por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, “*Pattern-Recognition Receptors*”) y su consecuente activación (Takeuchi & Akira, 2010; Suthar et al., 2013; Serman & Gack, 2019). En el caso concreto de la detección de flavivirus, se han descrito al menos tres clases principales de PRRs (Serman & Gack, 2019): los receptores de tipo Toll o “*Toll-Like Receptors*”, TLR3 y TLR7 que reconocen el ARN viral en el interior del endosoma (Sabouri et al., 2014; Vanwalscappel et al., 2018; Serman & Gack, 2019), los receptores parecidos al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) (RLR, “*retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*”), como el propio RIG-I o la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5, “*Melanoma*

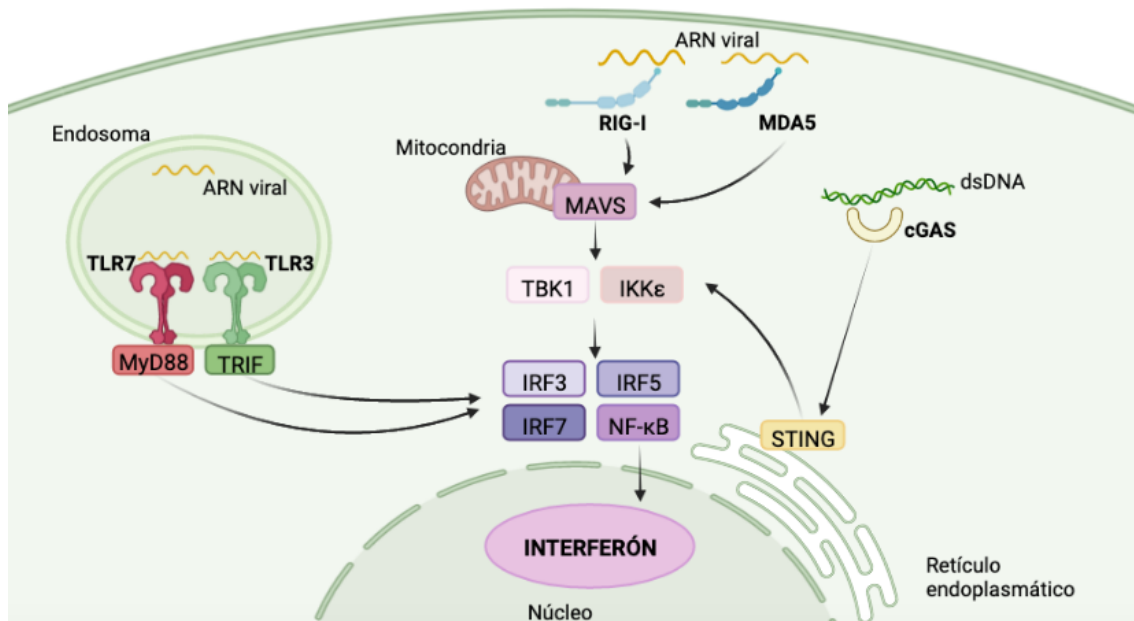
*differentiation-associated protein 5*) que reconocen el ARN viral en el citoplasma (Suthar et al., 2013; J. Ma et al., 2018; Serman & Gack, 2019), y, por último, la GMP-AMP sintetasa cíclica (cGAS) que detecta el dsDNA que se deslocaliza durante la infección (B. Sun et al., 2017; Y. Zheng et al., 2018; Serman & Gack, 2019).

Una vez activados los PRRs, RIG-I y MDA5 se translocan desde el citosol hacia la mitocondria y las membranas asociadas a la mitocondria para interactuar y activar, a través de sus dominios CARD (*"Caspase Activation and Recruitment Domains"*), la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, *"Mitochondrial Antiviral Signaling"*) que envía una señal *"downstream"* para activar TBK1 (*"TANK-Binding Kinase 1"*) (Loo & Gale, 2011; Chiang et al., 2014; Serman & Gack, 2019). TBK1, que junto con el inhibidor de NF- $\kappa$ B quinasa  $\epsilon$ , IKK $\epsilon$ , son necesarios para la fosforilación y activación de los factores de transcripción IRF3, IRF5, IRF7 y NF- $\kappa$ B (Loo & Gale, 2011; L. J. Lee et al., 2021). Dichos factores de transcripción activados se translocan del citoplasma al núcleo para producir IFN (Estévez-Herrera et al., 2021; L. J. Lee et al., 2021).

Por otro lado, el receptor endosomal TLR3 señala la proteína adaptadora TRIF que activa los factores de transcripción IRF3, IRF7 y NF- $\kappa$ B, y el receptor endosomal TLR7 señala la proteína adaptadora MyD88 que activa IRF7 y NF- $\kappa$ B para producir IFN (Kawasaki & Kawai, 2014; L. J. Lee et al., 2021).

Además, los PRR aparte de reconocer el ARN viral, también pueden reconocer el ADN mitocondrial que puede translocar debido a la infección por ZIKV (Ledur et al., 2020). El ADN mitocondrial es reconocido por cGAS que actuará sobre el estimulador intermediario asociado al RE de los genes del IFN, STING, que activará TBK1 y IKK $\epsilon$ , que a su vez fosforilarán IRF3/IRF7 activando NF- $\kappa$ B para producir IFN I (L. Sun et al., 2013; Cai et al., 2014; Y. Zheng et al., 2018; Estévez-Herrera et al., 2021).





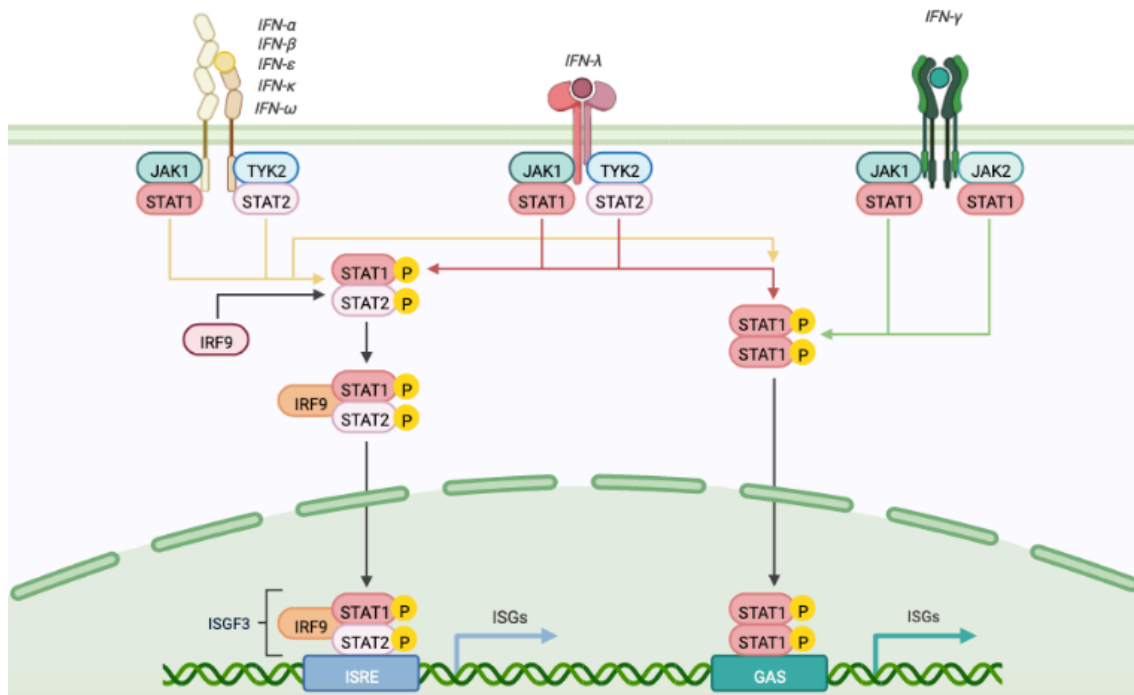
**Figura 19: Producción de Interferón (IFN) tras la infección por ZIKV.** El ARN viral de ZIKV puede ser reconocido por los receptores endosomales TLR3 y TLR7 activando los factores de transcripción IRF3, IRF7 y NF-κB que intervienen en la producción de IFN. También puede ser reconocido en el citoplasma por los receptores celulares RIG-I y MDA5, que se activan por el reconocimiento y se translocan a la mitocondria donde activan la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), que a su vez activa TBK1. TBK1 y IKKε intervienen en la fosforilación de IRF3, IRF5, IRF7 y NF-κB, los cuales una vez fosforilados, se translocan al núcleo con el fin de producir IFN. El ZIKV al infectar, puede producir la translocación de ADN mitocondrial que será reconocido por cGAS, que actuará sobre STING, un estimulador intermediario de los genes del IFN que se encuentra asociado al RE. STING activará TBK1 y IKKε promoviendo la cascada de producción de IFN. Figura creada en Biorender.com.

Una vez producido el IFN, el IFN $\alpha/\beta$  se unirá al receptor del IFN de la propia célula que lo produce o de células vecinas, actuando de manera autocrina y paracrina (Crosse et al., 2018; Serman & Gack, 2019). El receptor está formado por dos subunidades dimerizadas IFNAR1 e IFNAR2. Al unirse al IFN, se activa la quinasa 1 Janus (JAK1) y la tirosina quinasa 2 (TYK2) que fosforilan las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción STAT1 y STAT2, que al fosforilarse, forman un heterodímero que se asocia al factor regulatorio del IFN, IRF9, formando el factor de transcripción denominado ISGF-3 que se transloca al núcleo y permite la activación de elementos de la respuesta estimulada por IFN (ISRE, “*Interferon-sensitive response element*”) e induce la expresión de los genes inducibles por IFN (ISG) que actúan restringiendo el ciclo viral (de Veer et al., 2001; Chevaliez & Pawlotsky, 2009; Schneider et al., 2014; Crosse et al., 2018; L. J. Lee et al., 2021).



En el caso del IFN II (IFN $\gamma$ ) utiliza otro receptor de superficie celular que también está compuesto por dos subunidades, IFNGR1 e IFNGR2 que están asociados a JAK1 y JAK2 respectivamente, en vez de a JAK 1 y TYK2 como el receptor de IFN I. Otra diferencia es que con la activación del receptor por su unión a IFN $\gamma$  y la subsecuente activación de JAK1 y 2, se induce la formación de un homodímero entre STAT1 y STAT1 (en vez de un heterodímero formado por STAT1 y STAT2), que se transloca desde el citoplasma hacia el núcleo para unirse a los elementos GAS (“*gamma interferon activation sites*” o sitios activados por IFN $\gamma$ ) que se encuentran en los promotores de algunos ISG. Este proceso de homodimerización entre STAT1 y STAT1 y su consecuente señalización también ocurre en la vía del IFN I y III, pero en este caso es único, no se produce el complejo STAT1-STAT2 como en las otras clases de IFN (Platanias, 2005).

Por último, en el caso del IFN III (IFN $\lambda$ ) aunque utiliza un receptor diferente al IFN I, la cascada de señalización es igual por lo que inducen respuestas transcripcionales similares. El receptor del IFN $\lambda$  está formado por un heterodímero que se compone de dos cadenas, una cadena de alta afinidad IFN- $\lambda$ R1 y una cadena de baja afinidad IL-10R2 (Wack et al., 2015).



**Figura 20: Vía de señalización del Interferón (IFN) tras la infección por ZIKV.** Existen tres tipos de IFN, IFN I con 5 subtipos, IFN II o IFN $\gamma$  e IFN III o IFN $\lambda$ . El IFN I y III se une al receptor y activa JAK1 y TYK2, que fosforilan las proteínas activadoras de la transcripción STAT1 y STAT2 que forman un complejo con IRF9 denominado ISGF-3, que se transloca al núcleo activando los elementos de la respuesta estimulada por IFN (ISRE) y la expresión de los genes inducibles por IFN (ISG). El IFN II se une al receptor y activa JAK1 y JAK2 promoviendo en este caso la formación de un homodímero formado por STAT1, que se transloca al núcleo y se une a los elementos GAS de los promotores de algunos ISG. Esta homodimerización de STAT1 también se puede producir en la vía del IFN I y III. Figura creada en Biorender.com.

Pero ZIKV ha desarrollado mecanismos para modificar la formación y señalización de las diferentes clases de IFN. Por un lado, se ha descrito que ZIKV inhibe la ruta del IFN I y III (A. Kumar et al., 2016; Chaudhary et al., 2017). Cabe destacar, que el IFN III, como se ha expuesto anteriormente, se produce sobre todo en células epiteliales y el ZIKV debe cruzar esta barrera de células epiteliales para infectar células del cerebro del feto, por lo que la secreción de IFN III puede proteger de la infección de la placenta y de las células neuronales fetales (Lazear, Daniels, et al., 2015; Lazear, Nice, et al., 2015; Bayer et al., 2016). Por otro lado, se ha observado que la producción y señalización de IFN II mejora la replicación de ZIKV en las líneas celulares de placenta y glioblastoma (Chaudhary et al., 2017), aunque existe otro estudio que demuestra un efecto negativo del IFN II sobre ZIKV (Hamel et al., 2015), por lo que el efecto del IFN II sobre ZIKV puede ser específico del tipo celular (Chaudhary et al., 2017).

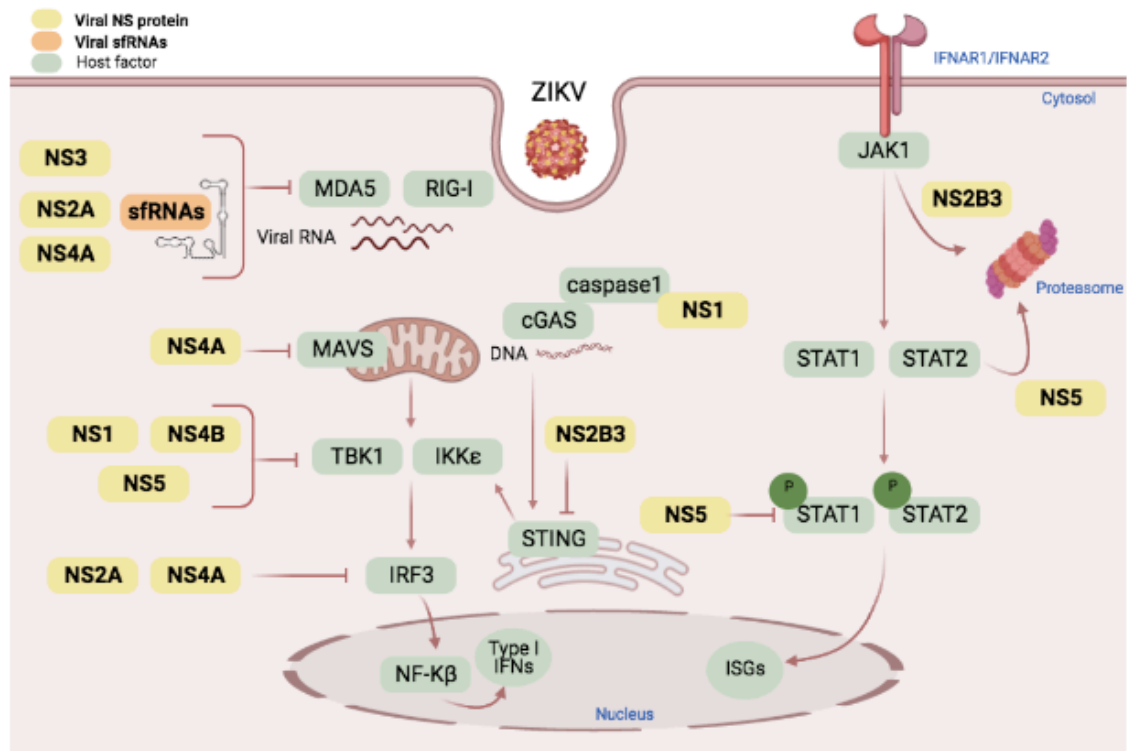
#### 1.4.4.2. Modulación de la vía del Interferón por el virus ZIKA.

ZIKV actúa mediante diferentes mecanismos y sobre diferentes pasos tanto a nivel de producción de interferón como de su señalización para inhibir su función antiviral.

A nivel de producción de interferón, por un lado, el ARN viral de ZIKV sufre un proceso de “*capping*” para evitar ser reconocido por los PRR (H. Dong et al., 2014; Bradrick, 2017). Además, el ARN viral puede ser procesado por la 5’-3’ exoribonucleasa (XRN-1) del hospedador generando productos subgenómicos de ARN, concretamente de la región UTR del extremo 3’, denominados sRNA (“*Subgenomic Flavivirus RNA*”), los cuales se ha visto que inhiben RIG-I y MDA5 (Pijlman et al., 2008; Donald et al., 2016; Göertz et al., 2018).

Por otro lado, diversas proteínas no estructurales actúan sobre diferentes factores celulares que intervienen en la producción de IFN modificándolos postraduccionalmente, compitiendo con interacciones proteicas o señalándolos para su degradación (Miorin et al., 2017; Thurmond et al., 2018). Por ejemplo, NS1 promueve la degradación de cGAS mediante la estabilización de la caspasa 1 (Y. Zheng et al., 2018), y también inhibe la fosforilación de TBK1 (Y. Wu et al., 2017). Además, se ha descrito una mutación de NS1 en el linaje asiático de ZIKV que facilita su interacción con TBK1, disminuyendo su fosforilación e inhibiendo así la producción de IFN $\beta$  (Xia et al., 2018). NS2A “*down-regulate*” RIG-1 y MDA5 e inhibe IRF3 (Ngueyen et al., 2019). NS2B3 corta STING impidiendo la activación de la vía cGAS/STING (Q. Ding et al., 2018). NS3 se une a la proteína 14-3-3 impidiendo la translocación de RIG-I y MDA5 a la mitocondria (Riedl et al., 2019). NS4A “*down-regulate*” RIG-1 y MDA5 (Ngueyen et al., 2019), se une al dominio CARD de MAVS impidiendo su unión a RIG-I y MDA5 (J. Ma et al., 2018; Hu et al., 2019) e interviene en la fosforilación de IRF3 (A. Kumar et al., 2016; Xia et al., 2018). Y NS4B interacciona con TBK1 impidiendo su oligomerización y fosforilación (Y. Wu et al., 2017).

A nivel de señalización, NS2B3 interacciona con JAK1 para su degradación vía proteasoma (Y. Wu et al., 2017).



**Figura 21: Modulación de la vía del IFN por ZIKV.** En esta imagen se muestra las interacciones de los factores celulares (recuadros verdes) que intervienen en la vía del IFN con las proteínas no estructurales virales (recuadros amarillos) y los sfRNA (sfRNA1 y 2, recuadro naranja). Los códigos de colores se indican arriba a la izquierda. Figura extraída de (Estévez-Herrera et al., 2021).

#### 1.4.4.3. Función de la proteína NS5 en la modulación de la vía del IFN.

NS5 es la proteína estructural con mayor importancia en el antagonismo del IFN, utilizando diferentes mecanismos para inhibir la vía de señalización JAK-STAT tanto en función de la especie de *Flavivirus* como de la cepa de la misma especie (Tripathi et al., 2017; Thurmond et al., 2018).

A nivel de producción de IFN, una de las principales funciones de NS5 durante el ciclo celular es el “capping” del ARN viral para evitar ser reconocido por los PRR (H. Dong et al., 2014). Además, es capaz de unirse a RIG-I a través de su dominio MTasa, inhibiendo su K-63 poliubiquitinación e impidiendo así la fosforilación y translocación de IRF3 (A. Li et al., 2020). También actúa en otros puntos, NS5 es capaz de inhibir la producción de IFN-I interaccionando con IRF3 y NF-κB (Grant et al., 2016; A. Kumar et al., 2016; Xia et al., 2018; Z. Zhao et al., 2021), así como también interacciona con IKKε

inhibiendo la fosforilación de IRF3 (Lundberg et al., 2019) e inhibe la activación de TBK-1 inhibiendo de nuevo la fosforilación de IRF3 (S. Lin et al., 2019).

A nivel de señalización de IFN, NS5 es capaz de inhibir la fosforilación de STAT1 (Hertzog et al., 2018). Pero su papel más importante es en la degradación de STAT2; NS5 se une a STAT2 a través de su dominio MTasa y promueve su degradación vía proteasoma en humanos, pero no en ratones. Este hecho explicaría la necesidad de una deficiencia de IFN para inducir la enfermedad de ZIKV en ratones (Grant et al., 2016; A. Kumar et al., 2016; Hertzog et al., 2018; L. J. Lee et al., 2021). La degradación de STAT2 puede promover la formación de homodímeros STAT1-STAT1 y como consecuencia la activación de genes estimulados por IFN $\gamma$ , como CXCL10 que se ha relacionado con el reclutamiento de células T CD8+ hacia el SNC durante la infección por WNV con el fin de disminuir la concentración viral en las neuronas (Klein et al., 2005; Hamel et al., 2015; Chaudhary et al., 2017), y que, por otro lado, también se ha relacionado con daño neuronal por apoptosis de neuronas fetales (M. Liu et al., 2011).

Aunque su mayor función en la evasión de la respuesta inmunitaria es antagonizar la respuesta de IFN-I, se ha observado que NS5 de ZIKV activa la respuesta transcripcional proinflamatoria en algunas células como las células neuronales y placentarias, pero no en otras como las células hepáticas (Chaudhary et al., 2017; Lum et al., 2017; Lima et al., 2019; M. J. A. Tan et al., 2019; Ng et al., 2019). Una activación descontrolada de la respuesta inmunitaria innata puede conllevar a la inflamación, autofagia y apoptosis celular, procesos que ayudarían a ZIKV a diseminarse y a generar los daños citopáticos característicos del virus en las células neuronales y de la placenta (Hamel et al., 2015; J. Dang et al., 2016; Frumence et al., 2016; Q. Liang et al., 2016; Chaudhary et al., 2017).

En relación con la inhibición de la respuesta del IFN, se ha descrito que la localización nuclear de NS5 de ZIKV juega un papel importante en la inhibición de la transcripción del IFN-I (Ng et al., 2019; Conde et al., 2020; Z. Zhao et al., 2021). NS5 de ZIKV se localiza mayoritariamente en el núcleo con un patrón punteado en los diferentes tipos celulares durante la infección, por lo que se cree que la localización celular y el

patrón es independiente del tipo celular, aunque sí se diferencia su función en relación con el tipo celular (Z. Zhao et al., 2021).

Ng *et al.* observaron el mismo patrón nucleado tanto en la línea celular neuronal LN-299 como en la línea celular hepática Huh-7, pero sólo activa la respuesta transcripcional proinflamatoria en la línea celular neuronal. Así como también obtuvieron resultados que sugieren que la localización nuclear podría jugar un papel parcial en dicha activación (Ng et al., 2019). Además, anteriormente ya se había descrito la activación de la respuesta inflamatoria en células neuronales, placentarias, oculares y de los órganos reproductores (Chaudhary et al., 2017; Lum et al., 2017; Lima et al., 2019; M. J. A. Tan et al., 2019; Simonin et al., 2019). Por lo que se cree, que estas estructuras nucleares donde se encuentra NS5 pueden modular la respuesta inmunitaria de manera diferente en función del tipo celular infectado (M. J. A. Tan et al., 2019).

Por otro lado, Conde *et al.* observaron una relación entre los NB formados por NS5 de ZIKV y la inhibición de la transcripción de ISG en células endoteliales microvasculares del cerebro (Conde et al., 2020). Este tipo celular normalmente actúa como barrera entre la sangre y el cerebro, evitando la infección viral de las neuronas (Sweeney et al., 2019), pero ZIKV es capaz de infectarlas sin causar citopatología, al contrario que en otros tipos celulares como las neuronas (Miner & Diamond, 2017; Mladinich et al., 2017). En las células endoteliales microvasculares del cerebro no infectadas, los SUMO NB están compuestos por proteínas ricas en sumoilaciones SUMO-1 y colocalizan con PML y STAT2, mejorando la inmunidad innata (Zhong et al., 2000; Shen et al., 2006; Everett et al., 2013; Conde et al., 2020). Los PML regulan de forma positiva la respuesta ISG uniéndose a STAT2 promoviendo su acumulación, así como también están involucrados en la restricción del crecimiento celular y la muerte celular programada (A. Guo et al., 2000; Scherer & Stamminger, 2016; Conde et al., 2020). Pero, NS5 se sumoila en los residuos de lisina y forma parte de estos NB colocalizando con SUMO-1 y STAT2, e impidiendo así la formación del complejo STAT2-PML y promoviendo la degradación de PML, regulando transcripcionalmente el ciclo celular y la respuesta ISG. Además, identificaron la sumoilación de la lisina de la posición 252 (K252) de NS5 como clave en su unión a STAT2 y la consecuente inhibición de la formación de los NB antivirales PML-

STAT2. Todo ello permite que el ZIKV sea capaz de infectar persistentemente las células endoteliales microvasculares del cerebro que en este caso podrían actuar de manera inversa a su función de barrera de defensa siendo una fuente continua para la infección viral neuronal (Conde et al., 2020).

### **1.5. Respuesta inmunitaria frente a virus ARN: factores de restricción.**

El sistema inmunitario de los mamíferos posee dos tipos de respuesta inmunitaria: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. La respuesta inmunitaria innata es la primera defensa del organismo frente a patógenos y es mediada por las células fagocíticas. Mientras que la respuesta inmunitaria adaptativa es una respuesta más tardía en la que se produce la eliminación del patógeno y la formación de la memoria inmunológica (Akira et al., 2006; Madigan et al., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, durante la respuesta inmunitaria innata frente a la infección por virus ARN, los PAMP son reconocidos por los receptores de PRR (Takeuchi & Akira, 2010; Suthar et al., 2013; Serman & Gack, 2019). En el caso de los virus de ARN, destacan tres tipos de PRR: los TLR, RLR y receptores similares a los que contienen el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR, “nucleotide-binding oligomerization domain-containing-like receptors”) (Jensen & Thomsen, 2012).

Los TLR, son los PRR más estudiados. Existen 12 receptores de este tipo en mamíferos (10 en humanos) y reconocen una amplia variabilidad de PAMP relacionados tanto con virus como con bacterias, hongos y parásitos. Por ejemplo, TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lípidos, mientras TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. En concreto, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8 han sido asociados al reconocimiento de dsRNA, ssRNA y glicoproteínas de superficie de virus ARN. Todos ellos se expresan en diversas células inmunitarias como células dendríticas, macrófagos, algunos tipos de células T y células B, así como en células no inmunitarias (células epiteliales y fibroblastos). A nivel celular, se encuentran mayoritariamente en la superficie celular, aunque algunos tipos como TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan casi exclusivamente en compartimentos

intracelulares como endosomas, lisosomas o endolisosomas (Akira et al., 2006; Jensen & Thomsen, 2012).

Los RLR son helicasas que poseen un dominio CARD en el extremo N-terminal clave en la señalización (Kato et al., 2006; Saito et al., 2007). Están conformados por tres receptores: RIG-I, MDA5 y LPG2 (*"Laboratory of Genetics and Physiology 2"*). RIG-I y MDA5 actúan como reguladores positivos, reconociendo el ARN viral a través de sus dominios helicasas y señalizando *"down-stream"* mediante CARD. En el otro lado, se encuentra LPG2 que no contiene dominio CARD y actúa como un regulador negativo interfiriendo en el reconocimiento viral por parte de RIG-I y MDA5 (Yoneyama et al., 2005; Rehwinkel & Gack, 2020). Este tipo de receptores se encuentran a nivel citoplasmático reconociendo dsRNA en muchos tipos celulares (Yoneyama et al., 2004; Jensen & Thomsen, 2012; Rehwinkel & Gack, 2020).

Los NLR son proteínas citosólicas que regulan la respuesta inflamatoria en mamíferos además de actuar como receptores antivirales. El reconocimiento del componente viral por parte de los NLR induce su oligomerización y posterior cascada de señalización *"down-stream"* en la que se encuentran NF- $\kappa$ B y caspasas proinflamatorias. Se han identificado 22 receptores NLR en humanos (Fritz et al., 2006; Kuenzel et al., 2010).

La señalización *"down-stream"* llevada a cabo por estos receptores celulares, conlleva a la transcripción de genes que codifican citocinas proinflamatorias, quimiocinas e interferón (IFN), generando así un ambiente antiviral tanto en la propia célula como en las células vecinas (Takeuchi & Akira, 2010; Jensen & Thomsen, 2012). Favoreciendo la respuesta inmunitaria innata y activando la respuesta inmunitaria adaptativa específica para el virus ARN (Kell & Gale, 2015).

Las células infectadas también son capaces de actuar a un nivel más directo a través de la respuesta inmunitaria intrínseca. La respuesta inmunitaria intrínseca, forma parte de la respuesta inmunitaria innata que se ha explicado anteriormente. Pero mientras esta última está mediada por células especializadas como las *"natural killers"* (NK), los



macrófagos y las células dendríticas en las que a través del reconocimiento del virus por parte de un receptor se genera una cascada de señalización que conlleva a la transcripción de factores antivirales, y por tanto a una inhibición de la infección viral de manera indirecta; la respuesta inmunitaria intrínseca consiste en factores de restricción que actúan de forma directa impidiendo la replicación viral (Duggal & Emerman, 2012; N. Yan & Chen, 2012).

Los factores de restricción son proteínas codificadas en la línea germinal, que detectan la infección viral y actúan inhibiendo la replicación del virus (interviniendo en diferentes partes del ciclo viral) de forma directa e inmediata en ausencia de exposición previa al virus (Duggal & Emerman, 2012; N. Yan & Chen, 2012). Se considera un factor de restricción a una proteína que cumple los siguientes requisitos: tener actividad antiviral como su principal función biológica, ser inducida por IFN o por la infección viral, ser antagonizado por una proteína viral y a nivel evolutivo haber sufrido una selección positiva (Duggal & Emerman, 2012).

Existen múltiples ejemplos de diferentes factores de restricción que actúan sobre diversos virus ARN y diversas fases del ciclo viral.

APOBEC3G (*"Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic subunit 3G"*) (A3G) es una citidina desaminasa celular que se incorpora en los viriones nacientes de VIH-1 y al infectar el virus una nueva célula provoca daños letales en el material genético viral al desaminar los residuos de citosina durante la retrotranscripción promoviendo su degradación (Goff, 2003; H. Zhang et al., 2003; Valera et al., 2015). A su vez, la proteína viral Vif de VIH-1 se une a A3G promoviendo la poliubiquitinación y degradación de la proteína celular (Mehle et al., 2004; Valera et al., 2015). Además, se ha descrito que el propio factor A3G promueve la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La actividad desaminasa induce la vía de respuesta celular al daño del ADN y la expresión de ligandos de activación de células NK, mejorando el reconocimiento de células infectadas por VIH-1 por parte de las NK (Norman et al., 2011). En relación con la respuesta inmunitaria adaptativa, A3G ha sido descrito como un inductor de dicha respuesta al activar los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos del VIH-1 (Casartelli et al., 2010).

TRIM5 $\alpha$  (*“Tripartite Motif”*) es una proteína de la familia E3 ligasas capaz de restringir diversos retrovirus mediante mecanismos específicos de especie. En el caso de Rhesus TRIM5 $\alpha$  tiene una fuerte actividad sobre VIH-1, mientras en la especie humana su actividad es muy débil (Sawyer et al., 2005; Colomer-Lluch et al., 2018). Se cree que TRIM5 $\alpha$  promueve el desmontaje prematuro de las cápsides retrovirales y/o su degradación por proteasoma y actúa sobre la retrotranscripción y posterior integración en el genoma celular (Perron et al., 2007; Kutluay et al., 2013).

SAMHD1 (*“Steril Alpha Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1”*) es una desoxinucleótido trifosfohidrolasa que hidroliza los cuatro dNTP a desoxinucleósidos y trifosfato inorgánico, reduciendo los dNTP celulares y como consecuencia alterando la retrotranscripción y replicación del VIH-1 en células mieloides (Lahouassa et al., 2012; Colomer-Lluch et al., 2018). Asimismo, la proteína auxiliar Vpx de VIH-2 y SIV induce la degradación de SAMHD1 vía proteasoma, pero esta viral no forma parte del VIH-1 (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011; Ahn et al., 2012).

Teterina es una proteína transmembrana inducible por IFN que ancla las partículas virales en la superficie de las células infectadas, reteniendo los viriones e impidiendo la salida viral de virus con envoltura como el VIH-1, Ébola, virus Marbug, virus Lassa, virus Nipah o el virus de la estomatitis vesicular. Estos viriones son posteriormente internalizados y degradados vía endosoma-lisosoma (Miyakawa et al., 2009; Perez-Caballero et al., 2009; le Tortorec et al., 2011). Además, actúa como un sensor de la infección activando la expresión de genes proinflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B y aumenta la susceptibilidad de las células infectadas por VIH-1 a la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (Galão et al., 2012; J. F. Arias et al., 2014). Por otro lado, la proteína auxiliar Vpu del VIH-1 actúa sobre la teterina promoviendo su poliubiquitinación y degradación, reduciendo su concentración en la superficie celular y reteniéndola en endosomas para su degradación lisosomal (van Damme et al., 2008; Iwabu et al., 2009; Mangeat et al., 2009; Colomer-Lluch et al., 2018). Así como también la glicoproteína del virus Ébola antagoniza la teterina por un mecanismo desconocido (Brinkmann et al., 2016).

Viperina es un factor de restricción inducido por IFN que actúa sobre diferentes virus como el VIH-1, el virus de la Hepatitis C, DENV, ZIKV o el virus de la encefalitis por garrapatas mediante diversos mecanismos (K.-C. Chin & Cresswell, 2001; Jiang et al., 2008; Nasr et al., 2012; Helbig et al., 2013; Panayiotou et al., 2018). En el caso del virus de la Hepatitis C, viperina interacciona con la proteína viral NS5 impidiendo la continuación de su ciclo viral (Helbig et al., 2011), mientras que con DENV, ZIKV y el virus de la encefalitis por garrapatas interacciona con la proteína viral NS3 afectando a la replicación del ARN viral (Helbig et al., 2013; Panayiotou et al., 2018).

ZAP (*"Zinc finger Antiviral Protein"*) es un factor de restricción principalmente citosólico que actúa sobre diversos virus como el virus de la leucemia murina, VIH-1, Ébola, Influenza, el virus Sindbis, el virus de la encefalitis equina venezolana o el virus Marburg (Bick et al., 2003; Müller et al., 2007; X. Guo et al., 2007; Zhu et al., 2011; Q. Tang et al., 2017). ZAP se une al ARNm viral y promueve su degradación (X. Guo et al., 2007). Pero, la proteína viral NS1 del virus Influenza antagoniza la actividad de ZAP, posiblemente evitando su unión al ARNm viral (Q. Tang et al., 2017).

IFITM (*"Interferon-Inducible Transmembrane Proteins"*) son factores celulares asociados a membrana que inhiben la entrada viral de virus con envueltas como el VIH-1, Influenza A, WNV o DENV; aunque el mecanismo exacto no se conoce (J. Lu et al., 2011; Colomer-Lluch et al., 2018; Jiang et al., 2010).

Mx (*"Myxovirus resistance"*) pertenecen a la clase trifosfatasa de guanosina similares en estructura y función a dinamina (GTPasas) (Haller et al., 2007). En humanos existen dos proteínas Mx, MxA que se encuentra a nivel citoplasmático y MxB en la membrana nuclear (Aebi et al., 1989; Melén et al., 1996). Ejercen como factor de restricción para una gran variedad de virus ARN como el virus Influenza y miembros de la familia *Bunyaviridae*. MxA reconoce la nucleocápside viral e interfiere en la replicación y transcripción viral (Haller et al., 2007). Mientras MxB impide la acumulación nuclear e integración cromosómica del dsDNA del VIH-1 (Goujon et al., 2013; Z. Liu et al., 2013).

HDAC6 (Histona Desacetilasa 6) es una histona desacetilasa cuya función principal es la desacetilación de diversos sustratos como la tubulina, la cortactina o la F-actina entre otros (Valenzuela-Fernández et al., 2008). Debido a su capacidad de desacetilación y a su dominio de unión a ubiquitinas (BUZ), interviene en importantes procesos celulares relacionados con el citoesqueleto y la vía degradativa autofágica (Kawaguchi et al., 2003; Valenzuela-Fernández et al., 2008; J.-Y. Lee et al., 2010). Pero también se ha descrito como un factor antiviral precisamente mediante su actividad en dichos mecanismos celulares. A nivel de su actuación en la modulación de los microtúbulos (MT), se ha descrito que HDAC6 dificulta el tráfico de los componentes virales del virus Influenza A hacia la membrana plasmática impidiendo la hiperacetilación de los MT (Husain & Cheung, 2014). Dicha hiperacetilación también se ha relacionado favorablemente en la entrada viral del VIH-1, el complejo de envoltura viral promueve la acetilación de los MT induciendo la fusión de membranas. A su vez, HDAC6 al igual que sobre el virus Influenza A, es capaz de inhibir la hiperacetilación restringiendo la entrada viral del VIH-1 (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Cabrera-Rodríguez et al., 2019). Por otro lado, respecto a la actividad de HDAC6 sobre el proceso degradativo de autofagia, se ha identificado a HDAC6 como factor de restricción de VIH-1 al promover la degradación autofágica de la proteína viral Vif, la cual es antagonista de A3G, y también forma un complejo con A3G, evitando su interacción con Vif (Valera et al., 2015). Pero, a su vez, Nef actúa sobre HDAC6 evitando la degradación de Vif (Marrero-Hernández et al., 2019).

**Tabla 3: Resumen y ejemplos de los diversos factores de restricción sobre virus ARN.**

Factor de restricción	Virus	Mecanismo de acción	Proteína viral antagonista
<b>A3G</b>	VIH-1	Desaminación de los residuos de citosina	Vif
<b>TRIM5<math>\alpha</math></b>	VIH-1	Desmontaje prematuro de las cápsides retrovirales.	Desconocida
<b>SAMHD1</b>	VIH-1	Reducción de los dNTP celulares.	Vpx
<b>Teterina</b>	VIH-1, virus Ébola, virus Marbug, virus Lassa, virus Nipah y virus de la estomatitis vesicular	Anclaje de las partículas virales en la superficie celular.	Vpu (VIH-1) y glicoproteína (virus Ébola)
<b>Viperina</b>	VIH-1, virus de la Hepatitis C, DENV, ZIKV y virus de la encefalitis por garrapatas	Interacción con las proteínas virales NS5 y NS3.	Desconocida
<b>ZAP</b>	virus de la leucemia murina, VIH-1, virus Sindbis, virus de la encefalitis equina venezolana, virus Ébola, virus Marburg y virus Influenza	Unión al ARNm y posterior degradación.	NS1 (Influenza)
<b>IFITM</b>	VIH-1, virus Influenza A, WNV y DENV	Mecanismo desconocido	Desconocida
<b>Mx</b>	VIH-1, virus Influenza y miembros de la familia <i>Bunyaviridae</i>	Interferencia en la replicación, transcripción e integración viral.	Desconocida
<b>HDAC6</b>	VIH-1 y virus Influenza A	Desacetilación de los microtúbulos y degradación autofágica de Vif.	Nef

Factores de restricción viral frente a virus ARN. En la columna izquierda encontramos el nombre de los factores de restricción viral, a continuación, ejemplos de virus sobre los que ejercen la restricción, en la tercera columna se describe el mecanismo de actuación y en la última columna se nombran las proteínas virales antagonistas del factor de restricción.

### 1.6. HDAC6, un factor antiviral.

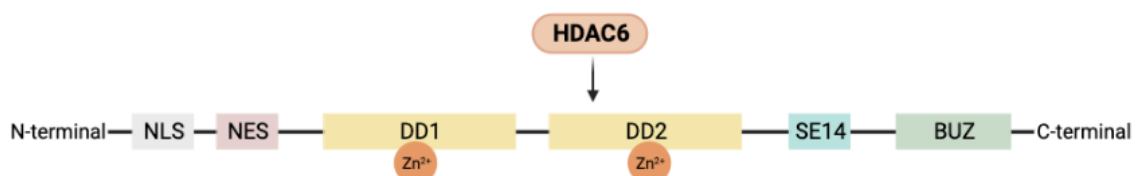
Como se acaba de exponer, HDAC6 es una histona desacetilasa. Las histonas desacetilasas (HDAC) junto con las histonas acetiltransferasas (HAT), son enzimas celulares encargadas de modificar el estado de acetilación (desacetilado y acetilado respectivamente) de las lisinas de gran variedad de proteínas (Marmorstein, 2001; K. K.

Lee & Workman, 2007; Shahbazian & Grunstein, 2007; Xu et al., 2007; K. Zheng et al., 2017). Aparte de las histonas, las HDAC tienen como sustratos receptores de hormonas, proteínas estructurales, proteínas del citoesqueleto, chaperonas, factores de transcripción, etc (Xu et al., 2007). Por lo que, como consecuencia, se encuentran involucradas en mecanismos celulares como la disposición de la cromatina, la expresión genética, la estabilidad proteica y el transporte intracelular entre otros (S. C. Kim et al., 2006; Choudhary et al., 2009; K. Zheng et al., 2017).

Se han reconocido 18 HDAC en mamíferos, que según su homología a las HDAC de levadura se han distribuido en 4 clases. En la clase I se encuentran HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, las cuales son ortólogas a la histona Rdpd3 de levadura. Las Histonas desacetilasas de clase II están relacionadas con la Hda1 de levadura, esta clase a su vez se subdivide en 2 grupos en función de su homología de secuencia y la organización de los dominios. La clase IIa está formada por HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9, y la clase IIb está integrada por HDAC6 y HDAC10. A diferencia de las HDAC de clase I y II que dependen de zinc, la clase III son histonas desacetilasas dependientes del cofactor metabólico NAD<sup>+</sup> y está formada por sirtuinas. Por último, la clase IV conformada por la HDAC11 que contiene residuos conservados en el dominio catalítico con las HDAC de clase I y II, y que al igual que estas, es dependiente de zinc; pero poseen diferente estructura (Carey & La Thangue, 2006; Xu et al., 2007; K. Zheng et al., 2017).

El gen *hdac6* humano tiene homología en 11 organismos entre los que se encuentran el chimpancé y el mono Rhesus; y ortología en 369 organismos. Tiene un tamaño de 21923 pb, un solo locus genómico y está codificado por 28 exones (Voelter-Mahlknecht & Mahlkecht, 2003; National Institutes of Health (NIH), 2023). Se localiza en el borde de la sub-banda del cromosoma X (p11.23), región caracterizada por frecuentes deleciones y adiciones de material cromosómico en diversas enfermedades neurológicas y cancerígenas (Voelter-Mahlknecht & Mahlkecht, 2003). El ARNm se expresa en 27 tejidos, principalmente en riñones y testículos, y codifica una proteína de ~130 kDa que se localiza principalmente en el citoplasma celular (Voelter-Mahlknecht & Mahlkecht, 2003; Aldana-Masangay & Sakamoto, 2011; Kaur et al., 2022; NIH, 2023).

HDAC6 se diferencia del resto de HDAC en que contiene dos dominios desacetilasa (DD1 y DD2) catalíticos adyacentes, con sendos residuos centrales de His (H216 e H611) (Grozinger et al., 1999; Y. Zhang et al., 2006; Zou et al., 2006), y un dominio de unión a ubiquitina con dedo de zinc, dominio BUZ (“*Binder of Ubiquitin Zinc finger*”) (antiguamente denominado PAZ (“*Polyubiquitin-Associated Zinc finger*”) en su extremo C-terminal (Hook et al., 2002; Pai et al., 2007; Ouyang et al., 2012). Los dominios DD1 y DD2 son los responsables de la actividad desacetilasa de HDAC6, DD1 tiene una actividad enzimática más débil y es altamente específica para sustratos que contienen en su extremo C-terminal residuos de acetil-lisina, mientras, DD2 tiene una amplia especificidad de sustratos. Por otro lado, el dominio BUZ, el cual es rico en histidinas y cisteínas, reconoce específicamente cadenas de mono y poliubiquitina no ancladas de aa, permitiendo su unión y transporte para su acumulación en agrosomas y la activación de la autofagia. También posee un dominio repetido que contiene Ser-Glu (Serina-Ácido Glutámico), (SE14), involucrado en la localización intracelular de la proteína y la interacción con la proteína Tau. Asimismo, en su extremo N-terminal tiene una NLS y una secuencia de exporte nuclear (NES) permitiendo la translocación del citoplasma al núcleo y viceversa, aunque se encuentre en el citoplasma mayoritariamente (Kawaguchi et al., 2003; Ruijter et al., 2003; J.-Y. Lee et al., 2010; K. Zheng et al., 2017) (Figura 22).



**Figura 22: Estructura de la proteína HDAC6.** En su extremo N-terminal se encuentran las secuencias de importe (NLS) y exporte (NES) nuclear, seguidas de los dominios catalíticos de desacetilación (DD1 y DD2). A continuación, posee un dominio repetido que contiene Ser-Glu (SE14) que interviene en la localización intracelular. Y, por último, en su extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión a ubiquitina con dedo de zinc (BUZ) que permite la eliminación de proteínas ubiquitinadas. Figura creada en Biorender.com.

El dominio catalítico de HDAC6 está formado por aproximadamente 390 aa. El sitio activo se dispone en un bolsillo tubular ligeramente curvado con un fondo más ancho. La desacetilación ocurre gracias al sistema “*charge-relay*” que consta de dos residuos de histidina adyacentes, dos residuos de aspártico (30 aa después de los residuos de histidinas y separados por 6 aa aproximadamente) y un residuo de tirosina (123 aa

después de los residuos de aspártico aproximadamente). El ion  $Zn^{2+}$  es imprescindible en dicho sistema, y se encuentra concretamente en el sitio de unión de zinc en el fondo del bolsillo (Finnin et al., 1999; Ruijter et al., 2003).

HDAC6 posee tanto la función de desacetilar residuos de lisina acetilados, como de unión y transporte de proteínas ubiquitinadas para su degradación. Por un lado, centrándose en su capacidad desacetiladora, HDAC6 posee un amplio rango de sustratos, en el que se pueden encontrar la cortactina, la proteína de unión F-actina, las chaperonas HSP90 (proteína de shock térmico de 90kDa) y Hsc70 (proteína de shock térmico de 70kDa), entre otros, interviniendo en la estructura y motilidad celular, el transporte intracelular o la degradación proteica (Kovacs et al., 2005; X. Zhang et al., 2007; Valenzuela-Fernández et al., 2008; J.-Y. Lee et al., 2010; L. Zhang et al., 2015; K. Zheng et al., 2017). HDAC6 también desacetila proteínas de la ruta de IFN-I (RIG-I). Pero, el sustrato más conocido y estudiado es la  $\alpha$ -tubulina, lo que genera una modificación en la estabilidad de los MT y el tráfico intracelular (Haggarty et al., 2003; Y. Zhang et al., 2006; K. Zheng et al., 2017). Esta capacidad de modificación del citoesqueleto establece un papel de HDAC6 en diversos mecanismos como la infección viral, la sinapsis inmunológica o la migración celular. La implicación de HDAC6 en la organización del citoesqueleto, así como sus consecuencias, se explicarán detalladamente en el [apartado 1.7](#).

Por otro lado, como consecuencia de su dominio BUZ de unión a ubiquitina, HDAC6 interviene en la degradación de proteínas ubiquitinadas actuando en diferentes etapas del proceso de autofagia. Interacciona con las proteínas ubiquitinadas y las proteínas motoras dineínas, transportándolas a través de los microtúbulos (MT) y promoviendo la formación de agresomas, así como también regulando la fusión del fagosoma con el lisosoma (procesos que se detallarán en el [apartado 1.9](#)) (Kawaguchi et al., 2003; J.-Y. Lee et al., 2010; K. Zheng et al., 2017).

A su vez, HDAC6 también sufre modificaciones postraduccionales que regulan su función en el citoplasma y núcleo. Existen diversos estudios donde demuestran que la fosforilación aumenta su actividad. Se ha asociado la fosforilación de las serinas de las



posiciones 22 (S22) y 1035 (S1035) por la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3 $\beta$ ) y la señalización de la vía EGFR-RAS-RAF-MEK-ERK respectivamente, con el aumento de la actividad de desacetilar la subunidad  $\alpha$ -tubulina. También la fosforilación de HDAC6 por parte de la quinasa 2 del receptor acoplado a proteína G (GRK2), aurora A y la isoforma  $\zeta$  de la proteína quinasa C (PKC $\zeta$ ), ejerce el mismo efecto. Mientras que la fosforilación de la posición 458 (S458) por la proteína quinasa CK2 aumenta su actividad en la formación y eliminación de agresomas (S. Chen et al., 2010; Watabe & Nakaki, 2011; K. A. Williams et al., 2013; Du et al., 2015; K. Zheng et al., 2017). Otra modificación postraduccional que afecta a sus funciones es la acetilación. La HAT p300/CBP acetila la lisina 16 (K16) de HDAC6 inhibiendo su capacidad de desacetilar tubulina y su translocación al núcleo impidiendo la unión de la  $\alpha$ -importina a la secuencia NLS (Y. Liu et al., 2012; K. Zheng et al., 2017).

También se puede modificar su función químicamente. Para HDAC6 existen pocos inhibidores selectivos pero muy efectivos y muchos de ellos pertenecen a la clase ácido hidroxámico debido a su alta capacidad de quelar Zn<sup>2+</sup>, entre ellos podemos encontrar la tubacina, triazol, ACY-1215, C1A, tubastatina A (TBSA). En diferentes estudios, se ha observado que todos aumentan la concentración de  $\alpha$ -tubulina acetilada y que podrían ser un posible tratamiento a diferentes tipos de cáncer (ACY-1215 y C1A), a enfermedades neurodegenerativas (TBSA) e incluso a infecciones virales (tubacina, TBSA) (Dallavalle et al., 2012; C.-Y. Lu et al., 2017; X.-X. Wang et al., 2018).

Numerosas investigaciones abalan la implicación de HDAC6 en diversas enfermedades neurodegenerativas (EN) al tener un papel clave en el estrés oxidativo neuronal, el transporte mitocondrial y la eliminación de agregados de proteínas (Simões-Pires et al., 2013).

HDAC6 también tiene como sustratos las proteínas reguladoras de la vía redox, peroxiredoxinas I y II, cuya forma acetilada incrementa su actividad reductora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su resistencia a la superoxidación (Parmigiani et al., 2008). Las especies reactivas de oxígeno causan daños irreversibles a biomoléculas celulares y generan un ambiente de estrés celular que lleva a la disfunción neuronal y muerte celular; por lo que se

relacionan con EN como el Alzheimer, el síndrome Down o la enfermedad de Niemann-Pick (Krapfenbauer et al., 2003; Bhatt et al., 2021). Pero cuando se inhibe la actividad desacetiladora de HDAC6 con tubacina o se silencia la expresión del ARNm se reduce significativamente la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la línea celular LNCaP (Parmigiani et al., 2008).

Con relación a su actividad desacetilasa, también se ha asociado a HDAC6 con EN, pero en este caso en base a su sustrato más conocido, la subunidad  $\alpha$ -tubulina de los MT. La acetilación de  $\alpha$ -tubulina juega un papel importante en la dinámica de MT y el transporte neuronal. El transporte mitocondrial hacia la zona celular donde debe aportar energía es imprescindible para una correcta funcionalidad neuronal, observándose el efecto contrario en enfermedades como el Alzheimer (Reynolds et al., 2004; Hollenbeck & Saxton, 2005; Trimmer & Borland, 2005). Sigeng Chen et al., describieron que la inhibición de la actividad desacetilasa de HDAC6 por el tratamiento de neuronas hipocámpales con tubacina, aumentó la cantidad y la velocidad del transporte mitocondrial. Dicho incremento se relacionó con la acetilación de  $\alpha$ -tubulina y la asociación de la mitocondria con la proteína motora kinesina-1 (involucrada en el transporte anterógrado axonal) (Hollenbeck & Saxton, 2005; S. Chen et al., 2010). Como consecuencia de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina, también se favorece la unión de otra proteína motora, dineína (involucrada en el transporte retrógrado axonal), a los MT, interviniendo en el transporte mitocondrial, y de otros orgánulos y vesículas (Reed et al., 2006). Un ejemplo es la enfermedad de Huntington, donde la huntingtina mejora el transporte vesicular de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) a través de los MT, pero su versión patogénica atenúa dicho proceso al impedir la interacción de proteínas motoras con los MT, produciendo la muerte neuronal (Gauthier et al., 2004; Dompierre et al., 2007). Pero, dicha situación patológica se revierte al tratar las neuronas con el inhibidor de HDAC tricostatina A (TSA). Además, se ha observado en muestras estriales “*post mortem*” de pacientes con la enfermedad de Huntington una drástica disminución en el nivel de  $\alpha$ -tubulina acetilada en comparación con los individuos control (Dompierre et al., 2007).

Con relación a la funcionalidad de HDAC6 en la vía degradativa autofágica, es ampliamente conocido que la formación de agregados de proteínas celulares mutantes tóxicos para las células es una de las causas de enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer o la enfermedad de Huntington (Keck et al., 2003; Lim & Tan, 2007). Las mutaciones de los genes implicados en estas EN producen principalmente un procesamiento anormal y la acumulación de proteínas mal plegadas en placas e inclusiones neuronales (J. P. Taylor et al., 2002). En la enfermedad de Parkinson, la proteína Parkin se encuentra mutada afectando a su función ubiquitina ligasa, contribuyendo a la disfuncionalidad de la vía degradativa proteasoma (UPS, “*ubiquitin-proteasome system*”) y a la muerte neuronal dopaminérgica (Shimura et al., 2000; Lim & Tan, 2007). Además, esta EN también se caracteriza por la presencia de los cuerpos de Lewy (inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas) en neuronas, cuyo componente principal es la proteína  $\alpha$ -sinucleína mutada que de igual forma genera la disfunción del proteasoma (Tanaka, 2001; L. Chen et al., 2006). También ocurre en el Alzheimer, donde la proteína Tau se une al proteasoma inhibiendo su actividad (Keck et al., 2003). O en la enfermedad de Huntington, en la que la proteína huntingtina también afecta negativamente a la UPS (Bence et al., 2001). Pasando HDAC6 a jugar un papel clave a través de la regulación de la vía agresoma-autofagia y la eliminación de agregados de proteínas como la  $\alpha$ -sinucleína (Kawaguchi et al., 2003; Su et al., 2011; Simões-Pires et al., 2013).

A su vez, también se ha relacionado negativamente a HDAC6 con enfermedades tumorales a través de diferentes mecanismos.

Yi-Shan Lee et al., descubrieron que la transformación oncogénica de Ras induce la expresión de HDAC6, siendo necesario HDAC6 en la transformación oncogénica y la formación de tumores. Ya que con el silenciamiento de HDAC6 (“*knockdown*” y shRNA (“*short hairpin RNA*”)) existe mayor resistencia a la transformación oncogénica dependiente de Ras y a la reducción del crecimiento de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. En concreto, se reduce el crecimiento celular independiente de anclaje favoreciendo la muerte celular inducida por la pérdida de adhesión. Además,

caracterizaron la actividad desacetilasa como la responsable del crecimiento de tumores sólidos (Y.-S. Lee et al., 2008).

Asimismo, se ha descrito la expresión de HDAC6 como un factor que favorece el crecimiento tumoral y la metástasis al tener como sustratos componentes del citoesqueleto y actuar sobre la migración celular como se ha expuesto anteriormente. HDAC6 desacetila los MT acrecentando su dinámica y favoreciendo la motilidad celular, mientras la tubacina, ejerce el efecto contrario (Haggarty et al., 2003). Martina Bazzaro et al., observaron que la inhibición farmacológica y “*knockdown*” de HDAC6 impide la motilidad de líneas celulares de cáncer de mama y ovario (Bazzaro et al., 2008).

Su actividad desacetilasa también se ha relacionado con la parada del ciclo celular. *CYLD* es un gen supresor de tumores delecionado en la cilindromatosis (Bignell et al., 2000). Su expresión produce una enzima desubiquitinasa que ante una señal protumoral se transloca del citoplasma a la región perinuclear e interacciona con el protooncogén Bcl-3 (“*B-cell lymphoma 3-encoded protein*”) y elimina la cadena de ubiquitinas unidas a la lisina 63 de Bcl-3. Como consecuencia, se inhibe la translocación de Bcl-3 al núcleo, y la posterior activación del promotor ciclina-D1 y aumento de la proliferación y crecimiento tumoral (Massoumi et al., 2006). Se ha visto que la capacidad de *CYLD* para controlar el crecimiento y el ciclo de división celular en la fase G1/S depende de su interacción con MT estables o polimerizados. Para favorecer dicha interacción, también se une a HDAC6 e inhibe su actividad catalítica para evitar el crecimiento tumoral (Wickström et al., 2010).

También existen estudios donde se ha relacionado su actividad autofágica con diversos tumores. La inhibición de HDAC6 mediante el tratamiento con SAHA o tubacina, su silenciamiento con siRNA o “*knockdown*”, y la consecuente repercusión en la vía agresoma-autofagia, origina un efecto positivo en enfermedades tumorales. Que junto a la inhibición de UPS con bortezomib, favorece la apoptosis de células cancerígenas del cáncer de páncreas, de ovario y múltiple mieloma. Al inhibir la vía UPS y autofágica se genera un ambiente de estrés celular que promueve el mecanismo de apoptosis (Hideshima et al., 2005; Nawrocki et al., 2006).

Lo que define a HDAC6 como una posible diana terapéutica e impulsa la investigación de posibles inhibidores de HDAC6 como futuros tratamientos en diversas enfermedades neurodegenerativas y tumorales. Así como también en infecciones virales, interviniendo tanto a nivel de citoesqueleto el cual actúa en el transporte viral a través de la célula, como a nivel de degradación autofágica.

### **1.7. El citoesqueleto de microtúbulos y su relación con HDAC6.**

En 2002, Charlotte Hubbert et al., definieron por primera vez a HDAC6 como una proteína modificadora del citoesqueleto de MT. Demostraron que HDAC6 es capaz de unirse y desacetilar los MT acetilados modificando su dinámica, interviniendo en procesos biológicos importantes (Hubbert et al., 2002).

El citoesqueleto es una estructura celular que le da forma y motilidad a las células, también participa en otros procesos como el transporte de vesículas y orgánulos, la división celular, etc. Está formado por tres elementos: los MT, los microfilamentos o filamentos de actina y los filamentos intermedios (Madigan et al., 2009).

Los MT son estructuras tubulares de unos 25 nm de diámetro formadas por heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Normalmente tiene uno de sus extremos unido a un único Centro de Organización de Microtúbulos (MTOC, "*Microtubule-Organizing Center*") denominado centrosoma y actúan en el mantenimiento de la forma y la motilidad celular, en el movimiento de los cromosomas durante la división celular y en el transporte de orgánulos (Madigan et al., 2009).

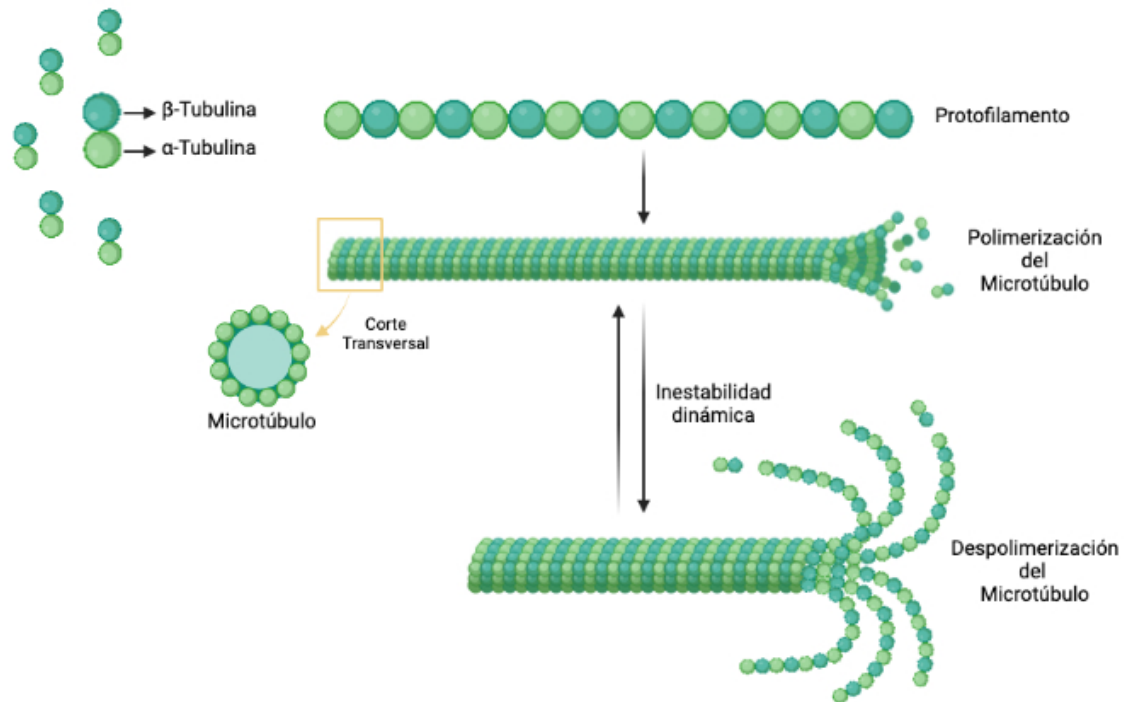
Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina difieren en la secuencia de aa codificadas por diferentes genes que se encuentran en todas las células eucariotas (Binarová & Tuszynski, 2019).

Existen 10 genes *TUBA* (*TUBA1A-1C*, *TUBA4A-4E*, *TUBA8* y *TUBA13*) que codifican la proteína  $\alpha$ -tubulina y 9 genes *TUBB* (*TUBB1*, *TUBB2A-2B*, *TUBB3*, *TUBB4A-4B*, *TUBB5*, *TUBB6* y *TUBB8*), que codifican la proteína  $\beta$ -tubulina. Los isotipos entre las mismas

subunidades son 99% idénticos, y la mayoría se expresan constitutivamente como  $\alpha$ 1a o  $\beta$ 5, aunque algunos son específicos de ciertos tipos celulares y tejidos como  $\alpha$ 8 en músculos,  $\beta$ 1 en plaquetas o  $\beta$ 3 en neuronas (Khodiyar et al., 2007; Gasic, 2022).

En relación con la secuencia, tanto  $\alpha$ -tubulina como  $\beta$ -tubulina, contienen una región de unión a nucleótidos en el dominio N-terminal, un dominio intermedio de unión a Taxol y un dominio que se cree que es de unión a proteínas motoras y proteínas asociadas a MT (MAP, “*Microtubule Associated Proteins*”) en el extremo C-terminal. A nivel estructural también son prácticamente idénticas, cada monómero posee un núcleo de dos láminas  $\beta$  rodeadas por 12 hélices  $\alpha$  (Nogales et al., 1998).

Los MT se forman a partir de dichas subunidades de tubulina, dos proteínas globulares unidas por enlaces no covalentes formando heterodímeros. Los heterodímeros se unen entre ellos longitudinalmente en la misma dirección para formar un protofilamento, es decir, la “parte alta” de la molécula de  $\beta$ -tubulina se unirá a la  $\alpha$ -tubulina del siguiente heterodímero sucesivamente hasta formar el protofilamento. A su vez, se unirán perpendicularmente 13 protofilamentos de forma paralela, formando contactos laterales entre monómeros del mismo tipo ( $\alpha$ - $\alpha$  y  $\beta$ - $\beta$ ) para formar la estructura cilíndrica hueca característica de los MT. Como consecuencia a dicha estructura, los MT tienen diferente polaridad estructural, exponiendo  $\alpha$ -tubulinas en un extremo y  $\beta$ -tubulinas en el otro. Además, los múltiples contactos entre las subunidades le proporcionan a los MT su rigidez característica (Alberts et al., 2008) (**Figura 23**).



**Figura 23: Estructura, polimerización y dinámica de los microtúbulos.** Los MT están formados por 13 protofilamentos de subunidades de tubulina (heterodímero de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina) y se caracterizan por su inestabilidad dinámica. La inestabilidad dinámica es el rápido cambio entre el estado de crecimiento y disociación, o lo que es lo mismo, entre polimerización y despolimerización. Figura creada en Biorender.com.

Las subunidades de tubulina tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de nucleósidos trifosfato, GTP (*“Guanosine Triphosphate”*). Esta hidrólisis se produce de forma lenta en las subunidades libres, pero se acelera el proceso cuando se incorporan en el filamento. La ratio de adición de subunidades al filamento puede ser más rápido que la ratio de hidrolización de GTP, generando un extremo del filamento que contiene nucleósidos trifosfato. Además, la hidrólisis disminuye la afinidad de unión entre subunidades “vecinas” favoreciendo la disociación del extremo del filamento. La introducción o separación de subunidades ocurre casi exclusivamente en los extremos de los microtúbulos (Alberts et al., 2008).

La polaridad estructural que tienen los MT influye en las ratios de crecimiento del filamento. En una estructura así, la cinética de asociación y disociación es a menudo mayor en un extremo que en otro. Los MT despolimerizan 100 veces más rápido en su extremo que contiene GDP que en el extremo GTP. El extremo más dinámico se denomina extremo positivo (+) y el menos dinámico, extremo negativo (-). Estas

estructuras se caracterizan por tener una gran inestabilidad dinámica, es decir se caracterizan por poseer cambios rápidos entre el estado de crecimiento y disociación (Alberts et al., 2008) (**Figura 23**). Esta inestabilidad dinámica es imprescindible en diversos procesos celulares como el tráfico intracelular, la motilidad o la morfología celular, entre otros. Un claro ejemplo es el ciclo celular; durante el ciclo celular en la interfase los microtúbulos se encuentran estables y con gran longitud, pasando a un estado mucho más dinámico en la mitosis que da como resultado la separación de las cromátidas y la posterior estabilización de los MT en las células hijas. Pero una extrema estabilización o desestabilización es perjudicial para la célula. Por ejemplo, agentes desestabilizadores de MT como los criptoficinas (inhiben la polimerización) bloquean la división celular y generan apoptosis, mientras otros afectan al tráfico de vesículas y orgánulos (Fanale et al., 2015). A su vez, el taxol, un estabilizador de MT (evita la despolimerización) afecta a la migración y ciclo celular (retiene a la célula en la fase G<sub>2</sub>/M) (C.-P. Yang & Horwitz, 2017).

También existe otra subunidad de la familia tubulina,  $\gamma$ -tubulina, que, aunque no es un componente de los MT es imprescindible en la funcionalidad de estos (Oakley, 1992). Se localiza en el MTOC actuando en la nucleación y ensamblaje de las otras subunidades (Oakley, 1992; Kollman et al., 2010). La  $\gamma$ -tubulina forma una estructura con forma de anillo denominada  $\gamma$ TuRC (" *$\gamma$  Tubulin Ring Complex*") en conjunto con otras proteínas asociadas (Job et al., 2003), que permiten el ensamblaje de los MT tanto *in vitro* (Y. Zheng et al., 1995) como *in vivo* (Kollman et al., 2011). También está involucrado en la regulación génica y el ciclo celular, así como en la disminución de la dinámica del extremo positivo de los MT (Bouissou et al., 2009; Oakley et al., 2015; Paluh et al., 2000). Esta función de  $\gamma$ -tubulina resulta extraña ya que se sitúa mayoritariamente en el extremo negativo de los MT, por lo que, para explicarlo, existen dos teorías (Oakley et al., 2015). Una de ellas propone que  $\gamma$ TuRC se podría unir a factores catastróficos o de rescate, o a las proteínas motoras que los transportan a través de los MT, afectando a su transporte hacia el extremo +, ya que se ha observado que mutaciones en  $\gamma$ -tubulina modifican la unión de proteínas motoras y/o factores estabilizadores de MT (Zimmerman & Chang, 2005; Cuschieri et al., 2006; Oakley et al., 2015). La otra hipótesis



es que  $\gamma$ TuRC actúe como un factor de rescate evitando la disociación de los MT (Bouissou et al., 2009; Oakley et al., 2015).

También juegan un papel importante las MAP que influyen en la estabilización de MT, como la estamina que impide la polimerización o la catanina que promueve la despolimerización; y además les permite su unión con otros componentes celulares (Alberts et al., 2008; Bodakuntla et al., 2019).

Adicionalmente, las modificaciones postraduccionales en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina juegan un papel clave en la estabilización de los MT. Estas modificaciones regulan las propiedades de los MT, modulan la unión a MAP, indican la longevidad de los MT e intervienen en la morfogénesis celular (MacRae & Langdon, 1989). La mayoría se producen una vez se da lugar la polimerización, y entre ellas podemos encontrar la acetilación, fosforilación, poliaminación, poliglicilación, poliglutamilación y tirosinación (Ludueña, 1997; Wloga & Gaertig, 2010). En concreto, se ha asociado a la acetilación y la destirosinación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina con MT más estables (Gundersen et al., 1987; Piperno et al., 1987).

El estado de acetilación-desacetilación del grupo  $\epsilon$ -amino de la K40 de  $\alpha$ -tubulina localizada en el lumen del MT determina la estabilización de las estructuras de los MT y su dinámica, siendo la tubulina acetilada su forma estable y la tubulina desacetilada su forma dinámica. La enzima responsable de la adición del grupo acetilo es la acetiltransferasa  $\alpha$ TAT/Mec-17, mientras las enzimas que ejercen el efecto contrario (desacetilación) son HDAC6 y SIRT2 (Sirtuina 2). HDAC6 interacciona con el extremo C-terminal de  $\beta$ -tubulina a través de sus dominios desacetilasas y desacetila la K40 de  $\alpha$ -tubulina sin afectar a la concentración de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Además, se ha comprobado que ambos dominios catalíticos (DD1 y DD2) de HDAC6 son necesarios en la desacetilación (Hubbert et al., 2002; Y. Zhang et al., 2003; Y. Li et al., 2012; Magiera & Janke, 2014).

Como consecuencia de la regulación de la estabilidad de los MT por parte de HDAC6, su participación es clave en diversos procesos celulares. Por ejemplo, en la morfología celular, la adhesión y la migración de las células (Boyault et al., 2007; Valenzuela-Fernández et al., 2008). Así como también a nivel de sistema inmunitario interviene en la sinapsis inmunológica, en la respuesta citotóxica y en la vía autofágica (Pandey et al., 2007; Valenzuela-Fernández et al., 2008; K. Zheng et al., 2017). También, aparte de influir en procesos celulares, también puede estar involucrado en diferentes partes del ciclo viral como la entrada o la transcripción viral (Valenzuela-Fernández et al., 2008; Y. Li et al., 2012).

### **1.8. Papel del citoesqueleto de microtúbulos en la infección viral.**

Los MT intervienen en múltiples funciones imprescindibles para la vida celular, por lo que muchos virus han desarrollado estrategias para utilizarlos en su propio beneficio y llevar a cabo diferentes pasos del ciclo viral.

A nivel de entrada, la mayoría de los virus sin envoltura y algunos con envoltura entran en la célula a través del mecanismo de endocitosis, mientras la mayoría de los virus con envoltura entran a través de la fusión de membranas promovida por el contacto con el receptor celular. En ambos casos, los MT juegan un papel que puede ser utilizado por los propios virus (Seo & Gammon, 2022). La polarización de la red de MT interviene en la organización espacial de los receptores y factores de entrada celular, como por ejemplo en el virus del herpes simple 1 (HSV-1), que infecta las células epiteliales polarizadas principalmente de manera basolateral más que apical (Marozin et al., 2004; Naghavi & Walsh, 2017).

A su vez, los receptores también influyen en la dinámica de MT. Una vez se produce la unión del virus con el receptor de superficie de membrana celular, se genera una señalización que conlleva a la estabilización de MT, la cual favorece la entrada viral. Por ejemplo, la envoltura del VIH-1 se une al receptor CD4 aumentando el nivel de acetilación de  $\alpha$ -tubulina de forma CD4 dependiente y con ello permitiendo la formación del poro de fusión y entrada viral (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Casado et al., 2018;

Cabrera-Rodríguez et al., 2019; Cabrera-Rodríguez et al., 2022; Pérez-Yanes et al., 2022; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). O el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi, que se une al receptor integrina  $\alpha 3\beta 1$  y activa una cascada de señalización generando un cambio en la estabilidad de los MT que le permite su internalización y tráfico intracelular (Naranatt et al., 2005).

Una vez entra el virus en la célula, pueden utilizar los MT para transportarse hacia el núcleo con el fin de llevar a cabo la replicación. Los adenovirus activan la señalización por Rac1 promoviendo la polimerización de los MT, asimismo, activan la proteína quinasa A y la proteína quinasa activada por mitógeno p38 con el fin de mejorar el transporte mediado por dineína hacia el núcleo (Suomalainen et al., 2001; Warren & Cassimeris, 2007). Otros ejemplos son el HSV-1 que se une a las proteínas especializadas en el seguimiento del extremo positivo de los MT y se transporta retrógradamente a través de ellos (Jovasevic et al., 2015), o el VIH-1 cuya cápside interacciona con bicaudal D2 (una proteína adaptadora de dineína) y proteínas MAP como MAP1A y MAP1S, y se transporta retrógradamente hacia el núcleo (Fernandez et al., 2015; Malikov et al., 2015; Carnes et al., 2018). También la proteína matriz del VIH-1 se une a la proteína Kif4 que se localiza en los extremos de MT estables e induce la estabilización de los MT necesaria para alcanzar el núcleo (Sabo et al., 2013; Morris et al., 2014). Además, se ha visto en el VIH-1 que la estabilización de los MT es importante en el “*uncoating*”, ya que el tratamiento con nocodazol (despolimeriza los MT) retrasa dicho proceso, al igual que ocurre con inhibidores de las proteínas motoras dineína o quinesina 1, proponiendo una posible relación entre el transporte y el “*uncoating*” (Lukic et al., 2014).

Aunque otros virus, sobre todo virus ARN, no llevan a cabo su replicación en el núcleo, sino en el citoplasma. Para ello utilizan también la proteína motora dineína para transportarse retrógradamente por los MT pero en esta ocasión hacia la zona perinuclear; y modifican los MT en dicha zona con el fin de crear los sitios de replicación que los protejan de la detección celular. Con relación al transporte, se ha visto que la proteína p54 del virus de la peste porcina africana, esencial para su replicación, se une a dineína y se transporta hacia el MTOC; y además el tratamiento con nocodazol inhibe la producción viral (Alonso et al., 2001). Otros ejemplos de virus que utilizan el

transporte retrógrado a través de los MT del axón neuronal para llegar a su lugar de replicación son los reovirus, el poliovirus y el virus de la rabia (Ohka et al., 2009; Gluska et al., 2014; Aravamudhan et al., 2020). Por otro lado, se ha descrito que la proteína VP1 de norovirus redistribuye los MT acetilados hacia los sitios de replicación adyacentes al MTOC (Hyde et al., 2012). Mientras los rotavirus se replican en “viroplasmias” que son una fusión de estructuras pequeñas que se localizan en la región perinuclear, estas fusiones derivan de la interacción de las proteínas virales NSP2 y NSP5 con los MT estables (Cabral-Romero & Padilla-Noriega, 2006; Eichwald et al., 2012). A su vez, los reovirus se replican y ensamblan en “factorías” o inclusiones perinucleares que pueden ser filamentosas o globulares, según el virus. En el caso de las inclusiones filamentosas, su formación depende de la estabilización de MT, ya que el tratamiento celular con nocodazol resulta en el cambio estructural a inclusiones globulares pequeñas dispersas en el citoplasma (Parker et al., 2002). También los flavivirus como el ZIKV forman los sitios de replicación reorganizando los MT y filamentos intermedios creando una estructura en forma de jaula alrededor. Pero en este caso, esta estructura depende de la inestabilidad de los MT, ya que bajo tratamiento con plactaxel, un estabilizador de MT, se reducen los títulos virales (Cortese et al., 2017).

También se ha descrito el papel de los MT en el ensamblaje de los viriones. La glicoproteína de la envoltura de los alfacoronavirus interacciona con la tubulina y se localiza en la región perinuclear, pero bajo la influencia de nocodazol se encuentra dispersa en el citoplasma, incorporándose en menor cantidad en los viriones y dificultando la salida viral (Rüdiger et al., 2016).

Al igual que en la entrada nuclear de algunos virus, los MT pueden intervenir en la salida viral permitiendo el movimiento de los viriones o componentes virales a través del citoplasma. Como ocurre con la cápside del virus HSV-1 (Pasdeloup et al., 2013) o su proteína de la envoltura pSU9 que se une a la quinesina-1 para el transporte anterógrado hacia la periferia axonal (Diefenbach et al., 2016); además se cree que su proteína VP22 podría estar involucrada en este paso al promover la estabilización e hiperacetilación de los MT (Elliott & O’Hare, 1998). Del mismo modo en el virus de la Hepatitis C también se ha observado este mecanismo de transporte anterógrado a

través de los MT, siendo imprescindible el estado acetilado de estos, ya que el tratamiento con nocodazol impide el transporte de la cápside, dificultando la salida viral (Coller et al., 2012). Además, Steeve Boulant et al., han descrito que la cápside madura del virus de la Hepatitis C redistribuye los “*lipid droplets*” alrededor del núcleo a través de los MT, concretamente hacia el MTOC. Este proceso es necesario para la salida viral, y el tratamiento celular con nocodazol reduce la salida viral al interferir en la redistribución (Boulant et al., 2008). Otros ejemplos son el virus de la peste porcina africana y el virus Herpes asociado al sarcoma de Kaposi, que transportan sus cápsides a través de los MT mediante la quinesina-1 y quinesina-2 respectivamente; así como también el virus de la peste porcina africana induce la acetilación de microtúbulos para su transporte a través del citoplasma celular y su consecuente salida (Jouvenet et al., 2004; Sathish et al., 2009).

Incluso algunos virus utilizan los MT para evadir la respuesta inmunitaria. En concreto, la proteína BHRF1 del virus de Epstein-Barr induce la hiperacetilación de los MT y la agrupación de mitocondrias cerca del núcleo formando un “mito-agresoma” dependiente de MT, todo ello conlleva a la mitofagia y subsecuente inhibición de la respuesta inmunitaria a través de MAVS (Glion et al., 2022). Así como la fosfoproteína del virus de la rabia que al dimerizarse se une a los MT y también es capaz de interactuar con STAT1, formando un complejo que secuestra STAT1 en el citoplasma, impidiendo su entrada al núcleo y posterior activación de la respuesta del IFN (Moseley et al., 2009).

Lo que demuestra la importancia de los MT no solo a nivel celular, sino también en diferentes etapas del ciclo viral de una gran diversidad de virus. Por tanto, podrían actuar como una diana en la restricción viral al igual que ocurre con la vía degradativa autofágica.

### **1.9. Autofagia e infección viral.**

La autofagia es una vía de degradación de componentes citoplasmáticos a través del lisosoma, tanto de macromoléculas como de orgánulos. Existen tres tipos de

autofagia que se diferencian en su mecanismo de acción: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Mizushima, 2011; Reggiori et al., 2012). En la microautofagia, se produce una invaginación hacia el interior de la membrana lisosomal para incorporar pequeñas partes del citoplasma (Mizushima et al., 2008; Z. Yang & Klionsky, 2010; Mizushima, 2011). En cambio, en la autofagia mediada por chaperonas citoplasmáticas se reconocen selectivamente proteínas solubles mal plegadas y se transportan directamente al lumen del lisosoma (Massey et al., 2006; Arias & Cuervo, 2011). En la macroautofagia (que se denominará autofagia a lo largo de la tesis doctoral), partes del citosol y orgánulos intactos son envueltos en una membrana de aislamiento o fagóforo, que evoluciona a una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma formando el autolisosoma, donde se degradará el contenido del autofagosoma al entrar en contacto con las hidrolasas lisosomales (Mizushima et al., 2008; Z. Yang & Klionsky, 2010; Mizushima, 2011) (**Figura 24**).

La autofagia constitutiva es un mecanismo importante en la homeostasis celular al eliminar orgánulos dañados, agregados de proteínas y proteínas de vida larga, manteniendo así el control de los componentes celulares. A su vez, los niveles de degradación a través de esta vía aumentan en situaciones de estrés celular como la falta de nutrientes. Sin embargo, tanto un exceso de autofagia como un bajo nivel puede producir la muerte celular (Mizushima et al., 2008; Z. Yang & Klionsky, 2010; Mizushima, 2011).

En esta vía de degradación se encuentran implicadas un gran número de proteínas relacionadas con la autofagia (ATG). Se han descubierto más de 30 genes *ATG* ("*Autophagy-related gene*") en levaduras, muchos de los cuales se conservan en eucariotas superiores e intervienen en los diversos pasos del proceso (Mizushima, 2011; Wesselborg & Stork, 2015; Nishimura & Tooze, 2020).

En condiciones celulares normales, el complejo macromolecular de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORC1) regula negativamente el complejo Ulk1-ATG13-FIP200. Bajo condiciones de inanición o falta de energía se promueve la autofagia

mediante la inhibición de mTORC1, como consecuencia de la activación de la proteína quinasa activada por AMP o del complejo Ulk-1-ATG13-FIP200, que puede regular la autofagia directamente fosforilando Beclin1 o indirectamente fosforilando Ambra1 provocando la separación de Beclin1 de su inhibidor Bcl2 (Z. Yang & Klionsky, 2010; Mizushima et al., 2011; A. M. K. Choi et al., 2013). Una vez se producen las señales para que se dé lugar la autofagia, se inicia la nucleación de la membrana del autofagosoma (fagóforo) y el reclutamiento de la maquinaria ATG, donde interviene también Beclin1 (Z. Xie & Klionsky, 2007; Z. Yang & Klionsky, 2010; A. M. K. Choi et al., 2013). Tras la nucleación, sigue la elongación de la membrana del autofagosoma. Este paso requiere de dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina, ATG5/ATG12 y ATG8/LC3 (Z. Xie & Klionsky, 2007; Z. Yang & Klionsky, 2010; A. M. K. Choi et al., 2013). En el último paso, se lleva a cabo la maduración de los autofagosomas que implica la fusión con el lisosoma, provocando la degradación del contenido que hay en su interior por las hidrolasas lisosomales (Z. Xie & Klionsky, 2007; Matsunaga et al., 2009; Z. Yang & Klionsky, 2010).

En base a la degradación de proteínas mal plegadas, se ha identificado la vía agresoma-autofagia como un sistema de defensa celular frente a la acumulación de proteínas mal plegadas aparte de los sistemas principales, chaperona y UPS (Kopito, 2000; L. Chin et al., 2008; L.-S. Chin et al., 2010). La diferencia entre la autofagia basal y la autofagia del agresoma es la especificidad de su cargo. En la autofagia basal se eliminan de forma no selectiva proteínas mal plegadas junto con proteínas y orgánulos celulares en buen estado, en cambio, en la autofagia del agresoma se eliminan de forma selectiva proteínas mal plegadas y agregadas en condiciones de estrés proteotóxico. Se cree que cuando existe un exceso de proteínas mal plegadas que no son capaces de ser degradadas por el sistema de plegado chaperona o UPS, se activa la vía agresoma-autofagia (L. Chin et al., 2008; L.-S. Chin et al., 2010). En este mecanismo de degradación, las proteínas mal plegadas y agregados de proteínas son reconocidos selectivamente y transportados a través de los MT por el complejo motor dineína hacia el MTOC donde se forman los agresomas en la región cercana al núcleo (Kopito, 2000; Garcia-Mata et al., 2002; L.-S. Chin et al., 2010) (**Figura 24**). La formación de agresomas aparte de proteger a las células secuestrando proteínas mal plegadas y agregadas que son tóxicas,

también actúan como un mecanismo de concentración para su eliminación a través de la autofagia (Kopito, 2000; L. Chin et al., 2008; L.-S. Chin et al., 2010).

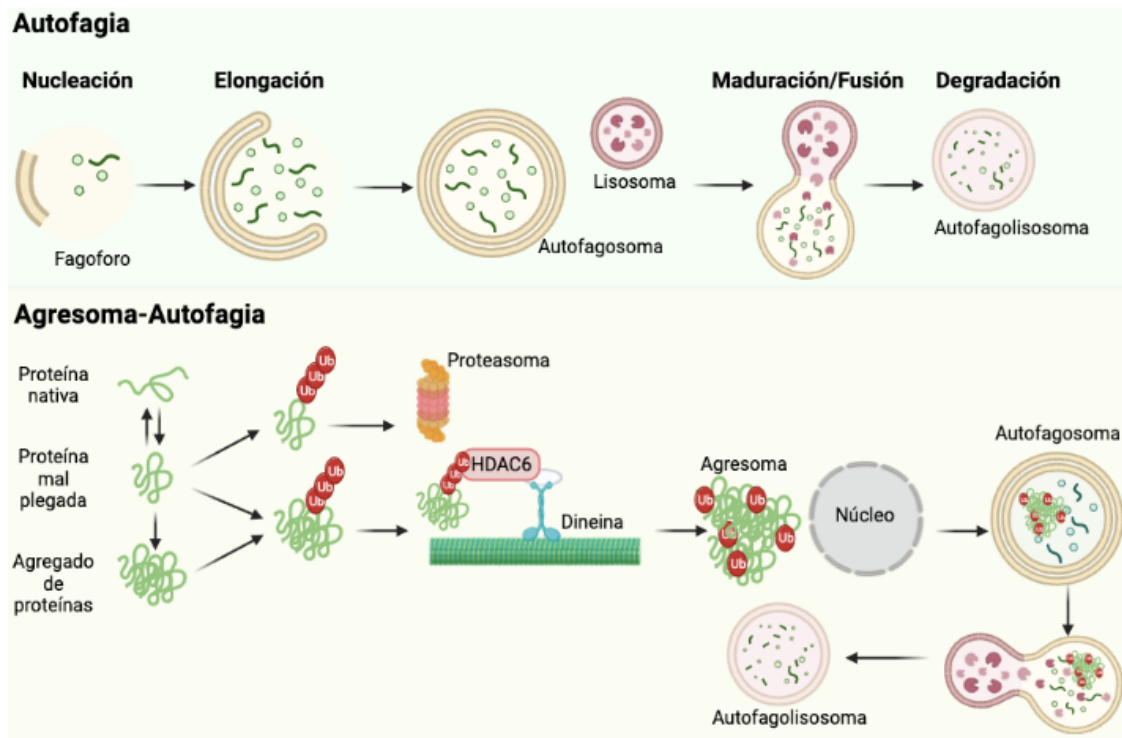
La formación del agresoma consta de diversas etapas. Primero se reconocen las proteínas mal plegadas y agregados que son marcadas postraduccionalmente, principalmente por ubiquitinación. Las proteínas celulares p62 a través de su dominio C-terminal asociado a ubiquitinas y HDAC6 a través de su dominio BUZ, reconocen estas marcas y se unen a ellas. A su vez, también se unen a LC3 (*“Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3”*) y al complejo motor dineína respectivamente, y se transportan a través de los MT hacia el centrosoma, siendo crucial la dinámica de MT en este punto (Kopito, 2000; Garcia-Mata et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003; L. Chin et al., 2008; E. Wong & Cuervo, 2010; Isogai et al., 2011; Mackeh et al., 2013) (**Figura 24**). Aparte de los MT, también intervienen los filamentos intermedios, que se organizan en una estructura similar a una jaula rodeando el agresoma (Johnston et al., 1998; Ardley et al., 2003). También podemos encontrar en el agresoma chaperonas moleculares, componentes de UPS y maquinaria de autofagia (Johnston et al., 1998; Garcia-Mata et al., 2002; H.-J. Lee et al., 2002; Iwata, Christianson, et al., 2005; L. Chin et al., 2008). Se cree que el agresoma podría concentrar el número de agregados para que la degradación por autofagia sea más eficiente (L. Chin et al., 2008; L.-S. Chin et al., 2010). A su vez, se ha descrito que los agresomas pueden inducir la autofagia secuestrando su inhibidor mTOR (Ravikumar et al., 2004; L. Chin et al., 2008).

Aunque falte mucho conocimiento sobre esta vía, se han identificado algunas moléculas que juegan un papel importante en el reconocimiento y transporte de las proteínas al agresoma, como el complejo motor dineína, HDAC6 o ataxina-3 (Johnston et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003; Burnett & Pittman, 2005). HDAC6 se transloca al agresoma en respuesta al aumento de los niveles de proteínas mal plegadas y también se ha caracterizado como una pieza clave en su formación (Kawaguchi et al., 2003). Esta distinción se debe a que actúa como una proteína adaptadora que une las proteínas poliubiquitinadas al complejo motor de dineína, permitiendo su transporte a través de los MT (Kawaguchi et al., 2003; Kopito, 2003; Olzmann et al., 2007; Aldana-Masangkay & Sakamoto, 2011). HDAC6 se une concretamente a través de su dominio BUZ a las proteínas poliubiquitinadas y a través de un dominio específico (65 aminoácidos



adyacentes a DD2) al complejo de dineína. Se ha descrito que aparte del dominio BUZ también son necesarios los dominios catalíticos DD1 y DD2 en la regulación de la formación del agresoma por parte de HDAC6, aunque todavía no se conozca de forma precisa el papel que juega la acetilación de tubulina aquí (Kawaguchi et al., 2003; Kopito, 2003; L. Chin et al., 2008). Lo que sí se ha visto, es que HDAC6 es esencial en el transporte retrógrado de autofagosomas y lisosomas y que la inhibición de la actividad desacetilasa de HDAC6 mediante tubacina bloquea el reclutamiento de LC3, confirmando la importancia de la actividad desacetilasa en la vía degradativa. Por lo que se ha hipotetizado que la acetilación de tubulina podría estar involucrada en la interacción o direccionalidad de las proteínas motoras (Iwata, Riley, et al., 2005).

Adicionalmente, aparte de intervenir en la formación de agresomas, HDAC6 también se encuentra implicado en la maduración del autofagosoma, es decir, en la fusión del autofagosoma con el lisosoma. HDAC6 recluta la maquinaria de remodelación de actina dependiente de cortactina hacia los agregados de proteínas ubiquitinadas, desacetila la cortactina promoviendo la remodelación de la F actina en una red que estimula la fusión del autofagosoma con el lisosoma y la posterior degradación del contenido del autofagosoma (J.-Y. Lee et al., 2010; Richter-Landsberg & Leyk, 2013; R. Wang et al., 2019).



**Figura 24: Vías de autofagia y agresoma-autofagia.** La vía de degradación autofágica está compuesta por diferentes pasos: nucleación (donde se recluta la maquinaria para iniciar la formación de la membrana), elongación (cuando aumenta de tamaño la membrana envolviendo los componentes citoplasmáticos), maduración o fusión (se fusionan las membranas del autofagosoma y el lisosoma) y la degradación (se degrada el contenido del autofagosoma gracias a las hidrolasas que porta el lisosoma). La vía agresoma-autofagia, es una autofagia selectiva de proteínas mal plegadas o agregados de proteínas como consecuencia de la formación de agresomas. Imagen creada en BioRender.

La autofagia aparte de ser un mecanismo regulador de la homeostasis celular también actúa como mecanismo de defensa celular frente a infecciones. Durante la infección viral, la célula es capaz de degradar partículas virales, componentes virales y/o factores celulares necesarios para la replicación viral mediante su degradación autofágica, interviniendo así también en la presentación de antígenos virales (Deretic et al., 2013; S. Liang et al., 2021). Por otro lado, los virus han evolucionado siendo capaces de utilizar estrategias que bloqueen e inviertan el proceso de autofagia en su propio beneficio (Mao et al., 2019; S. Liang et al., 2021). Por lo que la activación de la autofagia puede actuar de manera proviral o antiviral (X. Dong & Levine, 2013).

A nivel antiviral puede actuar por tres vías principales. Primero, mediante la degradación de las partículas virales, lo que implica a las hidrolasas lisosomales como se ha observado en múltiples virus. Por ejemplo, se ha descrito que la cápside del arbovirus

Sindbis se une a la proteína celular p62 dirigiendo la proteína viral hacia el autofagosoma (Orvedahl et al., 2010) o que los picornavirus, cuya infección produce daños en las membranas endosomales pero pueden ser degradados mediante autofagia (Staring et al., 2017). Es también el caso del virus de la Hepatitis C, cuya proteína no estructural NS5A interacciona con la proteína del RE, SCOTIN, enviando la proteína viral al autofagosoma para su degradación (N. Kim et al., 2016). Segundo, fomentando la producción de interferón lo que activa la respuesta inmunitaria innata. Así, Lee et al. señalaron la autofagia como un proceso necesario para el reconocimiento de virus ssRNA como el virus Sendai por parte del receptor celular TLR7 (H. K. Lee et al., 2007). A su vez, el ZIKV induce la expresión de genes estimulados por IFN en el cerebro de *Drosophila* (dSTING), los cuales actúan sobre ZIKV induciendo la autofagia (Y. Liu et al., 2018). Tercero, la autofagia también puede tener un efecto antiviral actuando en la respuesta inmunitaria adaptativa al intervenir en la presentación de antígenos. La infección de macrófagos por HSV-1 puede activar la autofagia favoreciendo su procesamiento y la posterior presentación de antígenos del MHC-I/HLA (English et al., 2009). También se ha visto que el antígeno 1 nuclear endógeno del virus Epstein-Barr se presenta a células T CD4+ mediante MHC-II y que la autofagia mejora dicho proceso (Paludan et al., 2005).

Pero los virus a su vez pueden actuar sobre esta vía de degradación bloqueándola o cambiando su función antiviral a proviral, utilizándola para llevar a cabo su infección y patogénesis (Orvedahl & Levine, 2009). Existen diversos ejemplos de virus que bloquean las proteínas ATG, también que inhiben la autofagia “*downstream*” o incluso que utilizan la autofagia para llevar a cabo su replicación. HSV-1 expresa la proteína ICP34.5 que se une a Beclin 1 inhibiendo la activación de la autofagia (Orvedahl et al., 2007). También, tanto la proteína 2 de la matriz del virus Influenza A como la fosfoproteína del virus Parainfluenza Humano tipo 4 inhiben la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Gannagé et al., 2009; B. Ding et al., 2014). A su vez, pueden utilizar la autofagia a su favor, los autofagosomas son un lugar perfecto para la replicación al proteger el material genético y al permitir la concentración de intermediarios esenciales (S. Liang et al., 2021).

Los virus de ARN son el tipo viral que más frecuentemente modifica la autofagia con el fin de promover su replicación (J. Mao et al., 2019), como es el caso de DENV (Heaton & Randall, 2010), el virus de la Hepatitis C (Dreux et al., 2009), el virus Coxsackie B3 (J. Wong et al., 2008) y B4 (S. Y. Yoon et al., 2008), SARS-CoV-2 (D. Chen & Zhang, 2022), VIH-1 (Espert et al., 2009) o ZIKV (Q. Liang et al., 2016).

En el caso del VIH-1 se ha descrito una modificación de dicha vía degradativa en función del tipo celular. Se ha observado una represión de la autofagia en células T CD4 infectadas productivamente por el virus y, por otro lado, una inducción en líneas celulares de macrófagos y monocitos posiblemente necesaria para una infección productiva (Espert et al., 2009). La envoltura de VIH-1 también promueve la autofagia y la muerte celular de células T no infectadas en contacto con células T CD4 infectadas debido a su capacidad fusogénica (Denizot et al., 2008; Blanco et al., 2004). Se ha descrito que las primeras etapas no degradativas de la autofagia mejoran la producción de VIH-1 al promover el procesamiento de la proteína viral Gag, y que, para evitar la degradación viral, la proteína viral Nef interacciona con la proteína celular Beclin 1 inhibiendo las últimas etapas degradativas de la vía (Kyei et al., 2009). De igual modo, HDAC6 promueve la degradación autofágica de las proteínas virales Vif y Pr55Gag actuando como un factor antiviral (Valera et al., 2015) y Nef actúa sobre HDAC6 para evitar dicha degradación (Marrero-Hernández et al., 2019). Por lo que, en resumen, el VIH-1 regula la autofagia celular en función del tipo celular y la etapa del ciclo viral.

En el ZIKV también se ha descrito un efecto proviral de la autofagia, interviniendo en la transmisión vertical y patogénesis del virus. La infección de fibroblastos por parte del ZIKV produce la formación de autofagosomas asociados a una mejora en la replicación viral (Hamel et al., 2015), al igual que la infección de los trofoblastos que también induce la actividad autofágica mejorando la infectividad (B. Cao et al., 2017). Esta inducción de la autofagia por parte del ZIKV se ha relacionado con la enfermedad congénita asociada al virus. En ratones deficientes del gen *Atg16/1* se limitó la transmisión vertical del virus al feto y el daño fetal y de la placenta característicos del ZIKV, así como el tratamiento con el inhibidor autofágico hidroxiclороquina, atenuó la infección placentar y fetal del ZIKV (B. Cao et al., 2017). También se ha descrito en células

madre neurales fetales humanas la inducción de la autofagia por parte de las proteínas del ZIKV NS4A y NS4B, al disminuir la fosforilación de Akt y con ello inhibir la actividad de mTOR (Q. Liang et al., 2016).

Por lo que, aunque el mecanismo degradativo de autofagia sea un mecanismo de defensa celular, los virus son capaces de evolucionar y de modificar la vía para poder llevar a cabo su ciclo viral, y en este sentido, los virus ARN como el VIH-1 y el ZIKV son la clase viral más destacable.

En conclusión, los virus VIH-1 y ZIKV, ambos virus ssRNA(+), son virus reemergentes que suponen un reto a nivel de salud pública mundial. Por lo que su estudio a nivel de biología molecular es imprescindible en la búsqueda de posibles tratamientos y/o curas que permitan su erradicación o disminución de su impacto. Conociendo así sus ciclos virales e interacciones con proteínas celulares que podrían ser claves en el control de la infección viral, como podría ser el caso de HDAC6. Por ello, hemos definido las hipótesis y objetivos que exponemos en el siguiente apartado.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## 2. Hipótesis y Objetivos.

El objetivo de la tesis doctoral es el estudio y la descripción de la proteína celular HDAC6 como un posible factor de restricción viral sobre virus ARN+. En trabajos previos se han identificado funciones antivirales de HDAC6 sobre virus ARN como el VIH-1 e Influenza, interviniendo tanto su capacidad de desacetilación de MT como su capacidad autofágica. Nuestra hipótesis se centra en el control de la infección por parte de HDAC6 sobre virus ARN+, en concreto sobre VIH-1 actuando en la señalización infectiva del complejo de envoltura, y sobre la estabilidad de la proteína y las funciones virales y citotóxicas del factor NS5 del ZIKV.

- Hipótesis 1:

Proponemos que la capacidad funcional de los complejos de envoltura (Env) viral de virus aislados de individuos VIH-1+ correlaciona con su perfil clínico, y que la propiedad infectiva de las Env radica en su capacidad a señalizar en la célula diana a través de CD4, para evitar así la restricción que impone el factor antiviral HDAC6.

- Hipótesis 2:

Proponemos a la proteína no estructural NS5 como regulador del citoesqueleto y del flujo autofágico, funciones en las que se encuentra implicado HDAC6. Por lo que, a su vez, también proponemos a HDAC6 como factor antiviral al ser modulador de ambos procesos celulares.

Con el fin de corroborar las hipótesis, planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar el complejo de Env de virus aislados de distintos grupos de pacientes VIH-1 en su capacidad infectiva.

- 1.1. Evaluar el nivel de expresión del complejo glicoproteico Env en la superficie de células productoras de viriones, de virus aislados de los individuos VIH-1+ de estudio.
  - 1.2. Estudiar la afinidad o capacidad de unión a CD4 de los complejos de Env de virus aislados de distintos grupos de pacientes VIH-1+.
  - 1.3. Evaluar los niveles de transferencia viral entre una célula infectada, expresando los complejos de Env de virus aislados de distintos grupos clínicos de individuos VIH-1+, y células no infectadas, mediada por la unión de estos complejos Env al CD4.
  - 1.4. Estudiar la infecciosidad de los complejos de Env de virus aislados de distintos grupos clínicos de pacientes VIH-1+, en las primeras etapas del ciclo viral.
2. Caracterizar a NS5 como responsable del reordenamiento de MT y del cambio del flujo autofágico, dependiente de HDAC6, de las células infectadas.
    - 2.1. Caracterizar la vía por la cual NS5 promueve la estabilización del citoesqueleto de tubulina (MT), medida por los niveles de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina de los MT.
    - 2.2. Estudiar el efecto de NS5 sobre la vía autofágica celular.
3. Caracterizar a HDAC6 como factor de restricción viral sobre NS5.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. Material y Métodos.

#### 3.1. Reactivos.

Para producir las soluciones necesarias de los diferentes experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral, se utilizaron los siguientes reactivos (las soluciones se producen en agua ultrapura MiliQ®).

**Tabla 4:** Reactivos utilizados en la preparación de soluciones.

Nombre	Referencia
Tween 20	P9416-100mL. Sigma-Aldrich
EDTA (ácido etildiaminotetraacético)	E5134-100G. Sigma-Aldrich
Trizma Base	T6066-1Kg. Sigma-Aldrich
Trizma Hydrochloride	T5941-1Kg. Sigma-Aldrich
Glicina	G8898-1Kg. Sigma-Aldrich
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	L3771-500g. Sigma-Aldrich
Triptona	403682.1210. PanReac Applichem
Extracto de levadura	403687.1210. PanReac Applichem
Agar bacteriológico tipo americano (ingrediente) CULTIMED	Ref:402303.1210. PanReac Applichem
Cloruro de sodio (NaCl)	S3014-5KG. Sigma-Aldrich
Tritón™ X-100	Ref:9036-19-5. Sigma-Aldrich
Desoxicolato sódico	Ref:30970. Sigma-Aldrich
Complete 25X	11697498001. Roche Diagnostics
HEPES	H3375-500G. Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio (KCl)	MR6004. M&B
1,4-Dithiothreitol (DTT)	43817. Sigma-Aldrich
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Ref: 10837091001. Roche
Nonidet P40 Substitute (NP40)	19828. USB Corporation
Glicerol	G5516-1L. Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	M-7522. Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	115-39-9. Merck
Dimetilsulfóxido (DMSO)	D8418-100ML. Sigma-Aldrich

En la tabla se indican los reactivos utilizados en la producción de soluciones necesarias en los diferentes experimentos llevados a cabo. En la columna izquierda se indica el nombre del reactivo y en la columna derecha su referencia.

#### 3.2. Anticuerpos.

Se han utilizado distintos anticuerpos que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 5: Anticuerpos.

Nombre	Dilución	Referencia	Técnica
$\alpha$ -2G12	6 $\mu$ g/mL	AB002 Polymun Scientific	Citometría de flujo
$\alpha$ -IgGB12	6 $\mu$ g/mL	Polymun Scientific	Citometría de flujo
<b>CD4+ T Cell Isolation Kit, Biotin-AB-Cocktail</b>		130-096-533 Miltenyi Biotec	Aislamiento de células T CD4+
$\alpha$ -CD4 v4 Mouse anti-Human, FITC, Clone-L120	1,5/50	340422 BD Biosciences	Citometría de flujo
$\alpha$ -HDAC6	1/500	sc-11420. Santa Biotechnology	<i>Western Blot</i> Cruz
$\alpha$ -HA	1/200	sc-7392 Santa Biotechnology	<i>Western Blot</i> Cruz
$\alpha$ -HA	1/50	sc-805 Santa Biotechnology	Cruz Inmunofluorescencia
$\alpha$ -p62 (SQSTM1)	1/200	sc-28359 Santa Biotechnology	Cruz <i>Western Blot</i>
$\alpha$ -Acetylated Tubulin	$\alpha$ - 1/5000	T7451 Sigma-Aldrich	<i>Western Blot</i>
$\alpha$ - $\alpha$ -Tubulin	1/3000	T6074 Sigma-Aldrich	<i>Western Blot</i>
$\alpha$ -Histona 3	1/500	sc-517576 Santa Cruz Biotechnology	<i>Western Blot</i>
$\alpha$ -Laminina $\beta$ 1	1/500	sc-374015 Santa Biotechnology	Cruz <i>Western Blot</i>
$\alpha$ -Myc	WB: 1/200 IF: 1/50	sc-40 Santa Biotechnology	Cruz <i>Western Blot</i>
$\alpha$ -RIG-I	1/200	sc-376845 Santa Biotechnology	Cruz <i>Western Blot</i>
$\alpha$ -Ac-lysine	1/200	sc-32268 Santa Biotechnology	Cruz <i>Western Blot</i>
$\alpha$ -PML	1/50	Sc-966 Santa Biotechnology	Cruz Inmunofluorescencia

<b><math>\alpha</math>-SUMO-1 (C9H1)</b>	1/50	4940S Signaling Technology	Immunofluorescencia
<b><math>\alpha</math>-PE-labeled goat anti-human IgG.</b>	1/200	AB_2337530 Jackson ImmunoResearch	Citometría de flujo
<b><math>\alpha</math>-HIV-1 core antigen-RD1, KC57</b>	1/50	6604667 Scientific	IZASA Citometría de flujo
<b><math>\alpha</math>-Mouse IgG (whole molecule)- Peroxidase antibody</b>	1/2000	A4416 Sigma-Aldrich	<i>Western Blot</i>
<b><math>\alpha</math>-Rabbit IgG (whole molecule)- Peroxidase antibody</b>	1/2000	A6154 Sigma-Aldrich	<i>Western Blot</i>
<b>Alexa Fluor 568 goat <math>\alpha</math>-Mouse IgG1 (<math>\gamma</math>1)</b>	1/500	A21124 Life technologies	Immunofluorescencia
<b>Alexa Fluor 488 goat <math>\alpha</math>-Mouse IgG1 (<math>\gamma</math>1)</b>	1/500	A21121 Life technologies	Immunofluorescencia
<b>Alexa Fluor 568 goat <math>\alpha</math>-Rabbit IgG (H+L)</b>	1/500	A11011 Invitrogen	Immunofluorescencia
<b>Alexa Fluor 488 goat <math>\alpha</math>-Rabbit IgG (H+L)</b>	1/500	A11008 Invitrogen	Immunofluorescencia
<b>Alexa Fluor 488 donkey <math>\alpha</math>-Mouse IgG (H+L)</b>	1/500	A21202 Life technologies	Immunofluorescencia
<b>Alexa Fluor 568 donkey <math>\alpha</math>-Goat IgG (H+L)</b>	1/500	A11057 Invitrogen	Immunofluorescencia

En la tabla se indican los anticuerpos utilizados en los diferentes experimentos desarrollados. En la columna izquierda se indica el nombre del anticuerpo, en la siguiente columna su concentración final o dilución, a continuación, su referencia y en la columna derecha la técnica en la que se utiliza.

### 3.3. Cultivo de las líneas celulares y células primarias.

#### 3.3.1. Líneas celulares y células primarias.

**HEK-293T:** es una línea celular procedente de células de riñón embrionario humano que derivan de la línea celular 293. Las células 293 fueron modificadas insertándoles el gen del antígeno T del Virus del Simio 40 (SV40), lo cual permite la replicación episomal de los plásmidos que contienen el origen de replicación del SV40, favoreciendo su amplificación y expresión. Como consecuencia, es frecuentemente utilizada en

experimentos de transfección. Es una línea celular adherente que se cultiva en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos penicilina y estreptomina al 1%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**HEK-Lucia<sup>TM</sup> RIG-I:** línea celular que procede de la línea celular HEK-Lucia<sup>TM</sup> Null, la cual a su vez deriva de células HEK-293 que expresan de forma estable el gen reportero de luciferasa Lucia que está bajo control del promotor ISG54 inducible por interferón. Además, esta línea celular expresa altos niveles del gen *RIG-I*. Por todo ello, se utiliza para realizar ensayos de Interferón. Es una línea celular adherente que se cultiva en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos penicilina y estreptomina al 1%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Además, para la selección de las células se añaden al cultivo Blastidina, Normocina y Zeocina.

**TZM-bl:** es una línea celular de carcinoma del epitelio cervical humano, que deriva de un clon de células HeLa, antiguamente denominado JC53-bl. Esta línea celular se caracteriza por ser muy permisiva en la infección por la mayoría de las cepas de VIH y SIV, ya que tienen un alto grado de expresión del receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4. Además, tiene integrados los genes de *Luciferasa* (gen *luc*) y *β-Galactosidasa* en su genoma bajo el control del promotor LTR del VIH-I, lo que permite medir de forma precisa la infección. Es una línea celular adherente que se cultiva en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**MOLT<sub>NL4.3</sub> y MOLT<sub>BaL</sub>:** es una línea celular producida en el laboratorio del Dr. Julià Blanco, la cuál ha sido infectada de manera crónica con aislados de virus VIH-I CXCR4 trópicos y CCR5 trópicos, denominados VIH-I NL4.3 y VIH-I BaL respectivamente. Es una línea celular que crece en suspensión y se cultiva en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**Células T CD4+ primarias de donantes sanos:** son células T CD4+ obtenidas por selección inmunogénica negativa de células mononucleares de sangre periférica o PBMC ("*Peripheral Blood Mononuclear Cells*"). Las células PBMC se han aislado previamente mediante gradiente de densidad con Ficoll de muestras sanguíneas de donantes sanos.



Las células crecen en suspensión y se mantienen en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3.2. Cultivo celular.

**Células HEK-293T y TZM-bl:** para realizar los pases de células, se elimina el medio del frasco y se realiza un lavado añadiendo PBS 1X. Al ser una línea celular adherente, se deben despegar de la superficie del frasco, para ello se retira el PBS y se añade 2,5 mL de Tripsina o Versene<sup>®</sup>. Se incuba durante aproximadamente 5 minutos (si se utiliza Versene<sup>®</sup>, la incubación se llevará a cabo a 37°C en el incubador) y una vez se han despegado del frasco, se añade medio DMEM completo y se mezcla homogeneizando la concentración de células en el volumen. Se conserva una parte en el frasco al cual se vuelve a añadir medio DMEM completo y se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El volumen restante se guarda para la siembra o se desecha si sólo se quiere realizar un pase a las células. Se pasan cada 2 días aproximadamente, según su confluencia.

**Células HEK-Lucia<sup>TM</sup> RIG-I:** el procedimiento es igual que en las células HEK-293T y TZM-bl. La única diferencia es que en el cultivo celular se añade Blastocidina, Normocina y Zeocina para la selección de las células que expresan de manera estable altos niveles de RIG-I.

**MOLT<sub>NL4.3</sub> y MOLT<sub>BaL</sub>:** para realizar los pases de células, se elimina cierta cantidad de medio del frasco y se añade el mismo volumen que hemos descartado de medio RPMI completo y se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El volumen descartado se guarda para la siembra o se desecha si sólo queremos pasar las células. Se pasan cada 2 días aproximadamente, según su confluencia.

Para evitar contaminación por micoplasma, en nuestro laboratorio, se añade MycoZap<sup>TM</sup> Prophylactic al cultivo celular.

Para realizar el recuento de células se empleó la tinción celular de azul de tripano (“*Trypan Blue*”) y se calculó la concentración celular con la cámara de Neubauer o con el NucleoCounter NC-250™, Automated Cell Analyzer.

**Tabla 6: Soluciones para el cultivo celular.**

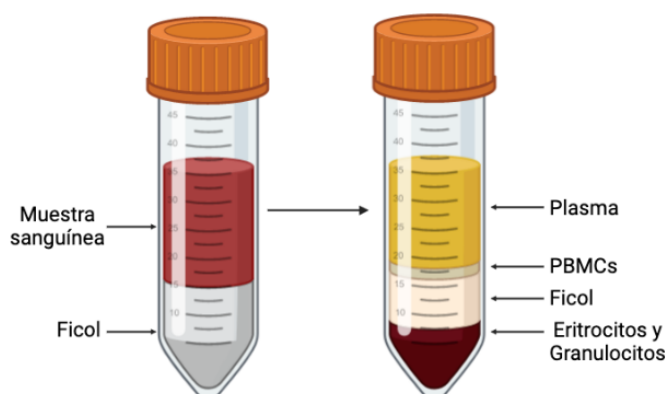
Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo para las líneas celulares HEK-293T, T2M-bl y HEK-Lucia™ RIG-I	L0104-500 Biowest
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo para las células MOLT <sub>NL4.3</sub> y MOLT <sub>BaL</sub> y células T CD4+ primarias de donantes sanos.	61870-010 Gibco™
<b>Suero Bovino Fetal (FBS)</b>	Suero para suplementar el medio de cultivo. Se añade a una dilución 1/10.	10270-106 Gibco™
<b>Penicilina-Estreptomicina</b>	Antibióticos de amplio espectro. Se añade a una dilución 1/100.	L0018-100 Biowest
<b>Blasticidina</b>	Antibiótico de selección para la línea celular HEK-Lucia™ RIG-I. Se añade a una dilución 3/1000 a partir de la concentración madre de 10 mg/mL.	BLL-42-01 InvivoGen
<b>Normocina</b>	Antibiótico de selección para la línea celular HEK-Lucia™ RIG-I. Se añade a una dilución 2/1000 a partir de la concentración madre de 50 mg/mL.	NOL-42-06 InvivoGen
<b>Zeocina</b>	Antibiótico de selección para la línea celular HEK-Lucia™ RIG-I. Se añade a una dilución 1/1000 a partir de la concentración madre de 100 mg/mL.	ZEL-42-01 InvivoGen
<b>PBS 1X</b>	Solución salina tamponada (pH 7,4). Se puede comprar a una marca comercial o se puede hacer casero. PBS 10X (1L): NaCl 80 g, KCl 2 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 14,4 g y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g.	PBS: 10010015 Gibco™
<b>Versene® (1X)</b>	Solución para la disociación celular.	15040-066 Gibco™
<b>Tripsina-EDTA 1X</b>	Solución para la disociación celular.	L0930-100 Biowest
<b>MycoZap™ Prophylactic</b>	Para prevenir la contaminación por micoplasma. Se añade a una dilución 1/1000 a partir de la concentración madre de 500X.	VZA-2031 Lonza
<b>Azul de Tripano (Trypan Blue)</b>	Colorante ácido azul.	T8154 Sigma-Aldrich

Medios y suplementos utilizados en el cultivo celular. En la columna izquierda se indica el nombre de la solución, en la columna central se describe su función y/o composición y en la columna derecha su referencia.

### 3.3.3. Obtención de células T CD4+ primarias a partir de muestras sanguíneas de donantes sanos.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se han obtenido a partir de residuos leucocitarios de sangre periférica (“*buffy-coat*”) de donantes sanos, procedentes del Banco de Sangre y Tejidos (Banc de Sang i Teixits, Barcelona).

La muestra sanguínea se diluye añadiendo 40 mL de PBS a la bolsa de “*buffy-coat*” y se divide la dilución en 2 falcons de 50 mL que contienen 15 mL de ficol (Ficoll® Paque) cada uno. Se centrifugan a 1850 rpm durante 30 minutos con aceleración y desaceleración muy lenta para separar las diferentes células sanguíneas por gradiente de densidad. Seguidamente, se recoge la capa blanquecina que corresponde con las células PBMC y se añaden a otro falcon de 50 mL (**Figura 25**).



**Figura 25: Esquema de separación de las diferentes células sanguíneas mediante gradiente de densidad.** Se añade la muestra sanguínea a un falcon que contiene ficol y mediante centrifugación se separan por gradiente de densidad las células sanguíneas (de abajo hacia arriba encontramos: eritrocitos y granulocitos, la capa de ficol, PBMC y por último el plasma). Imagen creada en BioRender.com.

Se lavan las células PBMC 2 veces con PBS, se resuspende el pellet en 15 mL de medio RPMI completo y se cuantifica el número de células PBMC que se han aislado. Una vez conocida la concentración celular, se calcula el número de PBMC que se tiene que separar para purificar X células T CD4+ que se utilizarán para el cocultivo del ensayo de transferencia viral sabiendo que se necesitan 100.000 células por pocillo (**apartado 3.5.4**). Se centrifugan las células PBMC necesarias durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspenden con la cantidad de anticuerpo necesario según la siguiente fórmula:

FD= Factor de dilución (Millones de PBMC que tenemos que coger por 0,1)  
BP= Buffer de purificación  
(40 x FD)  $\mu$ L BP + (10 x FD)  $\mu$ L Biotin-AB-Cocktail

A continuación, se incuban 5 minutos a 4°C, tras los cuales se añaden las Microbead (Perfect Count™ Microspheres 100) según la siguiente fórmula:

(30 x FD)  $\mu$ L BP + (20 x FD)  $\mu$ L Microbeads

Se incuban 10 minutos a 4°C. Una vez transcurridos los 10 minutos de incubación, se añade el volumen de BP que falta para obtener un volumen final de 500  $\mu$ L. Y a continuación, se utiliza el Robot AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) que separará mediante selección negativa las células T CD4+.

Se centrifugan las células T CD4+ aisladas a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizan dos lavados con PBS. Se resuspende el pellet en 5 mL de medio RPMI completo y se cuantifica la concentración final que tenemos. Una vez contadas, se resuspenden las células para que se encuentren a una concentración de 2 M/mL con medio RPMI completo y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para realizar el cocultivo al día siguiente.

Por otro lado, una vez aisladas las células T CD4+, se realiza un marcaje de los receptores CD4 para confirmar que se ha realizado correctamente el aislamiento. Para ello, se realiza el siguiente protocolo:

En una placa de 96 pocillos con fondo cónico se añaden 50  $\mu$ L de células T CD4+ aisladas y 1,5  $\mu$ L de anticuerpo  $\alpha$ -CD4 v4 Mouse anti-Human y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavan con PBS y se fijan con 200  $\mu$ L de formaldehído al 1% (Ref. F1635, Sigma-Aldrich). Además, se tienen dos controles, se marca en un pocillo 50  $\mu$ L de células PBMC y en otro pocillo se añaden células T CD4+ sin marcaje de anticuerpo. Para medir el porcentaje de células CD4 positivas y confirmar que el aislamiento se ha producido de manera correcta se analizan las células mediante el citómetro de flujo BD FACSCelesta™ (Becton Dickinson).

A continuación, en modo resumen, se muestran las soluciones empleadas en este proceso (**Tabla 7**).

**Tabla 7: Soluciones y kits para la purificación de células T CD4+ primarias.**

Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>Ficoll® Paque</b>	Solución para crear un gradiente de densidad y separar los diferentes tipos celulares.	GE17-1440-02. Sigma-Aldrich
<b>Perfect Count™ Microspheres 100</b>	Sistema basado en microesferas que junto al cocktail de anticuerpos del kit de separación de células T CD4+, permite realizar el aislamiento de las células T CD4+.	CYT-PMC100 Cytognos
<b>Buffer de Purificación (BP)</b>	Buffer en el que se resuspende el cocktail de anticuerpos y las microesferas del kit de separación de células T CD4+. Receta: PBS+EDTA 50 mL y FBS 250 µL. Se conserva a 4°C.	PBS: 10010015 Gibco™ EDTA: E7889. Sigma-Aldrich

Soluciones y kits utilizados en la purificación de células T CD4+ primarias. En la columna izquierda se indica el nombre de la solución o kit, en la columna central se describe su función y/o composición y en la columna derecha su referencia.

### 3.3.4. Transfección.

Se han utilizado agentes transfectantes diferentes según el experimento:

**X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent:** (Ref. 06365787001, Roche Diagnostics). Agente transfectante con una alta eficiencia para gran diversidad de líneas celulares y una baja citotoxicidad celular. Se añade en un eppendorf medio de cultivo DMEM incompleto a un volumen de 200 µL por pocillo si se siembra en una placa de 6 pocillos o 100 µL/pocillo si es una placa de 12 pocillos, y el ADN plasmídico a transfectar. Se agita la mezcla en un vórtex, se añade el X-tremeGENE a una relación 3 µL de XtremeGENE:1 µg de ADN y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se añade a cada pocillo de las placas sembradas el día anterior y se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el siguiente paso del experimento a realizar.

**FuGENE HD Transfection Reagent:** (Ref. E2312, Promega). Agente transfectante con un gran rendimiento de transfección que ejerce el mínimo efecto sobre la fisiología

celular. Se añade en un eppendorf medio de cultivo DMEM incompleto a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo y el ADN plasmídico a transfectar. Se agita en el vórtex y se añade el FuGENE HD a una relación 3  $\mu\text{L}$  de FuGENE HD:1  $\mu\text{g}$  de ADN y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se añaden los 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de las placas sembradas el día anterior y se incuba a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células son procesadas entre las 24 y 72 horas tras la transfección.

**PEI25K™:** (Ref. 23966-1, Polysciences Inc.). Agente transfectante que ofrece una alta expresión génica en células HEK-293 y muy rentable a nivel económico. Se añade en dos eppendorf NaCl 150 mM estéril a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo si se siembra en una placa de 6 pocillos o 50  $\mu\text{L}$ /pocillo si se siembra en una placa de 12 pocillos. En uno de los eppendorf se añade el ADN plasmídico y en el otro el PEI25k™ en una relación 3  $\mu\text{L}$  de PEI25k™:1  $\mu\text{g}$  de ADN. Se agitan ambos eppendorf mediante vórtex y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo de incubación, se incorpora la solución de PEI25k™ a la solución del ADN plasmídico, se mezcla mediante vórtex y se vuelve a incubar a temperatura ambiente, pero esta vez durante 30 minutos. Tras los cuales se incorporan los 100  $\mu\text{L}$  o 200  $\mu\text{L}$  a los pocillos de las placas sembradas el día anterior y se incuban a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células son procesadas entre las 24 y 72 horas tras la transfección.

**Lipofectamina RNAiMAX:** (Ref. 13778-075, Invitrogen). En este caso, es un agente transfectante específico para siRNA. Se añaden en un eppendorf 120  $\mu\text{g}$  de siRNA en 150  $\mu\text{L}$  por pocillo de medio de cultivo DMEM incompleto y, por otro lado, en otro eppendorf, 9  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina RNAiMAX en 150  $\mu\text{L}$  por pocillo de medio de cultivo DMEM incompleto. Tras 5 minutos de incubación se incorporan los 150  $\mu\text{L}$  de la solución del siRNA a la solución de lipofectamina. Se incorporan los 250  $\mu\text{L}$  de la mezcla en los pocillos de las placas sembradas y se incuban a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células son procesadas entre las 24 y 72 horas tras la transfección.

---

### 3.4. Biología molecular.

#### 3.4.1. Constructos (plásmidos) codificantes para cuerpo y proteínas virales, proteínas celulares y ARN de interferencia.

**Env de pacientes con diferente perfil clínico:** se obtuvieron 41 envolturas procedentes de diferentes orígenes: HIV HGM BioBank integrado en la Red de Investigación de SIDA Española (RIS-RETIC, ISCIII) (muestras 1,2,3,6,7,8,13,14,15,16,17,18,19), el Centro Sanitario Sandoval, Hospital Clínico San Carlos (muestras 21,22,24,28,30,31,32,33,36,37,38,39,40,42,43,44,45,46,49,50,51,52), la Fundación de Investigación IrsiCaixa (muestras 9,10,11,12) y el Hospital Xeral de Vigo (muestras 26,27). Las muestras proceden de tres fases de la epidemia en España, de 1993-94, 2004-2005 y 2013-2014, y de pacientes con diferentes perfiles clínicos, 10 Env provienen de 6 pacientes LTNP-EC, 10 clones de 6 pacientes vLTNP, 10 clones de 6 pacientes progresores (P) “Antiguos” (“*Old*”) y 11 clones de 10 pacientes P “Modernos” (“*Modern*”). Fueron procesadas según los procedimientos actuales y congeladas inmediatamente después de su recepción. Los genes *env* se amplificaron en el laboratorio del Dr. Cecilio López Galíndez y la Dra. Concepción Casado mediante PCR anidada de ADN proviral, los productos de las cuáles se clonaron en el vector de expresión pcDNA3.1D/V5-His’s Topo (Invitrogen). A continuación, los plásmidos fueron transformados en *E.coli* DH5 $\alpha$  y secuenciados para comprobar la correcta inserción del gen. Los números de identificación y las características de los pacientes se encuentran en la **Tabla 13**. Los pacientes del estudio dieron su consentimiento informado para los estudios de análisis genético, aprobados por el Comité de Ética e Investigación del “Centro Sanitario Sandoval”. Y sus muestras fueron registradas en el Registro Nacional Español del Biobanco de Investigación Biomédica con el número C.0004030. Las investigaciones clínicas se realizaron de acuerdo con los principios expuestos en la Declaración de Helsinki. También los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III con CEI PI 05\_2010-v3 y CEI PI 09-2013.

**envBaL:** (Ref: 11445 del “NIH-AIDS Research and Reference Reagent Program”). Plásmido que contiene los genes *env* y *rev* de un virus de laboratorio (virus BaL) que tiene tropismo CCR5. Al igual que las envolturas de los pacientes, se clonaron en el vector de expresión pcDNA3.1D/V5-His's Topo (Invitrogen).

**envNL4.3:** plásmido que proviene de un plásmido anterior, pHEnv, el cual contiene los genes *env* y *rev* de un virus de laboratorio (virus NL4-3) que tiene tropismo CXCR4. A partir de dicho plásmido se amplificaron los genes *env* y *rev* del virus NL4-3 y al igual que las envolturas de pacientes y la envoltura control BaL, se clonaron en el vector de expresión pcDNA3.1D/V5-His's Topo (Invitrogen).

**pTat Δenv:** plásmido del cuerpo viral de VIH-1 que contiene el gen *tat* del VIH-1 clonado en el vector pDS56, RBH, 6X y carece del gen *env*. Lo cual, nos permite generar partículas virales con el mismo cuerpo viral pero diferentes envolturas para así poder comparar sus características. El plásmido proviene del “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”.

**pSG3 Δenv:** (Ref: 11051 del “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”). Plásmido del cuerpo viral de VIH-1 que carece del gen *env* completo. Al plásmido pSG3.1 se le ha insertado un codón de parada tras el aminoácido 142 del gen *env*. Además, el plásmido contiene el gen *luc* y como consecuencia las células infectadas producirán luciferasa permitiéndonos medir la capacidad infectiva de los viriones.

**pcDNA™ 3.1 (+)/(-):** (Ref: V790-20 y V795-20, Invitrogen). Vector de expresión que se utiliza en el proceso de clonaje, ya que posee el origen de replicación del bacteriófago F1, el promotor T7 y varios sitios de clonaje. En nuestro caso se utiliza como ADN compensatorio en la transfección y como control negativo de los experimentos.

**pNS5-myc:** la secuencia de ADN que codifica para la proteína no estructural NS5 de ZIKV (cepa Zika MP1751\_East\_African (Uganda)) fue clonada con el “tag” myc en el extremo C-terminal utilizando los sitios de restricción BamHI/XhoI y la ligación ADN T4 en pcDNA™ 3.1(+). Plásmido obtenido por la Dra. Judith Estévez Herrera a través del



Proyecto Agustín de Betancourt “Zikassays” del Cabildo Insular de Tenerife para la Universidad de La Laguna y en colaboración con la empresa Bioassays en Madrid.

**pNS5-HA:** la secuencia de ADN que codifica para la proteína no estructural NS5 de ZIKV (cepa Zika MP1751\_East\_African (Uganda)) fue clonada con el “tag” hemaglutinina de la Influenza humana (HA) en el extremo C-terminal utilizando los sitios de restricción BamHI/XhoI y la ligación ADN T4 en pcDNA™ 3.1(+). Plásmido obtenido por la Dra. Judith Estévez Herrera a través del Proyecto Agustín de Betancourt “Zikassays” del Cabildo Insular de Tenerife para la Universidad de La Laguna y en colaboración con la empresa Bioassays en Madrid.

**pNS5K330A-myc:** el plásmido pNS5-myc se linealizó mediante PCR inversa utilizando cebadores de 15pb superpuestos entre sí en sus extremos 5' (5'-CCTGTCAGCGCCCTGGGATGTGGTGA<sup>CTGG</sup>-3' y 5'-CAGGGCGCTGACAGGAGTCTAACAACCC-3') y que contienen la sustitución deseada AAG (Lisina) por GCG (Alanina) dentro de las regiones que solapan mediante ClonAmp HiFi PCR (Ref: 639298, Takara). El producto de PCR se trató con “Cloning Enhancer” para eliminar el molde circular y se purificó con “Nucleospin Gel” y el kit “PCR Clean-up” (In-Fusion® HD Cloning Plus, ref:638910, Takara). Finalmente se utilizó “Fusion HD Enzyme” para el ensamblaje. Plásmido obtenido por la Dra. Judith Estévez Herrera a través del Proyecto Agustín de Betancourt “Zikassays” del Cabildo Insular de Tenerife para la Universidad de La Laguna y en colaboración con la empresa Bioassays en Madrid.

**NS2B3-HA:** la secuencia de ADN que codifica para la proteína no estructural NS3 de ZIKV (cepa Zika MP1751\_East\_African (Uganda)) fue clonada con el “tag” HA en el extremo C-terminal utilizando los sitios de restricción BamHI/XhoI y la ligación ADN T4 en pcDNA™ 3.1(+). También se incluyó 40 aa del dominio C-terminal de NS2B para mantener la actividad proteasa de NS3. Plásmido obtenido por la Dra. Judith Estévez Herrera a través del Proyecto Agustín de Betancourt “Zikassays” del Cabildo Insular de Tenerife para la Universidad de La Laguna y en colaboración con la empresa Bioassays en Madrid.

**HA-wt-HDAC6:** (Ref. V790-20, Invitrogen). Vector de expresión codificante de la proteína HDAC6 salvaje (*“wild-type”*, wt-HDAC6) con el *“tag”* HA en su extremo N-terminal. Se obtuvo mediante PCRs con oligos con la secuencia HA incorporada en el oligo *forward* y clonados en el vector de expresión pCDNA™ 3.1.

**HA-dm-HDAC6:** vector de expresión codificante de la proteína HDAC6 con ambos dominios de actividad desacetilasa mutados (cambio de Histidina por Arginina en las posiciones 216 y 611). Se obtuvo a partir de la PCR del plásmido dm-HDAC6-GFP (cedido por el Dr. Francisco Sánchez Madrid) que se utilizó como molde para su posterior clonaje en el vector de expresión pCDNA™ 3.1. Ha sido diseñado en nuestro laboratorio previamente a la realización de este trabajo.

**HA-HDAC6-ΔBUZ:** vector de expresión codificante de la proteína HDAC6 con su dominio BUZ deletado (del aa 1 hasta el 1091) y con el *“tag”* HA en su extremo N-terminal. Fue cedido por el Dr. Xiang-Jiao Yang.

**wt-HDAC6-dsRed:** vector de expresión codificante de la proteína HDAC6 salvaje (*“wild-type”*, wt-HDAC6) con el *“tag”* dsRed en su extremo C-terminal, clonado utilizando Age/Not. Cedido por el Dr. Ricardo Madrid.

**siRNA HDAC6:** se utilizaron 3 oligos interferentes con el fin de silenciar la proteína endógena HDAC6. Estos oligos se unen a las regiones del ARN mensajero 193-213, 217-237 y 284-304 (Sigma-Aldrich).

**siSCR:** (Ref: Mission® siRNA Universal Negative Control #1 (SIC001, Sigma-Aldrich)). Utilizamos un oligo *“scramble”* como control negativo del silenciamiento de HDAC6.

**shHDAC6:** (Ref: sc-35544-SH, Santa Cruz Biotechnology). *“short hairpin RNA”* con diana específica diseñado para inhibir la expresión génica de HDAC6 humano (secuencia *“hairpin”*):  
GATCCGACCTAATCGTGGGACTGCTCAAGAGAGCAGTCCCACGATTAGGTCTTTTT).

**shscrn EGFP:** “*short hairpin RNA*” que se utilizó como control del silenciamiento de HDAC6. Cedido por el Dr. Nicolas Vitale.

**HA-RIG-I:** el gen RIG-I humano “*wild type*” fue clonado en el vector pCR3.1 con el “*tag*” HA en su extremo N-terminal. El plásmido fue obtenido por el Dr. John Hiscott y cedido por la Dra. Laura Kakkola del “*Research Center Infections and Immunity, Institute of Biomedicine, University of Turku*”.

**Ub-GFP:** vector de expresión codificante de la proteína ubiquitina con “*tag*” GFP en su extremo C-terminal. Plásmido cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez.

**3p-hpRNA (“*5’ triphosphate hairpin RNA*”):** (Ref: tlr1-hprna, tlr1-hprna-100, InvivoGen). Secuencia de ARN que contiene un extremo 5’ trifosfato sin protección y un fragmento de doble cadena que reconoce RIG-I.

### 3.4.2. Producción de plásmidos.

Los plásmidos de las proteínas de estudio fueron transformados en bacterias competentes. En nuestro laboratorio se utilizan 2 cepas bacterianas diferentes: las bacterias XL10 y las bacterias One Shot™ Stb13™ Chemically Competent *E.coli*. Estas últimas se usan para transformar plásmidos reactivos para las bacterias como ocurre con el plásmido pNS5-myc. Para ello se siguieron las instrucciones de los kits. Una vez transformados, se incuban las placas “*overnight*” a 37°C.

Al día siguiente, se realiza un preinóculo a partir de una colonia en un tubo de ensayo que contiene 3 mL de LB y el antibiótico de selección, y se incuba en agitación a 37°C durante 6 horas aproximadamente. Tras lo cual, se inocula el volumen completo a un Erlenmeyer que contiene 100-200 mL de LB y el antibiótico específico. Y se vuelve a incubar en agitación a 37°C “*overnight*”.

El último paso se llevaría a cabo al día siguiente, cuando se realiza la lisis de las bacterias y la extracción plasmídica con los kits de EndoFree Plasmid Maxi Kit, Plasmid Midi Kit o QIAprep Spin Miniprep Kit siguiendo sus respectivas instrucciones.

Una vez realizada la extracción plasmídica, se mide la cantidad de plásmido obtenido con el espectrofotómetro de microvolumen mySPEC (VWR).

También, tras el último periodo de incubación “*overnight*”, añadimos 200  $\mu\text{L}$  de la cepa bacteriana que contiene el material plasmídico a 200  $\mu\text{L}$  de una solución LB que contiene un 30% de glicerol, para el mantenimiento de stock plasmídico a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, en modo resumen, se muestran en la **Tabla 8** las soluciones empleadas en este proceso.

**Tabla 8: Soluciones y kits necesarios en la producción de plásmidos.**

Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>Bacterias XL10-Gold Ultracompetent Cells</b>	Bacterias para transformar plásmidos.	200314 Agilent
<b>Bacterias One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent <i>E. coli</i></b>	Bacterias para transformar plásmidos.	C7373-03 Invitrogen
<b>LB</b>	Medio ampliamente utilizado en el crecimiento de bacterias. Receta (1 L): triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g. pH 7 y estéril.	
<b>LB Agar</b>	Medio de crecimiento bacteriano sólido. Receta (1 L): triptona 8 g, extracto de levadura 4g, NaCl 8 g y agar 12 g. pH 7 y estéril.	
<b>Ampicilina</b>	Antibiótico $\beta$ -lactámico de amplio espectro. Se añade al LB a una dilución 1/1000 a partir de una solución madre de 100 mg/mL.	A0166-5G Sigma-Aldrich
<b>Kanamicina</b>	Antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Se añade al LB a una dilución 1/1000 a partir de una solución madre de 10 mg/mL.	K1377-25G Sigma-Aldrich
<b>EndoFree Plasmid Maxi Kit</b>	Kit para la purificación de plásmidos.	12362 Qiagen
<b>Plasmid Midi Kit</b>	Kit para la purificación de plásmidos.	12143 Qiagen
<b>QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	Kit para la purificación de plásmidos.	27104 Qiagen

Soluciones y kits utilizados en la producción de plásmidos. En la columna izquierda se indica el nombre de la solución o el kit, en la columna central se describe su función y/o composición y en la columna derecha su referencia.

### 3.5. Ensayos de entrada e infección viral.

#### 3.5.1. Análisis filogenético del complejo de envoltura de VIH-1.

Gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Cecilio López Galíndez y la Dra. Concepción Casado, se pudieron complementar los análisis fenotípicos de las diferentes envolturas de pacientes con su análisis filogenético.

La historia evolutiva y la secuencia de nucleótidos del ancestro común más reciente (MRCA, “*Most recent common ancestor*”) del VIH-1 subtipo B se infirieron utilizando el método de probabilidad máxima y el modelo reversible de tiempo general.

Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancia por pares estimadas utilizando el modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL, “*Maximum composite likelihood*”), y después seleccionando la tipología con mayor valor de verosimilitud. Se utilizó una discreta distribución Gamma para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre los sitios [cinco categorías (+G, parámetro=0,4,590)]. El modelo de tasa de variación permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables [(+I), 14, 43% sitios]. Este análisis se basó en 142 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1ª+2ª+3ª + no codificante. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos del 5% de brechas de alineación, ausencia de datos y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). Hubo un total de 2454 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X. La divergencia evolutiva del MRCA del subtipo B se estimó como el número de sustituciones de bases por sitio entre cada secuencia de nucleótidos analizada y la secuencia del MRCA del VIH-1 subtipo B utilizando el modelo MCL.

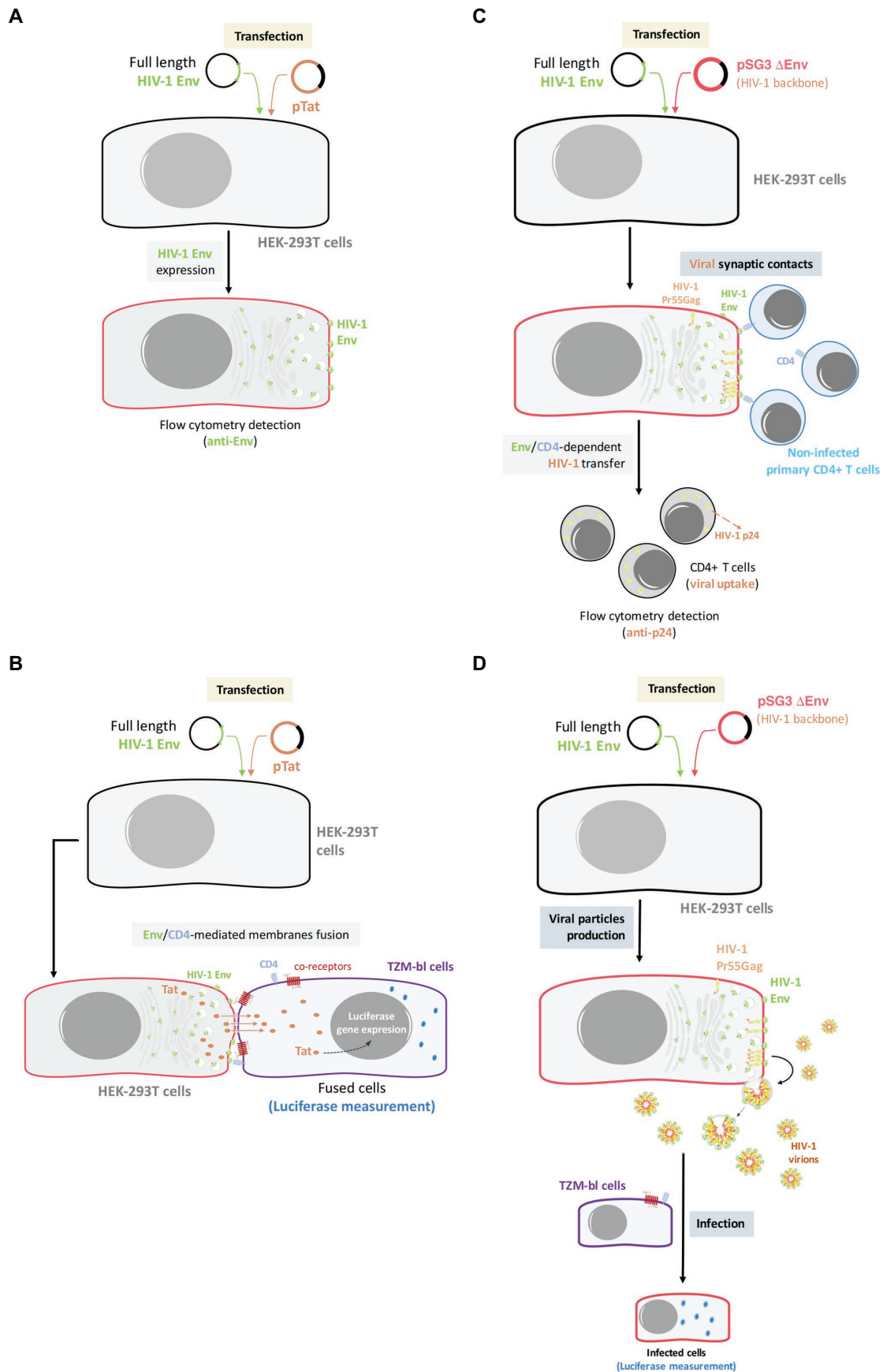
Las secuencias nucleotídicas fueron depositadas en el GeneBank con los siguientes códigos: KC595156, KC595162, KC595225, KC595227, KC 595189, MH605987, MH605986, KC595190, MH605988, MH605992, MH605991, MH605970, MH605971, KC595223, KC595222, MH605972, MH605975, MH605976, MH605978, MH605973, MH605979, MH605980, MH605981, MH605982, MH605983, MH605984, MK394184, and MK394185.

### **3.5.2. Análisis del nivel de expresión del complejo de envoltura del virus VIH-1 en la superficie de la membrana celular mediante la técnica de citometría de flujo.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 24 pocillos a una concentración de 200.000 células/mL y un volumen final de 1 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante X-tremeGENE, con el plásmido del cuerpo viral pTat  $\Delta$ env y los plásmidos de las diferentes envolturas de pacientes en una ratio 0,6:0,3  $\mu$ g.

Pasadas 24 horas, se lleva a cabo el marcaje de las envolturas de las células HEK-293T transfectadas y su cuantificación mediante citometría de flujo, como se puede observar en la **Figura 26**. También se realiza el ensayo de fusión célula-célula que se explicará en el siguiente apartado.

El protocolo de marcaje es el siguiente: se añaden 100.000 células HEK-293T transfectadas en cada pocillo de una placa con fondo cónico, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se lavan con 200  $\mu$ L de PBS. Se centrifugan otra vez 5 minutos a 1500 rpm, se elimina el sobrenadante y se añaden 50  $\mu$ L de una mezcla de dos anticuerpos diferentes que marcan la Env de VIH-1, IgGB12 y 2G12 a una concentración de 6  $\mu$ g/ $\mu$ L cada uno y se incuban 45 minutos a temperatura ambiente. Tras los 45 minutos de incubación, se lavan dos veces con PBS para eliminar el anticuerpo que no se ha unido a la envoltura y se añaden 50  $\mu$ L de una dilución 1/200 del anticuerpo secundario  $\alpha$ -PE-labeled goat anti-human IgG. Se incuban 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavan 2 veces con PBS, se resuspenden las células en 200  $\mu$ L de Formaldehído al 1% (Ref. F1635, Sigma-Aldrich) y se analizan en el citómetro de flujo BD FACSCelesta™ (Becton Dickinson).



**Figura 26:** Esquema del modelo experimental utilizado para el análisis de la expresión de Env, la fusión célula-célula mediada por Env, la transferencia e infectividad viral. (A) Expresión de Env: las células HEK-293T se cotransfectan con Envs de referencia y de estudio junto al plásmido



de expresión de VIH-1  $\Delta env$ , lo que permite la expresión de Env en la superficie celular en un contexto de producción viral. A continuación, se analiza la expresión de Env en la superficie celular mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos anti-Env. **(B)** Actividad de fusión mediada por Env: después de 24 h, las células efectoras HEK-293T que producen partículas de VIH-1 que contienen las Env primarias o de referencia se cultivan junto con células TZM-bl forzando la formación de la sinapsis y la unión mediada por CD4 de partículas “*budding*” a las células. **(C)** Transferencia viral mediada por Env: las células HEK-293T que producen partículas virales de VIH-1 que portan Env primarias o de referencia se cultivan con células T CD4+ primarias. Después, se analiza la transferencia de VIH-1 mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico anti-p24 en las células T CD4+ primarias. **(D)** Infección viral mediada por Env: las células TZM-bl se infectan con diluciones seriadas de partículas virales que contienen las diferentes Envs de VIH-1 primarias o de referencia, obtenidas a partir de células HEK-293T transfectadas. Después de 48 h, se analiza la capacidad de infección mediante el ensayo de luciferasa en células TZM-bl infectadas.

### 3.5.3. Ensayo de fusión célula-célula mediado por la envoltura del VIH-1.

Como se ha comentado anteriormente, las etapas iniciales de siembra y transfección son comunes al experimento de expresión de la envoltura en la superficie de la membrana celular ([apartado 3.5.2](#)).

Al día siguiente de la transfección, se realiza un cocultivo de las células HEK-293T transfectadas con células TZM-bl. Para ello, se despegan las células transfectadas con 100  $\mu$ L de Versene<sup>®</sup> y 900  $\mu$ L de medio DMEM completo. Una vez se encuentran las células resuspendidas, se cuantifican y se añaden 10.000 células/pocillo en un volumen final de 50  $\mu$ L en una placa de luminometría negra (Ref. 165305, Thermo Scientific). Por otro lado, se despegan las células TZM-bl, se cuantifican y también se añaden 10.000 células/pocillo en un volumen final de 50  $\mu$ L a la placa de luminometría donde se habían incorporado las células HEK-293T. Se incuban 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se eliminan 150  $\mu$ L de volumen de cada pocillo y se añade 50  $\mu$ L de Britelite<sup>™</sup> plus Reporter Gene Assay System 1X (Ref. 6066766, Perkin Elmer) a cada pocillo de la placa, la cual se deja 2 minutos en agitación y en oscuridad y se lee la absorbancia a 450 nm en el EnSight<sup>™</sup> Multimode Plate Reader (PerkinElmer). Como se puede observar en la [Figura 26](#).

Una vez obtenido los resultados, se calcula el % de fusión respecto a la envoltura control BaL, que será el 100% de fusión.

### **3.5.4. Ensayo de transferencia viral célula-célula: estudio de la capacidad de unión del complejo Env a CD4.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 350.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con X-tremeGENE y el plásmido del cuerpo viral pSG3  $\Delta$ env y los plásmidos de las diferentes envolturas de pacientes en una ratio 2,6:1,3  $\mu$ g.

Tras 24 horas, se realiza un cocultivo entre las células HEK-293T transfectadas y las células T CD4+ primarias aisladas el día anterior mediante el protocolo explicado en el [apartado 3.3.3](#). Para ello, se retira el sobrenadante de los pocillos de las células HEK-293T transfectadas donde se encuentran los pseudovirus y los guardamos a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar el ensayo de infectividad ([apartado 3.5.5](#)). Ya retirado el sobrenadante, se despegan de los pocillos las células HEK-293T transfectadas con 200  $\mu$ L de Versene<sup>®</sup> y 800  $\mu$ L de medio DMEM completo. Una vez resuspendidas, se cuantifican y se añaden 100.000 células/pocillo en 100  $\mu$ L de medio DMEM completo en una placa de 96 pocillos. Por otro lado, también se cuantifican las células T CD4+ primarias que hemos aislado el día anterior y se añaden 100.000 células en un volumen final de 100  $\mu$ L junto a las células transfectadas y se incuban 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Al día siguiente, se marca la proteína de la cápside p24 intracelular y se mide mediante citometría de flujo. El protocolo de marcaje es el siguiente:

Se homogeniza el cocultivo, se añaden 100  $\mu$ L de cada pocillo a una placa de citometría y se centrifuga 5 minutos a 1500 rpm. Se elimina el sobrenadante, se lavan 2 veces con 200  $\mu$ L de PBS+EDTA 2 mM, y se resuspende el pellet en 25  $\mu$ L de Medio A del FIX & PERM<sup>™</sup> Cell Permeabilization Kit (Ref. GAS004, Invitrogen Life Technologies) para permeabilizar la membrana celular y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavan con 200  $\mu$ L de PBS y se añaden 25  $\mu$ L

del anticuerpo p24 marcado con PE (KC57 anti HIV core antigen) diluido en medio B del FIX & PERM™ Cell Permeabilization Kit (Ref. GAS004, Invitrogen Life Technologies) a una dilución 1/50. Se incuban 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavan 2 veces con PBS, se resuspenden las células en 200 µL de Formaldehído al 1% (Ref. F1635, Sigma-Aldrich) y se mide la inmunofluorescencia en el citómetro de flujo BD FACSCelesta™ (Becton Dickinson). El esquema de este ensayo se puede observar en la **Figura 26**.

### **3.5.5. Análisis de la infectividad viral.**

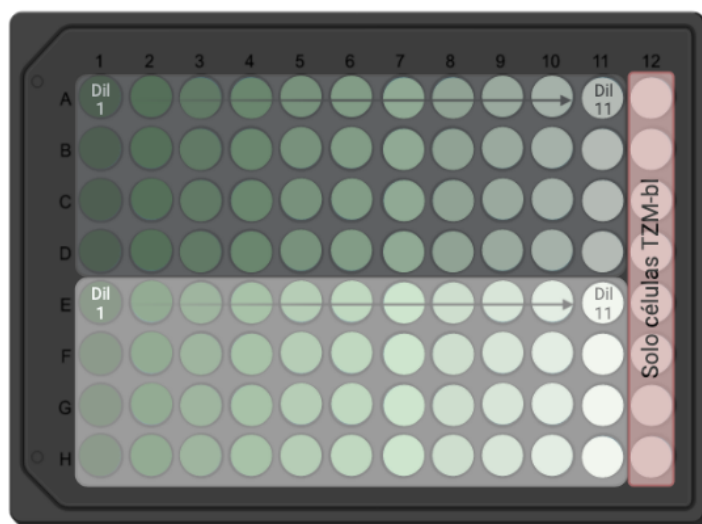
#### **3.5.5.1. Cuantificación de pseudovirus producidos.**

Una vez producidos los pseudovirus para el ensayo de infectividad ([apartado 3.5.4](#)) se cuantificaron mediante el Kit ELISA INNOTEST® HIV Antigen mAb (Ref. 80563, Innogenetics), siguiendo las instrucciones del kit y leyendo la absorbancia en EnSight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer) a 450 nm.

#### **3.5.5.2. Ensayo de infectividad viral.**

Para realizar el ensayo de infectividad se partió de pseudovirus producidos en el ensayo de transferencia viral ([apartado 3.5.4](#)), que fueron congelados a -80°C.

Una vez descongelados, se añaden 100 µL de DMEM completo a todos los pocillos de una placa de luminometría negra de 96 pocillos (Ref. 165305, Thermo Scientific) y 25 µL del stock viral en la primera columna (cada muestra se añade por cuadruplicado) como se detalla en la **Figura 27**. Y se hacen diluciones seriadas 1/5 de los pseudovirus pasando 25 µL del primer pocillo al siguiente y así sucesivamente, exceptuando la última columna en la que solo se añaden células TZM-bl como control negativo.



**Figura 27: Esquema del ensayo de infectividad.** Se realizan diluciones seriadas 1/5 de los pseudovirus de un pocillo a otro hasta la penúltima columna. La última columna será nuestro control negativo donde sólo tendremos células TzM-bl. En todos los pocillos encontramos 100.000 células TzM-bl. Se realizan cuadruplicados de cada muestra. Imagen creada en BioRender.com.

Por otro lado, se despegan las células TzM-bl y se cuantifican. Se preparan por placa 10 mL de células a una concentración de 100.000 células/mL a las que se agregan 25  $\mu$ L de DEAE dextrano (Ref. D9885, Sigma-Aldrich) con concentración final de 18  $\mu$ g/mL. Se añaden 100  $\mu$ L por pocillo a la placa donde se han realizado las diluciones de los pseudovirus, teniendo 10.000 células/pocillo y un volumen final de 225  $\mu$ L/pocillo, y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Tras lo cual, se eliminan 150  $\mu$ L de cada pocillo y se añaden 50  $\mu$ L de Britelite™ plus Reporter Gene Assay Sistem 1X (Ref. 6066766, Perkin Elmer), se agita la placa durante 2 minutos en oscuridad y se lee la absorbancia a 450 nm en el EnSight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer) (Figura 26).

Por último, se calcula la TICD50 (“Median Tissue Culture Infectious Dose”) con la plantilla de Montefiori/Calculation of TCID50, y se normaliza por la concentración de pseudovirus inicial que se ha calculado mediante ELISA (apartado 3.5.5.1).

### 3.6. Western Blot.

#### 3.6.1. Lisis celular.

Tras 24-72 horas de la transfección, se recogen las células transfectadas con PBS en un eppendorf, se centrifugan a 1500 rpm y 4°C durante 5 minutos, se resuspende el pellet en 30-40 µL de buffer de lisis y se incuban en hielo durante 30 minutos. Una vez pasado el tiempo de incubación, se aplican ultrasonidos a las muestras (excepto en el ensayo de coimmunoprecipitación (CoIP), ya que rompen las interacciones que se producen entre proteínas) con el sonicador Labsonic® M (Sartorius) y se centrifugan a 13000 rpm durante 10 minutos. Se cuantifica la concentración de proteína que tenemos mediante BCA protein assay kit (método ácido bicinonínico) (Ref. 71285-3, Novagen, Milipore) en el iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad). Finalmente, se añade laemlli buffer 4X en el mismo volumen que el buffer de lisis y se incuba a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y realizar la técnica de *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

Cabe destacar, que según el experimento se utilizan diferentes tipos de buffer de lisis adecuados para cada ensayo. En la [Tabla 9](#) se explica brevemente el uso y la composición de cada buffer de lisis.

**Tabla 9: Buffers de lisis celular.**

Nombre	Descripción/Receta
<b>Buffer de lisis</b>	Buffer para la lisis celular. Receta (10 mL): Tris-HCl 1 M (pH 7,5) 500µL, NaCl 5 M 300 µL, tritón 10% 1 mL, desoxicolato sódico 10% 500 µL y Complete 25X 400 µL.
<b>Buffer de lisis PMSF</b>	Buffer para la lisis celular de CoIP $\alpha$ -myc. Receta (10 mL): Tris-HCl 1 M (pH 7,5) 500 µL, NaCl 5 M 300 µL, tritón 10% 1 mL, desoxicolato sódico 10% 500 µL, Complete 25X 400 µL y PMSF 20 mM 500 µL.
<b>Buffer de lisis CoIP</b>	Buffer para la lisis CoIP $\alpha$ -HA. Receta: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, 1% Tritón, EDTA 5 mM, 10% Glicerol, Complete 1X y PMSF 1mM.
<b>Buffer de lisis celular</b>	Buffer para producir la lisis celular y la separación de los compartimentos citoplasmático y nuclear. Receta: HEPES 10 mM 1 mL, KCl 10 mM 200 µL, EDTA 0,1 mM 20 µL, DTT 1 mM 200 µL, PMSF 0,5 mM 250µL y NP40 0,50% 50 µL.
<b>Buffer de extracción nuclear</b>	Buffer para producir la lisis nuclear y así extraer las proteínas nucleares de estudio. Receta: HEPES 10 mM 2 mL, NaCl 400 mM 800 µL, EDTA 1 mM 200 µL, DTT 1 mM 200 µL y PMSF 1 mM 500 µL.

En la tabla se muestran los diferentes buffers de lisis celular que se utilizan en los distintos experimentos llevados a cabo en la tesis doctoral. En la columna izquierda se indica el nombre del buffer de lisis y en la columna derecha se describe su función y composición.

### 3.6.2. Técnica de western blot.

En nuestro laboratorio, se hacen los geles con el porcentaje de acrilamida en función de las proteínas que queramos analizar, 10% - 12% (**Tabla 10**). Se añaden los geles y el tampón de electroforesis SDS-PAGE al sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), se cargan las muestras desnaturalizadas y el marcador de peso molecular en los pocillos y se fija un amperaje constante de 35 mA por gel.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, se transfieren a una membrana PVDF (0,45 µm de poro) activada en metanol, hidratada en agua MiliQ® y finalmente embebida en solución de transferencia. Se realiza una transferencia semi-húmeda en el Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a 25 V 1.0 A durante 40 minutos.

Tras la transferencia, se bloquea la membrana en leche 5% durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación. Tras lo cual, se incuban las membranas con el anticuerpo primario “*overnight*” a 4°C. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario, se lavan las membranas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T y se marcan con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se vuelven a realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-T y se detectan las proteínas mediante luminiscencia, incubando la membrana 5 minutos con el sustrato de la peroxidasa Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) y se capturan las imágenes con el ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

Como se quiso estudiar diferentes proteínas, se debía volver a marcar la membrana con su respectivo marcaje, pero antes se tenía que eliminar el marcaje anterior y para ello se realizó el proceso de “*stripping*”. El “*stripping*” consiste en incubar la membrana en solución de “*stripping*” durante 30 minutos en agitación, seguido de 2 lavados en la solución NaCl 0,3% durante 10 minutos para equilibrar el pH de la membrana y 3 lavados con TBS-T de 5 minutos. Finalmente se vuelve a bloquear la membrana y a realizar los marcajes con anticuerpos primario y secundario.

A continuación, en modo resumen, se muestra en la **Tabla 10** las soluciones empleadas en este proceso.

**Tabla 10: Soluciones y kits para la técnica de *western blot*.**

Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>Laemmli Buffer 4X</b>	Buffer para la preparación de muestras. Receta: Tris-HCl (pH 6,8) 1,25 mL, SDS 0,4 g, glicerol 100% 2 mL, $\beta$ -mercaptoetanol 1 mL, azul de bromofenol 0,002 g y agua MiliQ® 0,75 mL.	
<b>Persulfato amónico (APS) 10%</b>	Cataliza la reacción de polimerización de la acrilamida.	A3678. Sigma-Aldrich
<b>Tetrametilenaiana (TEMED) 30%</b>	Cataliza la reacción de polimerización de la acrilamida. Como consecuencia de su polimerización (poliacrilamida), se crean geles que utilizamos para la separación de proteínas.	T9281 Sigma-Aldrich 1610158 Bio-Rad
<b>Zona de separación del gel (Running Buffer)</b>	Parte inferior del gel de electroforesis (" <i>running buffer</i> ") donde se producirá la separación de las proteínas según su peso molecular. <u>10% de reticulación:</u> agua MiliQ® 3,3 mL, Lower Buffer 4X 2 mL, acrilamida 30% 2,6 mL, TEMED 10 $\mu$ L y APS 10% 52 $\mu$ L. <u>12% de reticulación:</u> agua MiliQ® 2,8 mL, Lower Buffer 4X 2 mL, acrilamida 30% 3,2 mL, TEMED 10 $\mu$ L y APS 10% 64 $\mu$ L. Receta Lower Buffer 4X (200 mL): Tris-Base 36,34 g y SDS 10% 8 mL. pH final 8,8.	
<b>Zona de compactación del gel (Stacking Buffer)</b>	Parte superior del gel de electroforesis (" <i>stacking buffer</i> ") donde se añadiran las muestras en cada pocillo. Receta: agua MiliQ® 3,1 mL, Upper Buffer 4X 1,25 mL, acrilamida 30% 0,65 mL, TEMED 5 $\mu$ L y APS 10% 25 $\mu$ L. Receta Upper Buffer 4X (200 mL): Tris-Base 12,12 g y SDS 10% 8 mL. pH final 6,8.	
<b>SDS-PAGE</b>	Detergente iónico. Receta (5 L): Tris-Glicina 10X 500 mL y SDS 10% 50 mL. Receta Tris-Glicina 10X (1 L): Tris-Base 30,25 g y Glicina 144 g.	
<b>Precision Plus Protein™ Dual Color Standards</b>	Referencia de peso molecular. Contiene diez bandas de proteínas de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kD.	161-0374 Bio-Rad
<b>Buffer de Transferencia</b>	Solución que permite la transferencia de las proteínas del gel de policrilamida hacia la membrana de polivinilideno. Receta (1 L): Tris-Glicina 10X 100 mL, metanol 200 mL y SDS 10% 10 mL.	



<b>Immobilon transfer membranes</b>	Membranas de polivinilideno (PVDF). Tienen un tamaño de poro de 0,45 $\mu\text{m}$ .	IPVH00010 Millipore
<b>Metanol</b>	Alcohol que utilizamos en la transferencia de proteínas y para activar las membranas PVDF	141091 PanReac Applichem
<b>Leche</b>	Solución de bloqueo. Receta: Leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T.	
<b>TBS-T</b>	Tampón de lavado. Receta (5 L): TBST-10X 500 mL y Tween 20 5 mL. Receta TBST 10X (1 L): Tris-HCl 63,5 g, Tris-Base 11,8 g y NaCl 87,66 g. pH final 7,5.	
<b>Solución de Stripping</b>	Solución ácida que promueve la separación de los anticuerpos adheridos en la membrana PVDF. Receta (1 L): glicina 15 g, SDS 1 g y Tween20 10 mL. pH final 2,2.	
<b>NaCl 0,3%</b>	Solución para equilibrar el pH de membrana PVDF.	S3014-5KG Sigma-Aldrich
<b>Clarity Western ECL Substrate</b>	Sustrato de la Peroxidasa.	1705061 Bio-Rad

En la tabla se muestran las diferentes soluciones y kits que se utilizan en el *western blot*. En la columna izquierda se indica el nombre de las soluciones o kits, en la columna central se describe su función y/o composición, y en la columna derecha su referencia.

### 3.7. Empleo de inhibidores químicos.

#### 3.7.1. Regulación de la actividad desacetilasa de HDAC6: Tubacina/A-485.

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, las células se transfectan con el agente transfectante FuGENE HD con una dosis creciente del plásmido pNS5-myc (0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 1,5  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$  y 3  $\mu\text{g}$ ). Teniendo 3 placas con la dosis creciente de NS5 para las condiciones DMSO (control), A-485 (Inhibidor selectivo de la HAT p300/CBP que promueve la actividad desacetilasa de HDAC6) (Ref. 6387, TOCRIS) y tubacina (Inhibidor selectivo de la actividad desacetilasa de la HDAC6) (Ref. SML0065, Sigma-Aldrich).

Al día siguiente se añaden los inhibidores A-485 y tubacina en cada condición, a una concentración final de 3  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente. Además, también se añade DMSO (disolvente de ambos inhibidores) en una placa como control. 24 horas después se realiza la lisis celular explicada en el [apartado 3.6.1](#), para poder realizar la técnica de *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

### **3.7.2. Inhibidores de diferentes vías de degradación.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD y los plásmidos NS5-myc y HA-wt-HDAC6 a 1,5  $\mu\text{g}$  cada uno.

48 horas postransfección, se añaden los inhibidores de las diferentes rutas de degradación: MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (20  $\mu\text{M}$ ) (Ref. C2211-5MG, Sigma-Aldrich) que bloquea la vía proteasoma, 3-Metiladenina (3-MA) (5 mM) (Ref. M9281, Sigma-Aldrich) que interviene en la formación del autofagosoma, Bafilomicina A1 (100 nM) (Ref. SML 1661, Sigma-Aldrich) que actúa sobre la ATPasa vacuolar tipoH<sup>+</sup> inhibiendo la acidificación lisosomal y Aloxistatina junto a Pepstatina A (E-64d+PepsA) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Ref. E8640, Sigma-Aldrich y 77170, Sigma-Aldrich, respectivamente) sobre las proteasas; y sus respectivos vehículos DMSO y PBS como control. Se incuban 5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se realiza la lisis celular ([apartado 3.6.1](#)) para analizar las muestras mediante *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

### **3.7.3. Inhibición del importe nuclear: Ivermectina.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD y los plásmidos de las proteínas de estudio.

48 horas postransfección se añade el inhibidor de  $\alpha/\beta$  importinas, ivermectina (20  $\mu\text{M}$ ) (Ref. I8898, Sigma-Aldrich) y su vehículo DMSO como control y se incuban 6 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Pasado el tiempo de incubación, se realiza la lisis celular ([apartado 3.6.1](#)) para analizar las muestras mediante *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

### **3.8. Estudios de coimmunoprecipitación.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD y los plásmidos de las proteínas de estudio.

Para analizar la interacción entre NS5 y HDAC6 se realizó el siguiente protocolo de COIP:

Se homogenizan bien las bolas magnéticas, PureProteome™ Protein G Magnetic Beads, y se añaden 50  $\mu\text{L}$  en eppendorfs. Se elimina el buffer de almacenamiento de las bolas magnéticas con el Rack Magnético, Magna GrIP™ Rack (Millipore), se añaden 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X 0,1% Tween y se mezclan para lavarlas. Se vuelve a eliminar el PBS 1X 0,1% Tween y se resuspenden en 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X 0,1% Tween. Se añaden 7  $\mu\text{L}$  de anticuerpo  $\alpha$ -myc y se incuban 1 hora en agitación con el Rotator SB3 (Stuart®) a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación, se elimina el buffer y se lavan 2 veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X 0,1% Tween. Se elimina el PBS, se añade 100-500  $\mu\text{g}$  de proteínas del lisado (con buffer de lisis PMSF) en 150  $\mu\text{L}$  junto a 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis PMSF y 6,5  $\mu\text{L}$  de RNasa, y se incuban a 4°C “*overnight*” agitando en el Rotator SB3 (Stuart®).

Al día siguiente, se retira el lisado y se lavan las bolas magnéticas dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X 0,1% Tween. Se añade 60  $\mu\text{L}$  de Laemmli Buffer 4X, se calientan las muestras 5 minutos a 95°C en el termobloque para que se separen las proteínas de las bolas magnéticas, se recuperan las proteínas utilizando el Rack Magnético (Magna GrIP™ Rack (Millipore)) y se almacenan a -20°C para su posterior análisis mediante *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

Sin embargo, para observar la acetilación de RIG-I, se separaron las proteínas con el anticuerpo  $\alpha$ -HA mediante el siguiente protocolo de CoIP:

Se añaden 25  $\mu$ L de Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads en eppendorfs y 175  $\mu$ L de 0,05% TBS-T y se homogeniza. Se retira el sobrenadante con el Rack Magnético, Magna GrIP™ Rack (Millipore), y se vuelve a lavar con 1 mL de 0,05% TBS-T. Se descarta el sobrenadante, se incorporan 100 $\mu$ g de muestra del lisado (buffer de lisis CoIP) en 100  $\mu$ L de buffer de lisis CoIP y 400  $\mu$ L de 0,05% TBS-T y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos agitando en el Rotator SB3 (Stuart®). Tras el tiempo de incubación, se retira el lisado y se lavan dos veces con 300  $\mu$ L de 0,05% TBS-T. Se retira el sobrenadante y se realiza un lavado con 300  $\mu$ L de agua MiliQ® filtrada. Finalmente, se añaden 50  $\mu$ L de Laemmli Buffer 4X, se calientan las muestras 10 minutos a 95°C en el termobloque para que se separen las proteínas de las bolas magnéticas, se recuperan las proteínas utilizando el Rack Magnético (Magna GrIP™ Rack (Millipore)) y se almacenan las muestras a -20°C para su posterior análisis mediante *western blot* (apartado 3.6.2).

A continuación, en modo resumen, se muestra en la **Tabla 11** las soluciones empleadas en este proceso.

**Tabla 11: Soluciones y kits para el ensayo de coimmunoprecipitación.**

Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>PBS 1X 0,1% Tween</b>	Solución para lavados celulares. Receta PBS 1X 10%: PBS 1X 9 mL y Tween 20 1mL.	
<b>0,05% TBS-T</b>	Solución para lavados celulares. Receta: Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,15 M y 0,05% Tween 20.	
<b>TBS-T 5X</b>	Solución para lavados celulares. Receta: Tris-HCl 125 mM, NaCl 0,75 M y 0,25% Tween 20.	
<b>PureProteome™ Protein G Magnetic Beads</b>	Bolas magnéticas cuya superficie recubrimos con el Anticuerpo contra la proteína que queremos aislar.	LSKMAGG10 Millipore
<b>Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads</b>	Bolas magnéticas cuya superficie está recubierta con el anticuerpo HA.	88836 Thermo Scientific
<b>Pierce™ Anti-myc Magnetic Beads</b>	Bolas magnéticas cuya superficie está recubierta con el anticuerpo myc.	88842 Thermo Scientific
<b>RNase, DNase-free</b>	Solución de una mezcla heterogénea de ribonucleasas.	11119915001 Roche Diagnostics

Soluciones y kits utilizados en el ensayo de coimmunoprecipitación. En la columna izquierda se indica el nombre de la solución o el kit, en la columna central se describe su función y/o composición y en la columna derecha su referencia.

### 3.9. Estudios de silenciamiento de HDAC6 por RNA interferente.

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD, los plásmidos de la proteína de estudio y los “*short hairpin RNA*” shHDAC6 o shscrn EGFP como control. 48 horas postransfección se realiza la lisis celular ([apartado 3.6.1](#)) para analizar las muestras mediante *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

Otro método que se utilizó en lugar de shHDAC6, es siRNA de HDAC6, utilizando una mezcla de 3 oligos interferentes contra diferentes regiones del ARNm de HDAC6. Para ello se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante PEI25K™ y los plásmidos de la

proteína de estudio. 24 horas más tarde se transfectan 120 pg de siRNA con Lipofectamina RNAiMAX, y otras 24 horas después, se realiza la lisis celular ([apartado 3.6.1](#)) para analizar las muestras mediante *western blot* ([apartado 3.6.2](#)).

### **3.10. Fraccionamiento celular.**

Se siembran células HEK-293T en una placa de 6 pocillos a una concentración de 300.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD y la combinación de plásmidos a 1,5 µg cada plásmido.

48 horas después, se realiza el fraccionamiento celular. Para ello se recogen las células transfectadas con PBS 1X en un eppendorf. Se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se resuspende el pellet en 100 µL de buffer de lisis celular y se incuban 20 minutos en hielo, pipeteando a los 10 minutos para favorecer el proceso de lisis celular. Tras el tiempo de incubación, se mezcla en el vórtex y se centrifugan a 12000 rfc y 4°C durante 10 minutos. Una vez realizada la centrifugación, se separa el sobrenadante donde se encuentra el extracto citoplasmático a otro eppendorf y se lava tres veces (se centrifuga a 12000 rfc y 4°C durante 5 minutos y se pasa a un nuevo eppendorf). Se cuantifica la concentración de proteínas mediante BCA protein assay kit (Ref. 71285-3, Novagen, Milipore) en el iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad) y se añade Laemmli Buffer 4X en el mismo volumen que el extracto citoplasmático.

Por otro lado, se encuentra el pellet correspondiente al extracto nuclear, que se lava el tres veces con 80 µL de buffer de lisis celular (se centrifuga a 12000 rfc y 4°C durante 5 minutos). Después del último lavado, se resuspende el pellet en 50 µL de buffer de extracción nuclear y se incuba en hielo durante 30 minutos. Por último, se someten las muestras a ultrasonidos con el sonicador Labsonic® M (Sartorius) y se centrifugan a 12000 rfc a 4°C durante 15 minutos. Se cuantifica la concentración de proteínas mediante BCA protein assay kit (Ref. 71285-3, Novagen, Milipore) en el iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad) y se añade Laemmli Buffer 4X en el mismo volumen que el extracto nuclear.

Ambos extractos, citoplasmático y nuclear, se analizan mediante *western blot* (apartado 3.6.2).

### **3.11. Ensayos para cuantificar la activación de la vía del IFN.**

Se siembran células HEK-Lucia<sup>TM</sup> RIG-I en una placa de 6 pocillos a una concentración de 400.000 células/mL y un volumen final de 2 mL por pocillo. Al día siguiente, se transfectan las células con el agente transfectante FuGENE HD y 1,5 µg del plásmido pNS5-myc.

Tras 24 horas, se recogen las células transfectadas y se añaden a una placa de 96 pocillos. Se siembran 100.000 células en 180 µL de DMEM completo por pocillo, a las que se añade tubacina a una concentración final de 1 µM. 3 horas más tarde, se agrega el inductor de la respuesta del interferón 3p-hpRNA a una concentración final de 1 µg/mL en un volumen final de 200 µL.

Al día siguiente, se pasan 20 µL del sobrenadante, en el cual se encuentra la proteína inducida por el IFN ISG54, a una placa opaca de 96 pocillos. A la cual se añaden 50 µL de Quanti-Luc<sup>TM</sup> Gold (Ref. Rep-qlcg2, InvivoGen) en cada pocillo para medir la luminiscencia en Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems).

### **3.12. Inmunofluorescencia.**

Se flamean los cubres de 18 mm (Cover Glasses, Marienfeld) y se añade cada uno en un pocillo de una placa de 12 pocillos. Se cubren los cristales con poli D lisina al 0,01% (300 µL aproximadamente) y se incuban 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se retira la poli D lisina y se lavan los cubres 2 veces con agua MiliQ® filtrada. Ya realizado los dos lavados, se dejan los cristales a temperatura ambiente para que se sequen y una vez secos se siembran 50.000 células HEK-293T por pocillo en 1mL.

Al día siguiente se realiza la transfección de las condiciones que queremos analizar con el agente transfectante FuGENE HD y se incuban durante 48 horas a 37°C.

Tras 48 horas de incubación, se retira el medio de los pocillos, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído (PFA) al 4% en cada pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación suave. Tras lo cual, se quita el PFA, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de PBS-T por pocillo para permeabilizar las células y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Este proceso se realiza 3 veces. Una vez llevadas a cabo las 3 incubaciones con PBS-T, se hacen 3 incubaciones de 5 minutos a temperatura ambiente con 500  $\mu\text{L}$  de solución “*quenching*” en agitación. A continuación, se para la reacción añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. El siguiente paso es bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente con 500  $\mu\text{L}$  de la solución de bloqueo en agitación. Pasada la hora de bloqueo, se incuban las células “*overnight*” a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo.

Al día siguiente, se descarta el anticuerpo primario y se lavan las células 3 veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS-T, 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación cada lavado. A continuación, se incuban con el anticuerpo secundario diluido en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se vuelven a realizar 3 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad con 500  $\mu\text{L}$  de PBS-T. Después, se vuelven a lavar 2 veces durante 10 minutos en oscuridad y agitación con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Por último, se sumerge el cristal en agua destilada, se deja secar, se coloca el cubre sobre una gota de Fluoroshield™ con DAPI que a su vez se dispone sobre un porta y se deja secar en oscuridad. Las muestras se mantienen a 4°C hasta su visualización en el microscopio.

Finalmente, se obtuvieron las imágenes con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y las imágenes fueron analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging).

A continuación, se muestran en la **Tabla 12** las soluciones empleadas en este proceso.



**Tabla 12: Soluciones para microscopía de epifluorescencia.**

Nombre	Descripción/Receta	Referencia
<b>Poli-D-lisina 0,01%</b>	Solución para unir las células a la superficie del cobre. Se diluye en PBS 1X.	P1024 Sigma-Aldrich
<b>Paraformaldehído al 4%</b>	Solución para fijar las células. Se diluye en PBS 1X.	P6148. Sigma-Aldrich
<b>PBS-T</b>	Solución para permeabilizar las células y realizar lavados celulares. Receta: 0,1% Tween 20 en PBS 1X.	
<b>Quenching solution</b>	Solución para bloquear grupos aldehído libres y disminuir la fluorescencia de fondo. Receta: 100 mM glicina en PBS 1X.	
<b>Solución de Bloqueo</b>	Solución para bloquear uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios. Receta: 5% FBS en PBS-T.	
<b>Fluoroshield™ con DAPI</b>	Medio de montaje para histología, conserva la fluorescencia y tiñe el ADN con DAPI.	F6057 Sigma-Aldrich

Soluciones utilizadas en la microscopía de epifluorescencia. En la columna izquierda se indica el nombre de la solución, en la columna central se describe su función y/o composición y en la columna derecha su referencia.

### 3.13. Estadística empleada en los diferentes estudios.

En el apartado de resultados se especifica el análisis estadístico llevado a cabo para cada experimento.

En el estudio fenotípico de las funciones del complejo de envoltura de VIH-1, su expresión en la membrana celular, su capacidad de unión a CD4, fusión, transferencia e infectividad viral, se utilizó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn. También se utilizó este tipo de análisis estadístico para comparar la longitud y glicosilación de las secuencias de aminoácidos de las envolturas de los diferentes grupos clínicos, así como en su comparación en base a la distancia genética de las secuencias de Env respecto al MRCA.

Por otro lado, para el estudio de las correlaciones entre las diferentes funciones de la envoltura entre sí y también con la distancia genética de las Env de los grupos al ancestro del subtipo B se utilizó el test no paramétrico Spearman.

A su vez, en la segunda parte de la tesis doctoral, centrada en el ZIKV, se compararon estadísticamente las diferentes condiciones experimentales utilizando la prueba paramétrica t de Student.

## **4. RESULTADOS**



---

## 4. Resultados.

### Parte A: Caracterización de la enzima HDAC6 como potencial factor regulador de la capacidad infecciosa de los complejos de envoltura viral del VIH-1, y su relación con el fenotipo clínico de los pacientes.

#### 4.1. Análisis filogenético de las secuencias de los complejos de envoltura viral.

Para el estudio de la importancia del complejo de glicoproteínas de la envoltura (Env) del VIH-1 en el control virológico y la patogénesis, se analizaron las características fenotípicas de 41 envolturas procedentes de 24 pacientes, que muestran diferentes cargas virales (CV) (**Tabla 13**). Concretamente, se han analizado 10 Env de seis individuos LTNP-EC con CV indetectable, sin progresión clínica e infectados a finales de los años 80 y 90; y 10 clones virales de seis individuos vLTNP con  $CV < 10.000$  copias virales/mL e infectados en los años 90.

Para comprobar que las características de las Env de los grupos LTNP no se deben al tiempo de muestreo, se compararon con 10 Env obtenidas de seis individuos infectados también por VIH-1 en el mismo período (años 90), denominadas como Antiguas (“*Old*”), y que se relacionan con una CV alta ( $CV > 10^5$  copias virales/mL) y con infecciones crónicas. Y 11 clones virales de seis pacientes infectados crónicamente entre 2013 y 2014, también mostrando una alta CV ( $CV > 10^4$  copias virales/mL). Las características principales de los pacientes se pueden encontrar en la **Tabla 13**, y la estrategia experimental utilizada para estudiar las características funcionales de estas Env se expone en la **Figura 26**.

**Tabla 13:** Características epidemiológicas y clínicas de las Env virales y características de los pacientes.

Clinical Group	Sub-group	Env code <sup>a</sup>	Patient ID code	Viral Load <sup>g</sup> (at sampling)	Diagnostic time	Sampling time	Viral dating <sup>b</sup>	HLA-B <sup>i</sup>		
LTNP	EC	1	2057906-3	< 50	1993	2004	1989	4901/5701		
		2	3227050	< 50	1988	2004	1991	0702/5201		
		3	3227058-3	< 50	1992	2004	1991	1402/1402		
		6	20044616-3	< 50	1998	2004	1999	1501/5703		
		* 7	10246788	< 50	1992	2005	1993	4402/5701		
		8		< 50	1992	2005	1993	4402/5701		
		9	MDM <sup>c</sup>	507	1998	1996	1987	4402/3501		
		10	c	< 50	1998	2011	1996	4402/3501		
		11	c	< 50	1998	2005	1996	4402/3501		
		12	c	< 50	1998	2005	1996	4402/3501		
		Viremic	13	4022834	3.710	1994	2004	ND	1401/4403	
			14	9684	2.557	1998	2005	1994	1302/4001	
	15		2988465	2.286	1993	2004	1999	1402/2705		
	16		38 17 5	418	1996	2014	1999	2705/5801		
	17			418	1996	2014	1999	2705/5801		
	18			418	1996	2014	1999	2705/5801		
	19			418	1996	2014	1999	2705/5801		
	21		30	7.597	1989	1998	2000	1501/3501		
	22		64	11.926	1989	1999	1999	4402/4901		
	24			11.926	1989	2002	1999	4402/4901		
	Progressor		Old	26	V10 <sup>d</sup>	N.D. <sup>h</sup>	1993	1994	1999	4002/4402
				27		N.D. <sup>h</sup>	1993	1994	1999	4002/4402
		28		V13	N.D. <sup>h</sup>	1992	1994	1990	0702/1402	
		30		L10	89.000	----	1993	1993	1501/4901	
31				89.000	----	1993	1993	1501/4901		
32		L 11		42.000	1993	1993	2000	1801/5101		
33				42.000	1993	1993	2000	1801/5101		
36		I14 <sup>d</sup>		130.000	1987	1994	2002	0702/3502		
37		<sup>d</sup>		130.000	1987	1994	2002	0702/3502		
38		I18		170.000	1991	1994	1990	1402/4403		
Modern <sup>e</sup>		39		ESI 17A	156.300	2013	2013	N.A. <sup>f</sup>	4201/4402	
		40			156.300	2013	2013		4201/4402	
		42	ESI 39A	137.700	2012	2014	N.A.	1517/3801		
		43		137.700	2012	2014		1517/3801		
		44	ESI 41A	129.700	2012	2014	N.A.	3503/5701		
		45		129.700	2012	2014		3503/5701		
46		ESI 5A 2	49.107	2004	2007	N.A.	4102/4402			
49		ESI 42 A	11.510	2011	2014	N.A.	1402/4403			
50		11.510	2011	2014		1402/4403				
51	ESI 42 B	41.090	2011	2014	N.A.	0702/1501				
52		41.090	2011	2014		0702/1501				

<sup>a</sup>Código numérico de las Env VIH-1 utilizado en este estudio y su código de identificación

<sup>b</sup>De acuerdo a (Bello et al., 2004).

<sup>c</sup>Individuo doble infectado (Casado et al., 2007).

<sup>d</sup>Individuos con un corto periodo de terapia antirretroviral (AZT (zidovudine) y DDI (didanosine) para el paciente V10 y AZT para el paciente I14).

<sup>e</sup>Los pacientes modernos tienen un seguimiento mínimo de 3 años.

<sup>f</sup>N.A.: No aplicable.

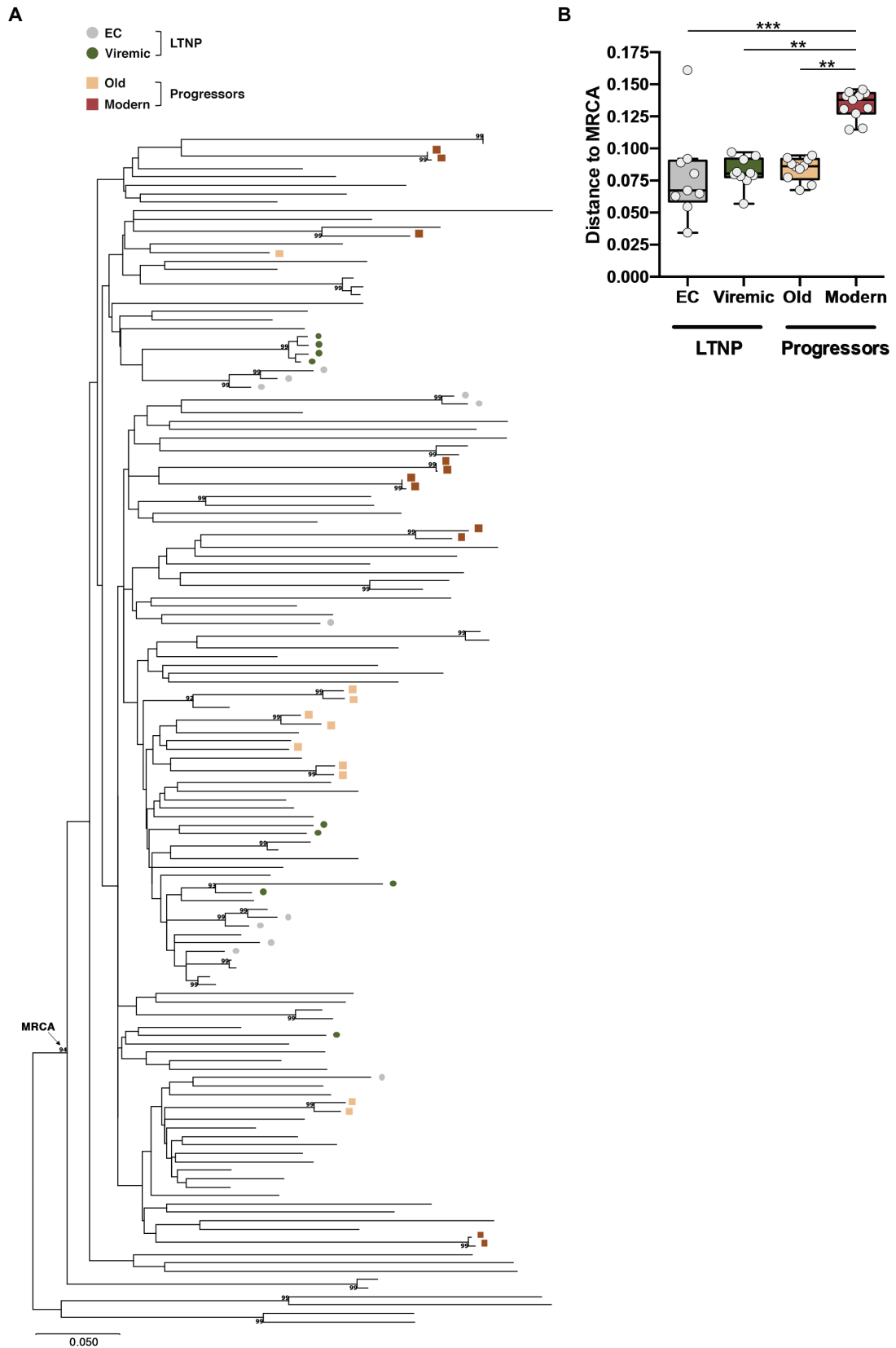
<sup>g</sup>copias ARN VIH/mL

<sup>h</sup>N.D.: No realizado (Not done). Estos pacientes presentan síntomas asociados a SIDA (estadío CDC A2 para el paciente V10, y estadío CDC A3 para el paciente V13) con niveles de linfocitos T CD4+ de 342 células/mL (paciente V10) y 76 células/mL (paciente V13).

<sup>i</sup>Se observa diversidad HLA-B entre todos los individuos.

\*Env aisladas del mismo paciente se indican mediante corchetes.

El análisis filogenético de la secuencia viral del gen *env* no reveló asociaciones entre los diferentes grupos ni agrupaciones, excepto aquellas secuencias obtenidas del mismo individuo (**Figura 28A**). Las Env de LTNP-EC y vLTNP se agruparon en ramas cortas, como consecuencia del control viral y evolutivo, mientras que en las secuencias de pacientes no controladores (Antiguos y Modernos) se observó una distribución en ramas largas, debido a la mayor replicación y evolución viral en estos individuos (**Figura 28A**). La estimación de la datación viral de las secuencias de los diferentes grupos (**Tabla 13**) y la distancia al MRCA apoyaron la clasificación clínica de los pacientes de estudio y dieron información de la evolución viral individual (**Figura 28B**, “*box-plot*”). Las secuencias de los LTNP-EC mostraron una datación viral de 1992,2, las de los vLTNP de 1998,2 y las del grupo P Antiguos de 1995,6. Así, la datación viral y la distancia al MRCA mostraron la evolución viral limitada en los LTNP, particularmente en los EC, en contraste con la amplia evolución y el aislamiento más reciente en los individuos P (Antiguos y Modernos).



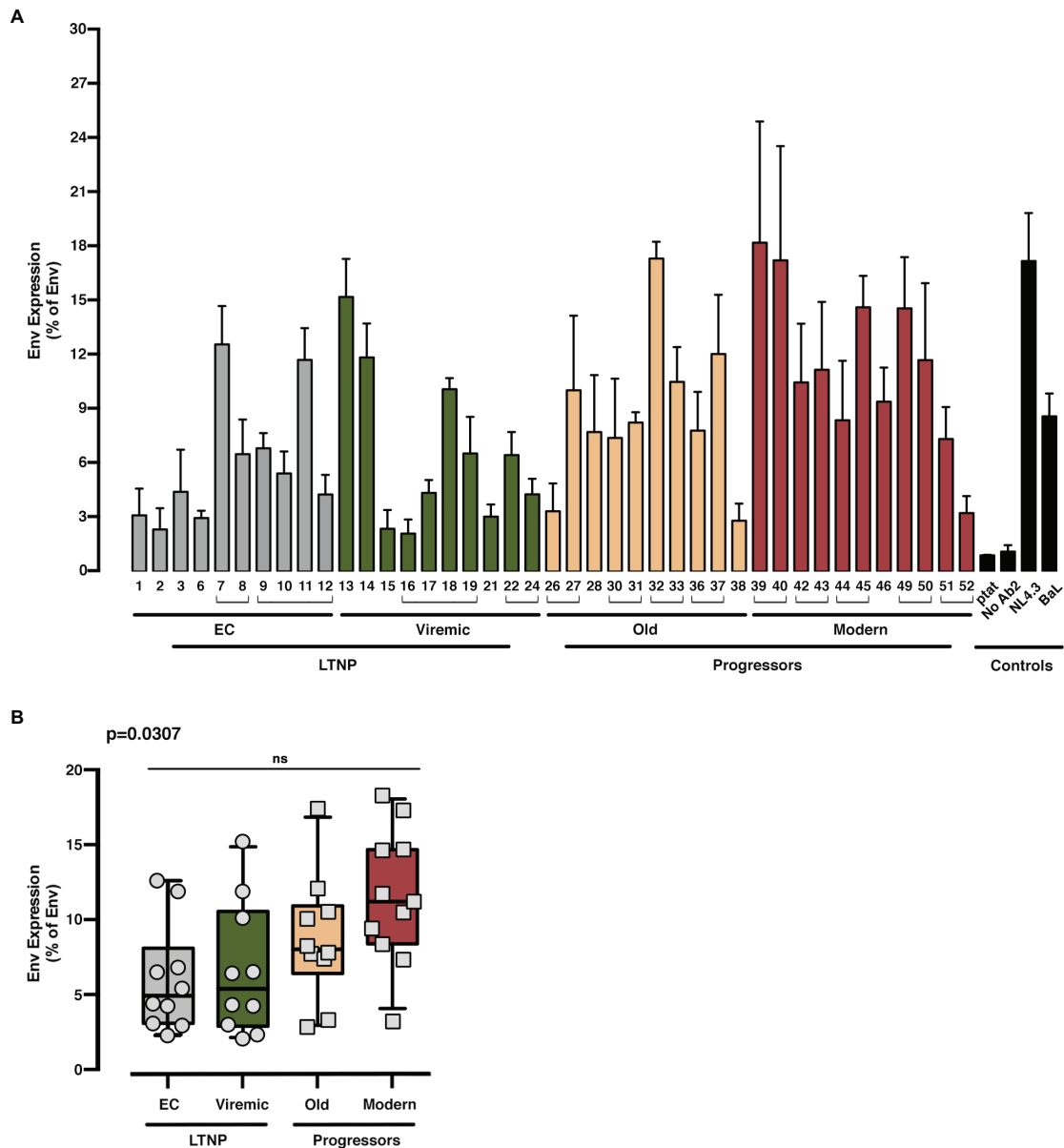
**Figura 28: Análisis filogenético de las secuencias de las Env que se relaciona con el ancestro común más reciente (MRCA).** (A) El árbol filogenético y el MRCA de subtipo B se infirieron con secuencias de nucleótidos de Env virales completas mediante el uso del método de probabilidad máxima y el modelo reversible de tiempo general mediante el software X de MEGA X (S. Kumar



et al., 2018). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon con valores superiores al 90% se muestra junto a las ramas. El árbol está representado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis filogenético de las secuencias virales de las Env de estudio no reveló relaciones entre los diferentes grupos ni agrupamiento, excepto en aquellas secuencias que provienen del mismo individuo. **(B)** Representación de diagrama de caja de las distancias genéticas de las secuencias Env virales al MRCA de virus LTNP (EC y Virémicos) en comparación con las distancias genéticas al MRCA de virus P (Antiguos y Modernos). Se muestran los valores de p (prueba de Krustal-Wallis) para la comparación entre todos los grupos (\*\*p<0,05 y \*\*\*p<0,001).

#### **4.2. Estudio de la relación entre la eficiencia de expresión de los complejos de envoltura y la infectividad viral.**

El primer paso llevado a cabo en la parte A de la tesis doctoral, fue el análisis de la expresión de las Env de los diferentes grupos de estudio. Para ello, como se ha explicado en el [apartado 3.5.2](#) de material y métodos, se midieron los niveles de expresión de las Env en la superficie celular mediante citometría de flujo (**Figura 29**). Se puede observar, que, aunque el nivel de expresión es un poco mayor en las Env virales que provienen de los pacientes P que no controlan la viremia (Antiguos y Modernos), en comparación con los pacientes no progresores LTNP (EC y Virémicos), dicho incremento no es estadísticamente significativo entre los grupos. Por lo que, la capacidad de expresión no contribuye a las diferencias observadas entre los diferentes grupos de pacientes a nivel de CV o en la patogénesis que existe entre ellos.



**Figura 29: Análisis de la expresión de las diferentes Env de pacientes LTNP-EC, vLTNP y P. (A)** Análisis de la expresión de Env en la superficie de la membrana de las células HEK-293T transfectadas con las Env procedentes de cada paciente LTNP-EC (barras grises), vLTNP (barras verdes), P Antiguos (“Old”) (barras naranjas) y Modernos (“Modern”) (barras rojas) o los controles (ptat  $\Delta$ env, sin anticuerpo secundario, NL4.3 y BaL, barras negras) mediante citometría de flujo. Las Env aisladas del mismo paciente están agrupadas con corchetes. **(B)** Expresión de Env en cada grupo de pacientes comparando los valores medios entre cada grupo (Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn). Arriba a la izquierda se muestra el valor de p para la comparación entre todos los grupos. No se identificaron diferencias significativas (ns). Los valores son la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes.

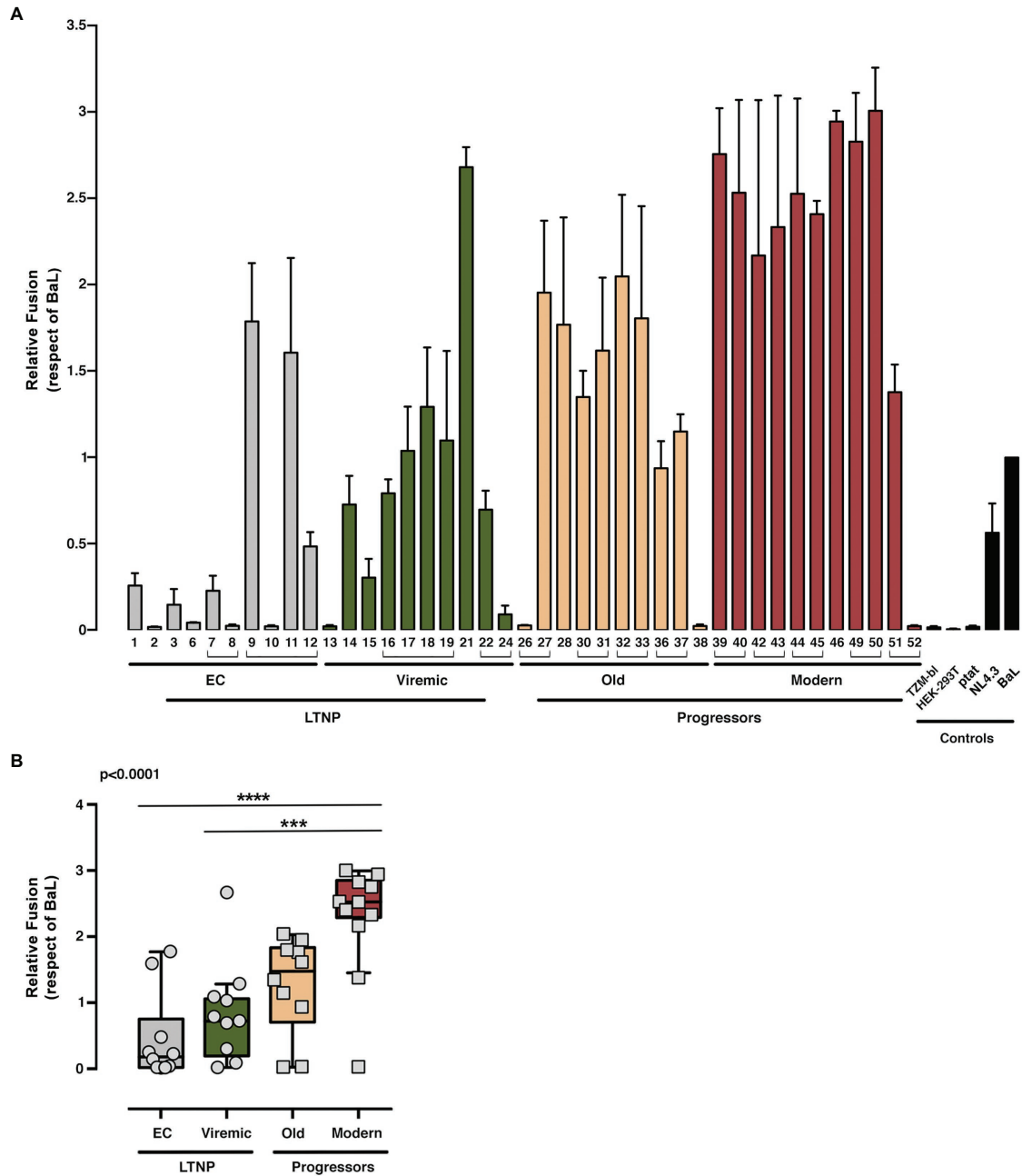
---

### **4.3. Análisis de la capacidad de fusión de membranas célula-célula y transferencia viral de los complejos de envoltura de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico.**

La interacción del complejo Env con el receptor celular CD4 es clave en el proceso de infección. Cuando se produce dicha interacción de una manera correcta y eficiente, la transferencia viral a través de contactos sinápticos o de la formación de poros de fusión se activan durante los contactos célula a célula o de virus a célula, respectivamente (Blanco et al., 2004; Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; Casado et al., 2018; Cabrera-Rodríguez et al., 2019). Por lo que se analizaron tanto la capacidad de las diferentes envolturas de generar la fusión de la membrana viral y celular permitiendo de dicho modo la infección, como, por otro lado, la capacidad de las envolturas expresadas en células infectadas de transferir el virus a células no infectadas, ambas funciones dependientes de su unión al receptor celular CD4.

#### **4.3.1. Evaluación de la capacidad de las envolturas a unirse a CD4 y promover la fusión de membranas.**

Para estudiar la capacidad de interacción entre las diferentes Env de estudio y el receptor CD4, se midió la capacidad de fusión de membrana de las Env mediante el análisis de la activación de LTR mediada por Tat (esquema de la metodología en la **Figura 26**) en cocultivos entre células HEK-293T que expresan en su superficie celular las Env y las células diana TZM-bl que son permisivas a la infección por VIH-1 (**Figura 30**). Todas las Env estudiadas presentan tropismo CCR5, por lo que el proceso de fusión célula-célula depende exclusivamente de la eficiencia de las Env a unirse a CD4, siendo este un ensayo que permite determinar la eficiencia de unión de las Env con CD4. De los resultados obtenidos se observa como las Env de los grupos LTNP-EC y vLTNP obtuvieron valores de fusión más bajos en comparación con los P, tanto Antiguos como Modernos. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas.



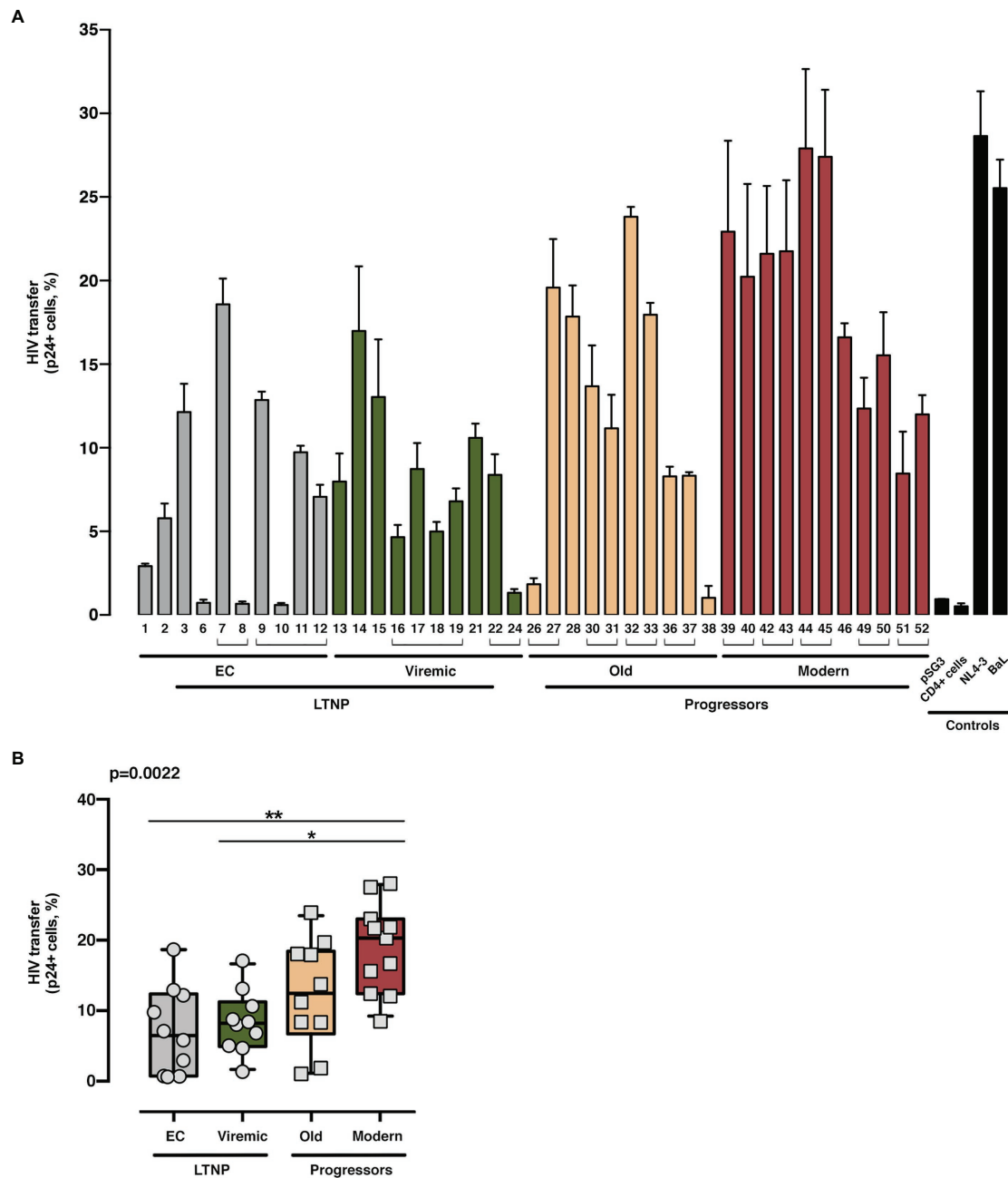
**Figura 30: Análisis de las características fenotípicas de fusión de membranas de las Env de VIH-1 aisladas de individuos LTNP-EC, vLTNP y P. (A)** Análisis de la actividad fusogénica de Env para cada paciente de los grupos LTNP-EC (barras grises), vLTNP (barras verdes), P Antiguos (“Old”) (barras naranjas), P Modernos (“Modern”) (barras rojas) y de los controles (células TZM-bl solas, HEK-293T solas, ptat  $\Delta$ env, NL4.3 y BaL, barras negras). Se muestra la actividad de fusión relativa con respecto al control BaL que será el 100%. Las env aisladas del mismo paciente se agrupan en corchetes. **(B)** Se muestra la actividad de fusión relativa de los diferentes grupos de pacientes. El análisis estadístico se realizó utilizando Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Arriba a la izquierda se muestra el valor p para la comparación entre todos los grupos. Los valores son la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes.

---

#### 4.3.2. Evaluación de la capacidad de los complejos de envoltura viral a transferir material viral célula-célula.

Una vez se ha analizado la capacidad de fusión de las Env, se ha procedido a estudiar su capacidad de transferencia viral de célula a célula dependiente de CD4 (**Figura 31**). Para ello, como se explica en el **apartado 3.5.4** de Materiales y Métodos, se realizó un cocultivo entre células efectoras HEK-293T que expresan las Env en la superficie de la membrana celular y linfocitos T CD4+ primarios, no estimulados y de donantes sanos, y se analizó mediante citometría de flujo la expresión de p24 intracelular en los linfocitos T CD4+ receptores. En este ensayo se induce la formación de sinapsis virológicas que dependen exclusivamente de la interacción entre la Env y el receptor CD4.

Las Env de los pacientes de los grupos LTNP (EC y Virémicos) mostraron una menor capacidad de transferencia viral en comparación con los pacientes P Antiguos y significativamente menor a nivel estadístico con los pacientes P Modernos ( $p < 0,0022$  entre todos los grupos). Con estos resultados se podría pensar que las Env de los virus del grupo LTNP-EC no son capaces de unirse correctamente al receptor CD4 y que dicho impedimento en la infección viral fue superado progresivamente en las Env de los grupos que no son capaces de controlar la replicación viral y que como consecuencia tienen una mayor carga viral.



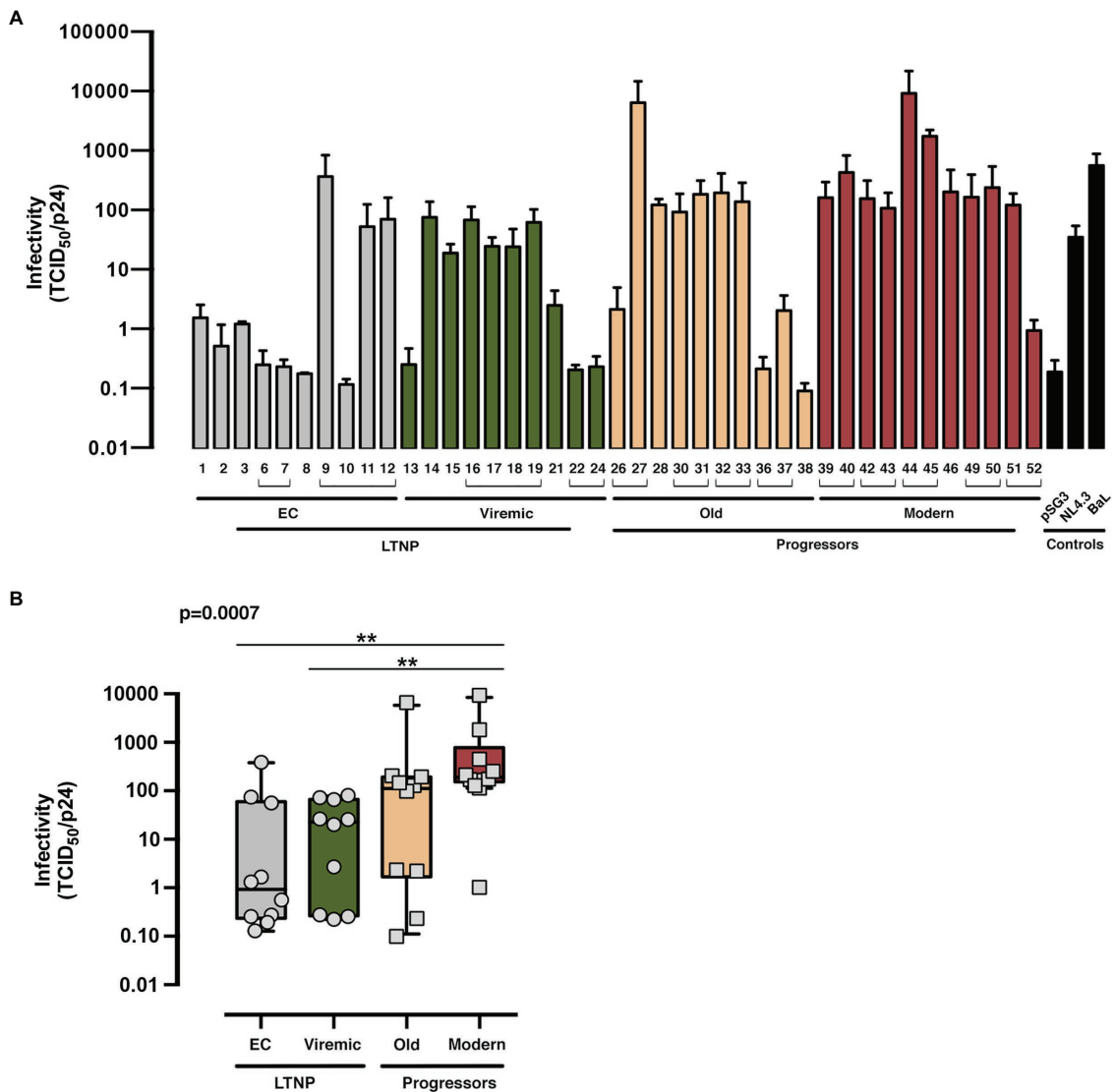
**Figura 31: Análisis de la transferencia viral de célula a célula mediada por el complejo Env del VIH-1. (A)** Análisis de la transferencia viral de célula a célula mediada por Env para cada paciente de los grupos LTNP-EC (barras grises), vLTNP (barras verdes), P Antiguos (“Old”) (barras naranjas), P Modernos (“Modern”) (barras rojas) y de los controles (pSG3  $\Delta$ env, células T CD4+ solas, NL4.3 y Bal, barras negras). Las Env procedentes del mismo paciente se agrupan en corchetes. **(B)** Análisis de la capacidad de inducir la transferencia viral de célula a célula de Env de los diferentes grupos de pacientes. Arriba a la izquierda se muestra el valor de p que es la comparación de las medias entre los diferentes grupos utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media  $\pm$ SEM de dos experimentos independientes.

Por consiguiente, tanto los resultados del ensayo de fusión como los resultados del ensayo de transferencia confirman que las Env pertenecientes a LTNP-EC y vLTNP son deficientes en su unión a CD4, y como consecuencia tienen una baja capacidad fusogénica y de transferencia viral en comparación con los grupos P. Esta deficiencia se relaciona con la baja carga viral detectada en los individuos (**Tabla 13**).

#### **4.4. Caracterización de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico, en su capacidad infectiva durante las primeras etapas del ciclo viral.**

La correcta o deficiente función de las características fenotípicas de las Env estudiadas en los apartados anteriores contribuyen en la eficacia de la infección del virus. Por dicho motivo, se estudió la capacidad infectiva de los pseudovirus producidos con el mismo cuerpo viral y las diferentes envolturas virales aisladas de pacientes con diferente progresión clínica en células TZM-bl.

Una vez analizados los datos, se puede ver que las Env aisladas del grupo LTNP-EC mostraron valores de infectividad más bajos, mientras que, en el lado contrario, las Env aisladas del grupo de P Modernos obtuvieron títulos más altos. A su vez, las Env aisladas del grupo vLTNP produjeron títulos más altos que el grupo LTNP-EC, pero más bajos que los P Antiguos (**Figura 32**). A nivel general, los pseudovirus cuya Env procede de los grupos que tienen una alta carga viral y una infección progresiva (Antiguos y Modernos) poseen una mayor capacidad infectiva en comparación con los grupos que son capaces de controlar la infección (EC y Virémicos). Esto confirma que las propiedades virales analizadas (unión a CD4, fusión y transferencia viral) influyen en gran medida en la infectividad viral y como consecuencia en la biología del VIH-1 y su patogénesis viral.



**Figura 32: Análisis de la infectividad viral de las Env VIH-1. (A)** Análisis de la infectividad (valor TCID<sub>50</sub> normalizado por la cantidad de p24 viral con el que se produce la infección) de cada Env aislada de los pacientes de los diferentes grupos clínicos LTNP-EC (barras grises), vLTNP (barras verdes), P Antiguos (“Old”) (barras naranjas), P Modernos (“Modern”) (barras rojas) y de los controles (pSG3Δenv, NL4.3 y BaL, barras negras). Las Env aisladas del mismo paciente están agrupadas en corchetes. **(B)** Análisis de la capacidad infectiva de las Env de los diferentes grupos de pacientes. Arriba a la izquierda se muestra el valor p para la comparación entre todos los grupos. Los valores p comparan las medias entre grupos utilizando la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Kurskal-Wallis, Dunn. Los valores son la media ±SEM de tres experimentos independientes.



#### **4.5. Análisis de las secuencias de aminoácidos de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes con distinto perfil clínico.**

Una vez analizadas las diferentes características fenotípicas de las Env, se han estudiado las secuencias de aa de las mismas, ya que algún cambio en ellas podría estar relacionado con las características (CV y patología) observadas en los pacientes de los distintos fenotipos clínicos estudiados.

Como se ha comentado anteriormente, primero el grupo colaborador del Dr. Cecilio López Galíndez y la Dra. Concepción Casado realizó una reconstrucción filogenética a partir de las secuencias de nucleótidos de las diferentes *env* de pacientes junto con otras secuencias de nucleótidos obtenidas de individuos españoles con VIH-1. Todas las secuencias analizadas proceden de virus VIH-1 subtipo B con fenotipo CCR5. Como se puede observar en la **Figura 28**, no existen relaciones filogenéticas ni agrupamientos entre los diferentes grupos analizados, exceptuando las secuencias de Env que proceden del mismo individuo.

Tras lo cual, se estudiaron las secuencias de proteínas centrándose en los bucles (“*loops*”) variables y sus posibles sitios de glicosilación ligados al residuo N (PNG) en la subunidad gp120 del complejo Env. Analizando los resultados, **Figura 33** y **Tabla 14**, se observa una tendencia de los complejos Env a ganar longitud y sitios de glicosilación a lo largo de la epidemia, al igual que se ha descrito en algún estudio previo (Sagar et al., 2006; Curlin et al., 2010; Yuan et al., 2013). Los complejos Env obtenidos de virus de los pacientes LTNP (EC y Virémicos) y P Antiguos mostraron longitudes más cortas que los del grupo de pacientes P Modernos. El bucle V3 de la subunidad gp120 fue la región más conservada y constante tanto en longitud como en glicosilación, mientras que los demás bucles mostraron un aumento de longitud, especialmente los bucles V2 y V5 de la subunidad gp120. Estadísticamente, se mostraron diferencias significativas entre la longitud total del complejo de Env en los vLTNP y los P Modernos, y en la longitud de los

bucles V2 (vLTNP respecto a P Modernos) y V5 (LTNP-EC y vLTNP respecto a P Modernos) de la subunidad gp120 del complejo de Env viral.

En relación con los sitios PNG, la mayoría de los 24 sitios relevantes descritos previamente (Sterjovski et al., 2007; Go et al., 2008; Gnanakaran et al., 2011; S. Wang et al., 2020) se encontraban presentes en las glicoproteínas virales de estudio. Sin embargo, se observaron diferencias en la extensión de aa de los bucles con una adquisición progresiva de más PNG en P Modernos (Tabla 14). El glicano en la posición N289 estaba presente en LTNP-EC, vLTNP y P Antiguos, pero no en P Modernos. La posición N362, que es N proximal al motivo DPE (*“Downstream Promoter Element”*) de unión a CD4 (posiciones de la secuencia 368-370HXB2), se conservó en LTNP-EC, vLTNP y P Antiguos, pero solo estuvo presente en dos Env de P Modernos. También se produjeron cambios en la proteína transmembrana gp41 en el glicano N816, el cuál era dominante en los LTNP pero no en los P (Antiguos y Modernos).

**Tabla 14: Características moleculares de Env de VIH-1: longitud de la secuencia y sitios potenciales de glicosilación en N (PNG) en los Bucles Variables (Vn) de la subunidad gp120.**

Clinical Group	Subgroup	Env code	<sup>a</sup> V1/G	V2/G	V3/G	V4/G	V5/G	<sup>b</sup> ΣVn/G	<sup>c</sup> Mean/G	<sup>d</sup> Gp160	<sup>e</sup> Mean		
LTNP	EC	1	28/4	43/2	37/2	28/4	12/1	148/13		848			
		2	33/5	41/2	37/2	31/4	12/1	154/14		853			
		3	33/5	41/2	37/2	31/3	12/2	154/14		853			
		6	28/3	41/2	37/2	34/4	12/1	152/12		852			
		*7	32/5	47/2	37/2	30/4	11/2	157/15	151.1/14.4	859	851.8		
		8	32/5	47/2	37/2	30/4	11/2	157/15		859			
		9	24/4	43/2	36/2	28/4	12/1	143/14		843			
		10	27/4	42/2	37/2	29/5	14/2	149/16		851			
		11	27/5	42/3	37/2	29/5	13/2	148/17		850			
		12	27/4	42/3	37/2	32/5	12/1	150/14		850			
		Viremic	13	31/5	41/2	37/2	31/4	13/1	153/14		854		
			14	29/4	42/2	37/2	32/5	12/2	152/15		852		
	15		34/5	41/2	37/2	36/5	12/1	160/15		860			
	16		29/5	41/2	37/1	29/5	12/1	148/14		849			
	17		29/5	41/2	37/2	29/5	12/1	148/16	150,3/14.1	849	851.5		
	18		29/4	41/2	37/2	29/5	12/1	148/15		849			
	19		29/4	41/2	37/2	29/5	12/1	148/14		849			
	21		24/3	41/2	37/1	30/5	10/0	142/11		842			
	22		28/4	41/2	37/2	32/5	12/1	150/14		850			
	24		37/7	41/2	36/2	32/5	12/1	158/15		861			
	Progressor		Old	26	31/4	41/3	37/2	39/7	14/2	160/18		862	
				27	31/5	48/3	37/2	28/5	14/2	158/16		858	
		28		25/5	41/2	36/2	33/5	12/2	145/15		848		
		30		33/4	41/2	37/2	27/4	11/1	150/14		852		
31		33/5		41/2	37/2	36/5	13/2	158/16		860			
32		28/5		44/2	36/2	30/5	15/2	151/15	153,8/15.2	853	855.8		
33		31/4		44/2	36/2	30/5	15/2	156/14		856			
36		28/4		46/1	37/2	34/5	14/2	157/15		859			
37		28/4		46/2	37/2	34/5	14/2	157/16		859			
38		30/4		41/3	37/1	31/4	13/2	150/13		851			
Modern <sup>e</sup>		39		31/4	41/2	37/2	29/4	12/2	149/14		849		
		40		31/4	41/2	37	29/4	17/2	154/14		849		
		42	29/4	48/2	37	36/6	17/2	167/13		878			
		43	29/4	48/3	37	30/4	15/2	159/15		872			
		44	28/4	47/3	37	31/4	15/2	158/15	158.1/14.7	859	862.0		
		45	28/4	47/2	37	31/4	15/2	158/14		859			
46		35/4	46/3	37	33/5	13/2	164/15		865				

## Resultados

---

[ 49	37/6	41/2	37	42/7	13/1	170/18	871
	37/6	41/2	37	42/7	13/1	170/18	871
[ 51	31/4	42/2	37	26/3	13/1	149/12	853
	29/4	42/2	37	32/6	12/1	152/15	856

<sup>a</sup> Longitud en aminoácidos (aa) y sitios potenciales de glicosilación (PNG) de las regiones variables Env-gp120 (Vn; desde V1 a V5) expresado como Vn/G ratio.

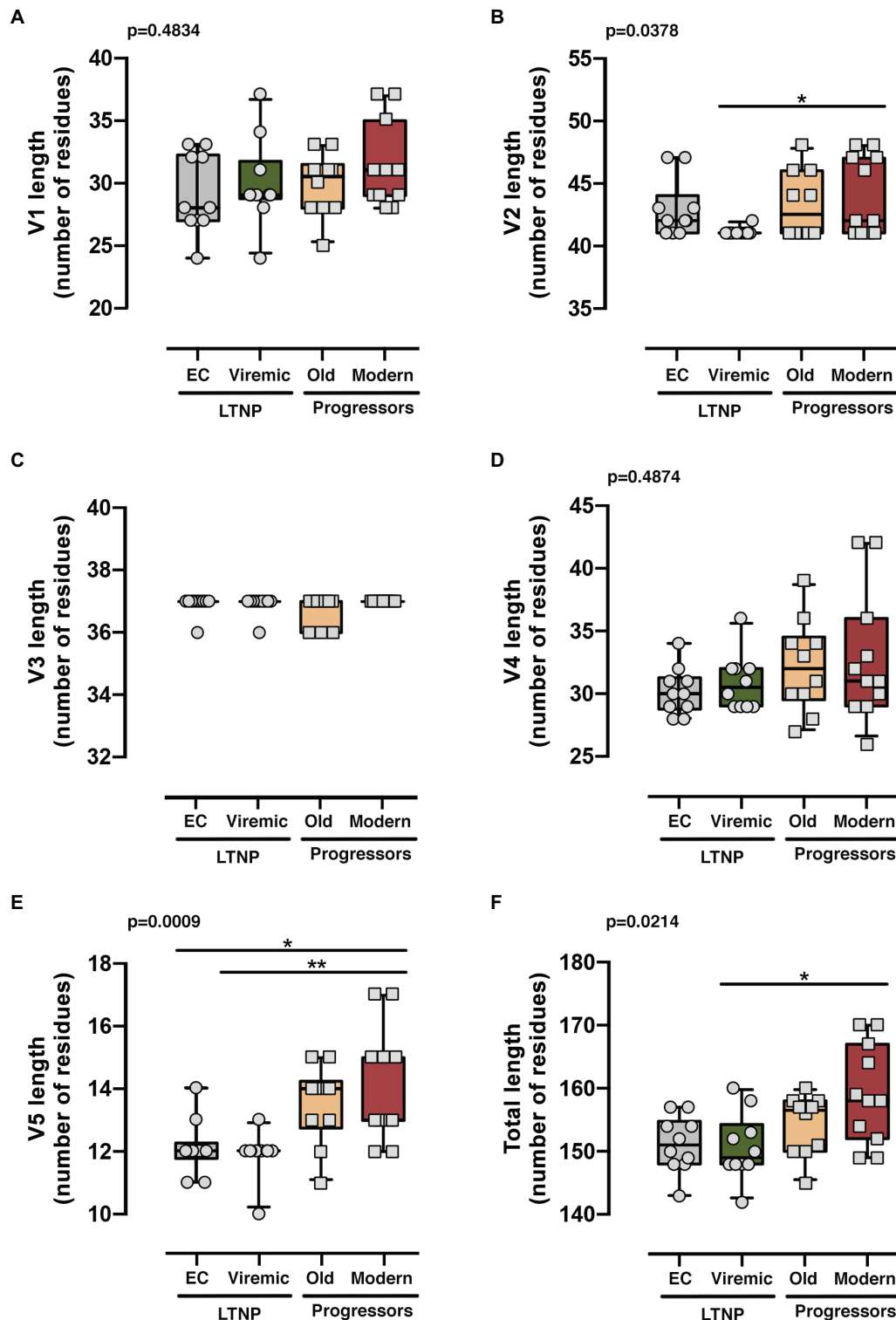
<sup>b</sup>ΣVn/G indica la suma de longitudes de aa de Vn y PNG (n; desde 1 a 5).

<sup>c</sup>Mean/G indica el valor medio de la longitud y PNG de cada grupo de Env.

<sup>d</sup>Gp160 muestra la longitud total en aa de cada Env incluyendo ambas subunidades gp41 y gp120.

<sup>e</sup>Mean indica el valor medio de la longitud de gp160 (gp41 y gp120) en aa para cada grupo de Env.

\*Las envolturas aisladas del mismo paciente se representan en corchetes.

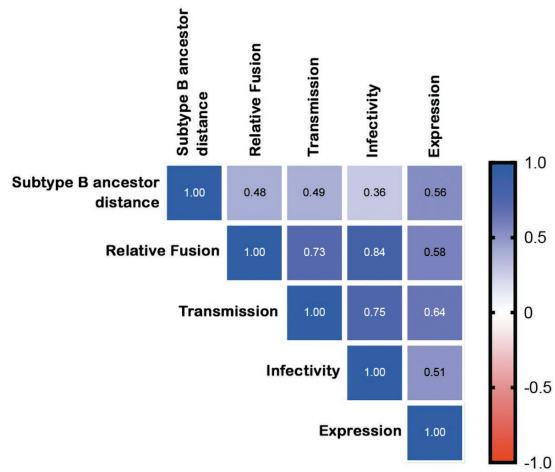


**Figura 33: Análisis de la longitud de los bucles de la subunidad gp120 del complejo Env de virus aislados de los diferentes grupos de pacientes.** Análisis de la longitud de cada bucle variable V1 (A), V2 (B), V3 (C), V4 (D), V5 (E) y todos los bucles variables juntos (F). Los resultados se agruparon (LTNP-EC: barra gris, vLTNP: barra verde, P Antiguos: barra naranja y P Modernos: barra roja) y se compararon mediante una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, Dunn. El valor p para la comparación entre todos los grupos se muestra arriba a la izquierda (\* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,05$ ). Las líneas son la media, los percentiles 25 y 75 de las cajas y los valores mínimo y máximo de las barras, considerando la longitud del bucle de todas las Env de estudio de los diferentes grupos.

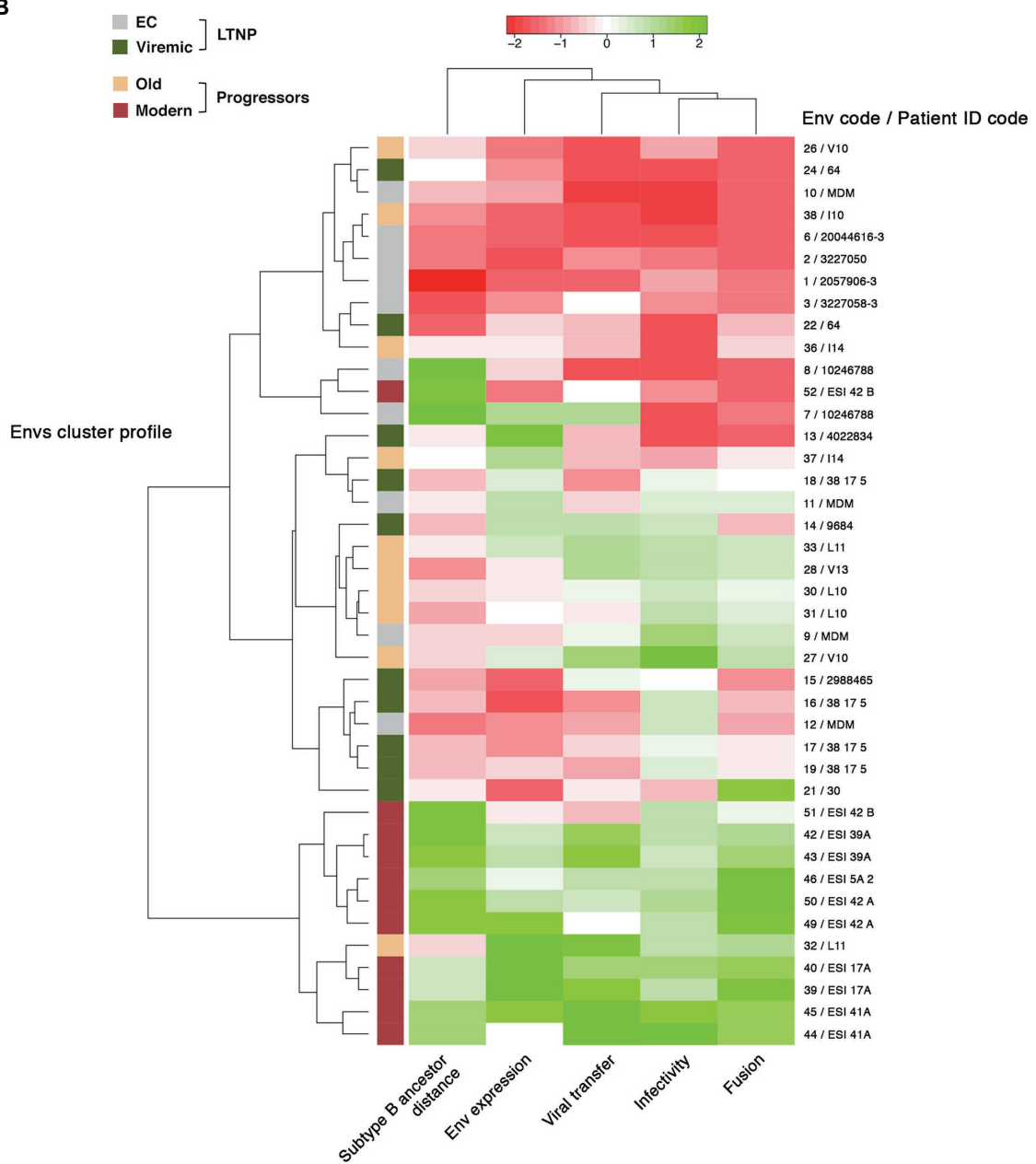
#### **4.6. Correlación entre las características virales de los complejos de envoltura viral de virus aislados de pacientes de distinto perfil clínico.**

A continuación, se estudiaron las posibles correlaciones existentes entre los diferentes parámetros funcionales analizados: expresión, capacidad de transferencia de célula a célula, que está directamente mediada por la unión de Env/CD4, fusogenicidad e infectividad (**Figura 34A**). Se observó una correlación positiva. También se mostró una agrupación de clones de Env según las características funcionales; se agruparon de forma muy clara las Env de pacientes LTNP-EC y las envolturas de pacientes P Modernos en ramas opuestas (**Figura 34B**). Es decir, las Env que muestran funciones virales deficientes, debido a la incorrecta unión al receptor CD4, se correlacionaron con el control de la viremia y los fenotipos clínicos no progresores. En el lado contrario, las envolturas funcionales se asociaron con la falta de control virémico y los fenotipos clínicos progresores. Estas correlaciones estadísticas apoyan una posible asociación entre las propiedades virales de las Env, las cuales condicionan directamente la infección por VIH-1, y el fenotipo viral, que a su vez se correlaciona con el fenotipo clínico de los pacientes VIH+ del estudio.

A



B



**Figura 34: Correlación de la expresión, fusión, transferencia, infectividad y distancia genética y agrupación de las características de Env. (A)** Correlación entre la distancia genética al ancestro del subtipo B de las Env de todos los grupos y las funciones de expresión, fusión relativa, transferencia e infectividad (los valores de correlación de Spearman se indican en la representación matricial). **(B)** Las Env de LTNP-EC (gris), vLTNP (verde), P Antiguos (naranja) y P Modernos (rojo) se analizaron de acuerdo con los parámetros indicados. Se identificaron dos grupos principales correspondientes a EC y P Modernos con características funcionales opuestas.

También se manifestó una buena correlación entre la distancia genética al MRCA de subtipo B y la funcionalidad de las Env analizadas (**Figuras 34A y 34B**). En general, las secuencias evolutivas más bajas (menor distancia genética al MRCA de subtipo B) tienen una menor funcionalidad (LTNP-EC) y las secuencias evolutivas más altas tienen una mayor funcionalidad (P Modernos); lo cual coincide con la tendencia en el aumento de la longitud de las Env que también sigue el mismo patrón que el crecimiento funcional de las diferentes características virales. En resumen, las Env con las características más eficientes se encuentran en el grupo P Modernos y también muestran las proteínas gp160 de mayor longitud, con más sitios glicosilados y mayor distancia al MRCA de subtipo B.

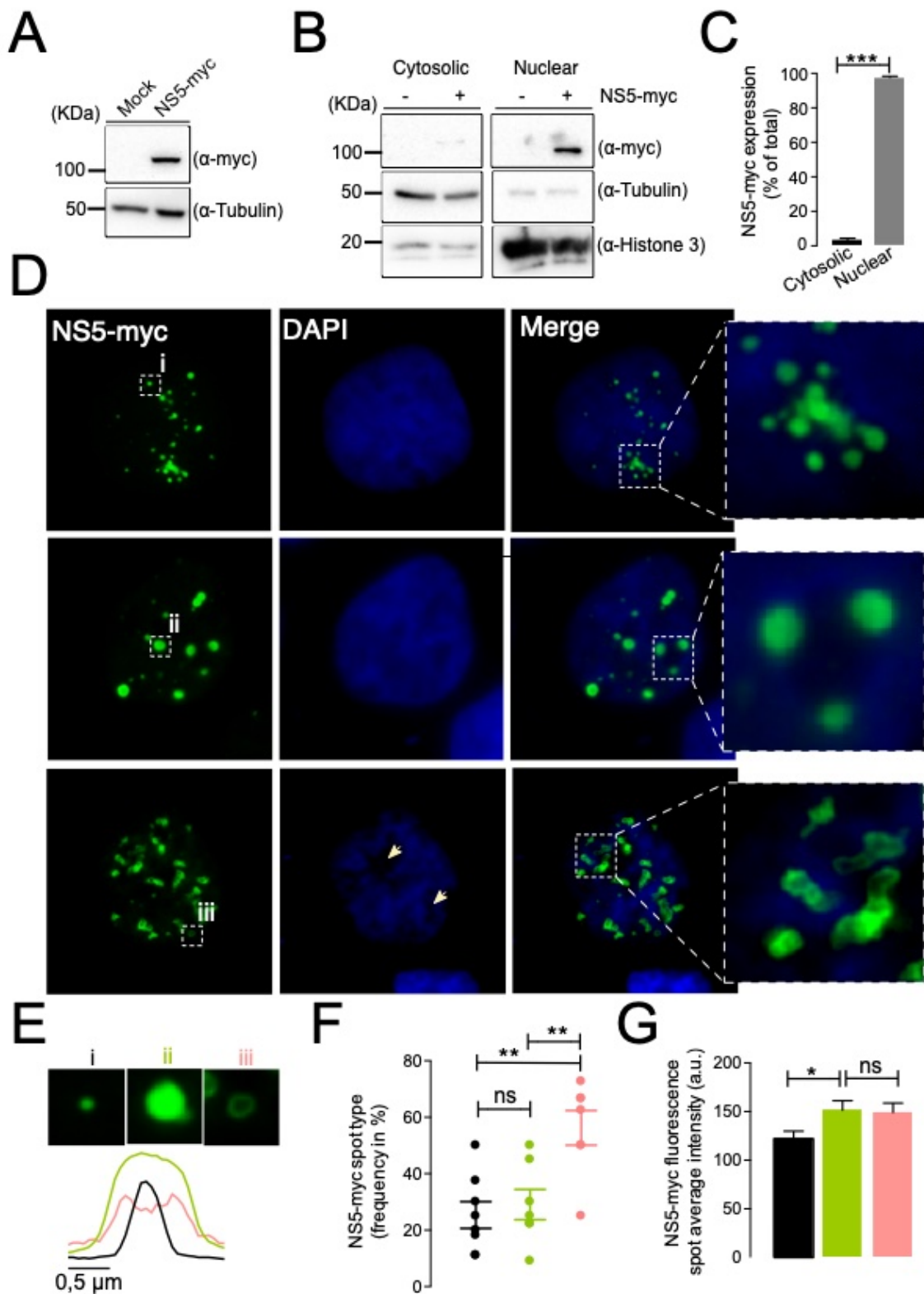


---

**Parte B: Caracterización de la proteína no estructural NS5 como regulador del citoesqueleto de tubulina y del flujo autofágico, ambas funciones antivirales de la enzima HDAC6.****4.7. Estudio de la localización celular de NS5: distribución en estructuras nucleares particulares.**

La relación existente entre la localización celular de la proteína NS5 del ZIKV y su función está cobrando mucho interés actualmente, y, en particular, en relación con su localización nuclear. Como se ha comentado en el apartado 1.4.4.3 de introducción, durante la infección por ZIKV, NS5 se localiza en el núcleo sin afectar a la replicación viral, favoreciendo la evasión de la respuesta inmunitaria. Por lo que, lo primero que se llevó a cabo fue la caracterización de la expresión y localización celular de un constructo de NS5. Concretamente, para analizar su localización subcelular se transfectaron células HEK-293T con el plásmido codificante del ORF de NS5 del ZIKV MP1751 etiquetado con Myc en su extremo C-terminal, pNS5-myc. A las 48 horas, mediante análisis bioquímico por *western blot* se observó cómo NS5 se localiza mayoritariamente (~95%) en la fracción nuclear frente a la citosólica (Figura 35B y 35C), extraídas del lisado celular (Figura 35A). Además, como ya se ha descrito anteriormente, la capacidad de NS5 de ZIKV de distribuirse en cuerpos nucleares punteados, se quiso confirmar mediante microscopía de epifluorescencia. NS5 se encontró casi completamente restringido en el núcleo y como se muestra en la Figura 35D, generalmente se manifiesta compartimentalizado en 15-30 formas puntiformes regulares con tamaño variable de  $0,90 \pm 0,14$  (media  $\pm$  SD), denominadas como (tipo i) (Figura 35D) a  $1,56 \pm 0,11$  micrómetros de diámetro (tipo ii); (24,7% y 27,2% respectivamente) (Figura 35D), y, en mayor proporción, en estructuras irregulares de un tamaño similar,  $1,52 \pm 0,41$ ; pero en forma de anillo (tipo iii) (48,1%) (Figura 35D), como se refleja con el trazo de “*line scanning*” (Fig. 35E). Asimismo, estas estructuras de tipo iii presentaron una tinción DAPI menos intensa en la zona central, lo que sugiere la ausencia de cualquier colocación de ADN (Figura 35E). A pesar de que las células fueron transfectadas al mismo tiempo, NS5 apareció selectivamente formando diversos patrones de estructuras en diferentes células (Figura 35D) mostrando su naturaleza altamente dinámica e influenciada por procesos que son independientes al tiempo desde la transfección, como ha sido descrito

previamente en estudios realizados con virus infectivos, y donde se atribuyó esta diversidad a su expresión y localización durante las distintas fases del ciclo viral (Ng et al., 2019; Conde et al., 2020), así como pudiendo estar condicionado por la fase del ciclo celular. Nuestros datos excluyen esta última opción, ya que la sincronización de las células en cultivo que expresaron pNS5-myc no produjo cambios en el patrón de la expresión (datos comprobados no mostrados).



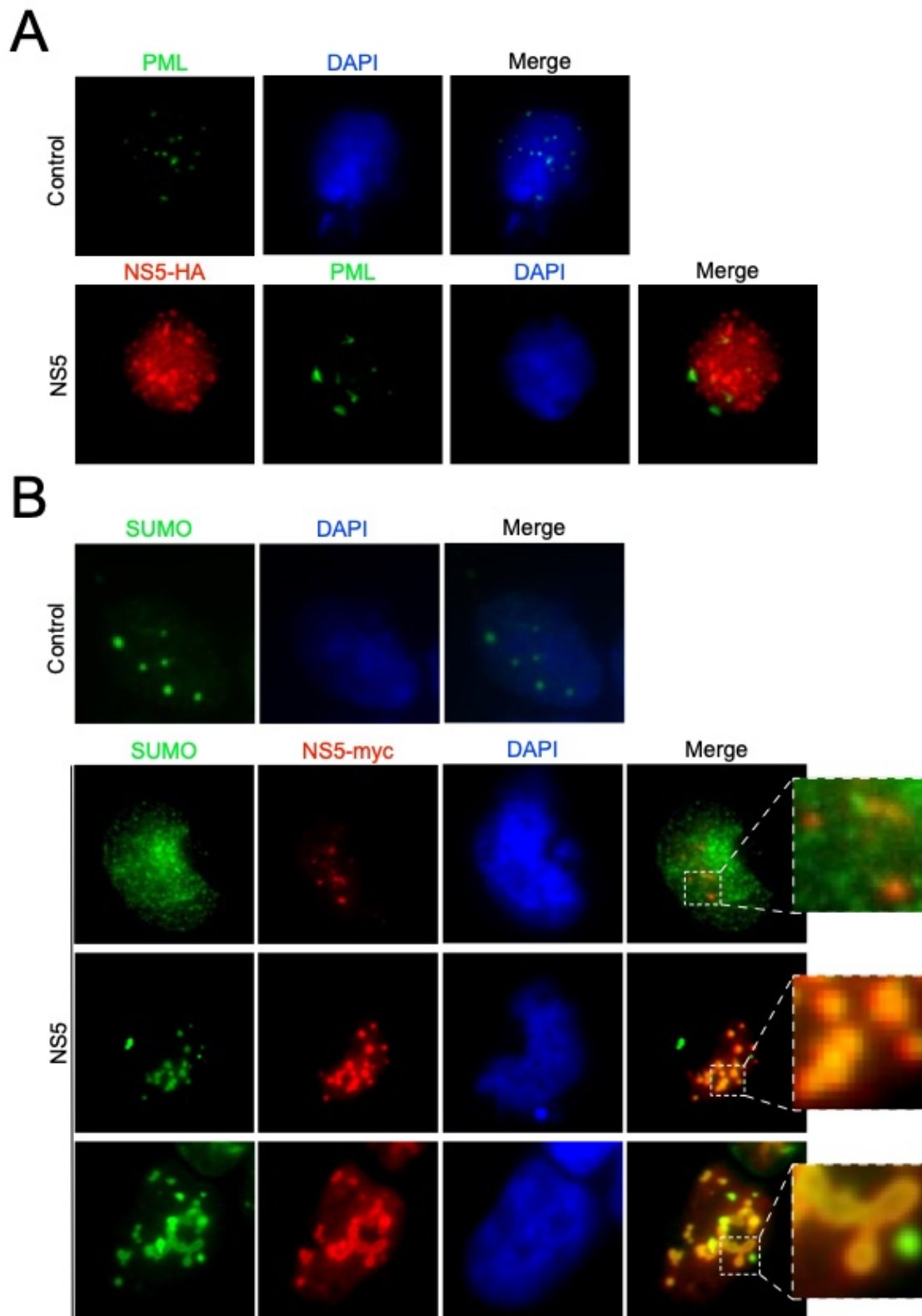
**Figura 35: Localización subcelular de NS5.** (A) y (B) Muestran *western blot* representativos del lisado total (A) y del fraccionamiento celular (B) de células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc (1,5 μg ADNc). La detección de la proteína Histona 3 se emplea como la proteína control de la fracción nuclear, y la detección de la proteína α-tubulina como proteína control de la fracción citoplasmática y de la carga proteica total empleada. (C) Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* de los experimentos del panel (B), representando la cantidad del constructo pNS5-myc que se encuentra en el citoplasma (barra negra) y en el núcleo

(barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga  $\alpha$ -tubulina de cada experimento. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de 2 experimentos independientes. **(D)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T expresando pNS5-myc, 48 horas postransfección las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpo  $\alpha$ -myc, seguido de un marcaje con anticuerpo secundario de especie A488  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. La proteína viral NS5 se encuentra en el núcleo formando 3 tipos de estructuras: como formas puntiformes regulares desde uno (tipo i) a diversos (tipo ii) micrómetros de diámetro y como formas irregulares que varían en tamaños más largos y con forma de anillo (tipo iii). **(E)** “Line scanning” de las diferentes estructuras formadas por NS5 (tipo i-línea negra, tipo ii-línea verde y tipo iii-línea rosa). **(F)** Análisis de frecuencia de los tipos de distribución en que NS5 aparece en los diferentes tipos de estructuras (tipo i-puntos negros, tipo ii-puntos verdes y tipo iii-puntos rosas) representadas como la media  $\pm$  S.E.M de 81 células cuantificadas de 8 imágenes pertenecientes a 2 experimentos independientes. La estructura tipo iii es la estructura de NS5 que aparece más frecuentemente. **(G)** Análisis del promedio de la intensidad de fluorescencia de los puntos de NS5 en sus diferentes estructuras (tipo i-barra negra, tipo ii-barra verde y tipo iii-barra rosa) representadas como la media  $\pm$  S.E.M de 81 células de 2 experimentos independientes. \*\*\* significa que  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$ , y ns no significativo ( $p > 0,05$ ). El valor de p es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando una prueba paramétrica t de Student.

La disposición de proteínas nucleares en estructuras dinámicas subcelulares, pueden atribuirse a múltiples organelas nucleares como los nucléolos, los cuerpos de Cajal, los “speckles”, los “histone locus bodies”, los cuerpos de Polycomb, los “paraspeckles” o los cuerpos nucleares PML, todos orgánulos subnucleares sin membrana (Y. S. Mao et al., 2011).

Los datos más recientes sobre la función de los cuerpos PML revelan que están involucrados en la respuesta a muchas formas de estrés, defensa viral y estabilidad del genoma mediante el secuestro, modificación y degradación de muchas proteínas asociadas. En este sentido, analizamos la hipótesis de distribución de NS5 con los componentes mayoritarios de los cuerpos nucleares de PML.

Se observó que NS5 colocaliza con SUMO cuando se encuentra formando las estructuras tipo ii y iii, pero no se observó colocalización con PML (Figura 36), lo que concuerda con lo descrito en estudios previos (Conde et al., 2020). A su vez, los NB de PML exhibieron una aparente estabilidad nuclear en las células control.



**Figura 36:** La proteína viral NS5 distribuye en cuerpos nucleares enriquecidos en la proteína SUMO. **(A)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-HA (2,5  $\mu$ g ADNc) para observar la posible localización de NS5 con PML. 48 horas postransfección las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpo  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -PML, y tras una incubación de 24 horas a 4°C, se marcaron con los anticuerpos secundarios específicos de especie A568  $\alpha$ -rabbit y A488  $\alpha$ -mouse, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. **(B)** Análisis por microscopía de

epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (2,5 µg ADNc) para analizar la localización de la proteína viral NS5 en estructuras nucleares positivas para la proteína SUMO. 48 horas postransfección, las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpo  $\alpha$ -myc y  $\alpha$ -SUMO, y, tras una incubación de 24 horas a 4°C, se marcaron con los anticuerpos secundarios de especie A568  $\alpha$ -mouse y A488  $\alpha$ -rabbit, respectivamente. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. NS5 no colocaliza con PML y colocaliza con SUMO en estructuras nucleares de tipo ii y iii.

En resumen, los experimentos mostraron que la proteína viral NS5 se acumula principalmente en el núcleo, comportándose de forma muy dinámica formando estructuras cuyo número y tamaño varía. Lo que sugiere que la acumulación nuclear de NS5 podría ser determinante o estar condicionada por las fases del ciclo de vida del ZIKV.

#### **4.8. Estudio de la proteína NS5 del ZIKV como reorganizador y estabilizador del citoesqueleto de tubulina.**

Existen evidencias de que la infección por ZIKV causa una reorganización drástica de los microtúbulos (Cortese et al., 2017) que es crucial tanto en la formación de los sitios de replicación viral como en el favorecimiento de los efectos tóxicos que rigen la diferenciación neuronal, lo que indirectamente contribuye a la microcefalia (Saade et al., 2020). Dado que el reordenamiento del citoesqueleto toma un papel activo durante la infección viral (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; García-Expósito et al., 2013; Santos et al., 2014), especialmente en el ciclo de los flavivirus (Y. Zhang et al., 2019), se buscó identificar los agentes responsables de esta reorganización por parte del ZIKV.

Un mecanismo que controla las propiedades y funciones de los microtúbulos es la modificación postraduccional de sus subunidades de tubulina. Por tanto, se analizaron los niveles de acetilación de la lisina K40 de la subunidad  $\alpha$ -tubulina, modificación postraduccional relacionada con la estabilidad de los microtúbulos (Nogales et al., 1998; Hammond et al., 2008; Choudhary et al., 2009; Wloga & Gaertig, 2010). Mediante el análisis bioquímico se pudo ver que NS5 de ZIKV está estrechamente relacionado en la modificación de la red de microtúbulos (Figura 37A). El efecto dosis creciente de

---

transfección del plásmido pNS5-myc en células HEK-293T y de expresión de la proteína NS5, analizado mediante *western blot*, mostró una hiperacetilación de MT en la subunidad  $\alpha$ -tubulina (**Figura 37B**). Este fenómeno de acumulación de  $\alpha$ -tubulina en su estado acetilado muestra un comportamiento lineal con una correlación entre la expresión viral de NS5 y los niveles de acetilación de  $\alpha$ -tubulina de  $R^2=0,84$  ( $p$ -value=0,0098). Este efecto dosis-respuesta alcanzó un máximo de  $\sim 3$  aumentos de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina, en comparación con las células control, a las 48 horas desde la transfección celular (**Figura 37C**). Un experimento de curso temporal reveló que dicho aumento ocurre al menos  $\approx 24$  horas después de que se detecte la expresión de NS5 (**Figura 38A**).

Los microtúbulos están sujetos a diferentes modificaciones postraduccionales, en concreto, la acetilación de K40 de  $\alpha$ -tubulina se rige principalmente por el balance entre la incorporación del grupo acetilo por la enzima acetil transferasa  $\alpha$ TAT1 y la eliminación por las desacetilasas SIRT2 y HDAC6 (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003; Shida et al., 2010; Skoge et al., 2014; Coombes et al., 2016), ambas reacciones ubicadas en el citosol celular. Con el propósito de investigar cómo ZIKV afecta la arquitectura celular, particularmente si NS5 posee la capacidad de reorganizar el citoesqueleto, se aplicaron diversos moduladores selectivos del citoesqueleto. La inhibición específica de la actividad enzimática de HDAC6 mediante el tratamiento con tubacina (se une al dominio desacetilasa de HDAC6) durante 24 horas, que induce la acetilación de  $\alpha$ -tubulina, pero no produce efectos sobre la acetilación de histonas (Haggarty et al., 2003), resultó en un aumento doble en la proporción de tubulina acetilada en comparación con la condición control (DMSO) (**Figura 37C y 37D**). El tratamiento con tubacina no comportó un incremento de la acumulación de tubulina acetilada por encima del efecto ya producido por la expresión de NS5, o viceversa (**Figura 37C y 37D**), lo que sugiere que la intervención sobre actividad de desacetilación de HDAC6 podría ser el eje central de acción de NS5 para el desequilibrio en la dinámica de MT, o que ayuda a estabilizar de forma transitoria a los MT y que el nivel endógeno de HDAC6 no es suficiente para desequilibrar esta acción estabilizadora de NS5, y que la sobreexpresión de HDAC6 evitaría, como se muestra más adelante (**Figura 39A y 37B**). El empleo de A-485, un



inhibidor catalítico selectivo de p300/CBP, una acetil transferasa que inhibe HDAC6 mediante su acetilación (Y. Han et al., 2009), eliminó por completo la linealidad de la relación dosis-respuesta de NS5 (**Figura 37C y 37D**). Es decir, en presencia de A-485 se observa una disminución de los niveles de acetilación de los MT en  $\alpha$ -tubulina, y de forma dependiente de los niveles de expresión de NS5. Esto podría indicar que HDAC6 desacetilaría correctamente la subunidad  $\alpha$ -tubulina de los MT en presencia de A-485 y NS5. Asimismo, la inhibición de p300 por A-485 debería comportar una mayor expresión de la  $\alpha$ -tubulina acetiltransferasa-1 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17) (p300 se expresa mayoritariamente en el núcleo, salvo en condiciones de estrés) (Mackeh et al., 2014), lo que debería resultar en un aumento de la acetilación de los MT. A su vez, la fracción citoplasmática del cofactor de transcripción p300 debería favorecer la hiperacetilación de MT por acción de  $\alpha$ TAT-1/MEC-17, al unirse, a su vez, a los MT hiperacetilados de forma  $\alpha$ TAT-1/MEC-17 dependiente (Mackeh et al., 2014). Así, lo esperable, tras el tratamiento con A-485, sería observar un aumento de la acetilación de los MT, como vemos en la condición control (“*mock*”) de células tratadas con A-485 (**Figura 37C**), y respecto a las células sin tratar (vehículo) (**Figura 37C**). Esto se podría explicar, como hemos anticipado, por estabilización de los niveles de  $\alpha$ TAT-1/MEC-17 tras inhibición de p300 por A-485. Sin embargo, tras sobreexpresar NS5, bajo tratamiento con A-485, se observa un aumento del efecto de desacetilación de los MT (**Figura 37C, A-485**). En este sentido, no podemos olvidar la función histona acetiltransferasa de p300 y que su inhibición por A-485 resultaría en la parada del proceso de división celular, y de la activación del proceso autofágico para evitar la muerte celular por apoptosis, tal y como se ha descrito en células neuronales y de pulmón (Mackeh et al., 2023). Precisamente, la función autofágica asociada a HDAC6 depende de su actividad desacetiladora de microtúbulos (Kawaguchi et al., 2003; J.-Y. Lee et al., 2010), y como hemos descrito en el grupo frente al VIH-1 (Valera et al., 2015). Por tanto, el efecto de la inhibición de la función acetiltransferasa en histonas del p300 nuclear podría favorecer un estado celular donde la desacetilación de MT predomine, y donde ni la sobreexpresión de NS5 ni la acción potencial de  $\alpha$ TAT-1/MEC-17 pudiesen estabilizar los MT ni su estado de hiperacetilación. De hecho, este efecto del inhibidor A-485 junto a la sobreexpresión de NS5 es totalmente contrario al observado en condiciones control, donde NS5 hiperacetila los MT en su subunidad  $\alpha$ -tubulina en ausencia de cualquier tratamiento



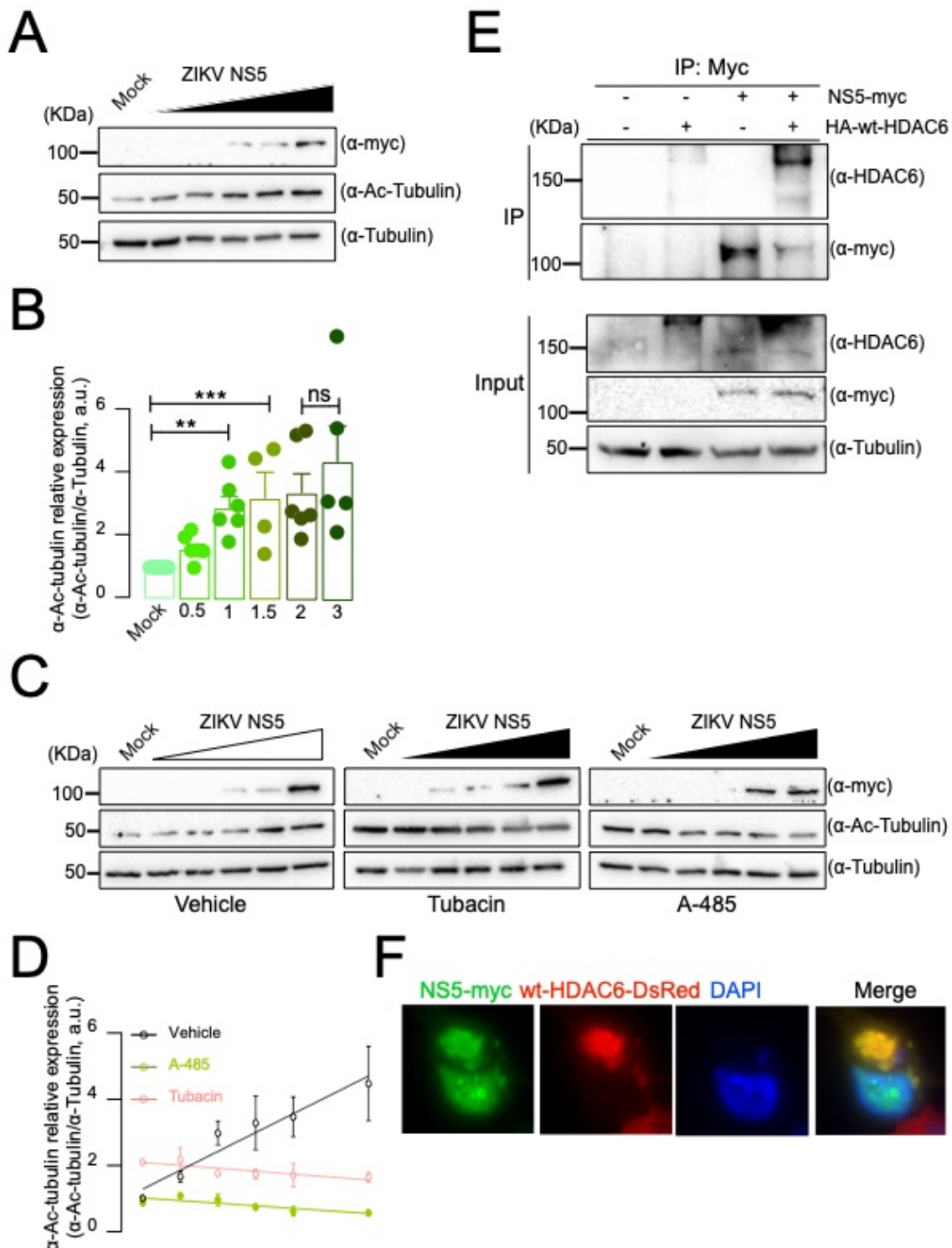
---

con inhibidor (**Figura 37C**, *vehículo*). Esto podría ser indicativo, en condiciones control de sobreexpresión de NS5 (sin inhibidores), de una posible estimulación de la actividad acetiladora de MT por  $\alpha$ TAT-1/MEC-17 por acción de NS5 sobre esta quinasa, y que los niveles de HDAC6 endógeno no podría neutralizar. Pero esta hipótesis debe ser demostrada.

Considerando estos resultados y discusión, podríamos sugerir que el equilibrio de expresión y función, que se pudiera establecer en un contexto de infección por el virus ZIKV (por sobreexpresión de NS5, en este trabajo), entre NS5, p300 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17) y HDAC6 podría determinar la dinámica del citoesqueleto de tubulina y sus funciones celulares por regulación de los niveles de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina en los MT. Donde el efecto observado de hiperacetilación de MT por NS5 podría ser parte de su función proviral, de escape a las defensas intracelulares y/o del efecto citotóxico de la proteína NS5.

HDAC6 tiene varios sustratos no histona, además de la subunidad  $\alpha$ -tubulina acetilada, sobre los que actúa desacetilándolos, tal como la proteína cortactina, RIG-I, hsp90 o  $\beta$ -catenina (L. Zhang et al., 2015). Cabe destacar, que RIG-I es importante en la regulación de la respuesta inmunitaria frente a la infección por virus ARN (Kell & Gale, 2015), como es el caso del virus ZIKV, protegiendo frente a la citotoxicidad asociada a la infección (Schilling et al., 2020). La modificación postraduccional de RIG-I por acetilación evita su oligomerización, modificación que debe ser revertida durante la infección viral aguda, para facilitar la activación de señalización de RIG-I inducida por el ARN viral reconocido. De hecho, la acetilación de RIG-I es revertida por HDAC6, lo que activa la señalización de RIG-I induciendo la inmunidad antiviral innata por activación de la ruta de inducción del INF (H. M. Liu et al., 2016). Por otra parte, se ha descrito que la proteína NS5 del ZIKV inhibe la vía RIG-I y la activación del promotor del INF-1 $\beta$  de tipo III, así como la producción de INF de tipo I y III (Hertzog et al., 2018; Lundberg et al., 2019). Todo esto hace que nos interese esclarecer si la capacidad enzimática de HDAC6 para desacetilar su sustrato RIG-I se ve afectada por NS5, lo que podría ser importante en la regulación de la respuesta inmunitaria, INF dependiente, frente a la infección por el virus ZIKV.

La activación de RIG-I durante la infección viral está regulada por la acetilación/desacetilación reversible. Para ello se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pNS5-myc y RIG-I-HA y se realizó un ensayo de CoIP con anticuerpo anti-HA (arrastrando a través del “tag” HA de la proteína RIG-I). Se evaluó la acetilación de RIG-I, recuperado por inmunoprecipitación, mediante análisis bioquímico por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-acetil-lisina, que permitiría ver si algún residuo de K en la proteína RIG-I-HA ha sido acetilado o no. Los resultados obtenidos mostraron que mientras RIG-I acetilado fue indetectable en células que no expresaban NS5 (control), la transfección de NS5 resultó en una banda de acetil-RIG-I (**Figura 44A**). Estos hallazgos sugieren un papel directo de NS5 en el mantenimiento del estado de acetilación de los sustratos de HDAC6, cambiando la estabilidad de los microtúbulos y el estado de activación de RIG-I.

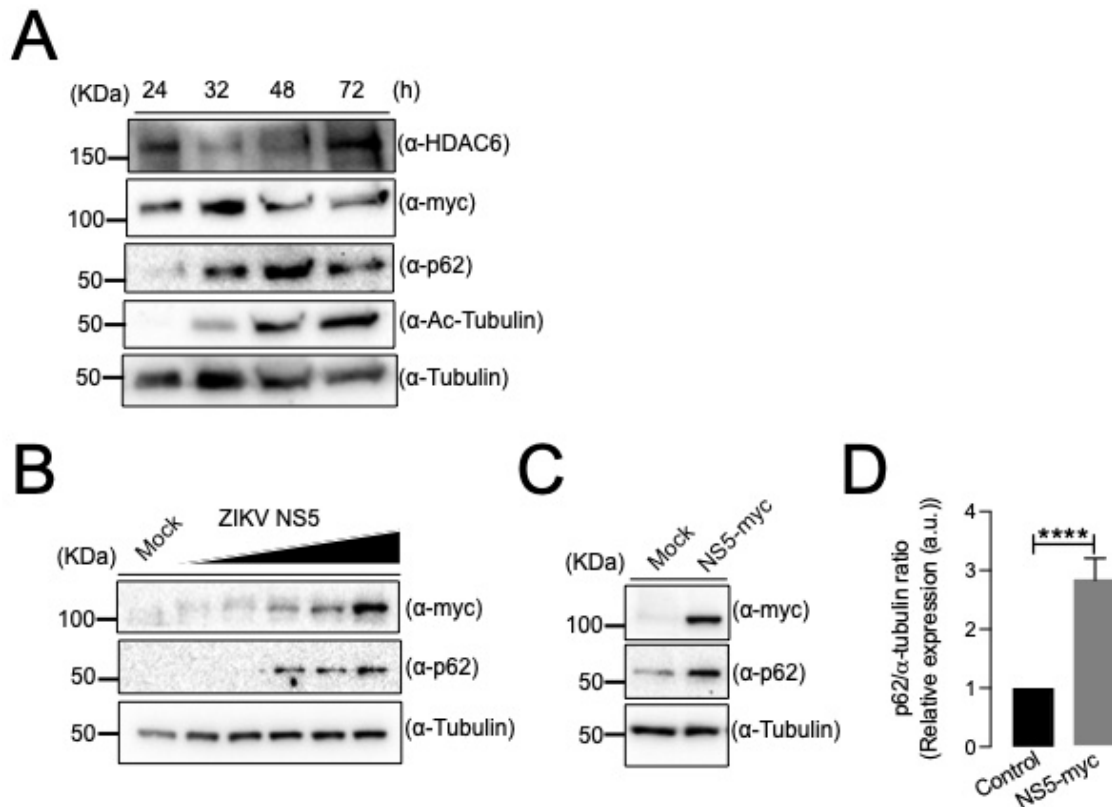


**Figura 37: Incremento del nivel de acetilación en la subunidad  $\alpha$ -tubulina de los MT en células que expresan NS5.** (A) Análisis bioquímico por *western blot* del nivel de expresión de NS5. Se muestra un experimento representativo del lisado total de células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc en una dosis creciente (de 0  $\mu$ g ADNc a 3  $\mu$ g ADNc). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. (B) Histogramas de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* de los experimentos del panel (A), que representan la cantidad de  $\alpha$ -tubulina acetilada en base a la concentración de pNS5-myc transfectado (0  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g y 3  $\mu$ g ADNc). Estos datos fueron normalizados por la proteína control de carga  $\alpha$ -tubulina de cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos independientes. ns significa no significativo, \*\* significa  $p \leq 0,01$  y

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student; ns indica no significativo. pNS5-myc aumenta la concentración de  $\alpha$ -tubulina acetilada en forma dosis respuesta. **(C)** Análisis de *western blot* representativo del lisado total de células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc en una dosis creciente (desde 0  $\mu$ g ADNc hasta 3  $\mu$ g ADNc) tratadas con dos inhibidores diferentes, tubacina (1  $\mu$ M) y A-485 (3  $\mu$ M), o con el vehículo de los fármacos DMSO como control. Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(D)** Gráfico lineal de la intensidad de las bandas de *western blot* de los experimentos del panel **(C)**, representando la cantidad de  $\alpha$ -tubulina acetilada normalizada por la  $\alpha$ -tubulina total de cada experimento. Los datos son la media de 3 experimentos independientes. Comparado con el control DMSO (línea negra), la adición de tubacina (línea verde) y A-485 (línea rosa) evitó el incremento de acetilación de  $\alpha$ -tubulina causado por pNS5-myc. **(E)** *Western blot* del lisado total (parte inferior, Input) y del lisado de coimmunoprecipitación (parte superior, IP) de células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y HA-wt-HDAC6 (1,5  $\mu$ g ADNc). El coimmunoprecipitado se realizó con el anticuerpo  $\alpha$ -myc. NS5 interactúa con HDAC6. **(F)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y wt-HDAC6-dsRed (2,5  $\mu$ g ADNc). 48 horas post transfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario A488  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. NS5 colocaliza con HDAC6 en estructuras citosólicas tipo agrosoma.

Como HDAC6 es una desacetilasa citoplasmática única capaz de interactuar con la ubiquitina y regular la formación de agrosomas y la viabilidad celular en respuesta al estrés por proteínas mal plegadas (Kawaguchi et al., 2003), se quiso probar si las células transfectadas con el plásmido pNS5-myc, para expresar NS5 que atenúa la actividad desacetilasa de HDAC6, no son capaces de eliminar los agregados de proteínas mal plegadas. HDAC6 en condiciones naturales interactúa con p62/SQSTM1 (“*sequestosome 1*”) uniendo agregados de proteínas ubiquitinadas al autofagosoma con el fin de promover su eliminación. En este proceso p62 también es degradado por la autofagia mediada por HDAC6 (Bjørkøy et al., 2006; Pankiv et al., 2007; Valera et al., 2015; Yan et al., 2019). Por ello, se analizó la cantidad de p62, marcador del proceso de la autofagia, en dichas células (Figura 38B y 38C). NS5 facilitó la acumulación de p62 en comparación con las células control (Figura 39D). De hecho, la capacidad de “*turnover*” de las proteínas poliubiquitinadas se midió utilizando un plásmido que codifica Ub-GFP (Figura 42). Tras 48 horas de la transfección, se pudo observar a través de microscopía de epifluorescencia la acumulación de proteínas ubiquitinadas en forma de agregados en células que expresan NS5 frente al control, lo que muestra un fallo en la degradación de estas proteínas mal plegadas en el citoplasma en comparación con las que no

expresaron la proteína viral. Es decir, NS5 actúa no solo sobre la capacidad enzimática de HDAC6 sino también está involucrada en el manejo correcto de los productos ubiquitinados, que vía HDAC6, involucraría presumiblemente a la formación de agresomas.



**Figura 38: NS5 estabiliza los niveles de expresión de la proteína p62.** **(A)** Análisis de *western blot* del lisado a diferentes tiempos (24, 32, 48 y 72 horas) de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5 µg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. Se observó la expresión de NS5 y su efecto sobre la estabilidad de MT y el flujo autofágico aproximadamente tras 48 horas postransfección, la cual corresponde con una discreta “*down-regulation*” de HDAC6 y con un incremento de la acetilación de α-tubulina y p62. **(B)** y **(C)** *Western blot* representativo del lisado total de células HEK-293T transfectadas con dosis creciente de pNS5-myc (0 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg y 3 µg) **(B)**, o con una única concentración (1,5 µg ADNc) **(C)**. **(D)** Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* de los experimentos del panel **(C)**, representando la cantidad de p62 que se acumula en las células control (barra negra) y en células que sobreexpresan NS5-myc (barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga α-tubulina de cada experimento. Los valores son la media ± S.E.M. de 10 experimentos independientes. \*\*\*\* significa  $p \leq 0,0001$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student. NS5 promueve la acumulación de la proteína celular p62.

Estos resultados definen a NS5 como un modificador de las principales funciones de HDAC6, indicando un efecto potente sobre la actividad de HDAC6 en las células infectadas por ZIKV.

### **4.9. Estudio de la asociación de HDAC6 con la proteína NS5 del ZIKV.**

HDAC6 interacciona con diversas proteínas en el citoplasma. Algunas de estas proteínas pueden ser desacetiladas mediante la actividad desacetilasa de HDAC6, y otras pueden afectar en las funciones de HDAC6 al modular su actividad catalítica o su capacidad de unión a ubiquitinas. Para aclarar si NS5 del ZIKV, a pesar de su ubicación nuclear mayoritaria, regula la actividad enzimática de HDAC6 y la vía de agresoma-autofagia mediante la formación de un complejo, se estudió la posibilidad de que HDAC6 se una a la ARN polimerasa viral, NS5. Con dicho fin, se realizaron experimentos de CoIP en células HEK-293T transfectadas con NS5-myc y HA-wt-HDAC6. HDAC6 coimmunoprecipitó con NS5-myc (**Figura 37E**), quizá a través de una interacción directa o siendo parte de un complejo de proteínas. A continuación, se examinó la localización subcelular de HDAC6 y NS5 mediante microscopía de epifluorescencia. Los plásmidos pNS5-myc y wt-HDAC6-dsRed se cotransfectaron en células HEK-293T, y las proteínas codificantes asociadas que se expresan se inmunomarcaron utilizando un anticuerpo específico del “tag” de NS5 myc como se ha descrito anteriormente en el [apartado 3.12](#) de “Material y Métodos”. Los estudios de microscopía revelaron que NS5, expresado ectópicamente, apenas se distribuía en el núcleo, como se muestra en la **Figura 35D**. HDAC6 afectó en la apariencia de NS5 con una disminución drástica en la intensidad de la fluorescencia (20,9 a.u. frente a 42,4 a.u.) (**Figuras 39E y 39F**), con un cambio en el patrón de estructuras nucleares (**Figura 39G**) y dirigiendo su ubicación hacia depósitos citosólicos donde colocalizó con HDAC6. NS5-myc y wt-HDAC6-DsRed sobreexpresados codistribuyeron solo en un bajo porcentaje de células (17,85%) formando estructuras citosólicas (**Figura 37F**), que siendo agregados positivos de Ub-GFP (**Figura 42**), es decir, marcadas por la ubiquitinación (seguido por la sobreexpresión de Ub-GFP fluorescente), sugieren la acumulación en el agresoma, que no se encontraron en las células control sin HDAC6.

---

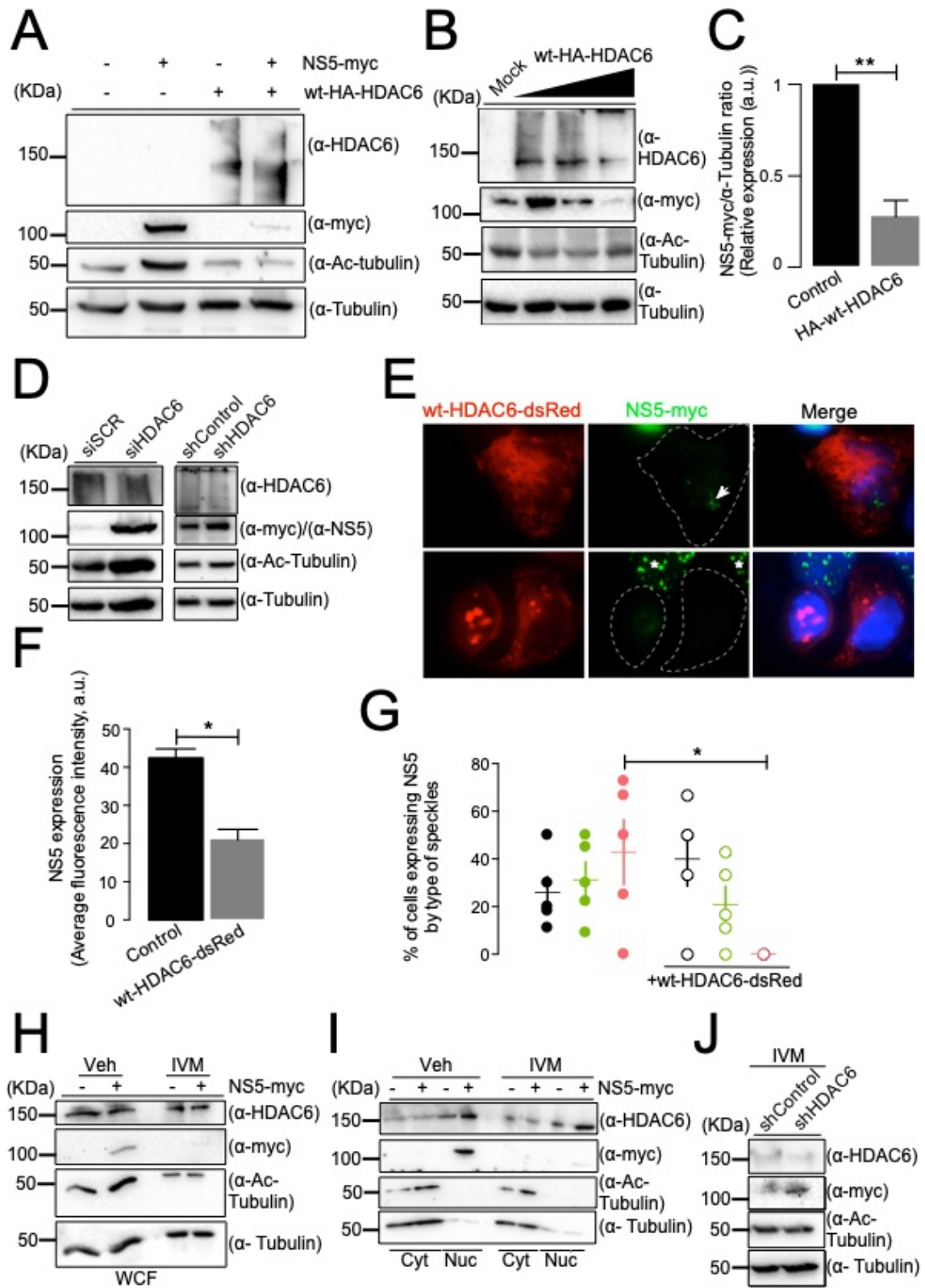
Estos datos muestran que NS5 del ZIKV ejerce una presión sobre las funciones de HDAC6, mostrando un nuevo mecanismo de regulación a través de una interacción. Así, NS5 coinmunoprecipitó y codistribuyó con HDAC6. Por otro lado, nuestros datos indican que la sobreexpresión de HDAC6 representó una amenaza para NS5, lo que podría indicar que es una diana del ciclo de vida del virus. En resumen, se observa una acción bidireccional entre el virus (pérdida de función de HDAC6) y célula (cambio en la expresión de NS5). Esto sugiere un mecanismo de regulación de la infección por ZIKV mediado por HDAC6, y donde NS5 intentaría evitaría la restricción citosólica que ejerce HDAC6 sobre NS5.

#### **4.10. Estudio del efecto de HDAC6 sobre la estabilidad de la proteína viral NS5.**

Ya se ha demostrado anteriormente la capacidad de HDAC6 de promover la degradación de proteínas virales (Valera et al., 2015; Marrero-Hernández et al., 2019), y observando los resultados anteriores se quiso comprobar si HDAC6 ejerce una presión degradativa sobre NS5. Para ello, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pNS5-myc y HA-wt-HDAC6, y se observó cómo con la sobreexpresión de HA-wt-HDAC6 los niveles de expresión de NS5 se ve afectada (Figura 39A). HDAC6 reduce los niveles de expresión de la proteína NS5 a menos de la mitad de los niveles detectados en la condición control (Figura 39C), y de una manera dosis dependiente de los niveles de expresión de HDAC6 (Figura 39B). Este efecto también se evidenció a nivel de célula única, mediante la detección de NS5 y la cuantificación de la media de la intensidad de fluorescencia y distribución del inmunomarcaje de la proteína NS5 por microscopía de epifluorescencia. La sobreexpresión del constructo wt-HDAC6-dsRed eliminó la localización nuclear de NS5 en un 48,2% de las células (Figura 39E), y forzó un cambio de patrón estructural que pasó de ser mayoritariamente de tipo iii a tipo i y ii (29,6% y 22,2%, respectivamente) (Figura 39G). Esto es indicativo de la degradación de la proteína NS5 por HDAC6, que se ve potenciada al impedir la entrada al núcleo de NS5 a través del tratamiento con ivermectina, inhibidor de la  $\alpha/\beta$ -importina (Wagstaff et al., 2012), promoviendo así su reconocimiento y degradación por la proteína celular citoplasmática HDAC6 (Figura 39H y 39I). Estos datos y mecanismo de acción de HDAC6



sobre NS5 se corroboran tras la recuperación de NS5 al silenciar HDAC6 por interferencia del ARNm (Figura 39D y 39J).





**Figura 39: HDAC6 promueve la degradación de NS5.** **(A)** Análisis de *western blot* representativo del lisado de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y HA-wt-HDAC6 (1,5  $\mu$ g ADNc). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(B)** *Western blot* representativo de 2 experimentos independientes del efecto dosis creciente de HA-wt-HDAC6 (0  $\mu$ g, 0,25  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g y 1  $\mu$ g) sobre pNS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(C)** Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* del experimento del panel **(A)**, representando la cantidad de NS5-myc que se acumula en las células control (barra negra) y en células que sobreexpresan HA-wt-HDAC6 (barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga  $\alpha$ -tubulina de cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de 4 experimentos independientes. \*\* significa  $p \leq 0,01$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student. HA-wt-HDAC6 promueve la disminución de la concentración de pNS5-myc a menos de la mitad en comparación con la condición control. **(D)** *Western blot* representativo de 2 experimentos independientes del silenciamiento de HDAC6 en células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc). El silenciamiento se consiguió mediante la aplicación de dos técnicas, con la utilización de oligonucleótidos cortos de interferencia del ARNm (siRNA oligos) específicos contra el ARNm de HDAC6 (izquierda) y con la transfección de “*short hairpin RNA*” específico de HDAC6 (derecha) (1,5  $\mu$ g ADNc). Se utilizó la proteína  $\alpha$ -tubulina como proteína control de la carga proteica total. En la condición control, pNS5-myc se encuentra a baja concentración en la célula, mientras que al silenciar HDAC6, pNS5-myc aumenta su concentración. **(E)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y wt-HDAC6-dsRed (2,5  $\mu$ g ADNc). 48 horas post transfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario A488  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. En gran parte de las células que expresaban wt-HDAC6-dsRed, no se observaba la presencia de NS5-myc. **(F)** Histograma del promedio de la intensidad de fluorescencia de NS5-myc en la condición control (barra negra) y bajo la sobreexpresión de wt-HDAC6-dsRed (barra gris), representadas como la media  $\pm$  S.E.M de 54 células cuantificadas de 8 imágenes pertenecientes a 2 experimentos independientes. wt-HDAC6-dsRed produce una disminución de la intensidad de fluorescencia de NS5-myc **(G)** Porcentaje del tipo de estructura que forma NS5 (tipo i-puntos negros, tipo ii-puntos verdes y tipo iii-puntos rosas) en ausencia de wt-HDAC6-dsRed (izquierda) y en presencia de dicho plásmido (derecha) representadas como la media  $\pm$  S.E.M de 54 células de 2 experimentos independientes. \* significa  $p \leq 0,05$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student. wt-HDAC6-dsRed produce un cambio en la estructura de NS5-myc. **(H)** e **(I)** *Western blot* del lisado total **(H)** y del fraccionamiento **(I)** de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y tratadas con ivermectina (20  $\mu$ M) o con su vehículo DMSO como control. Se utilizó la proteína  $\alpha$ -tubulina como proteína control de la carga proteica total. **(J)** *Western blot* representativo de 2 experimentos independientes del lisado del silenciamiento de HDAC6 en células HEK-293T que sobreexpresan NS5-myc (1,5  $\mu$ g ADNc) y shRNA (1,5  $\mu$ g ADNc) tratadas con ivermectina (20  $\mu$ M). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. El impedimento de la entrada al núcleo de NS5, inducido por el tratamiento con IVM, promueve su degradación, que a su vez se recupera al silenciar HDAC6.

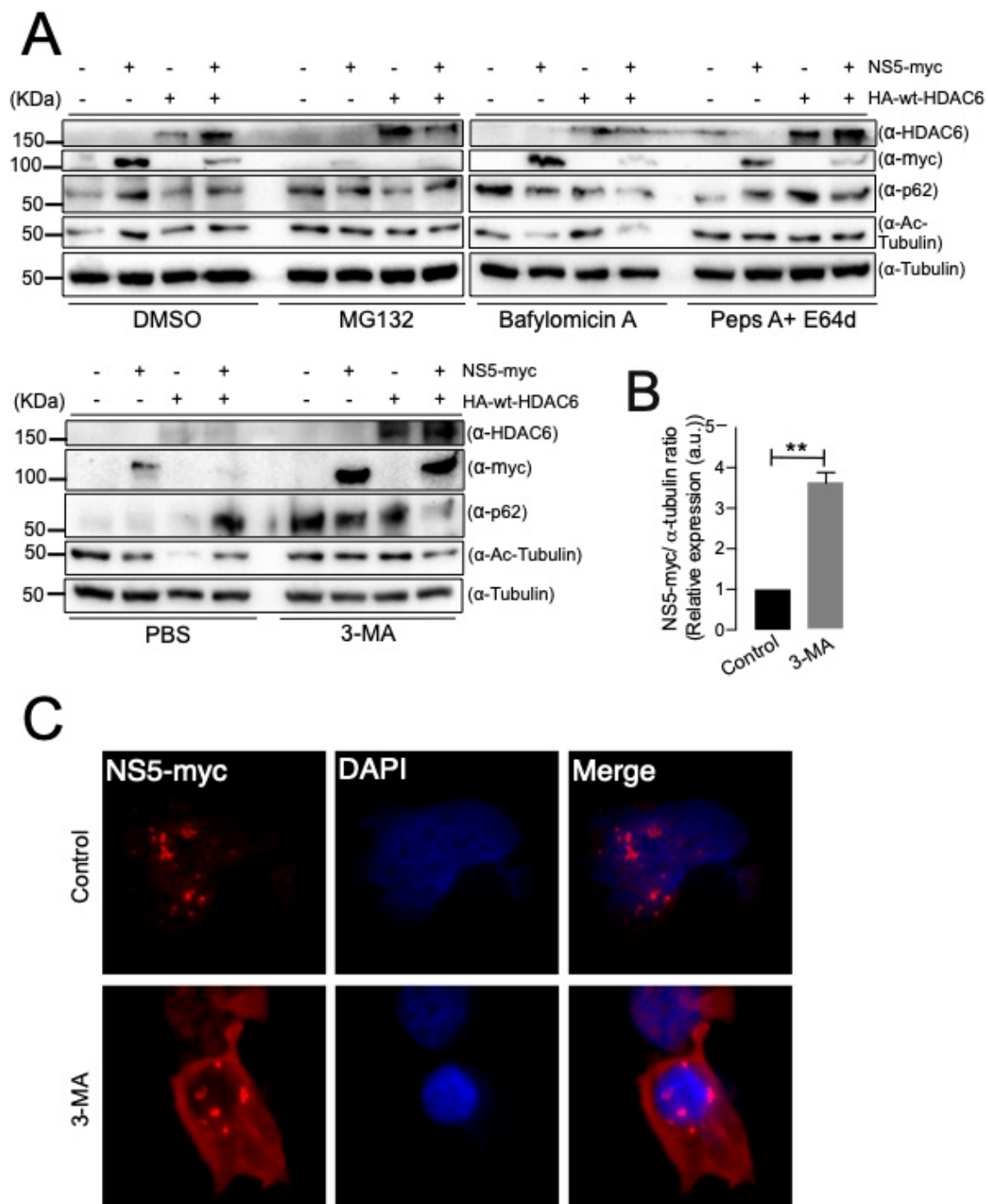
En definitiva, los resultados obtenidos mostraron la capacidad de HDAC6 de promover la degradación de la proteína viral NS5 y controlar su organización estructural.

#### 4.11. Estudio de la vía por la que HDAC6 induce la degradación de NS5 del ZIKV.

En un estudio reciente, también se mostró una degradación de NS5 al impedir su entrada al núcleo con el tratamiento con ivermectina y 4-HPR, inhibidores de la  $\alpha/\beta$ -importina, caracterizando al citoplasma como un “ambiente negativo” para la proteína viral; pero no se identificó el agente causal de dicho proceso (Ji & Luo, 2020). Este efecto ha sido comprobado en nuestra investigación, y además hemos descrito a HDAC6 como responsable de la degradación de NS5, ya que al silenciar HDAC6 mediante interferencia específica del ARNm de HDAC6, se produce una recuperación en la concentración de NS5 y en la organización estructural nuclear.

Una vez demostrado el efecto desestabilizador de NS5 inducido por HDAC6, se exploró cómo mecanísticamente HDAC6 podría ejercer tal efecto. Para ello, células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos pNS5-myc y HA-wt-HDAC6, y 48 horas más tarde se trataron con inhibidores de diferentes vías de proteólisis celular y sus respectivos vehículos como controles. Se utilizaron el MG132 (*carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*) (20 $\mu$ M), un péptido aldehído que bloquea eficazmente la actividad proteolítica del complejo 26S del proteasoma (National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2023b); la Bafilomicina A1 (100nM), un inhibidor específico y reversible de la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (V-ATPase) que interfiere en el proceso de acidificación lisosomal (NCBI, 2023d); E-64d junto a PepsA (10 $\mu$ g/mL), inhibidores irreversibles de cisteína proteasas de amplio espectro y de aspártico proteasas respectivamente (NCBI, 2023a; NCBI, 2023c); o 3-MA (3-metiladenina) (5mM), un inhibidor de la formación de agresomas en la ruta de degradación autofágica de HDAC6 (NCBI, 2023e). Mediante análisis bioquímico de la expresión de NS5 por *western blot*, bajo los tratamientos con MG132, Bafilomicina A1 o la combinación de E-64d/PepsA no se observaron cambios respecto a los respectivos controles (Figura 40A). Mientras, al tratar las células con el inhibidor 3-MA se evitó la degradación de NS5 inducida por la sobreexpresión de HDAC6, mostrando una recuperación de ~3 aumentos (Figura 40B) en su cantidad normalizada por la carga de tubulina. Esta resistencia a la degradación de NS5, tras el bloqueo de la formación de agresomas, se pudo observar también a través del análisis por microscopía de

epifluorescencia, donde en comparación con la condición control, en la que se encontró a NS5 ubicado exclusivamente en el núcleo formando sus estructuras características, se pudo evidenciar distribuido en el compartimento citoplasmático bajo el efecto del inhibidor de la ruta autofágica 3-MA (**Figura 40C**).

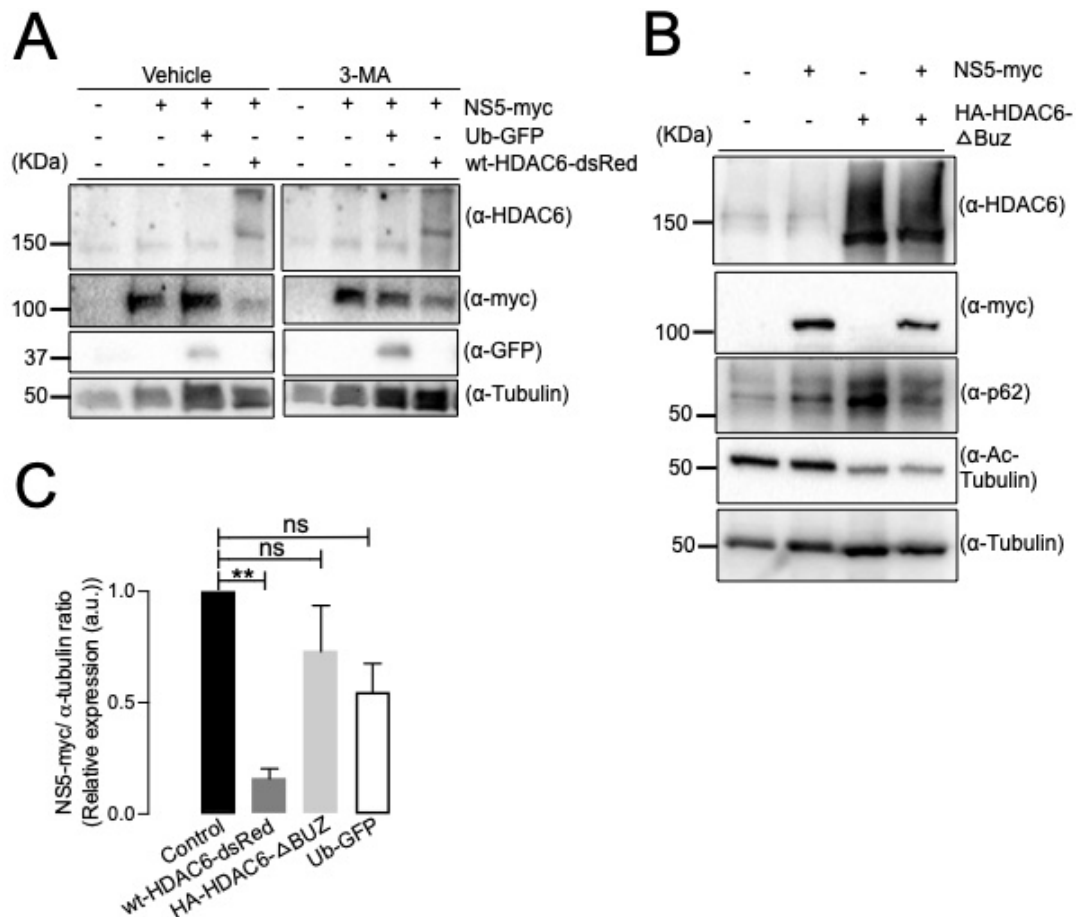


**Figura 40:** La degradación de NS5 se evita por acción de inhibidores de la proteólisis por la vía de la autofagia. **(A)** Western blot del lisado de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5µg ADNc) y HA-wt-HDAC6 (1,5µg ADNc), sometidas a diversos tratamientos inhibidores de las diferentes rutas de degradación, MG132 (20µM), Bafilomicina A1 (100nM), PepsA y E-64d (10µg/mL) y 3-MA (5mM) o sus respectivos vehículos DMSO y PBS como control. Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(B)** Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de western blot de los experimentos del panel **(A)**, representando la cantidad de NS5-myc que se acumula en las células control (barra negra) y las células bajo tratamiento de 3-MA (5mM) (barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga  $\alpha$ -tubulina de cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos independientes. \*\* significa  $p \leq 0,01$ , el valor de p es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica t de Student.

---

El tratamiento de las células con 3-MA genera una acumulación de NS5-myc aproximadamente 3 mayor en comparación con la condición control. **(C)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (2,5µg ADNc) tratadas con 3-MA (parte inferior) o PBS como control (parte superior). 48 horas post transfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario, específico de especie, A568  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. Bajo el tratamiento del inhibidor de la ruta autofágica 3-MA, NS5-myc mantiene su patrón estructural característico, e incluso se puede encontrar a nivel citoplasmático.

A su vez, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pNS5-myc junto a otro codificante de la proteína ubiquitina fusionada a la “Green Fluorescent Protein” (GFP), ubiquitina-GFP (Ub-GFP). Este constructo Ub-GFP permite la monitorización y la promoción del proceso de ubiquitinación de todas las proteínas que sufren esta modificación postraduccional, y potencialmente de la proteína viral NS5, que sufre degradación por la enzima proautofágica HDAC6. Considerando, además, como evidencia la recuperación de la degradación observada de NS5 por el bloqueo de la autofagia con 3-MA, la intervención de la ubiquitinación de NS5 mediante Ub-GFP favorece su eliminación. Proceso, una vez más, inhibido por el tratamiento con 3-MA (**Figura 41A y 41C**). Estos datos sugieren que NS5 se podría ubiquitinar y proponen que HDAC6 pudiera interactuar con NS5 promoviendo su proteólisis por la vía autofágica a través del dominio de unión a ubiquitina (BUZ), localizado en su extremo C-terminal. De hecho, al cotransfectar NS5 en células HEK-293T junto con el plásmido de un mutante de HDAC6 con su dominio BUZ deletado (HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ), que lo inhabilita de su función promotora de la degradación autofágica de proteínas ubiquitinadas (Valera et al., 2015), se observó una recuperación de los niveles de expresión de la proteína NS5 en comparación con los bajos niveles de expresión observados en células coexpresando el constructo HDAC6 funcional (“wild type” (wt)) (**Figura 41B y 41C**).

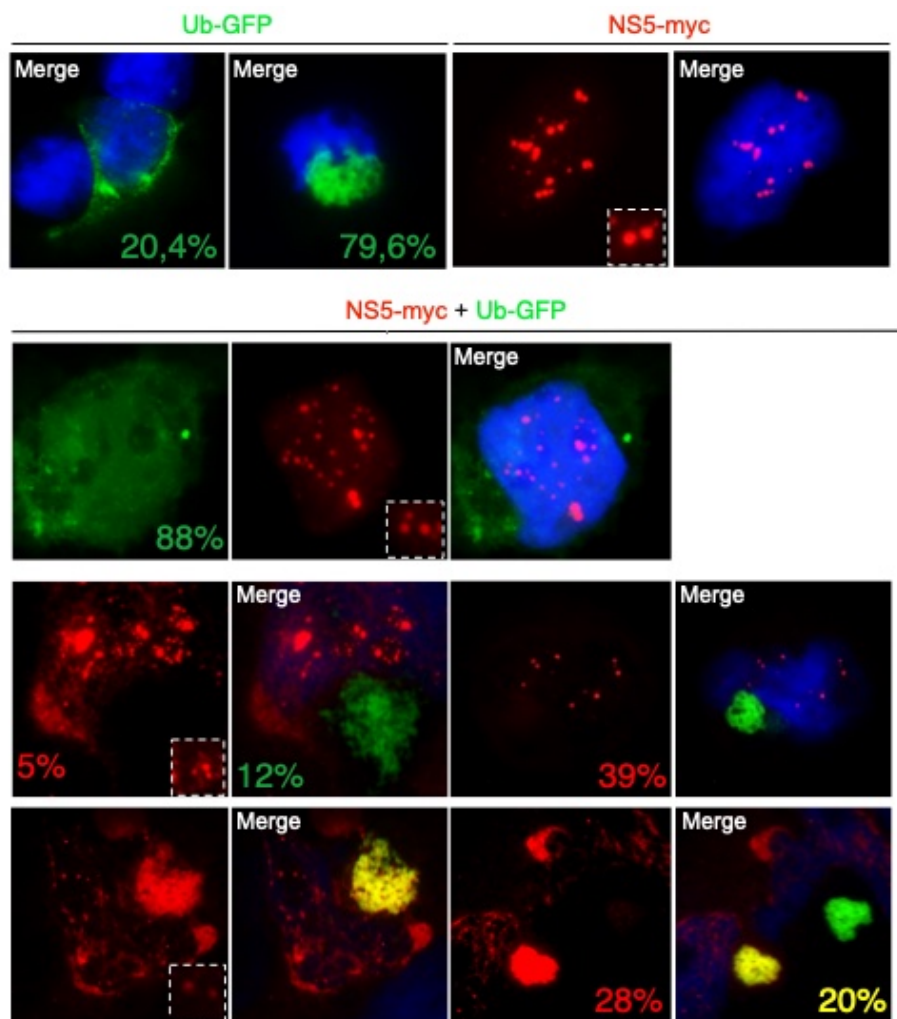


**Figura 41:** La degradación de NS5 ocurre por la vía de la autofagia, de forma HDAC6 dependiente implicando a su dominio BUZ. **(A)** Análisis de *western blot* representativo de 2 experimentos independientes del lisado de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pNS5-myc (1,5μg ADNc), Ub-GFP (0,5μg ADNc) y wt-HDAC6-dsRed (2,5μg ADNc), tratadas con el inhibidor 3-MA (5mM) o con su vehículo PBS como control. Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(B)** *Western blot* representativo de 4 experimentos independientes del lisado de células HEK-293T que sobreexpresan los plásmidos pNS5-myc (1,5μg ADNc) y HA-HDAC6-ΔBUZ (1,5μg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(C)** Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* de los experimentos de los paneles **(A)** y **(B)**, representando la cantidad de NS5-myc que se acumula en la condición control (barra negra) y al sobreexpresar wt-HDAC6-dsRed (barra gris oscuro), HA-HDAC6-ΔBUZ (barra gris claro) o Ub-GFP (barra blanca). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga α-tubulina de cada experimento. Los valores son la media ± S.E.M. \* significa  $p \leq 0,05$  y ns no significativo, el valor de p es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica t de Student. La cotransfección con Ub-GFP promueve la degradación de NS5-myc, que, a su vez, es inhibida por el tratamiento 3-MA. Además, HA-HDAC6-ΔBUZ produce una recuperación de la concentración de pNS5-myc en comparación con la versión “wild-type”.

Por otro lado, se analizó mediante microscopía de epifluorescencia el efecto de la promoción de la degradación autofágica de NS5 por cotransfección con Ub-GFP (**Figura 42**). En un 20% de las células NS5 codistribuyó con Ub-GFP en forma de agregados

proteicos sugerentes a agregados de partículas insolubles de proteínas mal plegadas no proteolizadas que podrían coincidir con los agresomas. No obstante, en la mayoría de las células la intensidad del marcaje fluorescente de NS5 disminuyó drásticamente (28%) acompañado de un cambio de patrón estructural, en comparación con la condición control. En lugar de presentarse mayoritariamente como estructuras de tipo iii, la expresión de Ub-GFP forzó un cambio de proporciones a estructuras de tipo i y ii (39% y 5%, respectivamente), algo muy similar al efecto observado al sobreexpresar HA-wt-HDAC6. Es más, en este caso, se evidenció en un 28% de las células un nuevo tipo de estructura de NS5, excluida del núcleo y en forma de depósitos proteicos alargados ocupando gran parte del citoplasma.





**Figura 42: NS5 colocaliza con Ub-GFP en estructuras citosólicas tipo agresoma.** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (2,5 $\mu$ g ADNc) y Ub-GFP (1 $\mu$ g ADNc). 48 horas post transfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4 $^{\circ}$ C se marcaron con el anticuerpo secundario A568  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. Bajo la condición control (parte superior), Ub-GFP se encuentra formando agregados en un 79,6% y disperso en el citoplasma en un 20,4%, mientras que, en conjunto con NS5-myc (parte inferior), cambia a encontrarse mayoritariamente disperso (88%). Por otro lado, Ub-GFP y NS5-myc colocalizaron en un 20% en agregados citoplasmáticos tipo agresoma. La intensidad de la fluorescencia de NS5-myc disminuyó en un 28% en presencia de Ub-GFP y cambió su patrón característico de organización estructural de tipo iii (condición control, parte superior) a tipo i y ii (39% y 5% respectivamente), y se visualizó un nuevo patrón no punteado de expresión para NS5 (28%).

Estos datos definieron la vía autofágica como la ruta responsable de la degradación y cambio de patrón de organización estructural de NS5.

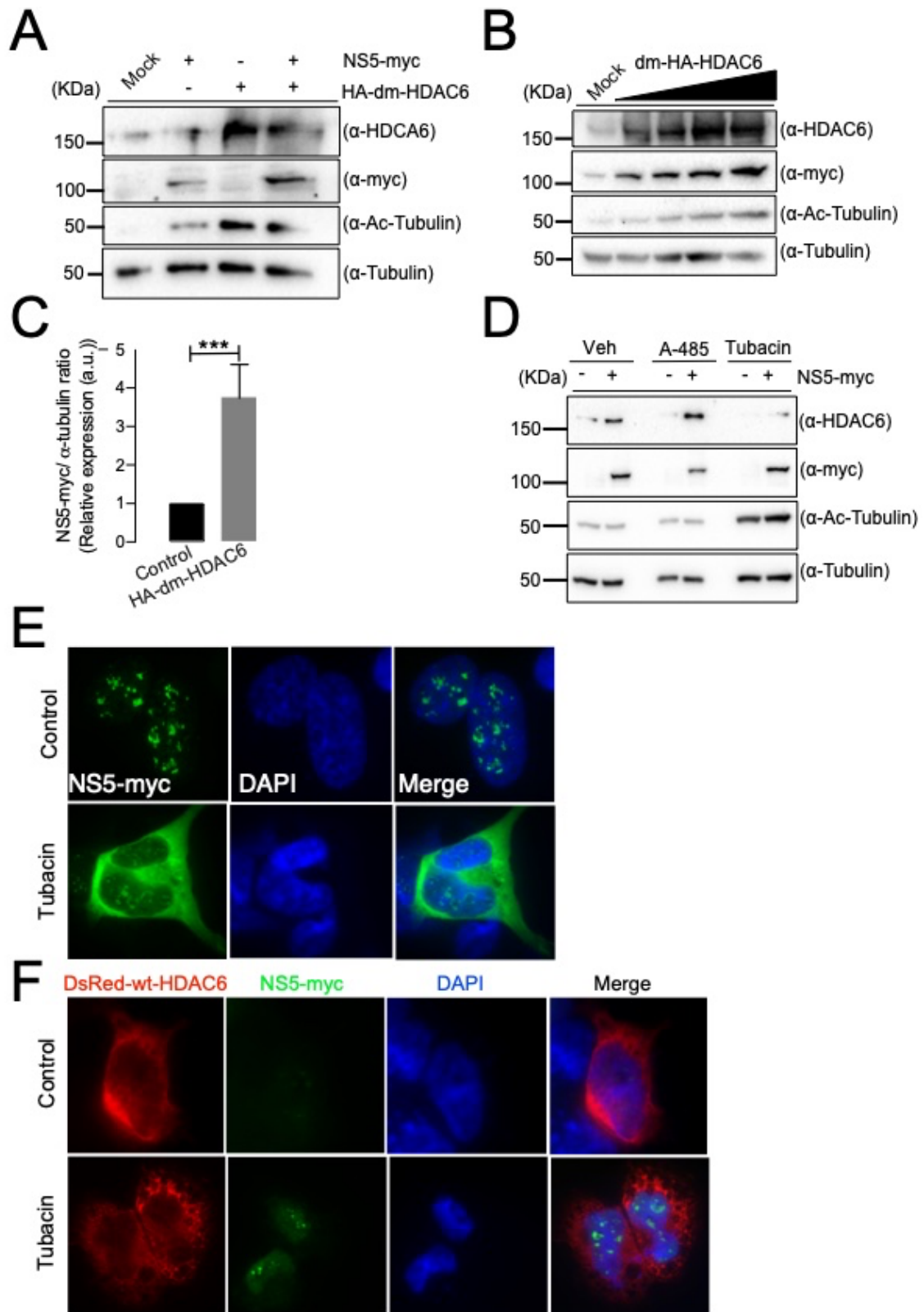


---

#### 4.12. Estudio de la implicación de la actividad desacetilasa de HDAC6 en la degradación autofágica de NS5.

HDAC6 es una enzima con actividad desacetiladora de sustratos acetilados en residuos de K, que se caracteriza y diferencia de otras desacetilasas por poseer dos dominios catalíticos desacetilasas (DD1 y DD2) en lugar de uno (Y. Zhang et al., 2006; Zou et al., 2006). Asimismo, HDAC6 posee un dominio con dedo de zinc de unión a ubiquitina (BUZ) (Pai et al., 2007; Ouyang et al., 2012). Tanto los dominios desacetilasas como el dominio BUZ son necesarios en el transporte por parte de HDAC6 de las proteínas ubiquitinadas hacia el agrosoma y su posterior degradación por la ruta de la autofagia (Kopito, 2003). Por tanto, a continuación, nos planteamos estudiar la implicación funcional de la actividad desacetilasa de HDAC6 en la degradación de la replicasa viral NS5 .

Para esclarecer si la participación de la capacidad desacetiladora de HDAC6 contribuye a la inestabilidad bajo la presión de la sobreexpresión de HDAC6, se utilizó un doble mutante de HDAC6 (HA-dm-HDAC6), cuyos dominios catalíticos DD1 y DD2 han sido mutados, anulando por completo su actividad catalítica (Serrador et al., 2004; Valera et al., 2015). La sobreexpresión del HA-dm-HDAC6 resultó en un aumento de ~3 veces en los niveles de expresión de NS5 en comparación con la condición control (Figura 43A y 43C). Este incremento se produjo de forma dosis respuesta dependiente a la cantidad de HA-dm-HDAC6 transfectado y correspondientemente expresado en las células de estudio (Figura 43B). Además, al tratar las células HEK-293T que sobreexpresan pNS5-myc con tubacina, un inhibidor específico de la actividad deacetilasa de HDAC6 (Haggarty et al., 2003; Lu et al., 2017; Depetter et al., 2019), se observó la inhibición de la degradación de NS5, que por el contrario no se observó con el tratamiento de A-485, un inhibidor de la acetiltransferasa p300 que, entre otras funciones, puede acetilar HDAC6 inhibiendo su actividad (K. Zheng et al., 2017) (Figura 43D). Por lo que al inhibir la actividad desacetilasa de HDAC6 se favoreció la acumulación de NS5 y al potenciar dicha actividad se facilitó la degradación autofágica de NS5.



**Figura 43:** La actividad catalítica desacetilasa de HDAC6 es clave en la degradación autofágica de NS5 del ZIKV. **(A)** Análisis de *western blot* representativo del lisado de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5µg ADNc) y el mutante HA-dm-HDAC6 (1,5µg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(B)** *Western blot* representativo de 3 experimentos independientes del efecto dosis creciente de HA-dm-HDAC6 (0µg, 0,5µg, 1µg, 1,5µg y 2µg) sobre NS5-myc (1,5µg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. **(C)**

Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* del experimento del panel (A), representando los niveles de proteína NS5-myc que se acumula en las células control (barra negra) y en células que sobreexpresan HA-dm-HDAC6 (barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga  $\alpha$ -tubulina de cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de 9 experimentos independientes. \*\*\* significa  $p \leq 0,001$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student. El mutante de HDAC6, HA-dm-HDAC6, no degrada NS5, observándose la acumulación de NS5-myc. (D) *Western blot* representativo de 2 experimentos independientes del lisado de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5 $\mu$ g ADNc) tratadas con los inhibidores A-485 (3 $\mu$ M) y tubacina (1 $\mu$ M). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. El inhibidor de p300 A-485 favorece la degradación de NS5-myc, mientras que la tubacina la inhibe, observándose un aumento en los niveles de expresión de NS5. (E) Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5 $\mu$ g ADNc) y tratadas con tubacina (1 $\mu$ M) (parte inferior) o DMSO (parte superior) como control. 48 horas posttransfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario A-488  $\alpha$ -mouse. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. Bajo el tratamiento con tubacina, NS5 mantiene sus patrones estructurales característicos, e incluso se puede encontrar también en el citoplasma. (F) Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5-myc (1,5 $\mu$ g ADNc) y wt-HDAC6-dsRed (2,5 $\mu$ g ADNc) y tratadas con tubacina (1 $\mu$ M) (parte inferior) o DMSO (parte superior) como control. 48 horas post transfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario A488  $\alpha$ -mouse. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. El tratamiento de las células con el inhibidor de la actividad desacetilasa de HDAC6, tubacina, recupera el patrón punteado de expresión característico de NS5. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging).

Asimismo, y como mencionamos previamente, el HDAC6 carente de su dominio de unión a ubiquitina (HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ) previno la degradación de NS5 (Figura 41B y 41C). Por lo que, tanto los dominios desacetilasas como el dominio de unión a ubiquitina son importantes en la degradación de NS5 por parte de HDAC6, jugando un papel clave la actividad catalítica desacetilasa.

#### **4.13. Estudio de la implicación funcional de la actividad desacetilasa de HDAC6 en la distribución nuclear de NS5.**

NS5 se encuentra en condiciones naturales en el núcleo, como se visualiza en nuestro modelo celular de estudio. Los resultados indican que al evitar el tráfico de NS5 a través de las importinas (transporte promovido por sus señales de importación de entrada al núcleo), por bloqueo farmacológico, transporte promovido por sus señales

de importación de entrada al núcleo, se favoreció su degradación (**Figura 39H y 39I**). Como se ha descrito en los resultados anteriores, al inhibir la actividad desacetilasa de HDAC6 inducimos la estabilidad de NS5, por lo que se analizó si tales mutaciones favorecían la acumulación de NS5 en el núcleo u otros compartimentos subcelulares donde bajo la expresión constitutiva de HDAC6 podría ejercer un papel desestabilizador y consecuentemente repercutir en su abundancia. Para ello, mediante microscopía de epifluorescencia, se estudiaron células HEK-293T tratadas con tubacina y que sobreexpresaban el plásmido pNS5-myc. Como resultado del tratamiento con tubacina, NS5 volvió a recuperar su estructura nuclear mayoritaria (tipo iii) e incluso se observó también su distribución en el citoplasma, como ocurría con el tratamiento 3-MA, inhibidor de la degradación autofágica de la proteína viral NS5 (**Figura 43E**). Además, aunque se sobreexpresó el constructo funcional (wt) de HDAC6, NS5 se siguió encontrando en los puntos nucleares característicos en presencia de tubacina, inhibidor de la función desacetilasa de HDAC6, clave para la degradación autofágica de NS5 (**Figura 43F**).

De modo, que con estos datos, se puede sugerir que la acetilación o la prevención de la desacetilación llevada a cabo por HDAC6 específicamente, determinan o no la acumulación nuclear y a la estabilidad celular de NS5.

#### **4.14. Estudio del efecto de la proteína viral NS5 en la vía del IFN**

Con los datos anteriormente expuestos, se ha comprobado una relación bidireccional entre la proteína viral de NS5 del ZIKV y la proteína celular HDAC6. Por un lado, HDAC6 promueve la degradación de NS5 y, por otro, NS5 actúa sobre sustratos y/o funciones claves de HDAC6, promoviendo la acetilación de MT y estabilizando el factor autofágico p62.

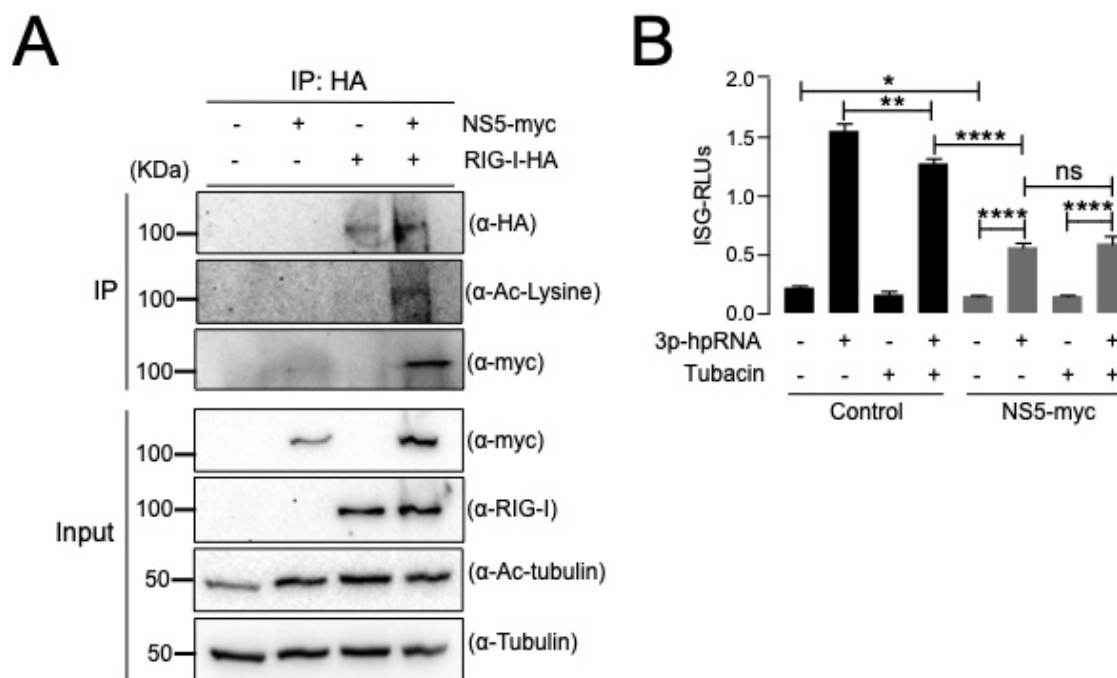
HDAC6, aparte de actuar como factor de restricción sobre proteínas virales, también tiene como sustratos proteínas celulares como la cortactina, Hsp90, Hsc70 y RIG-I, principalmente (Kovacs et al., 2005; X. Zhang et al., 2007; L. Zhang et al., 2015; S. J. Choi et al., 2016). Se ha descrito que HDAC6 desacetila RIG-I activando la respuesta

---

del IFN (S. J. Choi et al., 2016). Por el contrario, la infección por ZIKV, inhibe la respuesta del IFN, lo que permite que el virus alcance órganos y tejidos inmunoprivilegiados, causando su sintomatología característica (Bayer et al., 2016; A. Kumar et al., 2016). Por todo ello, proponemos que NS5 podría promover la acetilación de RIG-I al impedir su desacetilación por parte de HDAC6, o, a su vez, que HDAC6 desacetilando a RIG-I, por un lado, y desestabilizando a NS5, por otra parte, podría asegurar la respuesta INF dependiente frente al virus ZIKV. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de RIG-I (mediante anticuerpo anti-HA, para arrastrar al constructo RIG-I-HA sobreexpresado) en presencia de NS5, en células HEK-293T cotransfectadas con los plásmidos pNS5-myc y RIG-I-HA. El análisis bioquímico por *western blot*, del experimento de inmunoprecipitación de RIG-I en un lisado de estas células, indica que NS5 promovió la acetilación de RIG-I, sin afectar a su nivel de expresión, respecto de la condición control (células que no expresan NS5) (Figura 44A). Asimismo, observamos que NS5 colP con RIG-I, demostrando una interacción entre ambas proteínas (Figura 44BA).

Por otro lado, se transfectaron con el plásmido pNS5-myc células HEK-Lucia™ RIG-I, que expresan de forma estable el gen reportero de luciferasa Lucia que se encuentra bajo control del promotor ISG54 (“*IFN-stimulated gene 54*,” también denominado “*IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2, IFIT2*”) inducible por IFN. Para determinar si NS5 actúa en similitud a la inhibición de la desacetilación de RIG-I por parte de HDAC6, se añadieron condiciones en las que las células fueron tratadas con tubacina. A su vez, la respuesta del IFN fue inducida en la célula a través de 3p-hpRNA, una secuencia de ARN que contiene un extremo 5' trifosfato sin protección y un fragmento de doble cadena que reconoce RIG-I. Los resultados obtenidos mostraron como el tratamiento con tubacina disminuyó la producción de la proteína inducida por el IFN, ISG54. En el caso de pNS5-myc, se observó una disminución mucho mayor, una disminución de aproximadamente la mitad en comparación con la condición control, la cual es prácticamente invariable al tratamiento con tubacina (Figura 44B). Estos datos son indicativos de que NS5 podría estar actuando sobre la vía del IFN, en diferentes pasos de esta, y entre ellos, podría ejercer un efecto mecanísticamente similar al que provoca la inhibición de HDAC6 por la acción de tubacina, inhibiendo así la

desacetilación de RIG-I y su capacidad de activar el estado antivírico celular IFN dependiente.



**Figura 44: NS5 de ZIKV promueve la acetilación de RIG-I inhibiendo la respuesta del IFN. (A)** Western blot del lisado total (parte inferior, Input) y de la coimmunoprecipitación (parte superior, IP) realizada con el anticuerpo  $\alpha$ -HA de células HEK-293T cotransfectadas con pNS5-myc (1,5 $\mu$ g ADNc) y RIG-I-HA (1,5 $\mu$ g ADNc). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. NS5-myc promueve la acetilación de RIG-I-HA. **(B)** Ensayo Luciferasa representativo de células HEK-Lucia<sup>TM</sup> RIG-I transfectadas con pNS5-myc (1,5 $\mu$ g ADNc), cuya vía del interferón ha sido activada mediante 3p-hpRNA o se ha mantenido sin activar como control negativo. Tanto en la condición control como de sobreexpresión de NS5-myc se han tratado las células con tubacina (1 $\mu$ M) o con su vehículo (DMSO). Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de 6 medidas de cada condición. Ns significa no significativo, \* significa  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , el valor de p es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica t de Student. Se han realizado 4 experimentos independientes. NS5-myc provoca una disminución de la respuesta del interferón mucho mayor en comparación con el tratamiento de tubacina.

En consecuencia, de los resultados obtenidos, NS5 y HDAC6 interactuaron entre ellas de forma directa o indirecta mediante la formación de un complejo con otras proteínas, con el fin de “restringir” a la proteína contraria. Así, por un lado, HDAC6 promovió la degradación vía autofágica de la polimerasa viral NS5, gracias a sus dominios deacetilasas y en menor medida a su dominio BUZ, y, por otro lado, NS5 actuó sobre las principales funciones de HDAC6. NS5 perturbó la formación de agregomas, impidiendo la degradación de proteínas mal plegadas, mecanismo relacionado con

---

enfermedades neurológicas. Y también afectó a la desacetilación por parte de HDAC6 de diferentes sustratos como la  $\alpha$ -tubulina acetilada y RIG-I, contribuyendo así en la evasión de la respuesta inmunitaria y favoreciendo el ciclo viral.

#### **4.15. Estudio del efecto protector de la proteína viral NS2B3 frente a la degradación autofágica de NS5 mediada por HDAC6.**

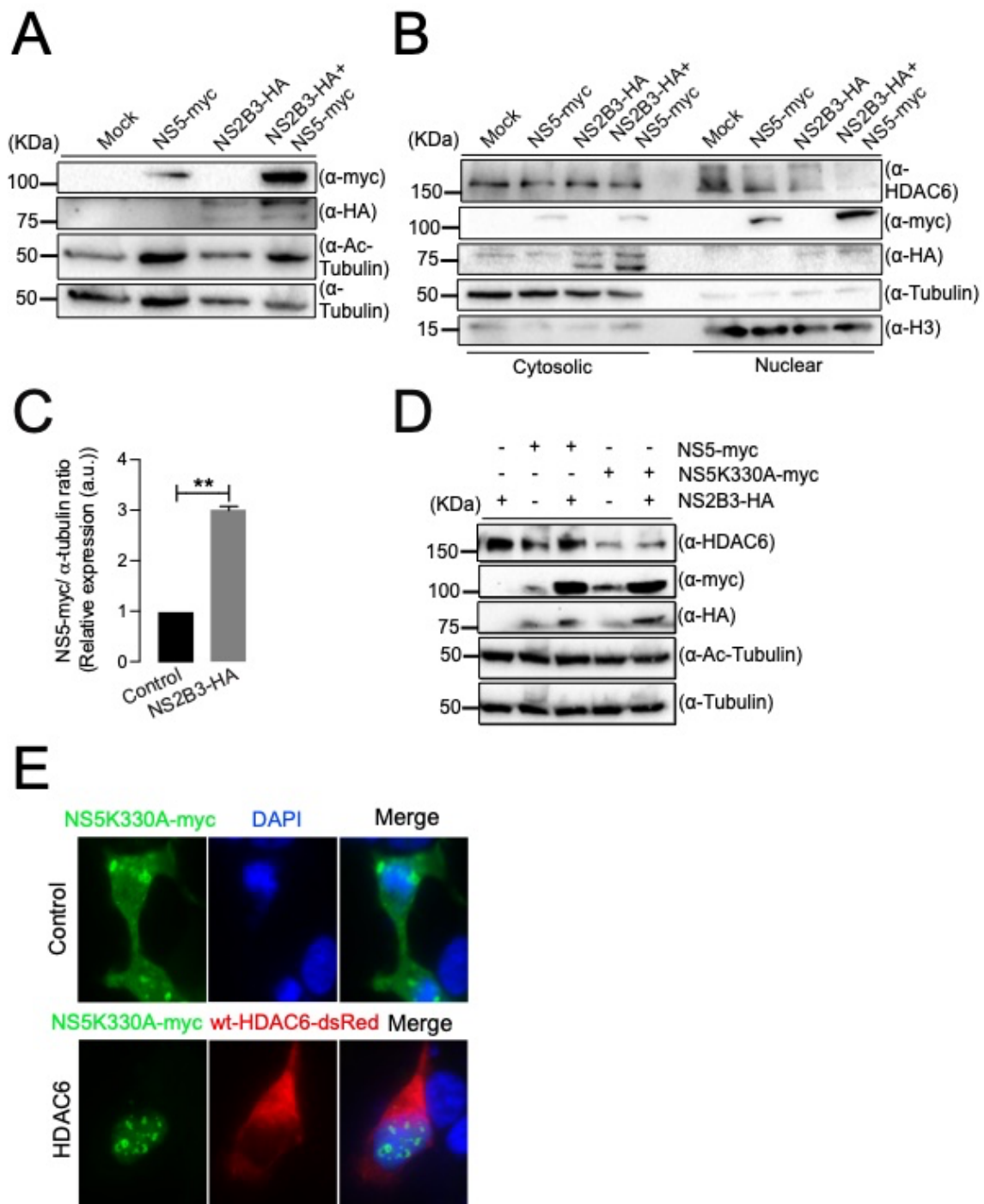
Hasta el momento, en los estudios llevados a cabo, se ha analizado el juego de interacciones de NS5 con HDAC6 y otros sustratos, en células que sobreexpresan NS5 como único factor viral, con tal de decorticar más fácilmente las funciones de NS5. Sin embargo, en diferentes estudios con el virus ZIKV, se ha demostrado que las proteínas virales como NS5 pueden actuar con otras proteínas virales, para evitar factores de restricción o llevar a cabo su función. En concreto, se ha descrito que NS5, a través de su dominio N-terminal, interacciona con el dominio C-terminal de la proteasa viral NS3, siendo el residuo asparagina de la posición 5070 (N570) de NS3 y la lisina de la posición 330 (K330) de NS5 claves en la interacción entre ambas proteínas, y así conseguir una correcta replicación viral (Kapoor et al., 1995; Tay et al., 2016). Esta asociación podría ser importante para asegurar una correcta replicación viral. Además, se ha descrito que la región de interacción de NS5 con NS3 es la misma con la que NS5 interacciona con la importina  $\beta$  (Johansson et al., 2001). Por lo que, es razonable estipular que NS3, o, mejor dicho, su forma activa en el complejo proteasa viral formado entre el cofactor NS2B y la proteasa NS3, NS2B3 (Benarroch et al., 2004; H. Lee et al., 2017; Majerová et al., 2019; Xing et al., 2020; Knyazhanskaya et al., 2021), podría influir en el tráfico de NS5 al núcleo y, por tanto, en su estabilidad por la prevención de la exposición citosólica al HDAC6. Para confirmarlo, se realizó un fraccionamiento subcelular de las HEK-293T transfectadas con pNS5-myc y NS2B3-HA, con posterior análisis bioquímico por *western blot*, observándose la acumulación en el núcleo de NS5 en presencia de NS2B3 (Figura 45B) y un aumento de ~2 veces en los niveles de expresión de la proteína viral NS5 (Figura 45A y 45C).

Como se ha comentado anteriormente, la lisina de la posición 330 de NS5 es clave en la interacción de esta polimerasa con el complejo proteasa viral NS2B3 (Tay et al.,



2016). Esto nos llevó a generar un mutante puntual de NS5 en esta posición, cambiando a alanina (NS5K330A), para así estudiar el efecto protector de la proteasa NS2B3 frente a la acción por HDAC6. El análisis bioquímico del nivel de expresión de las proteínas virales mediante *western blot*, mostró como la mutación de la lisina de la posición 330, por sí sola, protegió a NS5 de la degradación, sin la necesidad de la presencia del complejo proteasa viral NS2B3 (**Figura 45D**). Tal efecto de protección también se puso de manifiesto en estudios de microscopía de epifluorescencia. La versión mutante de NS5 (NS5K330A) formó el patrón estructural nuclear característico de la versión “*wild type*” de NS5, y también se expresó notablemente en el citoplasma, lo que sugiere que esta K en la posición 330 de NS5 sería uno de los residuos clave para que HDAC6 regule su estabilidad y organización estructural. Por otro lado, aunque el mutante de NS5 no se encontró a nivel citoplasmático en presencia de wt-HDAC6-dsRed, sí mantuvo su patrón estructural nuclear mayoritario de tipo iii, que se perdía en la versión “*wild type*” en presencia de wt-HDAC6-dsRed y de Ub-GFP (**Figura 45E**). Poniendo de manifiesto así la importancia de dicha lisina en la estabilidad de NS5 y su organización estructural en el núcleo.





**Figura 45: NS2B3 y la lisina 330 de NS5 son claves en el escape de la degradación de NS5. (A) y (B)** Análisis de *western blot* del lisado total **(A)** y del fraccionamiento **(B)** de células HEK-293T que sobreexpresan los plásmidos pNS5-myc (1,5µg ADNc) y NS2B3-HA (1,5µg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína α-tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. La sobreexpresión del complejo de proteasa viral NS2B3-HA aumenta los niveles de expresión de NS5-myc y promueve su acumulación nuclear. **(C)** Histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas de *western blot* del experimento del panel **(A)**, representando el nivel de expresión de NS5-myc, que se acumula en las células control (barra negra) y en células que sobreexpresan NS2B3-HA (barra gris). Estos datos han sido normalizados por la proteína control de carga α-tubulina de cada experimento. Los valores son la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. \*\* significa  $p \leq 0,01$ , el valor de  $p$  es la comparación de las medias entre los dos grupos utilizando la prueba paramétrica  $t$  de Student. NS5-myc se acumula en presencia de

NS2B3-HA. **(D)** *Western blot* del lisado de células HEK-293T cotransfectadas con pNS5-myc (1,5µg ADNc), pNS5K330A-myc (1,5µg ADNc) y NS2B3-HA (1,5µg ADNc). Los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina se consideran como el control de carga total de proteína. La sobreexpresión de NS5K330A-myc por sí solo aumenta el nivel de expresión de la polimerasa viral mutada, respecto de la enzima viral control NS5. **(E)** Análisis de microscopía de epifluorescencia de células HEK-293T transfectadas con pNS5K330A-myc (1,5µg ADNc) y wt-HDAC6-dsRed (2,5µg ADNc). 48 horas postransfección las células fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo  $\alpha$ -myc, y tras una incubación de 24 horas a 4°C se marcaron con el anticuerpo secundario A488  $\alpha$ -mouse. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Zeiss 200M (Zeiss, Jena, Germany) y analizadas con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. El mutante de NS5, NS5K330A-myc se encuentra celularmente distribuido con un patrón punteado nuclear, además de distribuirse de forma difusa en las células control, mientras que en presencia de wt-HDAC6-dsRed no encontramos a NS5K330A-myc en el citoplasma, pero si en el núcleo con su patrón punteado característico.

Por tanto, el complejo viral NS2B3 se puede considerar un cofactor estabilizador del nivel de expresión de NS5, su localización celular y organización estructural nuclear. La Lys330 en NS5 mediaría en este equilibrio de interacciones y estabilización de NS5 frente a la acción degradativa que ejerce HDAC6 sobre NS5. El equilibrio en el nivel de expresión de estas tres enzimas se muestra como crítico en la determinación de la función proviral de NS5. Cabe destacar, que los resultados obtenidos hasta este punto corresponden con análisis preliminares que merecen ser estudiados más en profundidad, si bien ya muestran la complejidad de las interacciones que se establecen entre las proteínas de estudio, que, sin duda alguna, se acrecienta a nivel célula-virus ZIKV en el proceso de infección y la patología asociada.

## **5. DISCUSIÓN**



---

## 5. Discusión.

### 5.1. La funcionalidad del complejo viral Env es clave en determinar la infectividad del VIH-1.

Existe una amplia diversidad en la progresión clínica en las personas infectadas por el VIH-1, en la cual intervienen múltiples factores como factores genéticos, inmunológicos y virales. En esta parte de la tesis doctoral, se ha estudiado la contribución de las características de la glicoproteína del complejo de Env viral en el fenotipo clínico de la infección por VIH-1. Para ello, se caracterizaron las funciones del complejo de Env de virus aislados de pacientes VIH-1 mostrando diferentes perfiles clínicos.

Los diferentes grupos de pacientes se definieron en función de sus características clínicas, como el nivel de células T CD4+ circulante en sangre, y las cargas virales detectadas en el torrente sanguíneo (**Tabla 13**). De hecho, numerosos estudios han descrito la correlación entre la carga viral de los pacientes y la probabilidad de transmisión del virus, la progresión de la enfermedad y la patogenicidad (J. M. Coffin, 1995; Mellors, 1995; Mellors et al., 1996; Quinn et al., 2000; Fideli et al., 2001). De estos pacientes, se obtuvieron un número limitado de clones de Env de los diferentes grupos debido a que su obtención es muy laboriosa y es difícil de realizar los distintos análisis fenotípicos en múltiples muestras.

Aunque el control viral en personas infectadas con VIH-1 se ha relacionado con la respuesta inmunitaria del paciente (Deeks & Walker, 2007; Balasubramaniam et al., 2019), otros investigadores y nuestro propio grupo han establecido una conexión directa entre las deficiencias en las funciones del complejo de Env del VIH-1 y el control de la viremia a largo plazo en los individuos del grupo LTNP-EC (Lassen et al., 2009; Casado et al., 2013; Casado et al., 2018). Las Env aisladas de virus de individuos LTNP-EC muestran ineficacia en su unión al receptor CD4 y en sus funciones posteriores de señalización viral, como es la remodelación y estabilización del citoesqueleto de tubulina (la cual, a su vez, está limitada por la actividad tubulina desacetilasa de la enzima HDAC6), y la

consiguiente fusión de las membranas viral y celular que lleva a la entrada de la cápside en la célula. Por tanto, la deficiente funcionalidad de estos complejos de Env explica los pobres niveles de replicación y transmisión observado en los viriones portadores de dicha proteína viral (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; Casado et al., 2018; Cabrera-Rodríguez et al., 2019). Todos estos datos apoyan firmemente la importante función de la Env en determinar el fenotipo LTNP-EC y la patogénesis viral.

En la presente tesis doctoral, las observaciones sobre la deficiente función viral de los complejos de Env de virus de individuos no progresores, controladores de élite (LTNP-EC), que se agrupaban en un “*cluster*” de infección/transmisión estudiado, se corroboraron en individuos LTNP-EC que no provienen de un “*cluster*” de transmisión/infección. Asimismo, esta deficiencia funcional se constató en comparación con la función viral de complejos de Env aislados de virus de pacientes de diferentes grupos de individuos progresores crónicos. Las características de las Env de virus de pacientes LTNP (EC y Virémicos) se compararon con las Env de virus de pacientes P (Antiguos y Modernos). Se caracterizó la eficiencia o no en la asociación de estos complejos de Env con el receptor CD4, del proceso de fusión de las membranas del virus con las células diana, la transferencia de material viral de célula a célula y la capacidad de infección viral. Las glicoproteínas virales de pacientes del grupo LTNP mostraron una capacidad de unión a CD4 más baja, comparada con la de los virus de pacientes P, lo que condujo a una baja señalización y con ello a una deficiencia en la fusión de membranas y en la capacidad de transferencia viral célula a célula, como también se describió anteriormente en complejos de Env de virus de un grupo de pacientes LTNP-EC formando parte de un “*cluster*” viral (Casado et al., 2018).

Las diferencias encontradas en las propiedades de los complejos de Env de virus de pacientes LTNP no se debían al origen ancestral de los virus del grupo LTNP, infectados a finales de los 80 y 90, ya que las características de los virus de los pacientes P Antiguos coinciden a nivel temporal de la infección con los pacientes LTNP, pero en este caso no mostraron una limitación en sus características funcionales. Al contrario, los complejos de Env de virus de pacientes P (Antiguos y Modernos) presentaron una unión a CD4

eficiente y, como consecuencia, una correcta señalización que produce una correcta fusión de membranas y transferencia viral. Por lo tanto, existe una clara correlación entre el nivel de fusión viral, la capacidad de transferencia viral y la infectividad. Además, cabe destacar que las diferencias observadas entre las características de las Env de virus de los diferentes grupos no se pueden asociar a su tropismo viral, ya que todas las secuencias nucleotídicas de los complejos de Env de virus del estudio mostraron un tropismo CCR5.

Por otro lado, la replicación del VIH-1 se encuentra inevitablemente asociada a la generación de variabilidad genética, que es la base de la evolución viral y la aparición de nuevas variantes. La cuantificación de la evolución viral llevó a proponer la existencia de un reloj molecular “lento” en la epidemia española (Casado et al., 2000; Bello et al., 2004) como ya se había demostrado en otros países (Leitner & Albert, 1999) y permitió estimar una potencial datación viral de la secuencia (Casado et al., 2000; Bello et al., 2004). Esta datación viral también corresponde a la distancia genética al MRCA.

La falta de evolución viral en los virus de los pacientes LTNP se puede observar claramente en el árbol filogenético (Figura 28), en la datación viral (Tabla 13) y la distancia al MRCA. Estas observaciones y la identificación previa de virus genéticamente relacionados en diferentes individuos LTNP-EC (Casado et al., 2018) respaldan que se puedan considerar a los virus del grupo LTNP como muy similares a los virus “fundadores”/“transmisores”. En este sentido, la incapacidad de los complejos de Env de ciertos virus a unirse eficientemente a CD4, señalizar y fusionarse con la membrana celular está relacionada con la deficiente transmisión e infección viral, lo que a su vez correlaciona con una limitada evolución y diversidad viral.

Recientemente se ha propuesto que la respuesta inmunitaria está relacionada con el control de la evolución viral, al eliminar potencialmente los virus funcionales de los individuos LTNP-EC. Sin embargo, no hay que olvidar que los virus de estos individuos resistirían a dicha eliminación por el sistema inmunitario, gracias a su integración cromosómica en la heterocromatina, lo cual les confiere un estado de latencia y protección frente al sistema inmunitario (Lian et al., 2021). Los autores de este trabajo

argumentaron que estos eventos inmunológicos no difieren entre las personas que reciben ART y los individuos LTNP-EC. Además, evidentemente la mala funcionalidad de los complejos de Env de virus de los individuos LTNP y la baja variabilidad viral ayudarían al sistema inmunitario a controlar la infección. En este sentido, como se muestra en la **Tabla 13**, los pacientes de este estudio presentan heterogeneidad a nivel de los alelos B del HLA de clase I. Asimismo, ciertos alelos HLA-B, como HLA-B\*27, HLA-B\*57 y HLA-B\*14, que se han asociado con un mayor control viral, se observan en los individuos LTNP-EC, pero no en todos ellos (Almeida et al., 2007; Fellay et al., 2007; International HIV Controllers Study et al., 2010). Por lo tanto, la variabilidad HLA-B observada en estos individuos LTNP podría indicar que las funciones deficientes de las glicoproteínas de Env de los virus de los pacientes podrían ayudar a mantener el control viral en estos individuos, más que la huella de control inmunitario HLA-B que no prevalece en estos individuos.

En este contexto, los complejos de Env de virus de individuos LTNP exhibieron características no funcionales (**Figuras 30-32**) en comparación con los individuos de infección progresiva, lo que apoya la idea de que las propiedades del complejo de Env del virus condicionan directamente la infección por VIH-1. Además, las deficientes funciones de la Env viral se correlacionan con el control viral y la baja tasa de progresión clínica de los individuos LTNP, mientras que se observa que las Env virales funcionales provienen de virus de pacientes VIH+ que carecen de control viral y que muestran progresión clínica.

A pesar del limitado muestreo, debido a la difícil y laboriosa caracterización fenotípica de complejos de Env de virus aislados, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las características de las Env de virus de pacientes LTNP-EC respecto de las de los pacientes P Modernos. Además, si se consideran las características de los complejos de Env aislados de virus de todos los grupos clínicos, existe una tendencia a ganar funcionalidad, menor en los individuos LTNP (LTNP-EC y vLTNP) y mayor en los virus de los grupos P (Antiguos y Modernos). Dicho aumento en la funcionalidad también se correlacionó con proteínas más largas y glicosiladas (**Tabla 14**). La longitud de aminoácidos y el perfil de los PNG de los complejos de Env viral de



---

los diferentes grupos clínicos mostraron que las Env de estudio tienden a aumentar la longitud de los bucles variables de la proteína viral gp120 del complejo de Env (aumenta número de amino ácidos), y la glicosilación (aumenta el número de residuos potencialmente glicosilables en los bucles de la proteína viral gp120) en el transcurso de la epidemia, tal como se ha descrito anteriormente (Sagar et al., 2006; Curlin et al., 2010). En este estudio de la tesis doctoral se observó que los cambios sufridos se acumulan esencialmente en los bucles V1, V2, V4 y V5. Además, previamente se ha demostrado en otros trabajos que los bucles V1 y V4 desempeñan un papel importante en la unión a CD4 y en la neutralización (Rong et al., 2007; E. Castro et al., 2008; Moore et al., 2008; van Gils et al., 2011), así como también en la capacidad de transferencia viral de célula a célula (Yuan et al., 2013; Davenport et al., 2016). En relación con los cambios específicos detectados en nuestro estudio, la pérdida del PNG de N362 prevalecía en los virus de pacientes de los grupos EC, Virémicos y P Antiguos, pero no en los virus de pacientes del grupo P Modernos, lo que podría asociarse con la ganancia de funcionalidad observada en el complejo de la Env. Sin embargo, en un estudio en virus australianos, se encontró un efecto contrario de la glicosilación en el residuo N362, que favorecía una eficiente capacidad de fusión y transferencia viral (Sterjovski et al., 2007). El papel de otros cambios en los PNG detectados en nuestro estudio debe investigarse más a fondo. Por otro lado, además de estos cambios importantes, está claro que las mutaciones puntuales podrían tener un impacto significativo en las características virales y la patogénesis del VIH-1 (J. Coffin & Swanstrom, 2013; Mishra et al., 2019). Por lo tanto, la contribución de las mutaciones individuales merece más estudios, pero está fuera del alcance de nuestra investigación. Por otro lado, en contraste con los significativos cambios observados en los bucles V2 y V5, la longitud y glicosilación del bucle V3 se mantuvo estable. Seguramente, al virus le interesa mantener estable la región V3, al ser clave su estructura en la infección, determinando el tropismo viral (Cocchi et al., 1996; L. Wu et al., 1996; Bieniasz, 1997; Speck et al., 1997; Isaka et al., 1999) y en la correcta unión a CD4 (Trkola et al., 1996; Valenzuela et al., 1997).

Se había publicado la deficiente funcionalidad de los complejos de Env de virus de individuos pertenecientes de un “*cluster*” viral de pacientes LTNP-EC (Lassen et al., 2009; Casado et al., 2018), Además, en nuestro caso, hemos extendido estos resultados a

individuos VIH-1+ que controlan la viremia y que no forman parte de un “cluster” de infección/transmisión, asociado a un mismo virus “fundador”. Como ya se ha comentado, se identificó una ganancia de funcionalidad en las Env virales, sobre todo, del fenotipo clínico P. Asimismo, esta mejora en la funcionalidad se asoció en nuestra investigación con aumentos de longitud y de residuos PNG en los bucles variables de la proteína viral gp120. Este aumento, se ha descrito de forma similar en otros estudios en los que se analiza la susceptibilidad, la sensibilidad a la neutralización, la unión al correceptor, el rango de hospedadores y el fenotipo viral (Curlin et al., 2010). Este aumento en la longitud de las regiones V1-V2 y en sitios PNG también se ha detectado en infecciones crónicas, a partir de muestras de complejos de Env de virus aislados en las fases tempranas del curso de la infección *in vivo*, además de en fases más tardías del mismo (Curlin et al., 2010). Asimismo, en un grupo de individuos infectados con virus estrechamente relacionados, se observó una mayor densidad de PNG en la región V1-V5 de gp120 de virus aislados durante la infección crónica en comparación con la observada en virus aislados durante la fase temprana de la infección viral (Pollakis et al., 2015). Además, en los virus del subtipo B del VIH-1, parece que, tras la transmisión viral a un nuevo hospedador, se produce una selección de variantes virales con regiones variables más cortas y un grado reducido de sitios PNG (Y. Liu et al., 2008). El crecimiento en la funcionalidad de las características virales también se correlacionó con la distancia genética de las secuencias al ancestro del subtipo B. La variabilidad genética del gen *env* se ha asociado con un aumento de la infectividad y la capacidad de replicación del virus (Keele, Giorgi, et al., 2008; Quan et al., 2009; Fischer et al., 2010; Roche et al., 2011; Fraser et al., 2014; L. V. P. Dang et al., 2020). Estos cambios podrían facilitar la replicación viral, al aumentar las características virales que favorecen el escape de la respuesta inmunitaria y el ART (Koot, 1993; Kitrinós et al., 2003; Kitchen et al., 2004; Kitrinós et al., 2005; Duenas-Decamp et al., 2008; Salazar-Gonzalez et al., 2008; Kassaye et al., 2009; B. Shi et al., 2010).

Además, es concebible que la caracterización funcional de los complejos de Env deficientes del VIH-1 podría ayudar en el desarrollo de una nueva generación de inmunógenos basados en dicha proteína viral. De hecho, las vacunas atenuadas contra el VIH o SIV se han postulado como estrategias vacunales terapéuticas (Murphey-Corb,

1997; Desrosiers, 1998; Johnson, 1999; Blower et al., 2001; Almond, 1999; Baba et al., 1999). Sin embargo, se necesita más estudios a nivel antigénico e inmunogénico para revelar las potenciales implicaciones de las glicoproteínas de la Env no funcionales en el campo de la vacunación.

En resumen, en esta parte de la tesis doctoral se ha descrito que las características de los complejos de Env de virus aislados de diferentes grupos de individuos infectados por HIV-1 podrían estar asociadas con el control o no de la carga viral, a corto o largo plazo, y la tasa de progresión clínica de la infección. Se observó que los complejos de Env de virus de individuos LTNP presentan características no funcionales en comparación con los aislados de los virus de los grupos P, lo que respalda que las propiedades de la Env viral condicionan directamente la infección por VIH-1. Por lo tanto, los individuos VIH-1+ LTNP (EC y Virémicos) que muestran un control viral y bajas tasas de progresión clínica presentan virus con Env deficientes a nivel funcional, mientras que las Env funcionales provienen de virus de pacientes VIH-1+ que carecen de control viral y presentan progresión clínica. Por lo tanto, el control viral podría explicar una interacción entre la infectividad viral y la respuesta inmunitaria que sería más eficiente contra virus que portan Env deficientes, no funcionales, con una baja capacidad de fusión e infección y una evolución muy limitada, y que observamos en virus aislados de los grupos LTNP, como se ha mostrado recientemente (Lian et al., 2021). Por ello, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la funcionalidad del complejo de la Env viral es una característica clave en el control de la infección, la replicación y la patogénesis asociada al VIH-1. Los complejos de Env del VIH-1 no funcionales, deficientes en la unión a CD4 y la señalización subsecuente, no promueven la estabilización de los microtúbulos, y favorece, por tanto, la desestabilización de los mismos mediada por HDAC6, lo que dificulta la fusión e infección viral mediada por estos complejos de Env deficientes. Comprender esta pérdida de función de los complejos de Env deficientes podría ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias para la cura funcional y la erradicación del virus.

## 5.2. Efecto bidireccional funcional entre la proteína NS5 del ZIKV y la enzima celular HDAC6.

El ZIKV se diferencia de otros flavivirus en su capacidad de traspasar las barreras de defensa del organismo y alcanzar órganos y tejidos inmunoprivilegiados, infectando diversas células en las que interacciona con cientos de proteínas celulares causando enfermedades neurológicas como la microcefalia y el Síndrome Guillain-Barré (Oehler et al., 2014; B. Wolf et al., 2017; Conde et al., 2020). En un estudio de interactómica describieron 3.033 interacciones entre las diferentes proteínas virales de ZIKV y 1.224 polipéptidos humanos, gran parte de los cuales se relacionan con el control de calidad y procesamiento de proteínas, el tráfico vesicular, el metabolismo lipídico y el procesamiento de ARN (Coyaud et al., 2018). Por otro lado, Cortese *et al.* describieron una gran reorganización de los microtúbulos y filamentos intermedios con el fin de formar la estructura “cage-like” alrededor de la factoría de replicación viral del ZIKV, utilizando así el citoesqueleto celular en su propio beneficio (Cortese et al., 2017). El citoesqueleto es un componente celular activo durante la infección viral, interviniendo en diferentes procesos como: el transporte de sustancias necesarias para el virus, como soporte en la replicación perinuclear y el córtex celular, conectando el transporte del endosoma temprano-tardío y la degradación endosoma tardío-lisosoma o incluso como un “escudo” de protección frente al sistema inmunitario (Y. Zhang et al., 2019). De hecho, en estudios con flavivirus se ha manifestado la importancia de la interacción de las proteínas virales con los componentes del citoesqueleto en la entrada viral, transporte celular, ensamblaje intracelular y salida viral (Foo & Chee, 2015; Y. Zhang et al., 2019). En esta parte de la tesis doctoral se ha caracterizado a la polimerasa viral NS5 de ZIKV como un regulador del citoesqueleto y del flujo autofágico a través de su acción sobre p62 y/o HDAC6. Y a su vez, a HDAC6 como factor de restricción viral sobre NS5, determinando su estabilidad a nivel de proteína y organización estructural en el núcleo, describiendo una relación bidireccional entre la proteína viral y celular.

El citoesqueleto de tubulina (MT) interviene en la migración y diferenciación celular, jugando un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso (Singh & Tsai, 2010). Se han relacionado diversas mutaciones en los genes de tubulina con daños

---

estructurales cerebrales, como las mutaciones de la subunidad de  $\alpha$ -tubulina TUBA1A con lisencefalia (Keays et al., 2007; Poirier et al., 2007), de la subunidad  $\beta$ -tubulina TUBB2B con polimicrogiria asimétrica (Jaglin et al., 2009) y TUBB3 con trastorno de la motilidad ocular entre otras enfermedades del sistema nervioso (Poirier et al., 2010; Tischfield et al., 2010). Asimismo, se ha descrito que la infección por ZIKV produce un aumento en el número de centrosomas y un mal posicionamiento del huso mitótico contribuyendo a la generación de la microcefalia (B. Wolf et al., 2017), y también una fuerte regulación a la baja de componentes de los microtúbulos y filamentos de actina, afectando al correcto funcionamiento del citoesqueleto (Zanini et al., 2018). Por lo que los resultados obtenidos en los que se muestra la acumulación de tubulina acetilada por parte de NS5 (Figura 37), estabilizando los microtúbulos y afectando negativamente a su dinámica, están en concordancia con las observaciones de otros estudios como los anteriormente expuestos. Este efecto de NS5 sobre los MT podría ser clave en parte de la patología asociada a la infección por ZIKV arriba descrita.

En el SNC, la disrupción del citoesqueleto de actina resulta en un defecto de la barrera hematoencefálica, facilitando la infección de virus neurotrópicos como el ZIKV y el WNV (Al-Obaidi et al., 2018). Como se ha demostrado en los experimentos llevados a cabo, NS5 promueve la acetilación de  $\alpha$ -tubulina en los MT, afectando a la naturaleza dinámica de los MT necesaria en el correcto funcionamiento del citoesqueleto. NS5 podría estar favoreciendo de esta forma la infección de células del sistema nervioso al modificar el citoesqueleto celular.

Los MT sufren modificaciones postraduccionales que afectan a su función, como es el caso de la acetilación reversible de la K40 de la subunidad  $\alpha$ -tubulina. El estado de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina en los MT es el resultado de su interacción con diferentes proteínas con funciones opuestas. Por un lado, actúan las acetiltransferasas como ATAT1 acetilando la subunidad (Shida et al., 2010; Coombes et al., 2016), y/o el cofactor p300 que puede favorecer la hiperacetilación de MT por acción de  $\alpha$ TAT-1/MEC-17, al unirse, a su vez, a los MT hiperacetilados de forma  $\alpha$ TAT-1/MEC-17 dependiente (Mackeh et al., 2014). Y, por otro lado, encontramos a HDAC6 o sirtuina 2 (SIRT2) que eliminan el grupo acetilo de la subunidad (Hubbert et al., 2002; North et al.,

2003; Skoge et al., 2014). La acetilación de K40 se ha asociado a la flexibilidad de los MT, una mejor resistencia al estrés mecánico y un aumento en su vida media (Janke & Montagnac, 2017; Portran et al., 2017). Por lo que a ZIKV le favorecería la acetilación de los microtúbulos para poder utilizar la red de MT en los diferentes procesos que se han nombrado anteriormente.

Pero el desequilibrio en una dinámica como la acetilación-desacetilación de los MT trae consecuencias a nivel celular. Se han descrito a los niveles anormales de acetilación y desacetilación de los microtúbulos como causas de enfermedades neurológicas, cardiovasculares y cancerígenas (Boggs et al., 2015; L. Li & Yang, 2015; Cappelletti et al., 2021; Martínez-Hernández et al., 2022). NS5 podría intervenir en el desarrollo de las patologías neurológicas características de ZIKV en este nivel, acrecentando la acetilación de tubulina.

En un estudio sobre la ciliopatía y la neurogénesis prematura en la infección por ZIKV, se describió a la oligomerización de NS5 como la causa de dichos procesos, apuntando la multimerización de NS5 como una diana terapéutica para prevenir las malformaciones relacionadas con el síndrome congénito de ZIKV. En este estudio, también se describió a NS5 colocalizando en las células subependimarias y endependimarias con el eje de cilios marcados por  $\alpha$ -tubulina acetilada, siendo los cilios de las células infectadas por ZIKV más cortos que en las células control y los residuos Y25, K28 y K29 de NS5 claves en su localización en los cilios (Saade et al., 2020). Una posible hipótesis es que NS5 podría interactuar con la  $\alpha$ -tubulina de los MT en su estado acetilado, impidiendo su desacetilación por parte de HDAC6, y, con ello, promoviendo la modificación postraducciona de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina en los MT. Cabe destacar que en la investigación llevada a cabo, se describe un efecto en el estado de NS5 sobre la acetilación de RIG-I (Figura 44), otro sustrato de la histona desacetilasa, por lo que, de forma directa o indirecta, sugiere que NS5 repercute sobre la actividad desacetilasa de HDAC6 en sus sustratos.

Los resultados obtenidos mediante el tratamiento celular con el inhibidor selectivo de la actividad desacetilasa de HDAC6, tubacina, y con el inhibidor selectivo de la HAT

---

p300/CBP, A-485, indican que NS5 de ZIKV promueve la acetilación de  $\alpha$ -tubulina actuando sobre la función desacetilasa de HDAC6 o dificultando su acción de alguna forma (**Figura 37**), alterando así al estado de acetilación de otros sustratos de HDAC6 como RIG-I. En este estudio no se ha descrito el mecanismo por el cuál NS5 afecta a la actividad desacetilasa de HDAC6, pero si se ha observado una interacción directa o indirecta (**Figura 37**) entre estas dos proteínas que podría producir la disfuncionalidad de HDAC6. Sin embargo, considerando estos resultados, podríamos sugerir que el equilibrio de expresión y función que se pudiera establecer entre NS5, p300 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17) y HDAC6 (en un contexto de infección por el virus ZIKV), podría determinar la dinámica del citoesqueleto de tubulina y sus funciones celulares por regulación de los niveles de acetilación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina en los MT. Donde el efecto observado de hiperacetilación de MT por NS5 podría ser parte de su función proviral, de escape a las defensas intracelulares y/o del efecto citotóxico de la proteína NS5. Asimismo, el equilibrio entre NS5, HDAC6 y RIG-I determinaría el nivel de acetilación de RIG-I y, por tanto, la eficacia de la respuesta inmunitaria innata que se establezca frente a la infección por ZIKV, mediante la activación de la producción de INF supeditada, a su vez, a la actividad desacetiladora de HDAC6 sobre RIG-I acetilado.

Por otro lado, NS5 aparte de afectar a la actividad desacetilasa de HDAC6 también actúa sobre su capacidad autofágica. NS5 promueve la acumulación de la proteína p62 en la célula, proteína “control” de la autofagia (**Figura 38**). Cuando se lleva a cabo la degradación de proteínas vía autofagia, p62 se degrada durante el proceso, mientras que cuando se bloquea dicha vía, p62 se acumula (Bjørkøy et al., 2006; Pankiv et al., 2007). Además, aparte de dicha observación mediante bioquímica básica, también a nivel de microscopía de epifluorescencia se han visualizado estructuras tipo agresoma en presencia de la proteína viral NS5 (**Figura 37 y 42**). Lo que da lugar a caracterizar a NS5 como un regulador de la actividad desacetilasa y autofágica de HDAC6.

La acumulación de proteínas mal plegadas que no son capaces de degradarse vía proteasoma, en condiciones naturales pasan a ser degradadas vía autofagia, proceso en el que interviene HDAC6 (Rideout et al., 2004; Iwata, Riley, et al., 2005). Cuando se bloquea la vía autofágica en células del sistema nervioso como las neuronas o las células

gliales, se forman agregados proteicos incapaces de degradarse y dicha acumulación es tóxica para la célula, definiéndolo como una causa de diversas EN (Trojanowski & Lee, 2006; L. Chin et al., 2008). Tanto en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson como Huntington se ha descrito la acumulación de proteínas mutantes (Waelter et al., 2001; J. P. Taylor et al., 2002; Rubinsztein, 2006). De hecho, estudios con ratones demostraron que la inhibición de la autofagia en las neuronas del SNC produce la muerte neuronal y se relaciona con la patogénesis de EN (Komatsu et al., 2006), incluso en ausencia de proteínas mutantes (Hara et al., 2006). Los propios agregados proteicos pueden generar una desregulación e incluso la muerte celular (Bence et al., 2001). Lo que propone a HDAC6 como una diana terapéutica en dichas enfermedades favoreciendo la degradación autofágica (Pandey et al., 2007; Simões-Pires et al., 2013).

A su vez, HDAC6 ejerce una fuerza degradativa sobre NS5 de ZIKV. Dicha degradación se produce de manera dosis dependiente de la concentración de HDAC6 y se impide al silenciar el ARNm de HDAC6 (Figura 39). Este efecto degradativo se ha observado tanto a nivel de bioquímica como de inmunofluorescencia, donde en un 48,2% de las células donde se ve expresado HDAC6 no se observa NS5. Sería interesante comprobar una disminución en la replicación viral de ZIKV al sobreexpresar HDAC6, debido a su efecto degradativo sobre la polimerasa viral NS5.

La localización de NS5 es importante a nivel de su degradación (Ji & Luo, 2020). HDAC6 es una proteína celular citoplasmática y NS5 en condiciones naturales se acumula en el núcleo. Por lo que al forzar su localización citoplasmática y así potenciar su interacción con HDAC6 tratando las células con ivermectina, un inhibidor de la  $\alpha/\beta$ -importina (Wagstaff et al., 2012), se favorece la degradación de la polimerasa viral. Al mismo tiempo, se vuelve a recuperar al silenciar el ARNm de HDAC6 con shHDAC6 y siRNA de HDAC6 (Figura 39). Describiendo así el mecanismo responsable de la baja expresión citosólica de NS5, hasta ahora desconocido, y definiendo a HDAC6 como factor responsable de su degradación. Es decir, NS5 pivotaría entre el núcleo y el citoplasma. En el citoplasma la expresión de la proteína sería baja, debido a la acción degradativa de HDAC6, quedando la proteína NS5 localizada de forma predominante en el núcleo. Lógicamente, la sobreexpresión de HDAC6 funcional afecta también a la



distribución nuclear de NS5, ya que, bajo estas condiciones, a NS5 le es más difícil escapar a la acción degradativa autofágica de HDAC6, que ocurre a nivel citoplasmático, y translocar al núcleo. El silenciamiento del ARNm de HDAC6, la inhibición de su función desacetilasa y el empleo de constructos de HDAC6 inhabilitados en sus funciones principales desacetilasa (dm-HDAC6) y de unión a Ub (HDAC6-DBUZ) protegen a NS5 de su degradación autofágica por HDAC6, pudiendo ver su localización en el citoplasma y principalmente en el núcleo, donde se agrega en estructuras propias de NB.

A nivel de transporte nuclear de NS5 de flavivirus se ha descrito detalladamente la importancia de las secuencias NLS en dicho proceso. Pero, por otro lado, también se han propuesto las modificaciones postraduccionales como factor en la localización subcelular de proteínas celulares para que lleven a cabo su función (Bauer et al., 2015; M. J. A. Tan et al., 2019). En concreto, la acetilación de proteínas, aparte de relacionarse con su actividad, estabilidad e interacción con otras proteínas, también puede intervenir en su localización subcelular (Sadoul et al., 2011). Diversas proteínas en función de su estado de acetilación se encuentran en el citoplasma o en el núcleo. Por ejemplo, el estado acetilado de la polimerasa poly(A) inhibe su unión con el complejo de importina  $\alpha/\beta$  localizando a la proteína en el citoplasma (Shimazu et al., 2007). Al igual que el supresor tumoral p53, que se acetila en múltiples lisinas promoviendo su localización citoplasmática (Kawaguchi et al., 2006). Sin embargo, en otras proteínas la acetilación implica su localización nuclear, como es el caso del regulador transcripcional CtBP2 (L.-J. Zhao et al., 2006), o el transactivador de clase II que al acetilarse y acumularse en el núcleo se mejora la regulación de expresión génica del MHC-II (Spilianakis et al., 2000). La localización de la proteína en estos compartimentos subcelulares puede deberse directamente a la propia acetilación de la proteína o indirectamente por la interacción con otra proteína que define su localización subcelular (L. Chen et al., 2001; Thevenet et al., 2004; Kawaguchi et al., 2006; Shimazu et al., 2007; Dietschy et al., 2009).

NS5 contiene una secuencia NLS rica en argininas y lisinas (M. J. A. Tan et al., 2019). Estas últimas pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales como la acetilación. Se ha demostrado a través de ensayos de mutagénesis que dicha secuencia es clave en el transporte nuclear de la proteína viral (Ji & Luo, 2020), pero una cuestión

interesante es si la acetilación de las lisinas de la secuencia NLS influye en el proceso de translocación al núcleo y como consecuencia en su estabilidad proteica. En el estudio en el que relacionan la multimerización de NS5 con la ciliopatía que produce la infección por ZIKV que se comentó anteriormente, también relacionan dicha multimerización, en la que los residuos Y25, K28 y K29 son claves, con el transporte de la polimerasa viral del núcleo al cuerpo basal (Saade et al., 2020). Por lo que una pregunta que se podría realizar es si estas lisinas son claves en la entrada y estabilización nuclear de NS5 y si influye su estado de acetilación.

El siguiente paso fue definir la vía de degradación de NS5. Se aplicaron inhibidores de diferentes rutas de degradación proteica celulares. El MG132, inhibidor de la vía proteosómica (NCBI, 2023b); la Bafilomicina A1, inhibidor de la acidificación lisosomal (específicamente de la bomba de protones lisosomal ATPasa) (NCBI, 2023d); E-64d, inhibidor de la cistein proteasa (NCBI, 2023a), junto con pepstatina A, inhibidor de la aspartil proteasa (NCBI, 2023c); y por último 3-MA, inhibidor de la formación de agresomas en la ruta de la autofagia (NCBI, 2023e). Solamente se consiguió una recuperación de la concentración de la proteína NS5 con el tratamiento 3-MA, lo que sugiere que NS5 se degrada vía autofágica (Figura 40). Además, los experimentos de inmunofluorescencia revelaron la formación de estructuras tipo agresoma en regiones cercanas al núcleo que colocalizan con Ub y HDAC6 (Figura 37 y 42), y una recuperación del patrón nuclear de tipo iii característico de NS5, e incluso su localización a nivel citoplasmático bajo el tratamiento 3-MA (Figura 40).

En condiciones de estrés celular debido a la incapacidad de degradar proteínas por la vía proteasoma o chaperona, se degradan por la vía agresoma-autofagia (L.-S. Chin et al., 2010). Las proteínas ubiquitinadas son transportadas a través de los MT hacia el MTOC en la región citoplasmática cercana al núcleo a través del complejo motor dineína (Kopito, 2000; L.-S. Chin et al., 2010). En este proceso interviene HDAC6, gracias a su dominio BUZ que une las proteínas ubiquitinadas y actúa como enlace con la proteína motora dineína (Kawaguchi et al., 2003; Kopito, 2003), permitiendo el transporte de las proteínas hacia el agresoma a través de los MT, por lo que tanto la actividad de unión a ubiquitina como la actividad desacetilasa de HDAC6 son necesarias en la formación del

agresoma (Kawaguchi et al., 2003; G. Li et al., 2011). La modificación postraducciona de acetilación, aparte de intervenir en la dinámica de citoesqueleto, también interviene en otros procesos como la endocitosis, la señalización, la formación de agresoma o la autofagia, entre otros (Caron et al., 2005; Matthias et al., 2008; X.-J. Yang & Seto, 2008<sup>a</sup>; X.-J. Yang & Seto, 2008<sup>b</sup>). Este agresoma será incorporado en el interior del autofagosoma que, a su vez, se fusionará con el lisosoma, creando un autofagolisosoma donde se degradarán las proteínas gracias a las hidrolasas lisosomales (Mizushima et al., 2008; Z. Yang & Klionsky, 2010; Mizushima, 2011). De igual manera, HDAC6 vuelve a jugar un papel importante en la vía autofágica. HDAC6 moviliza la maquinaria de remodelación de actina dependiente de cortactina hacia los agregados proteicos y desacetila la cortactina produciendo la remodelación de la F actina en una especie de red que permite la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (J.-Y. Lee et al., 2010; R. Wang et al., 2019). La inmunofluorescencia respalda las observaciones de los patrones de expresión proteica medidos por *western blot* en los que se observa el gran poder degradativo que ejerce HDAC6 sobre NS5, concordando con la implicación de HDAC6 en la ruta degradativa autofágica. Por otro lado, NS5 estabiliza sustratos de HDAC6, o factores clave para la estabilización de los MT y la regulación del flujo autofágico, como son la  $\alpha$ -tubulina acetilada en MT y el factor proautofágico p62, respectivamente. En estas condiciones de sobreexpresión de NS5, el nivel de expresión de HDAC6 endógeno no es suficiente o la enzima no podría desestabilizar los MT acetilados por NS5 ni promover la eliminación de p62 por autofagia. NS5, por tanto, podría estar dificultando dichas funciones de HDAC6, con el fin de evitar su propia degradación, creando una vía de escape que le permita su estabilización nuclear, con el fin de regular negativamente la respuesta INF dependiente, y perturbando el citoesqueleto de tubulina que podría favorecer la replicación viral; pudiendo, ambos procesos, ser eventos importantes para la patología asociada a la infección por ZIKV.

Mediante la cotransfección de pNS5-myc con dos mutantes de HDAC6 que afectan a sus dos módulos funcionales principales, asociados con la actividad autofágica de HDAC6, se investigó qué dominio o dominios son clave en HDAC6 para promover la degradación de NS5. Se empleó un mutante de ambos dominios catalíticos desacetilasas (HA-dm-HDAC6) y un mutante del dominio BUZ (HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ). Con ambos

mutantes se observó una recuperación de los niveles de expresión de la proteína NS5 en comparación con los niveles bajos de expresión detectados en células coexpresando el constructo funcional de HDAC6 (HA-wt-HDAC6). Por una parte, con el mutante del dominio BUZ se recupera más de la mitad del nivel de expresión de la proteína de NS5 respecto del detectado en la condición control (**Figura 41C**), pero se sigue produciendo una cierta degradación de NS5. Esto es indicativo de la importancia de la función desacetilasa de HDAC6 para su función autofágica, que el mutante HDAC6- $\Delta$ BUZ aún conserva y muestra aún cierta actividad degradativa sobre NS5. Un proceso similar ha sido descrito por nuestro equipo en la acción degradativa autofágica de HDAC6 sobre el factor viral Vif del VIH-1 (Valera et al., 2015). Así, los datos obtenidos con el doble mutante de la actividad desacetilasa de HDAC6 muestran que no se promueve la degradación de NS5, así como el aumento en los niveles de expresión de NS5, prácticamente al triple de los niveles observados para NS5 en la condición control (**Figura 43C**). Lo que señala al dominio BUZ como importante para la degradación de NS5 por autofagia, y, sobre todo, a los dominios desacetilasa de HDAC6 como dominios claves en la desestabilización y degradación del NS5 del ZIKV. Resultado que se confirma al realizar un tratamiento con tubacina, un inhibidor de la actividad desacetilasa de HDAC6 (Haggarty et al., 2003), a células que expresan NS5-myc. En estas condiciones experimentales, se recupera el patrón nuclear punteado de tipo iii característico e incluso se observa un nuevo patrón difuso de distribución de NS5 en el citoplasma (**Figura 43E**). Por lo que los resultados obtenidos muestran que NS5 promueve un entorno celular de “acetilación”, que, en gran medida, favorece su estabilización.

Este contexto puede ser propio del virus ZIKV, ya que estudios sobre la infección del virus JEV, otro flavivirus importante, rindieron datos, en principio, contrarios. En este trabajo, se muestra que la tubacina inhibe la expresión y la síntesis de la cadena ARN antisentido de NS5 en células infectadas por JEV. Parece ser que al tratar las células con tubacina, HSP90, sustrato de HDAC6, se encuentra en un estado hiperacetilado que interviene en el proceso, evitando la interacción entre HSP90 y la proteína viral NS5 del JEV, lo que estabiliza a NS5. Por el contrario, la novobiocina, un inhibidor de la función chaperona de HSP90, disminuyó el nivel de expresión de la proteína NS5, afectando negativamente a la replicación viral del JEV (C.-Y. Lu et al., 2017).

---

A lo largo de este apartado de discusión se han identificado diversas lisinas claves en la localización subcelular de NS5 y patologías asociadas. A su vez, se conoce que en las proteínas, dicho residuo aminoacídico sufre diversas modificaciones postraduccionales, como son la acetilación y la ubiquitinación, y que estas modificaciones influyen en la estabilidad de las proteínas (Caron et al., 2005). Caron *et al.* observaron una estabilización de 12 proteínas reguladoras celulares tras la acetilación de lisinas específicas, y en 7 de ellas las lisinas que acetilaron se podían ubiquitinar, sugiriendo una competición entre la acetilación y la ubiquitinación. Aunque en otras proteínas estudiadas su estabilización gracias a la acetilación de lisinas no se debía a su competencia directa con la ubiquitinación (Caron et al., 2005). NS5 podría superar la acción antiviral de los niveles endógenos de la enzima HDAC6, estabilizando sus sustratos o alterando las funciones asociadas a HDAC6 (acetilación de MT y estabilización de p62), que podría evitar su reclutamiento en el agresoma y su posterior degradación autofágica. Pero ¿NS5 podría también, estar impidiendo la desacetilación de sus lisinas y con ello evitando su marcaje con ubiquitinas y su consiguiente degradación?

HDAC6, aparte de intervenir en diversos procesos celulares como la regulación del citoesqueleto, la migración celular, el tráfico intracelular o la respuesta celular frente a estrés (Hubbert et al., 2002; Valenzuela-Fernández et al., 2008; M. Li et al., 2016), también actúa a nivel de defensa inmunitaria, ya que entre los diversos sustratos que posee HDAC6, se encuentra RIG-I. RIG-I es activado gracias a su desacetilación mediante HDAC6, promoviendo la respuesta del IFN (S. J. Choi et al., 2016). De hecho, al virus ZIKV le interesa justo que ocurra lo contrario, es decir inhibir la respuesta del IFN con el fin de llevar a cabo su ciclo viral e infectar células que se encuentran en órganos inmunoprivilegiados, como son el cerebro o la placenta (Bayer et al., 2016; A. Kumar et al., 2016). En este estudio se ha demostrado que NS5 influye en el estado de acetilación de los sustratos de HDAC6, como es el caso de RIG-I. Mediante *western blot* se ha visto que la expresión de NS5 promueve la acetilación de RIG-I, lo que dificulta su activación y la consecuente respuesta del IFN (Figura 44A). A través de un ensayo de luciferasa, donde se mide la expresión de la proteína inducida por el IFN, ISG54, se observó la disminución de la expresión de la proteína ISG54, al sobreexpresar NS5. Esto es

indicativo del efecto anti-INF de NS5 actuando sobre esta ruta RIG-I/ISG54 dependiente. La inhibición de la actividad desacetilasa de HDAC6 con tubacina disminuyó también los niveles de expresión del factor ISG54, aunque en menor medida que el efecto causado por NS5 (**Figura 44B**). Esto se explica, porque, de por sí, los niveles de la proteína ISG54 son ya muy bajos sólo al sobreexpresar NS5. Por lo que NS5 inhibe la respuesta del IFN mediante diferentes mecanismos entre los que se podría encontrar un mecanismo equivalente a la tubacina, actuando sobre la actividad desacetilasa de HDAC6. Podría producirse por interacción con RIG-I evitando la acción de HDAC6 o impidiendo de forma indirecta la acción de HDAC6 sobre RIG-I. Este nuevo mecanismo de regulación negativa de la respuesta inmunitaria innata, afectando a la vía de producción del INF a través de RIG-I/ISG54, se sumaría a las acciones de escape inmunitario ya descritas para NS5 como promover la degradación vía proteasoma de STAT2 (Grant et al., 2016; A. Kumar et al., 2016) e inhibe la fosforilación de STAT1 (Hertzog et al., 2018), componentes de la vía del IFN.

En relación con la actividad de NS5 sobre la vía del IFN, se cree que las estructuras punteadas nucleares (tipo ii y iii) donde encontramos a NS5 intervienen en la modulación de la respuesta inmunitaria de manera diferente en función del tipo celular infectado (M. J. A. Tan et al., 2019). Conde *et al.* demostraron una relación entre los NB donde se encuentra NS5 del ZIKV y la inhibición de ISG en células endoteliales microvasculares del cerebro (hBMEC, “*brain microvascular endothelial cells*”) (Conde et al., 2020), células “barrera” entre el torrente sanguíneo y el tejido cerebral (Goasdoué et al., 2017; Sweeney et al., 2019). ZIKV infecta este tipo celular sin causar daños citopáticos, actuando como reservorio viral y permitiendo la diseminación hacia compartimentos neuronales (Mladinich et al., 2017; Conde et al., 2020). En estas células, de forma natural, se encuentran SUMO NB que intervienen en la respuesta inmunitaria innata y están compuestos por proteínas con abundantes sumoilaciones, SUMO-1, PML y STAT2 (Zhong et al., 2000; Shen et al., 2006; Conde et al., 2020). Los PML se unen a STAT2 favoreciendo su acumulación y mejorando la respuesta ISG (Scherer & Stamminger, 2016; Conde et al., 2020). Se ha descrito que NS5 se sumoila en los residuos de lisina, colocalizando en estos NB con SUMO-1 y STAT2, evitando la formación del complejo STAT2-PML, promoviendo la degradación de PML y regulando negativamente

la respuesta ISG. Además, se definió a la lisina de la posición 252 como una lisina clave en dicho proceso, ya que su mutante K252R no es capaz de degradar los PML, reducir la expresión de STAT2 y con ello inhibir la inducción de ISG (Conde et al., 2020). Este proceso proceso también lo hemos estudiado y descrito en el presente trabajo de tesis doctoral. Así, en estudios de microscopía de epifluorescencia se observa una colocalización de NS5 con proteínas SUMO-1, cuando se encuentra formando las estructuras de tipo ii y iii, mientras que NS5 no colocaliza con PML (**Figura 36**). Estos datos apuntan a que NS5 participaría en esta otra vía de inhibición de la respuesta del IFN, lo que podría explicar la disminución que se observó en la expresión de la proteína ISG54 al sobreexpresar NS5-myc, y sin olvidar el impedimento que ejerce en la desacetilación de RIG-I por HDAC6, anteriormente analizado.

ZIKV y DENV son dos flavivirus muy similares en términos de biología molecular y epidemiología, pero con diferente sintomatología y diferentes mecanismos celulares (Olagnier et al., 2016). DENV suele cursar de manera asintomática o con sintomatología general como fiebre, dolor de cabeza, sarpullido y artralgia entre otros síntomas, al igual que ZIKV. Pero varían en las complicaciones de la enfermedad, mientras que ZIKV causa daños a nivel neurológico, DENV causa fiebre hemorrágica y el síndrome de shock del dengue acompañado con hipotensión, trombocitopenia y aumento de la permeabilidad vascular, causando un shock a nivel sistémico (Tuiskunen Bäck & Lundkvist, 2013; Khetarpal & Khanna, 2016; Nanaware et al., 2021; Roy & Bhattacharjee, 2021). El ZIKV es capaz de diseminarse entre hBMEC, durante 1 a 9 días postinfección, sin tener restricción paracrina por acción del IFN. En cambio, la diseminación de DENV hacia células endoteliales de la vena umbilical humana es bloqueada por el IFN- $\beta$  secretado por las células infectadas por DENV (Mladinich et al., 2017), por lo que la regulación del sistema inmunitario por parte de ambos virus es diferente, definiendo o estableciendo un tropismo celular y una sintomatología diferente.

Al contrario de lo que ocurre con la proteína del ZIKV, NS5 del DENV se localiza en el núcleo con un patrón uniformemente disperso en el nucleoplasma, en vez de punteado como hemos comprobado en este trabajo (**Figura 35D**). Conde et al., mutaron la lisina K546 (K546R) de NS5 del DENV y consiguieron cambiar su patrón estructural

nuclear a discretos patrones punteados en células hBMEC, donde colocalizaba con SUMO-1, similar al patrón que presenta NS5 del ZIKV. Lo que conllevó a que el NS5 de DENV se comportara como el de ZIKV, inhibiendo la respuesta del interferón (Conde et al., 2020). Este estudio muestra la importancia de la localización de NS5 de flavivirus en los NB en la regulación de la respuesta inmunitaria y sintomatología asociada.

El estudio llevado a cabo durante la presente tesis doctoral, demuestra como la sobreexpresión de HDAC6 modifica el patrón estructural de NS5 que pasa de ser mayoritariamente de tipo iii a tipo i y ii, o incluso a no detectarse la proteína viral en la célula debido a su degradación (**Figura 39**). Este hecho, lleva a proponer a HDAC6 como un factor de restricción viral, al degradar a la proteína no estructural NS5 evitando su función en el ciclo viral, y en este caso, también podría impedir la colocalización de NS5 con estos SUMO NB, neutralizando el efecto inhibitor de la respuesta inmunitaria por parte de NS5. Esto nos permite especular sobre una potencial función protectora de HDAC6, dependiente del nivel de expresión de la enzima y de sus funciones biológicas, al evitar el efecto de NS5 sobre la respuesta inmunitaria, esto podría conllevar a una modificación en la patología asociada al ZIKV como la microcefalia, al evitar el paso del virus a través de la barrera transplacentaria y hematoencefálica.

Cabe destacar que la investigación llevada a cabo se ha realizado estudiando únicamente la proteína viral NS5, por lo que se debería escalar a virus completo para observar si influyen otras proteínas virales en esta dinámica entre NS5 y HDAC6 que se ha descrito. De hecho, en datos preliminares obtenidos, se ha visto que la incorporación del complejo proteasa viral NS2B3 a la ecuación desequilibra la balanza hacia NS5. NS2B3 estabiliza los niveles de expresión de NS5, fomentando su entrada al núcleo y posiblemente dificultando así la actividad degradativa de HDAC6 (**Figuras 45**). En un estudio de interactómica sobre ZIKV, observaron que las células que expresaban NS2B3 mostraban lisosomas de menor tamaño, sugiriendo que la proteasa viral podría afectar a la funcionalidad de los lisosomas (Coyaud et al., 2018), lo que favorecería la no degradación de las proteínas virales de ZIKV como NS5.



Con anterioridad se ha descrito que el residuo K330 de NS5 es una lisina clave en la interacción entre NS5 y NS2B3 (Tay et al., 2016), por lo que su modificación podría variar el efecto de NS2B3 sobre NS5. Sorprendentemente, la propia mutación de K330 de NS5 de ZIKV le ofrece protección a la proteína viral. Incluso recuperando su patrón punteado nuclear que se perdía en presencia de HDAC6 con NS5 “wild type” (Figuras 45). Una posible causa sería el equilibrio en modificaciones postraduccionales de NS5. Dicha lisina se podría ubiquitinar, marcando a NS5 para degradar. Ampliando esta idea, NS5 podría verse favorecida en un ambiente acetilado, ya que, si NS5 actuara como sustrato de HDAC6, y HDAC6 desacetilara NS5, podrían quedar lisinas libres a favor de ubiquitininas o sumo. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos que muestran una mayor acción de los dominios desacetilasas de HDAC6 sobre NS5 en comparación con el dominio BUZ.

En resumen, NS5 y HDAC6 e impide el desarrollo de sus actividades catalíticas y degradativas posiblemente con el fin de evitar el efecto degradativo que ejerce HDAC6 sobre NS5. A su vez, HDAC6 promueve la degradación de la polimerasa viral a través de la vía autofágica dificultando la evasión de la respuesta inmunitaria por parte de NS5 y probablemente también la replicación viral. Además, datos preliminares sugieren un papel clave de las lisinas de NS5 en esta actuación bidireccional entre la proteína celular y la proteína viral. Lo cual muestra la complejidad de la relación entre la célula y el virus, que evolucionan para contrarrestar los efectos opuestos que ejercen el uno sobre el otro.

### **5.3. HDAC6 como factor de restricción viral sobre virus de ARN: VIH-1 y ZIKV.**

Gracias a su gran diversidad y capacidad de rápida adaptación, los virus de ARN como el VIH-1 y el ZIKV, tienen un papel clave en la emergencia y reemergencia viral, suponiendo así un riesgo en la salud pública mundial (Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005; K. E. Jones et al., 2008; Carrasco-Hernandez et al., 2017). Por lo que el estudio de esta clase de virus es importante para conocer su mecanismo de acción y buscar herramientas que permitan tratar la infección viral y/o su erradicación.

La globalización, los cambios socioeconómicos y socioculturales y el cambio climático ha favorecido la interacción del ser humano con nuevos patógenos (A. J. McMichael, 2004; B. A. Jones et al., 2013; Allen et al., 2017). Pero también hay que tener en cuenta el factor viral, que es capaz de evolucionar y adaptarse a un nuevo hospedador y a presiones externas como tratamientos o vacunas, siendo clave las variaciones genéticas que permiten el salto de especie y el escape del sistema inmunitario (Woolhouse et al., 2005; Holmes, 2006). Como consecuencia, los virus ARN son los principales agentes causales de las emergencias y reemergencias virales, ya que poseen una polimerasa que no tiene capacidad de corrección y tienen una alta tasa de replicación, lo que en su conjunto favorece la incorporación de mutaciones en su genoma que le permiten evolucionar en un corto plazo de tiempo (Holland et al., 1982; Domingo et al., 1985; Steinhauer & Holland, 1987; Domingo & Holland, 1997; Domingo, 2000). De igual forma también interviene en dicha evolución su capacidad de recombinación (Lai, 1992; Jung et al., 2002; Shriner et al., 2004; Dixit & Perelson, 2005; W. Li et al., 2006).

La emergencia de estos virus ha supuesto un gran problema sanitario a nivel mundial, causando un gran impacto en la sociedad como ha ocurrido actualmente con la pandemia de SARS-CoV-2. O también con la epidemia del VIH-1, virus que ha afectado gravemente a la sociedad, sobre todo al colectivo homosexual durante el principio de la epidemia, y que actualmente sigue siendo un factor discriminatorio para las personas VIH+ (O'Hare et al., 1996; Piot et al., 2001; Ruel & Campbell, 2006; Kontomanolis et al., 2017; CDC, 2021). Así como también el ZIKV, cuya mayor exposición a nivel mundial se produjo durante los juegos olímpicos del 2016 en Río de Janeiro (M. C. Castro, 2016; WHO, 2016c). Por ello, aparte de investigar posibles fármacos y vacunas contra el virus, también es necesario investigar la biología del virus y su "comportamiento" durante las diferentes etapas de su ciclo viral, ya que podemos encontrar posibles factores de restricción viral que pueden ayudar al control de la infección. Como, por ejemplo, en este caso HDAC6.

---

HDAC6 es una histona desacetilasa que a diferencia de la mayoría de las histonas desacetilasas, se encuentra mayoritariamente en el citoplasma (Verdel et al., 2000; Y. Liu et al., 2012). En el citoplasma ejerce dos funciones imprescindibles en la viabilidad celular como son la dinámica de MT y la autofagia (Kawaguchi et al., 2003; Valenzuela-Fernández et al., 2008; J.-Y. Lee et al., 2010; K. Zheng et al., 2017). A nivel de dinámica de MT HDAC6, interviene en su estabilidad desacetilando la K40 de la subunidad  $\alpha$ -tubulina y desestabilizando así los MT, es decir, promueve su dinámica (Hubbert et al., 2002; Matsuyama, 2002; Y. Zhang et al., 2003). Dicha dinámica es imprescindible en gran número de procesos celulares como la división mitótica, la reorganización de los orgánulos celulares, la adhesión y migración celular, entre otras, pero también interviene en el ciclo viral de diversos virus (Howard & Hyman, 2003; Destaing et al., 2005; Tran et al., 2007; Gudimchuk & McIntosh, 2021). Se ha descrito que HDAC6 inhibe la fase de salida viral del virus Influenza A a través de su actividad desacetilasa, Matloob Husain y Chen-Yi Cheung observaron que HDAC6 impide la hiperacetilación de los MT necesaria para el tráfico de los componentes virales hacia la membrana plasmática (Husain & Cheung, 2014). En este sentido, nuestro laboratorio también ha descrito a HDAC6 como factor de restricción sobre el VIH-1. En un estudio, observaron que HDAC6 forma un complejo con A3G a través de su dominio BUZ (Valera et al., 2015), una desoxicitidina desaminasa antirretroviral que se incorpora en los viriones de VIH-1 e hipermuta el ADN viral durante su retrotranscripción promoviendo su degradación (Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Soros et al., 2007) y que también interviene negativamente en la replicación viral a través de diferentes mecanismos (Esnault et al., 2005; Mbisa et al., 2007; Soros et al., 2007; X. Wang et al., 2012). Este complejo HDAC6-A3G compite con la proteína viral Vif (Valera et al., 2015), que degrada la proteína celular A3G para evitar su incorporación a los viriones nacientes y su actividad de restricción viral y favorecer así el ciclo viral (Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003). En el mismo estudio, observaron que HDAC6 es capaz de unirse directamente a Vif a través de su dominio BUZ y de promover su degradación por autofagia, y con ello controlar la concentración de Vif incorporado en los viriones nacientes y su habilidad infecciosa (Valera et al., 2015). Por otro lado, también describieron en otro estudio a HDAC6 como factor de restricción viral de VIH-1 pero en este caso actuando a nivel de entrada viral. Observaron al infectar las células con el virus VIH-1, que el complejo de Env viral

---

promueve la acetilación de tubulina y que dicha hiperacetilación se ve inhibida con la sobreexpresión de HDAC6. HDAC6 a través de su actividad catalítica desacetilasa inhibe la hiperacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en MT producida por el complejo de Env viral, impidiendo la correcta fusión de membranas e infección viral (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Cabrera-Rodríguez et al., 2019). Así como también se ha descrito que una infección eficiente por VIH-1 se consigue cuando la señalización es tan fuerte que genera una reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de “*capping*” en al menos 20-30% de las células, proceso en el que también interviene HDAC6 (Valenzuela-Fernández et al., 2005; Barrero-Villar et al., 2009; García-Expósito et al., 2013; Santos et al., 2014).

En relación con esta capacidad del complejo de Env viral de unirse al receptor y correceptor celular y su consecuente señalización, fusión de membranas e infección, se ha descrito que los complejos de Env de virus de pacientes LTNP-EC pertenecientes a un “*cluster*” no son capaces de inducir dicha señalización, generando viriones poco infectivos (Casado et al., 2018; Valenzuela-Fernández, Cabrera-Rodríguez, et al., 2022). En nuestro caso, hemos extendido esta conclusión a complejos de Env virales que no pertenecen a un “*cluster*”, los resultados de las Env de nuestro estudio muestran que los complejos de Env de virus pertenecientes a pacientes LTNP (EC y Virémicos) no se unen eficientemente a CD4, impidiendo la correcta señalización y con ello la eficiente fusión de membranas e infección (Figuras 30-32). Sería interesante comprobar si al inhibir HDAC6 y favorecer la estabilización de MT necesaria durante la señalización, estos complejos de Env virales de los grupos LTNP ineficientes en su funcionalidad mejoran su capacidad infectiva temprana; y por el lado contrario, al potenciar la actividad de HDAC6 y promover la desestabilización de los MT, en las Env virales de los grupos P (Antiguos y Modernos) se disminuye su infectividad. Ya que, en un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, se demostró que al actuar sobre la enzima celular HDAC6, se mejora la capacidad infectiva viral del complejo de Env de virus de pacientes controladores de la infección pertenecientes a un “*cluster*” viral. En concreto, se observó que la proteína de unión a ARN nuclear (TDP-43; “*Transactive response DNA binding protein 43 kDa*”) incrementa la cantidad de ARNm y proteína de HDAC6 en la célula, dificultando de dicho modo la infección de VIH-1 al favorecer la desacetilación de

$\alpha$ -tubulina e impedir la formación del poro de fusión. Asimismo, los complejos de Env de virus pertenecientes a los grupos rápidos progresores y virémicos no progresores, que mostraron una correcta funcionalidad y posterior infección, al sobreexpresar TDP-43 disminuyeron su capacidad infectiva. Mientras que al silenciar específicamente el ARNm de TDP-43 se favoreció la infección de los virus que portaban las Env virales de pacientes LTNP-EC (Cabrera-Rodríguez et al., 2022).

HDAC6 ejerce además una función de restricción viral sobre ZIKV al promover la degradación de NS5 (Figura 39). En este sentido, HDAC6 podría estar actuando en dos niveles del ciclo viral. Por un lado, podría actuar a nivel replicativo al disminuir los niveles de la polimerasa viral (B. Zhao et al., 2017), y, por otro lado, también podría actuar a nivel de evasión de la respuesta inmunitaria, impidiendo la localización de NS5 en los SUMO NB, necesaria para evitar la respuesta antiviral del IFN (Ng et al., 2019; Conde et al., 2020). Además, NS5 también actúa sobre HDAC6 estabilizando a sus sustratos, e impidiendo que los niveles endógenos de HDAC6 ejerzan sus principales funciones desacetilasa y autofágica sobre MT y p62, respectivamente (Figuras 37 y 38), lo que demuestra la existencia de un equilibrio dinámico entre la proteína viral NS5 y la proteína celular HDAC6, condicionado por sus niveles de expresión y funciones. A su vez, también se han obtenido resultados preliminares que muestran como la proteasa NS2B3 ayuda en la estabilidad de NS5, contrarrestando en cierta medida la actividad anti-NS5 de HDAC6 (Figura 45). Por lo que, en un contexto de infección por ZIKV y/o en presencia de otras proteínas virales, puede ser que la dinámica entre NS5 y HDAC6 tienda más hacia un lado u otro, como se ha visto al añadir en la ecuación el complejo proteasa NS2B3 del ZIKV.

Nuestro trabajo pone de manifiesto la importancia de HDAC6 como factor de restricción antiviral. Afectando en diferentes fases del ciclo viral, como en este caso, en la regulación de la capacidad de fusión y entrada viral del complejo Env de VIH-1 y en la degradación de la polimerasa viral NS5 de ZIKV impidiendo su acción en la evasión de la respuesta inmunitaria y su efecto citotóxico sobre los MT y la proteína autofágica p62. Además, es un ejemplo de la importancia de la colaboración y la divulgación de conocimientos entre diferentes campos de la ciencia, ya que por ejemplo en nuestro

caso encontramos un factor de restricción celular que puede afectar a dos virus ARN+ diferentes, un retrovirus y un flavivirus, influyendo en ambos casos en su ciclo viral gracias a su actividad desacetilasa y proautofágica.

En resumen, nuestros datos apoyan la hipótesis de que HDAC6 es un factor antiviral de virus ARN+, capaz de controlar la infección y citotoxicidad asociada a VIH-1 y Zika.

## **6. CONCLUSIONES**





---

## 6. Conclusiones.

### VIH-1:

1. El complejo de Envoltura de virus VIH-1 aislados de individuos VIH-1+ LTNP-EC, que de forma natural controlan la infección viral, son deficientes en su capacidad de unión a CD4, fusión, transmisión de material viral e infectividad. Y, por otro lado, las Envolturas funcionales se encuentran en virus de pacientes Progresores.
2. La funcionalidad del complejo Envoltura correlaciona con la evolución y diversidad viral respecto al MRCA.
3. Existe una tendencia de los complejos de Envoltura del VIH-1 a ganar longitud y sitios de glicosilación, en los bucles de su subunidad gp120, a lo largo de la epidemia, correlacionándose con ganancia de función viral.
4. Por tanto, existe una correlación directa entre la eficacia funcional del complejo de Envoltura de virus VIH-1 aislados de pacientes y el perfil clínico de estos.

### ZIKV:

5. La polimerasa NS5 del ZIKV actúa como reorganizador y estabilizador del citoesqueleto de tubulina, así como también del flujo autofágico celular, estabilizando el factor p62, dificultando la acción del HDAC6 endógeno.
6. HDAC6 promueve la degradación vía agresoma-autofagia de NS5, siendo importante, en dicho proceso, su actividad desacetilasa y el dominio BUZ.
7. El complejo proteasa viral NS2B3 protege a NS5 de su degradación autofágica mediada por HDAC6, asegurando su localización nuclear.
8. El residuo de lisina 330 de la proteína NS5 del ZIKV es clave en la estabilización de la proteína viral, y el equilibrio funcional NS5-NS2B3 / NS5-HDAC6.
9. El equilibrio que se establece, a nivel de expresión proteica y funcional sobre RIG-I, entre la proteína viral NS5 y la proteína celular HDAC6 condiciona la activación de la vía del IFN, mecanismo indispensable en la evasión de la respuesta inmunitaria por parte del ZIKV.

En resumen, estos datos demuestran la capacidad de HDAC6 de dificultar o impedir la infección de virus ARN+ como el VIH-1 y ZIKV, actuando en diferentes etapas del proceso infeccioso como un factor de restricción antiviral.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. Bibliografía.

- Ackermann, M., & Padmanabhan, R. (2001). De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39926–39937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104248200>
- Adam, A., Fontes-Garfias, C. R., Sarathy, V. v., Liu, Y., Luo, H., Davis, E., Li, W., Muruato, A. E., Wang, B., Ahatov, R., Mahmoud, Y., Shan, C., Osman, S. R., Widen, S. G., Barrett, A. D. T., Shi, P.-Y., & Wang, T. (2021). A genetically stable Zika virus vaccine candidate protects mice against virus infection and vertical transmission. *Npj Vaccines*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00288-6>
- Adam, A., Lee, C., & Wang, T. (2023). Rational Development of Live-Attenuated Zika Virus Vaccines. *Pathogens*, 12(2), 194. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020194>
- Aebi, M., Fäh, J., Hurt, N., Samuel, C. E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., & Staeheli, P. (1989). cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5062–5072. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.5062-5072.1989>
- Ahn, J., Hao, C., Yan, J., DeLucia, M., Mehrens, J., Wang, C., Gronenborn, A. M., & Skowronski, J. (2012). HIV/Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Accessory Virulence Factor Vpx Loads the Host Cell Restriction Factor SAMHD1 onto the E3 Ubiquitin Ligase Complex CRL4DCAF1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12550–12558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340711>
- Aid, M., Dupuy, F. P., Moysi, E., Moir, S., Haddad, E. K., Estes, J. D., Sekaly, R. P., Petrovas, C., & Ribeiro, S. P. (2018). Follicular CD4 T Helper Cells As a Major HIV Reservoir Compartment: A Molecular Perspective. *Frontiers in Immunology*, 9, 895. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00895>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Albers, J. W., Donofrio, P. D., & McGonagle, T. K. (1985). Sequential electrodiagnostic abnormalities in acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle & Nerve*, 8(6), 528–539. <https://doi.org/10.1002/mus.880080609>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5th ed.). Garland Science.
- Alcoba-Florez, J., Muñoz-Barrera, A., Ciuffreda, L., Rodríguez-Pérez, H., Rubio-Rodríguez, L. A., Gil-Campesino, H., García-Martínez de Artola, D., Íñigo-Campos, A., Díez-Gil, O., González-Montelongo, R., Valenzuela-Fernández, A., Lorenzo-Salazar, J. M., & Flores, C. (2022). A draft of the first genome sequence of Monkeypox virus associated with the multi-country outbreak in May 2022 from the Canary Islands, Spain. *Virological (Monkeypox / Genome Reports)*. <https://doi.org/https://virological.org/t/a-draft-of-the-first-genome-sequence-of-monkeypox-virus-associated-with-the-multi-country-outbreak-in-may-2022-from-the-canary-islands-spain/864>
- Aldana-Masangkay, G. I., & Sakamoto, K. M. (2011). The Role of HDAC6 in Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/875824>

- Alexaki, A., Liu, Y., & Wigdahl, B. (2008). Cellular Reservoirs of HIV-1 and their Role in Viral Persistence. *Current HIV Research*, 6(5), 388–400.  
<https://doi.org/10.2174/157016208785861195>
- Allen, T., Murray, K. A., Zambrana-Torrel, C., Morse, S. S., Rondinini, C., di Marco, M., Breit, N., Olival, K. J., & Daszak, P. (2017). Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature Communications*, 8(1), 1124.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8>
- Almeida, J. R., Price, D. A., Papagno, L., Arkoub, Z. A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T. E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Marcelin, A.-G., Douek, D., Autran, B., & Appay, V. (2007). Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2473–2485.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20070784>
- Almond, N. (1999). Live attenuated SIV; a model of a vaccine for AIDS. *Immunology Letters*, 66(1–3), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00153-9)
- Al-Obaidi, M. M. J., Bahadoran, A., Wang, S. M., Manikam, R., Raju, CH. S., & Sekaran, S. D. (2018). Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system. *Acta Virologica*, 62(01), 16–27.  
[https://doi.org/10.4149/av\\_2018\\_102](https://doi.org/10.4149/av_2018_102)
- Alonso, C., Miskin, J., Hernández, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., & Escribano, J. M. (2001). African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein. *Journal of Virology*, 75(20), 9819–9827.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9819-9827.2001>
- Ambrose, R. L., & Mackenzie, J. M. (2015). Conserved amino acids within the N-terminus of the West Nile virus NS4A protein contribute to virus replication, protein stability and membrane proliferation. *Virology*, 481, 95–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.045>
- Ambrose, Z., & Aiken, C. (2014). HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*, 454–455, 371–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.004>
- Ansari, M. S. Z., Stagni, V., Iuzzolino, A., Rotili, D., Mai, A., Del Bufalo, D., Lavia, P., Degrossi, F., & Trisciuglio, D. (2023). Pharmacological targeting of CBP/p300 drives a redox/autophagy axis leading to senescence-induced growth arrest in non-small cell lung cancer cells. *Cancer gene therapy*, 30(1), 124–136.  
<https://doi.org/10.1038/s41417-022-00524-8>
- Appay, V., & Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of Pathology*, 214(2), 231–241.  
<https://doi.org/10.1002/path.2276>
- Araujo, A. Q. C., Silva, M. T. T., & Araujo, A. P. Q. C. (2016). Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain*, 139(8), 2122–2130.  
<https://doi.org/10.1093/brain/aww158>
- Aravamudhan, P., Raghunathan, K., Konopka-Anstadt, J., Pathak, A., Sutherland, D. M., Carter, B. D., & Dermody, T. S. (2020). Reovirus uses macropinocytosis-mediated entry and fast axonal transport to infect neurons. *PLOS Pathogens*, 16(2), e1008380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008380>

- Ardley, H. C., Scott, G. B., Rose, S. A., Tan, N. G. S., Markham, A. F., & Robinson, P. A. (2003). Inhibition of Proteasomal Activity Causes Inclusion Formation in Neuronal and Non-Neuronal Cells Overexpressing Parkin. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(11), 4541–4556. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0078>
- Arias, E., & Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology*, *23*(2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.009>
- Arias, J. F., Heyer, L. N., von Bredow, B., Weisgrau, K. L., Moldt, B., Burton, D. R., Rakasz, E. G., & Evans, D. T. (2014). Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(17), 6425–6430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321507111>
- Ascher, M. S., & Sheppard, H. W. (1988). AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clinical and Experimental Immunology*, *73*(2), 165–167.
- Ashwal, S., Michelson, D., Plawner, L., & Dobyns, W. B. (2009). Practice Parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review) [RETIRED]. *Neurology*, *73*(11), 887–897. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b783f7>
- Avettand-Fènoël, V., Hocqueloux, L., Ghosn, J., Cheret, A., Frange, P., Melard, A., Viard, J.-P., & Rouzioux, C. (2016). Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, *29*(4), 859–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-16>
- Azhar, E. I., Hui, D. S. C., Memish, Z. A., Drosten, C., & Zumla, A. (2019). The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infectious Disease Clinics of North America*, *33*(4), 891–905. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.001>
- Baba, T. W., Liska, V., Khimani, A. H., Ray, N. B., Dailey, P. J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M. F., McClure, H. M., Martin, L. N., & Ruprecht, R. M. (1999). Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nature Medicine*, *5*(2), 194–203. <https://doi.org/10.1038/5557>
- Balasubramaniam, M., Pandhare, J., & Dash, C. (2019). Immune Control of HIV. *Journal of Life Sciences (Westlake Village, Calif.)*, *1*(1), 4–37.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, *35*(3), 235–241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- Barbelanne, M., & Tsang, W. Y. (2014). Molecular and Cellular Basis of Autosomal Recessive Primary Microcephaly. *BioMed Research International*, *2014*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/547986>
- Barbour, A. G., & Fish, D. (1993). The Biological and Social Phenomenon of Lyme Disease. *Science*, *260*(5114), 1610–1616. <https://doi.org/10.1126/science.8503006>
- Barouch, D. H., Kunstman, J., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Santra, S., Peyerl, F. W., Krivulka, G. R., Beaudry, K., Lifton, M. A., Gorgone, D. A., Montefiori, D. C., Lewis, M. G., Wolinsky, S. M., & Letvin, N. L. (2002). Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, *415*(6869), 335–339. <https://doi.org/10.1038/415335a>
- Barrero-Villar, M., Cabrero, J. R., Gordón-Alonso, M., Barroso-González, J., Álvarez-Losada, S., Muñoz-Fernández, M. A., Sánchez-Madrid, F., & Valenzuela-Fernández, A. (2009). Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin

- redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *Journal of Cell Science*, *122*(1), 103–113. <https://doi.org/10.1242/jcs.035873>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, *118*(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Bartelma, G., & Padmanabhan, R. (2002). Expression, Purification, and Characterization of the RNA 5'-Triphosphatase Activity of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3. *Virology*, *299*(1), 122–132. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1504>
- Barton, K., Winkelmann, A., & Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends in Microbiology*, *24*(5), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.006>
- Bauer, N. C., Doetsch, P. W., & Corbett, A. H. (2015). Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*, *16*(10), 1039–1061. <https://doi.org/10.1111/tra.12310>
- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., Marques, E. T. D. A., Cherry, S., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2016). Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, *19*(5), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>
- Bayless, N. L., Greenberg, R. S., Swigut, T., Wysocka, J., & Blish, C. A. (2016). Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host & Microbe*, *20*(4), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.006>
- Bazzaro, M., Lin, Z., Santillan, A., Lee, M. K., Wang, M.-C., Chan, K. C., Bristow, R. E., Mazitschek, R., Bradner, J., & Roden, R. B. S. (2008). Ubiquitin Proteasome System Stress Underlies Synergistic Killing of Ovarian Cancer Cells by Bortezomib and a Novel HDAC6 Inhibitor. *Clinical Cancer Research*, *14*(22), 7340–7347. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0642>
- Becquart, P., Wauquier, N., Nkoghe, D., Ndjoyi-Mbiguino, A., Padilla, C., Souris, M., & Leroy, E. M. (2010). Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infectious Diseases*, *10*(1), 356. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-356>
- Bello, G., Casado, C., García, S., Rodríguez, C., del Romero, J., & López-Galíndez, C. (2004). Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *Journal of General Virology*, *85*(2), 399–407. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19365-0>
- Benarroch, D., Selisko, B., Locatelli, G. A., Maga, G., Romette, J.-L., & Canard, B. (2004). The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*, *328*(2), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.004>
- Bence, N. F., Sampat, R. M., & Kopito, R. R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science*, *292*(5521), 1552–1555. <https://doi.org/10.1126/science.292.5521.1552>
- Bernatchez, J. A., Tran, L. T., Li, J., Luan, Y., Siqueira-Neto, J. L., & Li, R. (2020). Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(2), 470–489. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00775>



- Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, *19*(13). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
- Best, S. M. (2017). The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *Journal of Virology*, *91*(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01970-16>
- Bhatnagar, J., Rabeneck, D. B., Martines, R. B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L. B. C., Suzuki, T., Ritter, J., Keating, M. K., Hale, G., Gary, J., Muehlenbachs, A., Lambert, A., Lanciotti, R., Oduyebo, T., Meaney-Delman, D., Bolaños, F., Saad, E. A. P., Shieh, W.-J., & Zaki, S. R. (2017). Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(3), 405–414. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161499>
- Bhatt, S., Puli, L., & Patil, C. R. (2021). Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, *26*(3), 794–803. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.12.004>
- Bick, M. J., Carroll, J.-W. N., Gao, G., Goff, S. P., Rice, C. M., & MacDonald, M. R. (2003). Expression of the Zinc-Finger Antiviral Protein Inhibits Alphavirus Replication. *Journal of Virology*, *77*(21), 11555–11562. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11555-11562.2003>
- Bieniasz, P. D. (1997). HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *The EMBO Journal*, *16*(10), 2599–2609. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2599>
- Biggar, R. J., Chaturvedi, A. K., Goedert, J. J., & Engels, E. A. (2007). AIDS-Related Cancer and Severity of Immunosuppression in Persons With AIDS. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *99*(12), 962–972. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm010>
- Bignell, G. R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P. J., Lakhani, S. R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D. G., Schrandt-Stumpel, C., Beemer, F. A., ... Stratton, M. R. (2000). Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nature Genetics*, *25*(2), 160–165. <https://doi.org/10.1038/76006>
- Bilgrami, M., & O'keefe, P. (2014). *Neurologic diseases in HIV-infected patients* (pp. 1321–1344). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00090-0>
- Binarová, P., & Tuszynski, J. (2019). Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells*, *8*(10), 1294. <https://doi.org/10.3390/cells8101294>
- Bjørkøy, G., Lamark, T., & Johansen, T. (2006). p62/SQSTM1: A Missing Link between Protein Aggregates and the Autophagy Machinery. *Autophagy*, *2*(2), 138–139. <https://doi.org/10.4161/auto.2.2.2405>
- Blanco, J., Barretina, J., Clotet, B., & Esté, J. A. (2004). R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. *Journal of Leukocyte Biology*, *76*(4), 804–811. <https://doi.org/10.1189/jlb.0204100>
- Blankson, J. N., Persaud, D., & Siliciano, R. F. (2002). The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection. *Annual Review of Medicine*, *53*(1), 557–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104024>

- Blower, S. M., Koelle, K., Kirschner, D. E., & Mills, J. (2001). Live attenuated HIV vaccines: Predicting the tradeoff between efficacy and safety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(6), 3618–3623. <https://doi.org/10.1073/pnas.061029998>
- Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., & Janke, C. (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, *29*(10), 804–819. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.004>
- Boggs, A. E., Vitolo, M. I., Whipple, R. A., Charpentier, M. S., Goloubeva, O. G., Ioffe, O. B., Tuttle, K. C., Slovic, J., Lu, Y., Mills, G. B., & Martin, S. S. (2015).  $\alpha$ -Tubulin Acetylation Elevated in Metastatic and Basal-like Breast Cancer Cells Promotes Microtentacle Formation, Adhesion, and Invasive Migration. *Cancer Research*, *75*(1), 203–215. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3563>
- Bohan, D., & Maury, W. (2021). Enveloped RNA virus utilization of phosphatidylserine receptors: Advantages of exploiting a conserved, widely available mechanism of entry. *PLOS Pathogens*, *17*(9), e1009899. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009899>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, *87*(2), 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Bouissou, A., Vérollet, C., Sousa, A., Sampaio, P., Wright, M., Sunkel, C. E., Merdes, A., & Raynaud-Messina, B. (2009).  $\gamma$ -Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *Journal of Cell Biology*, *187*(3), 327–334. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905060>
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic*, *9*(8), 1268–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00767.x>
- Bour, S., Schubert, U., & Strebel, K. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *Journal of Virology*, *69*(3), 1510–1520. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.3.1510-1520.1995>
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., & Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, *26*(37), 5468–5476. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210614>
- Bradrick, S. S. (2017). Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02374>
- Brasil, P., Calvet, G. A., Siqueira, A. M., Wakimoto, M., de Sequeira, P. C., Nobre, A., Quintana, M. de S. B., Mendonça, M. C. L. de, Lupi, O., de Souza, R. V., Romero, C., Zogbi, H., Bressan, C. da S., Alves, S. S., Lourenço-de-Oliveira, R., Nogueira, R. M. R., Carvalho, M. S., de Filippis, A. M. B., & Jaenisch, T. (2016). Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(4), e0004636. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004636>

- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., & Douek, D. C. (2004). CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(6), 749–759. <https://doi.org/10.1084/jem.20040874>
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F. X., & Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal*, *23*(4), 728–738. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600064>
- Briggs, J. A. G. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *The EMBO Journal*, *22*(7), 1707–1715. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg143>
- Brinkmann, C., Nehlmeier, I., Walendy-Gnirß, K., Nehls, J., González Hernández, M., Hoffmann, M., Qiu, X., Takada, A., Schindler, M., & Pöhlmann, S. (2016). The Tetherin Antagonism of the Ebola Virus Glycoprotein Requires an Intact Receptor-Binding Domain and Can Be Blocked by GP1-Specific Antibodies. *Journal of Virology*, *90*(24), 11075–11086. <https://doi.org/10.1128/JVI.01563-16>
- Brooks, A. J., Johansson, M., John, A. v., Xu, Y., Jans, D. A., & Vasudevan, S. G. (2002). The Interdomain Region of Dengue NS5 Protein That Binds to the Viral Helicase NS3 Contains Independently Functional Importin  $\beta$ 1 and Importin  $\alpha/\beta$ -Recognized Nuclear Localization Signals. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(39), 36399–36407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204977200>
- Buchbinder, S. P., Katz, M. H., Hessol, N. A., O'Malley, P. M., & Holmberg, S. D. (1994). Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*, *8*(8), 1123–1128. <https://doi.org/10.1097/00002030-199408000-00014>
- Buckley, A., Gaidamovich, S., Turchinskaya, A., & Gould, E. A. (1992). Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells. *Journal of General Virology*, *73*(5), 1125–1130. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1125>
- Burnett, B. G., & Pittman, R. N. (2005). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(12), 4330–4335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407252102>
- Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N., Martinez-Picado, J., Zurakowski, R., Yu, X. G., Telenti, A., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., & Lichtenfeld, M. (2014). Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *Journal of Virology*, *88*(17), 10056–10065. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14>
- Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T. J., Li, J. Z., Pereyra, F., Zurakowski, R., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., Yu, X. G., & Lichtenfeld, M. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, *20*(2), 139–142. <https://doi.org/10.1038/nm.3445>
- Cabral-Romero, C., & Padilla-Noriega, L. (2006). Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *101*(6), 603–611. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600006>

- Cabrera-Rodríguez, R., Hebmann, V., Marfil, S., Pernas, M., Marrero-Hernández, S., Cabrera, C., Urrea, V., Casado, C., Olivares, I., Márquez-Arce, D., Pérez-Yanes, S., Estévez-Herrera, J., Clotet, B., Espert, L., López-Galíndez, C., Biard-Piechaczyk, M., Valenzuela-Fernández, A., & Blanco, J. (2019). HIV-1 envelope glycoproteins isolated from Viremic Non-Progressor individuals are fully functional and cytopathic. *Scientific Reports*, *9*(1), 5544. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42075-3>
- Cabrera-Rodríguez, R., Pérez-Yanes, S., Estévez-Herrera, J., Márquez-Arce, D., Cabrera, C., Espert, L., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2021). The Interplay of HIV and Autophagy in Early Infection. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661446>
- Cabrera-Rodríguez, R., Pérez-Yanes, S., Montelongo, R., Lorenzo-Salazar, J. M., Estévez-Herrera, J., García-Luis, J., Íñigo-Campos, A., Rubio-Rodríguez, L. A., Muñoz-Barrera, A., Trujillo-González, R., Dorta-Guerra, R., Casado, C., Pernas, M., Blanco, J., Flores, C., & Valenzuela-Fernández, A. (2022). Transactive Response DNA-Binding Protein (TARDBP/TDP-43) Regulates Cell Permissivity to HIV-1 Infection by Acting on HDAC6. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 6180. <https://doi.org/10.3390/ijms23116180>
- Cai, X., Chiu, Y.-H., & Chen, Z. J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, *54*(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.040>
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M., de Sequeira, P. C., de Mendonça, M. C. L., de Oliveira, L., Tschoeke, D. A., Schrago, C. G., Thompson, F. L., Brasil, P., dos Santos, F. B., Nogueira, R. M. R., Tanuri, A., & de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Calza, L. (2003). Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(1), 10–14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh013>
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(10), 1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
- Canaud, G., Dejucq-Rainsford, N., Avettand-Fenoël, V., Viard, J.-P., Anglicheau, D., Bienaimé, F., Muorah, M., Galmiche, L., Gribouval, O., Noël, L.-H., Satie, A.-P., Martinez, F., Sberro-Soussan, R., Scemla, A., Gubler, M.-C., Friedlander, G., Antignac, C., Timsit, M.-O., Onetti Muda, A., ... Legendre, C. (2014). The Kidney as a Reservoir for HIV-1 after Renal Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(2), 407–419. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013050564>
- Cantero-Pérez, J., Grau-Expósito, J., Serra-Peinado, C., Rosero, D. A., Luque-Ballesteros, L., Astorga-Gamaza, A., Castellví, J., Sanhueza, T., Tapia, G., Lloveras, B., Fernández, M. A., Prado, J. G., Solé-Sedeno, J. M., Tarrats, A., Lecumberri, C., Mañalich-Barrachina, L., Centeno-Mediavilla, C., Falcó, V., Buzon, M. J., & Genescà, M. (2019). Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nature Communications*, *10*(1), 4739. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12732-2>

- Cao, B., Parnell, L. A., Diamond, M. S., & Mysorekar, I. U. (2017). Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(8), 2303–2313. <https://doi.org/10.1084/jem.20170957>
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., & Ho, D. D. (1995). Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *New England Journal of Medicine*, *332*(4), 201–208. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501263320401>
- Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., ... Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, *387*(10027), 1531–1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A. A., & Musso, D. (2014). Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(6), 1084–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- Cappelletti, G., Calogero, A. M., & Rolando, C. (2021). Microtubule acetylation: A reading key to neural physiology and degeneration. *Neuroscience Letters*, *755*, 135900. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135900>
- Carey, N., & la Thangue, N. B. (2006). Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Current Opinion in Pharmacology*, *6*(4), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.03.010>
- Carnes, S. K., Zhou, J., & Aiken, C. (2018). HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus. *Journal of Virology*, *92*(20). <https://doi.org/10.1128/JVI.00358-18>
- Caron, C., Boyault, C., & Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays*, *27*(4), 408–415. <https://doi.org/10.1002/bies.20210>
- Carrasco-Hernandez, R., Jácome, R., López Vidal, Y., & Ponce de León, S. (2017). Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review. *ILAR Journal*, *58*(3), 343–358. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx026>
- Carro, S. D., & Cherry, S. (2020). Beyond the Surface: Endocytosis of Mosquito-Borne Flaviviruses. *Viruses*, *13*(1), 13. <https://doi.org/10.3390/v13010013>
- Carter, C. C., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L. A., Riddell, J., Bixby, D., Savona, M. R., & Collins, K. L. (2010). HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nature Medicine*, *16*(4), 446–451. <https://doi.org/10.1038/nm.2109>
- Carter, J. B., & Saunders, V. A. (2007). *Virology: Principles and Applications* (1st ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Casado, C., Colombo, S., Rauch, A., Martínez, R., Günthard, H. F., Garcia, S., Rodríguez, C., del Romero, J., Telenti, A., & López-Galíndez, C. (2010). Host and Viral Genetic Correlates of Clinical Definitions of HIV-1 Disease Progression. *PLoS ONE*, *5*(6), e11079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011079>
- Casado, C., Galvez, C., Pernas, M., Tarancon-Diez, L., Rodriguez, C., Sanchez-Merino, V., Vera, M., Olivares, I., de Pablo-Bernal, R., Merino-Mansilla, A., del Romero, J., Lorenzo-Redondo, R., Ruiz-Mateos, E., Salgado, M., Martinez-Picado, J., & Lopez-

- Galindez, C. (2020). Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. *Scientific Reports*, *10*(1), 1902. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58696-y>
- Casado, C., Marrero-Hernández, S., Márquez-Arce, D., Pernas, M., Marfil, S., Borràs-Grañana, F., Olivares, I., Cabrera-Rodríguez, R., Valera, M.-S., de Armas-Rillo, L., Lemey, P., Blanco, J., Valenzuela-Fernández, A., & Lopez-Galíndez, C. (2018). Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers. *MBio*, *9*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02338-17>
- Casado, C., Pernas, M., Alvaro, T., Sandonis, V., García, S., Rodríguez, C., Romero, J. del, Grau, E., Ruiz, L., & Lopez-Galindez, C. (2007). Coinfection and Superinfection in Patients with Long-Term, Nonprogressive HIV-1 Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, *196*(6), 895–899. <https://doi.org/10.1086/520885>
- Casado, C., Pernas, M., Sandonis, V., Alvaro-Cifuentes, T., Olivares, I., Fuentes, R., Martínez-Prats, L., Grau, E., Ruiz, L., Delgado, R., Rodríguez, C., del Romero, J., & López-Galíndez, C. (2013). Identification of a Cluster of HIV-1 Controllers Infected with Low Replicating Viruses. *PLoS ONE*, *8*(10), e77663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077663>
- Casado, C., Urtasun, I., Martín-Walther, M. V., García, S., Rodríguez, C., Romero, J. del, & López-Galíndez, C. (2000). Genetic Analysis of HIV-1 Samples From Spain. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *23*(1), 68–74. <https://doi.org/10.1097/00126334-200001010-00009>
- Casartelli, N., Guivel-Benhassine, F., Bouziat, R., Brandler, S., Schwartz, O., & Moris, A. (2010). The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(1), 39–49. <https://doi.org/10.1084/jem.20091933>
- Castro, C., Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Research*, *107*(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.004>
- Castro, E., Bélair, M., Rizzardi, G. P., Bart, P. A., Pantaleo, G., & Graziosi, C. (2008). Independent Evolution of Hypervariable Regions of HIV-1 gp120: V4 as a Swarm of N-Linked Glycosylation Variants. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *24*(1), 106–113. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0139>
- Castro, M. C. (2016). Zika virus and the 2016 Olympic Games – Evidence-based projections derived from dengue do not support cancellation. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *14*(4), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.06.007>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019, May 21). *Zika Virus*. <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/treatment.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981a). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *30*(21), 250–252.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981b). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *30*(25), 305–308.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020, October 28). *HIV Transmission*. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021, June 1). *HIV Stigma and Discrimination*. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/hiv-stigma/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022a, June 3). *Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP)*. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/prep.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022b, July 25). *Areas with Risk of Zika*. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/files/zika-areas-of-risk.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022c, December 16). *Birth Defects: Microcephaly*. <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/microcephaly.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2023, January 6). *Monkeypox virus cases*. <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/index.html>
- Chaitanya, K. v. (2019). Structure and Organization of Virus Genomes. In *Genome and Genomics* (pp. 1–30). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1_1)
- Chang, T.-H., Liao, C.-L., & Lin, Y.-L. (2006). Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Microbes and Infection*, *8*(1), 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.014>
- Chare, E. R., Gould, E. A., & Holmes, E. C. (2003). Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *Journal of General Virology*, *84*(10), 2691–2703. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19277-0>
- Charneau, P., Borman, A. M., Quillent, C., Guétard, D., Chamaret, S., Cohen, J., Rémy, G., Montagnier, L., & Clavel, F. (1994). Isolation and Envelope Sequence of a Highly Divergent HIV-1 Isolate: Definition of a New HIV-1 Group. *Virology*, *205*(1), 247–253. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1640>
- Chatel-Chaix, L., Fischl, W., Scaturro, P., Cortese, M., Kallis, S., Bartenschlager, M., Fischer, B., & Bartenschlager, R. (2015). A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *Journal of Virology*, *89*(14), 7170–7186. <https://doi.org/10.1128/JVI.00867-15>
- Chaudhary, V., Yuen, K.-S., Chan, J. F.-W., Chan, C.-P., Wang, P.-H., Cai, J.-P., Zhang, S., Liang, M., Kok, K.-H., Chan, C.-P., Yuen, K.-Y., & Jin, D.-Y. (2017). Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *Journal of Virology*, *91*(14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00163-17>
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2007). Downregulation of CD4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is Dependent on Clathrin and Involves Direct Interaction of Nef with the AP2 Clathrin Adaptor. *Journal of Virology*, *81*(8), 3877–3890. <https://doi.org/10.1128/JVI.02725-06>
- Chen, D., & Zhang, H. (2022). Autophagy in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Current Opinion in Physiology*, *29*, 100596. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2022.100596>
- Chen, J.-H., Zhang, R.-H., Lin, S.-L., Li, P.-F., Lan, J.-J., Song, S.-S., Gao, J.-M., Wang, Y., Xie, Z.-J., Li, F.-C., & Jiang, S.-J. (2018). The Functional Role of the 3' Untranslated Region and Poly(A) Tail of Duck Hepatitis A Virus Type 1 in Viral Replication and Regulation of IRES-Mediated Translation. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02250>

- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E., & Greene, W. C. (2001). Duration of Nuclear NF- $\kappa$ B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science*, 293(5535), 1653–1657. <https://doi.org/10.1126/science.1062374>
- Chen, L., Thiruchelvam, M. J., Madura, K., & Richfield, E. K. (2006). Proteasome dysfunction in aged human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 23(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.004>
- Chen, S., Owens, G. C., Makarenkova, H., & Edelman, D. B. (2010). HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE*, 5(5), e10848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010848>
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J.-M. (2009). *Interferons and Their Use in Persistent Viral Infections* (pp. 203–241). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0_8)
- Chiang, J. J., Davis, M. E., & Gack, M. U. (2014). Regulation of RIG-I-like receptor signaling by host and viral proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(5), 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.06.005>
- Chin, K.-C., & Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15125–15130. <https://doi.org/10.1073/pnas.011593298>
- Chin, L., Olzmann, J., & Li, L. (2008). Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. *Current Medicinal Chemistry*, 15(1), 47–60. <https://doi.org/10.2174/092986708783330692>
- Chin, L.-S., Olzmann, J. A., & Li, L. (2010). Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy. *Biochemical Society Transactions*, 38(1), 144–149. <https://doi.org/10.1042/BST0380144>
- Choi, A. M. K., Ryter, S. W., & Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 368(7), 651–662. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>
- Choi, S. J., Lee, H., Kim, J., Park, S. Y., Kim, T., Lee, W., Jang, D., Yoon, J., Choi, Y., Kim, S., Ma, J., Kim, C., Yao, T., Jung, J. U., Lee, J., & Lee, J. (2016). HDAC6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I. *The EMBO Journal*, 35(4), 429–442. <https://doi.org/10.15252/embj.201592586>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Hill, B. J., Douek, D. C., Routy, J.-P., Haddad, E. K., & Sékaly, R.-P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine*, 15(8), 893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. v., & Mann, M. (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*, 325(5942), 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Chun, T., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., Kottlil, S., Moir, S., Mican, J. M., Mullins, J. I., Ward, D. J., Kovacs, J. A., Mannon, P. J., & Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in Gut-Associated Lymphoid Tissue despite Long-Term Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(5), 714–720. <https://doi.org/10.1086/527324>
- Chun, T.-W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A. M., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A., & Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National*



- Academy of Sciences*, 94(24), 13193–13197.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13193>
- Ci, Y., Liu, Z.-Y., Zhang, N.-N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., Yang, W., Qin, C.-F., & Shi, L. (2020). Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *Journal of Cell Biology*, 219(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.201903062>
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R. C., & Lusso, P. (1996). The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nature Medicine*, 2(11), 1244–1247.  
<https://doi.org/10.1038/nm1196-1244>
- Coffin, J. M. (1995). HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science*, 267(5197), 483–489.  
<https://doi.org/10.1126/science.7824947>
- Coffin, J., & Swanstrom, R. (2013). HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), a012526–a012526. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012526>
- Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L., & Randall, G. (2012). Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis C Virus Secretion. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002466>
- Collier, L., Kellam, P., & Oxford, J. (2011). *Human Virology* (4th ed.). Oxford University Press.
- Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A., & Prado, J. G. (2018). Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>
- Conde, J. N., Schutt, W. R., Mladinich, M., Sohn, S.-Y., Hearing, P., & Mackow, E. R. (2020). NS5 Sumoylation Directs Nuclear Responses That Permit Zika Virus To Persistently Infect Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Virology*, 94(19). <https://doi.org/10.1128/JVI.01086-20>
- Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., & Landau, N. R. (1997). Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1-Infected Individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 621–628.  
<https://doi.org/10.1084/jem.185.4.621>
- Coomes, C., Yamamoto, A., McClellan, M., Reid, T. A., Plooster, M., Luxton, G. W. G., Alper, J., Howard, J., & Gardner, M. K. (2016). Mechanism of microtubule lumen entry for the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase enzyme  $\alpha$ TAT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1605397113>
- Corman, V. M., Rasche, A., Baronti, C., Aldabbagh, S., Cadar, D., Reusken, C. B., Pas, S. D., Goorhuis, A., Schinkel, J., Molenkamp, R., Kümmerer, B. M., Bleicker, T., Brünink, S., Eschbach-Bludau, M., Eis-Hübinger, A. M., Koopmans, M. P., Schmidt-Chanasit, J., Grobusch, M. P., de Lamballerie, X., ... Drexler, J. F. (2016). Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(12), 880–892. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.175950>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113–2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>

- Couturier, J., Suliburk, J. W., Brown, J. M., Luke, D. J., Agarwal, N., Yu, X., Nguyen, C., Iyer, D., Kozinetz, C. A., Overbeek, P. A., Metzker, M. L., Balasubramanyam, A., & Lewis, D. E. (2015). Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4<sup>+</sup> T cells and HIV. *AIDS*, *29*(6), 667–674. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000599>
- Coyaud, E., Ranadheera, C., Cheng, D., Gonçalves, J., Dyakov, B. J. A., Laurent, E. M. N., St-Germain, J., Pelletier, L., Gingras, A.-C., Brumell, J. H., Kim, P. K., Safronetz, D., & Raught, B. (2018). Global Interactomics Uncovers Extensive Organellar Targeting by Zika Virus. *Molecular & Cellular Proteomics*, *17*(11), 2242–2255. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR118.000800>
- Cribbs, S. K., Lennox, J., Caliendo, A. M., Brown, L. A., & Guidot, D. M. (2015). Healthy HIV-1-Infected Individuals on Highly Active Antiretroviral Therapy Harbor HIV-1 in Their Alveolar Macrophages. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *31*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0133>
- Crosse, K. M., Monson, E. A., Beard, M. R., & Helbig, K. J. (2018). Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *Journal of Innate Immunity*, *10*(2), 85–93. <https://doi.org/10.1159/000484258>
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G. C., Romero, S., Polonio, C. M., Cunha, I., Freitas, C. L., Brandão, W. N., Rossato, C., Andrade, D. G., Faria, D. de P., Garcez, A. T., Buchpiguel, C. A., ... Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, *534*(7606), 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Curlin, M. E., Zioni, R., Hawes, S. E., Liu, Y., Deng, W., Gottlieb, G. S., Zhu, T., & Mullins, J. I. (2010). HIV-1 Envelope Subregion Length Variation during Disease Progression. *PLoS Pathogens*, *6*(12), e1001228. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001228>
- Cuschieri, L., Miller, R., & Vogel, J. (2006).  $\gamma$ -Tubulin Is Required for Proper Recruitment and Assembly of Kar9–Bim1 Complexes in Budding Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(10), 4420–4434. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0245>
- DAD Study Group, Friis-Møller, N., Reiss, P., Sabin, C. A., Weber, R., Monforte, A., El-Sadr, W., Thiébaud, R., de Wit, S., Kirk, O., Fontas, E., Law, M. G., Phillips, A., & Lundgren, J. D. (2007). Class of Antiretroviral Drugs and the Risk of Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, *356*(17), 1723–1735. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062744>
- DAD Study Group, Sabin, C. A., Worm, S. W., Weber, R., Reiss, P., El-Sadr, W., Dabis, F., de Wit, S., Law, M., D'Arminio Monforte, A., Friis-Møller, N., Kirk, O., Pradier, C., Weller, I., Phillips, A. N., & Lundgren, J. D. (2008). Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *The Lancet*, *371*(9622), 1417–1426. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60423-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60423-7)
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., Xiao, H., Yan, J., Shi, Y., Qin, C.-F., Qi, J., & Gao, G. F. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe*, *19*(5), 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>

- Dallavalle, S., Pisano, C., & Zunino, F. (2012). Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, *84*(6), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.06.014>
- Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fènoël, V., Huot, N., Dejuçq-Rainsford, N., Satie, A.-P., Mélard, A., David, L., Gommet, C., Ghosn, J., Noel, N., Pourcher, G., Martinez, V., Benoist, S., Béréziat, V., Cosma, A., Favier, B., Vaslin, B., Rouzioux, C., ... Bourgeois, C. (2015). Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLOS Pathogens*, *11*(9), e1005153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005153>
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
- Dang, L. V. P., Pham, H. V., Dinh, T. T., Nguyen, T. H., Vu, Q. T. H., Vu, N. T. P., Le, P. T. B., Nguyen, L. van, Le, H. T., Vu, P. T., & Olson, L. (2020). Characterization of envelope sequence of HIV virus in children infected with HIV in Vietnam. *SAGE Open Medicine*, *8*, 205031212093719. <https://doi.org/10.1177/2050312120937198>
- Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P., & Omar, F. (1983). A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(4), 442–445. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90106-2)
- Dave, R. S., Jain, P., & Byrareddy, S. N. (2018). Follicular Dendritic Cells of Lymph Nodes as Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Reservoirs and Insights on Cervical Lymph Node. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00805>
- Davenport, Y. W., West, A. P., & Bjorkman, P. J. (2016). Structure of an HIV-2 gp120 in Complex with CD4. *Journal of Virology*, *90*(4), 2112–2118. <https://doi.org/10.1128/JVI.02678-15>
- Davey, R. T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.-W., Metcalf, J. A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R. A., Adelsberger, J. W., Miller, K. D., Kovacs, J. A., Polis, M. A., Walker, R. E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D. S., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(26), 15109–15114. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15109>
- de Araújo, T. V. B., Rodrigues, L. C., de Alencar Ximenes, R. A., de Barros Miranda-Filho, D., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., Valongueiro, S., de Albuquerque, M. de F. P. M., Souza, W. V., Braga, C., Filho, S. P. B., Cordeiro, M. T., Vazquez, E., di Cavalcanti Souza Cruz, D., Henriques, C. M. P., Bezerra, L. C. A., da Silva Castanha, P. M., Dhalia, R., Marques-Júnior, E. T. A., & Martelli, C. M. T. (2016). Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(12), 1356–1363. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8)
- de Maio, F. A., Risso, G., Iglesias, N. G., Shah, P., Pozzi, B., Gebhard, L. G., Mammi, P., Mancini, E., Yanovsky, M. J., Andino, R., Krogan, N., Srebrow, A., & Gamarnik, A. v. (2016). The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and

- Modulates Splicing. *PLOS Pathogens*, 12(8), e1005841.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005841>
- de Siqueira, I. C., Rodrigues, S. G., Martins, L. C., Vasilakis, N., Novaes, M. A. C., Alcântara, L. C. J., Farias, D. S., do Rosário, M. S., de Jesus, P. A. P., Ko, A. I., & Vasconcelos, P. F. da C. (2016). Guillain–Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), 1157–1160. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0306>
- de Veer, M. J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., Silverman, R. H., & Williams, B. R. G. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(6), 912–920. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.6.912>
- Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>
- Deeks, S. G., & Walker, B. D. (2007). Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*, 27(3), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010>
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Malasit, P., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Immunology*, 17(9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
- Delobel, P., Sandres-Sauné, K., Cazabat, M., L’Faqihi, F.-E., Aquilina, C., Obadia, M., Pasquier, C., Marchou, B., Massip, P., & Izopet, J. (2005). Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naive and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART. *AIDS*, 19(16), 1739–1750. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000183125.93958.26>
- Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Elisabet Garcia, E. G., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J., & Biard-Piechaczyk, M. (2008). HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy*, 4(8), 998–1008. <https://doi.org/10.4161/auto.6880>
- Depetter, Y., Geurs, S., de Vreese, R., Goethals, S., Vandoorn, E., Laevens, A., Steenbrugge, J., Meyer, E., de Tullio, P., Bracke, M., D’hooghe, M., & de Wever, O. (2019). Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models. *International Journal of Cancer*, 145(3), 735–747. <https://doi.org/10.1002/ijc.32169>
- Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 722–737. <https://doi.org/10.1038/nri3532>
- Desrosiers, R. C. (1998). Prospects for live attenuated HIV. *Nature Medicine*, 4(9), 982–982. <https://doi.org/10.1038/1949>
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., & Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *Journal of Cell Science*, 118(13), 2901–2911. <https://doi.org/10.1242/jcs.02425>
- Diallo, D., Sall, A. A., Diagne, C. T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., Hanley, K. A., Buenemann, M., Weaver, S. C., & Diallo, M. (2014). Zika Virus Emergence in Mosquitoes in

- Southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE*, 9(10), e109442.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109442>
- Dick, G. W. A. (1952). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 521–534.  
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90043-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90043-6)
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Diefenbach, R. J., Davis, A., Miranda-Saksena, M., Fernandez, M. A., Kelly, B. J., Jones, C. A., LaVail, J. H., Xue, J., Lai, J., & Cunningham, A. L. (2016). The Basic Domain of Herpes Simplex Virus 1 pUS9 Recruits Kinesin-1 To Facilitate Egress from Neurons. *Journal of Virology*, 90(4), 2102–2111. <https://doi.org/10.1128/JVI.03041-15>
- Diehl, W. E., Lin, A. E., Grubaugh, N. D., Carvalho, L. M., Kim, K., Kyawe, P. P., McCauley, S. M., Donnard, E., Kucukural, A., McDonel, P., Schaffner, S. F., Garber, M., Rambaut, A., Andersen, K. G., Sabeti, P. C., & Luban, J. (2016). Ebola Virus Glycoprotein with Increased Infectivity Dominated the 2013–2016 Epidemic. *Cell*, 167(4), 1088–1098.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.014>
- Dietschy, T., Shevelev, I., Pena-Diaz, J., Hühn, D., Kuenzle, S., Mak, R., Miah, M. F., Hess, D., Fey, M., Hottiger, M. O., Janscak, P., & Stagljar, I. (2009). p300-mediated acetylation of the Rothmund-Thomson-syndrome gene product RECQL4 regulates its subcellular localization. *Journal of Cell Science*, 122(8), 1258–1267.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.037747>
- Ding, B., Zhang, G., Yang, X., Zhang, S., Chen, L., Yan, Q., Xu, M., Banerjee, A. K., & Chen, M. (2014). Phosphoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Blocks Autophagosome-Lysosome Fusion to Increase Virus Production. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 564–577. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.004>
- Ding, Q., Gaska, J. M., Douam, F., Wei, L., Kim, D., Balev, M., Heller, B., & Ploss, A. (2018). Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1803406115>
- Dirlikov, E., Kniss, K., Major, C., Thomas, D., Virgen, C. A., Mayshack, M., Asher, J., Mier-y-Teran-Romero, L., Salinas, J. L., Pastula, D. M., Sharp, T. M., Sejvar, J., Johansson, M. A., & Rivera-Garcia, B. (2017). Guillain-Barré Syndrome and Healthcare Needs during Zika Virus Transmission, Puerto Rico, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 134–136. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161290>
- Dixit, N. M., & Perelson, A. S. (2005). HIV dynamics with multiple infections of target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8198–8203.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407498102>
- Domingo, E. (2000). Viruses at the Edge of Adaptation. *Virology*, 270(2), 251–253.  
<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0320>
- Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA Virus Mutations and Fitness for Survival. *Annual Review of Microbiology*, 51(1), 151–178.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151>
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., & Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely

- heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance — a review. *Gene*, *40*(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90017-4)
- Dompierre, J. P., Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelières, F. P., King, S. J., Humbert, S., & Saudou, F. (2007). Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *The Journal of Neuroscience*, *27*(13), 3571–3583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007>
- Donald, C. L., Brennan, B., Cumberworth, S. L., Rezelj, V. v., Clark, J. J., Cordeiro, M. T., Freitas de Oliveira França, R., Pena, L. J., Wilkie, G. S., da Silva Filipe, A., Davis, C., Hughes, J., Varjak, M., Selinger, M., Zuvanov, L., Owsianka, A. M., Patel, A. H., McLauchlan, J., Lindenbach, B. D., ... Kohl, A. (2016). Full Genome Sequence and sRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), e0005048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048>
- Dong, H., Fink, K., Züst, R., Lim, S. P., Qin, C.-F., & Shi, P.-Y. (2014). Flavivirus RNA methylation. *Journal of General Virology*, *95*(4), 763–778. <https://doi.org/10.1099/vir.0.062208-0>
- Dong, X., & Levine, B. (2013). Autophagy and Viruses: Adversaries or Allies? *Journal of Innate Immunity*, *5*(5), 480–493. <https://doi.org/10.1159/000346388>
- Douek, D. C., Picker, L. J., & Koup, R. A. (2003). T Cell Dynamics in HIV-1 Infection. *Annual Review of Immunology*, *21*(1), 265–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141053>
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F., & Chisari, F. v. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(33), 14046–14051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907344106>
- Driggers, R. W., Ho, C.-Y., Korhonen, E. M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A. J., Smura, T., Rosenberg, A., Hill, D. A., DeBiasi, R. L., Vezina, G., Timofeev, J., Rodriguez, F. J., Levanov, L., Razak, J., Iyengar, P., Hennenfent, A., Kennedy, R., Lanciotti, R., du Plessis, A., & Vapalahti, O. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, *374*(22), 2142–2151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824>
- Du, Y., Seibenhener, M. L., Yan, J., Jiang, J., & Wooten, M. C. (2015). aPKC Phosphorylation of HDAC6 Results in Increased Deacetylation Activity. *PLOS ONE*, *10*(4), e0123191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123191>
- Duenas-Decamp, M. J., Peters, P., Burton, D., & Clapham, P. R. (2008). Natural Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to the CD4bs Antibody b12 Conferred by a Glycan and an Arginine Residue Close to the CD4 Binding Loop. *Journal of Virology*, *82*(12), 5807–5814. <https://doi.org/10.1128/JVI.02585-07>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>

- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, *9*(4), 267–276. <https://doi.org/10.1038/nrg2323>
- Duggal, N. K., & Emerman, M. (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nature Reviews Immunology*, *12*(10), 687–695. <https://doi.org/10.1038/nri3295>
- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daurès, M., John, M., Grangeon, J.-P., & Gourinat, A.-C. (2015). Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(2), 381–382. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141553>
- Egloff, M.-P., Decroly, E., Malet, H., Selisko, B., Benarroch, D., Ferron, F., & Canard, B. (2007). Structural and Functional Analysis of Methylation and 5'-RNA Sequence Requirements of Short Capped RNAs by the Methyltransferase Domain of Dengue Virus NS5. *Journal of Molecular Biology*, *372*(3), 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.005>
- Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A. S., Schraner, E. M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O. R., & Ackermann, M. (2012). Rotavirus Viroplasm Fusion and Perinuclear Localization Are Dynamic Processes Requiring Stabilized Microtubules. *PLoS ONE*, *7*(10), e47947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047947>
- Eisele, E., & Siliciano, R. F. (2012). Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*, *37*(3), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.010>
- El-Atrouni, W., Berbari, E., & Temesgen, Z. (2006). HIV-associated opportunistic infections. Bacterial infections. *Le Journal Medical Libanais. The Lebanese Medical Journal*, *54*(2), 80–83.
- Elliott, G., & O'Hare, P. (1998). Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein VP22 Induces the Stabilization and Hyperacetylation of Microtubules. *Journal of Virology*, *72*(8), 6448–6455. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6448-6455.1998>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- English, L., Chemali, M., & Desjardins, M. (2009). Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. *Autophagy*, *5*(7), 1026–1029. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9163>
- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T., & Schwartz, O. (2005). APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature*, *433*(7024), 430–433. <https://doi.org/10.1038/nature03238>
- Esper, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V., & Biard-Piechaczyk, M. (2009). Differential Role of Autophagy in CD4 T Cells and Macrophages during X4 and R5 HIV-1 Infection. *PLoS ONE*, *4*(6), e5787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005787>
- Estévez-Herrera, J., Pérez-Yanes, S., Cabrera-Rodríguez, R., Márquez-Arce, D., Trujillo-González, R., Machado, J.-D., Madrid, R., & Valenzuela-Fernández, A. (2021). Zika Virus Pathogenesis: A Battle for Immune Evasion. *Vaccines*, *9*(3), 294. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030294>

- Everett, R. D., Boutell, C., & Hale, B. G. (2013). Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(6), 400–411. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3015>
- Fanale, D., Bronte, G., Passiglia, F., Calò, V., Castiglia, M., di Piazza, F., Barraco, N., Cangemi, A., Catarella, M. T., Insalaco, L., Listì, A., Maragliano, R., Massihnia, D., Perez, A., Toia, F., Cicero, G., & Bazan, V. (2015). Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option? *Analytical Cellular Pathology*, *2015*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2015/690916>
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2012). The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. In *N Engl J Med* (Vol. 366). <https://doi.org/10.1056/NEJMra1108296>
- Fellay, J., Shianna, K. v., Ge, D., Colombo, S., Ledergerber, B., Weale, M., Zhang, K., Gumbs, C., Castagna, A., Cossarizza, A., Cozzi-Lepri, A., de Luca, A., Easterbrook, P., Francioli, P., Mallal, S., Martinez-Picado, J., Miro, J. M., Obel, N., Smith, J. P., ... Goldstein, D. B. (2007). A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science*, *317*(5840), 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1143767>
- Fernandez, J., Portilho, D. M., Danckaert, A., Munier, S., Becker, A., Roux, P., Zambo, A., Shorte, S., Jacob, Y., Vidalain, P.-O., Charneau, P., Clavel, F., & Arhel, N. J. (2015). Microtubule-associated Proteins 1 (MAP1) Promote Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) Intracytoplasmic Routing to the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 4631–4646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.613133>
- Fideli, Ü. S., Allen, S. A., Musonda, R., Trask, S., Hahn, B. H., Weiss, H., Mulenga, J., Kasolo, F., Vermund, S. H., & Aldrovandi, G. M. (2001). Virologic and Immunologic Determinants of Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *17*(10), 901–910. <https://doi.org/10.1089/088922201750290023>
- Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N. K., Cotton, M. F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T. W., Ruprecht, R. M., & Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine*, *1*(2), 129–134. <https://doi.org/10.1038/nm0295-129>
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., & Pavletich, N. P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, *401*(6749), 188–193. <https://doi.org/10.1038/43710>
- Fischer, W., Ganusov, V. v., Giorgi, E. E., Hraber, P. T., Keele, B. F., Leitner, T., Han, C. S., Gleasner, C. D., Green, L., Lo, C.-C., Nag, A., Wallstrom, T. C., Wang, S., McMichael, A. J., Haynes, B. F., Hahn, B. H., Perelson, A. S., Borrow, P., Shaw, G. M., ... Korber, B. T. (2010). Transmission of Single HIV-1 Genomes and Dynamics of Early Immune Escape Revealed by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS ONE*, *5*(8), e12303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012303>
- Fisher, M. (1956). An Unusual Variant of Acute Idiopathic Polyneuritis (Syndrome of Ophthalmoplegia, Ataxia and Areflexia). *New England Journal of Medicine*, *255*(2), 57–65. <https://doi.org/10.1056/NEJM195607122550201>



- Fokke, C., van den Berg, B., Drenthen, J., Walgaard, C., van Doorn, P. A., & Jacobs, B. C. (2014). Diagnosis of Guillain-Barre syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain*, *137*(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/brain/awt285>
- Fontaine, K. A., Leon, K. E., Khalid, M. M., Tomar, S., Jimenez-Morales, D., Dunlap, M., Kaye, J. A., Shah, P. S., Finkbeiner, S., Krogan, N. J., & Ott, M. (2018). The Cellular NMD Pathway Restricts Zika Virus Infection and Is Targeted by the Viral Capsid Protein. *MBio*, *9*(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02126-18>
- Fontes-Garfias, C. R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A. E., Medeiros, D. B. A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C. M., Wakamiya, M., Rossi, S. L., Wang, T., Weaver, S. C., & Shi, P.-Y. (2017). Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Reports*, *21*(5), 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016>
- Foo, K. Y., & Chee, H.-Y. (2015). Interaction between Flavivirus and Cytoskeleton during Virus Replication. *BioMed Research International*, *2015*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/427814>
- Food and Drug Administration (FDA). (2018, May). *Donor Screening Recommendations to Reduce the Risk of Transmission of Zika Virus by Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products*. <https://www.fda.gov/files/vaccines,%20blood%20&%20biologics/published/Donor-Screening-Recommendations-to-Reduce-the-Risk-of-Transmission-of-Zika-Virus-by-Human-Cells--Tissues--and-Cellular-and-Tissue-Based-Products--Guidance-for-Industry.pdf>
- Food and Drug Administration (FDA). (2020, July 8). *HIV Treatment Information for Adults*. <https://www.fda.gov/drugs/hiv-treatment/hiv-treatment-information-adults>
- Foti, M., Mangasarian, A., Pigué, V., Lew, D. P., Krause, K.-H., Trono, D., & Carpentier, J.-L. (1997). Nef-mediated Clathrin-coated Pit Formation. *Journal of Cell Biology*, *139*(1), 37–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.37>
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., Lanciotti, R. S., & Tesh, R. B. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(5), 880–882. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- Frankel, A. D., & Young, J. A. T. (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, *67*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.1>
- Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G. E., Shirreff, G., Hollingsworth, T. D., Alizon, S., & Bonhoeffer, S. (2014). Virulence and Pathogenesis of HIV-1 Infection: An Evolutionary Perspective. *Science*, *343*(6177). <https://doi.org/10.1126/science.1243727>
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*, *7*(12), 1250–1257. <https://doi.org/10.1038/ni1412>
- Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., Missé, D., Gadea, G., Viranaicken, W., & Desprès, P. (2016). The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells

- leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. *Virology*, 493, 217–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>
- Galão, R. P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., & Neil, S. J. D. (2012). Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NF $\kappa$ B-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 633–644.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.007>
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämmer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., García-Sastre, A., & Münz, C. (2009). Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host & Microbe*, 6(4), 367–380.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.005>
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, 397(6718), 436–441. <https://doi.org/10.1038/17130>
- Garcez, P. P., Loiola, E. C., Madeiro da Costa, R., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, J. M., Brindeiro, R., Tanuri, A., & Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352(6287), 816–818. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6116>
- Garcia, R., Marchette, N. J., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika Virus from Aedes Aegypti Mosquitoes in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3), 411–415. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>
- García-Expósito, L., Ziglio, S., Barroso-González, J., de Armas-Rillo, L., Valera, M.-S., Zipeto, D., Machado, J.-D., & Valenzuela-Fernández, A. (2013). Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection. *Retrovirology*, 10(1), 39.  
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-39>
- Garcia-Mata, R., Gao, Y.-S., & Sztul, E. (2002). Hassles with Taking Out the Garbage: Aggravating Aggresomes. *Traffic*, 3(6), 388–396. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30602.x>
- Gasic, I. (2022). Regulation of Tubulin Gene Expression: From Isotype Identity to Functional Specialization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.898076>
- Gatherer, D., & Kohl, A. (2016). Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *Journal of General Virology*, 97(2), 269–273.  
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000381>
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., de Mey, J., MacDonald, M. E., Leßmann, V., Humbert, S., & Saudou, F. (2004). Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell*, 118(1), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018>
- Gibellini, D., Borderi, M., de Crignis, E., Cicola, R., Cimatti, L., Vitone, F., Chiodo, F., & Re, M. C. (2008). HIV-1 DNA load analysis in peripheral blood lymphocytes and monocytes from naïve and HAART-treated individuals. *Journal of Infection*, 56(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.01.001>
- Giorgi, J. V., Hultin, L. E., McKeating, J. A., Johnson, T. D., Owens, B., Jacobson, L. P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D. J., Phair, J. P., Wolinsky, S. M., & Detels, R. (1999). Shorter Survival in Advanced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is

- More Closely Associated with T Lymphocyte Activation than with Plasma Virus Burden or Virus Chemokine Coreceptor Usage. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(4), 859–870. <https://doi.org/10.1086/314660>
- Giraldo, M. I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C., Xie, X., Sturdevant, G. L., Robertson, S. J., McNally, K. L., Meade-White, K., Azar, S. R., Rossi, S. L., Maury, W., Woodson, M., Ramage, H., Johnson, J. R., Krogan, N. J., Morais, M. C., ... Rajsbaum, R. (2020). Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature*, 585(7825), 414–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2457-8>
- Glon, D., Vilmen, G., Perdiz, D., Hernandez, E., Beauclair, G., Quignon, F., Berlioz-Torrent, C., Maréchal, V., Poüs, C., Lussignol, M., & Esclatine, A. (2022). Essential role of hyperacetylated microtubules in innate immunity escape orchestrated by the EBV-encoded BHRF1 protein. *PLoS Pathogens*, 18(3), e1010371. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010371>
- Gluska, S., Zahavi, E. E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., & Perlson, E. (2014). Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathogens*, 10(8), e1004348. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004348>
- Gnanakaran, S., Bhattacharya, T., Daniels, M., Keele, B. F., Hraber, P. T., Lapedes, A. S., Shen, T., Gaschen, B., Krishnamoorthy, M., Li, H., Decker, J. M., Salazar-Gonzalez, J. F., Wang, S., Jiang, C., Gao, F., Swanstrom, R., Anderson, J. A., Ping, L.-H., Cohen, M. S., ... Korber, B. (2011). Recurrent Signature Patterns in HIV-1 B Clade Envelope Glycoproteins Associated with either Early or Chronic Infections. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002209. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002209>
- Go, E. P., Irungu, J., Zhang, Y., Dalpathado, D. S., Liao, H.-X., Sutherland, L. L., Alam, S. M., Haynes, B. F., & Desaire, H. (2008). Glycosylation Site-Specific Analysis of HIV Envelope Proteins (JR-FL and CON-S) Reveals Major Differences in Glycosylation Site Occupancy, Glycoform Profiles, and Antigenic Epitopes' Accessibility. *Journal of Proteome Research*, 7(4), 1660–1674. <https://doi.org/10.1021/pr7006957>
- Goasdoué, K., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Björkman, S. T. (2017). Review: The blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. *Placenta*, 54, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.005>
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2018). Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research*, 254, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>
- Goff, S. P. (2003). Death by Deamination: a novel host restriction system for HIV-1. *Cell*, 114(3), 281–283. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00602-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00602-0)
- Gorochov, G., Neumann, A. U., Kereveur, A., Parizot, C., Li, T., Katlama, C., Karmochkine, M., Raguin, G., Autran, B., & Debré, P. (1998). Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nature Medicine*, 4(2), 215–221. <https://doi.org/10.1038/nm0298-215>
- Gorshkov, K., Shiryaev, S. A., Fertel, S., Lin, Y.-W., Huang, C.-T., Pinto, A., Farhy, C., Strongin, A. Y., Zheng, W., & Terskikh, A. v. (2019). Zika Virus: Origins, Pathological Action, and Treatment Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03252>

- Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C. C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W. S., Schulz, R., & Malim, M. H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, *502*(7472), 559–562. <https://doi.org/10.1038/nature12542>
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., & Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS*, *23*(9), 1163–1169. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832b44c8>
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J., Best, S. M., & García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*, *19*(6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., & Leroy, E. M. (2014). Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(2), e2681. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
- Griffin, J. W., Li, C. Y., Ho, T. W., Tian, M., Gao, C. Y., Xue, P., Mishu, B., Cornblath, D. R., Macko, C., McKhann, G. M., & Asbury, A. K. (1996). Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology*, *39*(1), 17–28. <https://doi.org/10.1002/ana.410390105>
- Griffin, J. W., Li, C. Y., Macko, C., Ho, T. W., Hsieh, S.-T., Xue, P., Wang, F. A., Cornblath, D. R., McKhann, G. M., & Asbury, A. K. (1996). Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neurocytology*, *25*(1), 33–51. <https://doi.org/10.1007/BF02284784>
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. M., & Paul, W. E. (2002). CD4+ T-cell depletion in HIV infection: Are we closer to understanding the cause? *Nature Medicine*, *8*(4), 319–323. <https://doi.org/10.1038/nm0402-319>
- Grozinger, C. M., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(9), 4868–4873. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4868>
- Grulich, A. E., Wan, X., Law, M. G., Coates, M., & Kaldor, J. M. (1999). Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS*, *13*(7), 839–843. <https://doi.org/10.1097/00002030-199905070-00014>
- Gudimchuk, N. B., & McIntosh, J. R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(12), 777–795. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>
- Gundersen, G. G., Khawaja, S., & Bulinski, J. C. (1987). Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *Journal of Cell Biology*, *105*(1), 251–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.251>
- Günthard, H. F., Havlir, D. V., Fiscus, S., Zhang, Z., Eron, J., Mellors, J., Gulick, R., Frost, S. D. W., Brown, A. J. L., Schleif, W., Valentine, F., Jonas, L., Meibohm, A., Ignacio, C. C., Isaacs, R., Gamagami, R., Emini, E., Haase, A., Richman, D. D., & Wong, J. K. (2001). Residual Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in Lymph Nodes and HIV RNA in Genital Secretions and in Cerebrospinal Fluid after Suppression of Viremia for 2 Years. *The Journal of Infectious Diseases*, *183*(9), 1318–1327. <https://doi.org/10.1086/319864>

- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., & Paolo Pandolfi, P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 730–736. <https://doi.org/10.1038/35036365>
- Guo, M., Hui, L., Nie, Y., Tefsen, B., & Wu, Y. (2021). ZIKV viral proteins and their roles in virus-host interactions. *Science China Life Sciences*, 64(5), 709–719. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1818-4>
- Guo, X., Ma, J., Sun, J., & Gao, G. (2007). The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 151–156. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607063104>
- Gupta, R. K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L. E., Mok, H. P., Peppas, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A. M. J., Lee, H., Grant, P., Nastouli, E., Lambert, J., Pace, M., Salasc, F., Monit, C., Innes, A. J., Muir, L., Waters, L., ... Olavarria, E. (2019). HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 568(7751), 244–248. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- Gurdasani, D., Iles, L., Dillon, D. G., Young, E. H., Olson, A. D., Naranbhai, V., Fidler, S., Gkrania-Klotsas, E., Post, F. A., Kellam, P., Porter, K., & Sandhu, M. S. (2014). A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS*, 28(2), 149–162. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000049>
- Gürtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., & Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of Virology*, 68(3), 1581–1585. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.3.1581-1585.1994>
- Hackett, B. A., & Cherry, S. (2018). Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 4246–4251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720032115>
- Hadden, R. D. M., Karch, H., Hartung, H.-P., Zielasek, J., Weissbrich, B., Schubert, J., Weishaupt, A., Cornblath, D. R., Swan, A. V., Hughes, R. A. C., & Toyka, K. V. (2001). Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 56(6), 758–765. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.6.758>
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I., & Goma, L. K. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, 31(1), 57–69.
- Hafer-Macko, C., Hsieh, S.-T., Ho, T. W., Sheikh, K., Cornblath, D. R., Li, C. Y., McKhann, G. M., Asbury, A. K., & Griffin, J. W. (1996). Acute motor axonal neuropathy: An antibody-mediated attack on axolemma. *Annals of Neurology*, 40(4), 635–644. <https://doi.org/10.1002/ana.410400414>
- Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-

- mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4389–4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De, K. M., Cock, & Sharp, P. M. (2000). AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287(5453), 607–614. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.607>
- Haller, O., Staeheli, P., & Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 89(6–7), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.015>
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., & Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, 89(17), 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
- Hammond, J. W., Cai, D., & Verhey, K. J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Current opinion in cell biology*, 20(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.010>
- Han, X., Wang, J., Yang, Y., Qu, S., Wan, F., Zhang, Z., Wang, R., Li, G., & Cong, H. (2021). Zika Virus Infection Induced Apoptosis by Modulating the Recruitment and Activation of Proapoptotic Protein Bax. *Journal of Virology*, 95(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.01445-20>
- Han, Y., Jeong, H. M., Jin, Y.-H., Kim, Y.-J., Jeong, H. G., Yeo, C.-Y., & Lee, K.-Y. (2009). Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(1), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.147>
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 13–20. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
- Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- Hazenbergh, M. D., Hamann, D., Schuitemaker, H., & Miedema, F. (2000). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nature Immunology*, 1(4), 285–289. <https://doi.org/10.1038/79724>
- Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host & Microbe*, 8(5), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>
- Helbig, K. J., Carr, J. M., Calvert, J. K., Wati, S., Clarke, J. N., Eyre, N. S., Narayana, S. K., Fiches, G. N., McCartney, E. M., & Beard, M. R. (2013). Viperin Is Induced following Dengue Virus Type-2 (DENV-2) Infection and Has Anti-viral Actions

- Requiring the C-terminal End of Viperin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2178. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002178>
- Helbig, K. J., Eyre, N. S., Yip, E., Narayana, S., Li, K., Fiches, G., McCartney, E. M., Jangra, R. K., Lemon, S. M., & Beard, M. R. (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*, 54(5), 1506–1517. <https://doi.org/10.1002/hep.24542>
- Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C., & Sodroski, J. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *Journal of Virology*, 65(4), 2119–2123. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.4.2119-2123.1991>
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>
- Henderson, L. J., Johnson, T. P., Smith, B. R., Reoma, L. B., Santamaria, U. A., Bachani, M., Demarino, C., Barclay, R. A., Snow, J., Sacktor, N., Mearthur, J., Letendre, S., Steiner, J., Kashanchi, F., & Nath, A. (2019). Presence of Tat and transactivation response element in spinal fluid despite antiretroviral therapy. *AIDS*, 33(Supplement 2), S145–S157. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002268>
- Henderson, L. J., Reoma, L. B., Kovacs, J. A., & Nath, A. (2020). Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs. *Journal of Virology*, 94(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.00375-19>
- Hendriks, J. C. M., Satten, G. A., van Ameijden, E. J. C., van Druten, H. A. M., Coutinho, R. A., & van Griensven, G. J. P. (1998). The incubation period to AIDS in injecting drug users estimated from prevalent cohort data, accounting for death prior to an AIDS diagnosis. *AIDS*, 12(12), 1537–1544. <https://doi.org/10.1097/00002030-199812000-00017>
- Hertzog, J., Dias Junior, A. G., Rigby, R. E., Donald, C. L., Mayer, A., Sezgin, E., Song, C., Jin, B., Hublitz, P., Eggeling, C., Kohl, A., & Rehwinkel, J. (2018). Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European Journal of Immunology*, 48(7), 1120–1136. <https://doi.org/10.1002/eji.201847483>
- Hideshima, T., Bradner, J. E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S. L., & Anderson, K. C. (2005). Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8567–8572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503221102>
- Hilgenfeld, R. (2016). Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces. *The EMBO Journal*, 35(24), 2631–2633. <https://doi.org/10.15252/embj.201695871>
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., & Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, 339(6223), 389–392. <https://doi.org/10.1038/339389a0>
- HIVinfo. (n.d.). *Clase de medicamentos para VIH/SIDA*. Retrieved January 25, 2023, from <https://clinicalinfo.hiv.gov/es/glossary/clase-de-medicamentos>
- HIVinfo. (2022, April 27). *Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA*. <https://hivinfo.nih.gov/es/understanding-hiv/fact-sheets/medicamentos-contr-el-vih-autorizados-por-la-fda>

- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, *373*(6510), 123–126. <https://doi.org/10.1038/373123a0>
- Ho, T. W., Mishu, B., Li, C. Y., Gao, C. Y., Cornblath, D. R., Griffin, J. W., Asbury, A. K., Blaser, M. J., & McKhann, G. M. (1995). Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, *118*(3), 597–605. <https://doi.org/10.1093/brain/118.3.597>
- Hocqueloux, L., Avettand-Fènoël, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Mélard, A., Niang, M., Mille, C., le Moal, G., Viard, J.-P., & Rouzioux, C. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(5), 1169–1178. <https://doi.org/10.1093/jac/dks533>
- Hoffmann, H.-H., Schneider, W. M., Rozen-Gagnon, K., Miles, L. A., Schuster, F., Razooky, B., Jacobson, E., Wu, X., Yi, S., Rudin, C. M., MacDonald, M. R., McMullan, L. K., Poirier, J. T., & Rice, C. M. (2021). TMEM41B Is a Pan-flavivirus Host Factor. *Cell*, *184*(1), 133-148.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.005>
- Hogan, C. M., & Hammer, S. M. (2001). Host Determinants in HIV Infection and Disease: Part 1: Cellular and Humoral Immune Responses\*. *Annals of Internal Medicine*, *134*(9\_Part\_1), 761. [https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-9\\_Part\\_1-200105010-00013](https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-9_Part_1-200105010-00013)
- Hogg, R. S. (1998). Improved Survival Among HIV-Infected Individuals Following Initiation of Antiretroviral Therapy. *JAMA*, *279*(6), 450. <https://doi.org/10.1001/jama.279.6.450>
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., & VandePol, S. (1982). Rapid Evolution of RNA Genomes. *Science*, *215*(4540), 1577–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7041255>
- Hollenbeck, P. J., & Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, *118*(23), 5411–5419. <https://doi.org/10.1242/jcs.02745>
- Holmes, E. C. (2006). The evolution of viral emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(13), 4803–4804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601166103>
- Honeycutt, J. B., Thayer, W. O., Baker, C. E., Ribeiro, R. M., Lada, S. M., Cao, Y., Cleary, R. A., Hudgens, M. G., Richman, D. D., & Garcia, J. V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nature Medicine*, *23*(5), 638–643. <https://doi.org/10.1038/nm.4319>
- Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., & Eisenman, R. N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(21), 13425–13430. <https://doi.org/10.1073/pnas.172511699>
- Hou, S., Kumar, A., Xu, Z., Airo, A. M., Stryapunina, I., Wong, C. P., Branton, W., Tchesnokov, E., Götte, M., Power, C., & Hobman, T. C. (2017). Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *Journal of Virology*, *91*(16). <https://doi.org/10.1128/JVI.00474-17>
- Hou, W., Cruz-cosme, R., Armstrong, N., Obwolo, L. A., Wen, F., Hu, W., Luo, M.-H., & Tang, Q. (2017). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*, *628*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>



- Howard, J., & Hyman, A. A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, *422*(6933), 753–758. <https://doi.org/10.1038/nature01600>
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S. K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M. P., & Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*, *474*(7353), 658–661. <https://doi.org/10.1038/nature10195>
- Hu, Y., Dong, X., He, Z., Wu, Y., Zhang, S., Lin, J., Yang, Y., Chen, J., An, S., Yin, Y., Shen, Z., Zeng, G., Tian, H., Cai, J., Yang, Y., Guan, H., Wu, J., Li, M., & Zhu, X. (2019). Zika virus antagonizes interferon response in patients and disrupts RIG-I–MAVS interaction through its CARD-TM domains. *Cell & Bioscience*, *9*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0308-9>
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., & Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, *417*(6887), 455–458. <https://doi.org/10.1038/417455a>
- Hughes, R. A., & Cornblath, D. R. (2005). Guillain-Barré syndrome. *The Lancet*, *366*(9497), 1653–1666. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67665-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67665-9)
- Hunt, P. W. (2009). Natural Control of HIV-1 Replication and Long-Term Nonprogression: Overlapping but Distinct Phenotypes. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(11), 1636–1638. <https://doi.org/10.1086/646610>
- Husain, M., & Cheung, C.-Y. (2014). Histone Deacetylase 6 Inhibits Influenza A Virus Release by Downregulating the Trafficking of Viral Components to the Plasma Membrane via Its Substrate, Acetylated Microtubules. *Journal of Virology*, *88*(19), 11229–11239. <https://doi.org/10.1128/JVI.00727-14>
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I. W., Hofmann, W. K., & Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, *360*(7), 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Hyde, J. L., Gillespie, L. K., & Mackenzie, J. M. (2012). Mouse Norovirus 1 Utilizes the Cytoskeleton Network To Establish Localization of the Replication Complex Proximal to the Microtubule Organizing Center. *Journal of Virology*, *86*(8), 4110–4122. <https://doi.org/10.1128/JVI.05784-11>
- International HIV Controllers Study, Pereyra, F., Jia, X., McLaren, P. J., Telenti, A., de Bakker, P. I. W., Walker, B. D., Ripke, S., Brumme, C. J., & et al. (2010). The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science*, *330*(6010), 1551–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1195271>
- Ioos, S., Mallet, H.-P., Leparac Goffart, I., Gauthier, V., Cardoso, T., & Herida, M. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *44*(7), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>
- Isaka, Y., Sato, A., Miki, S., Kawauchi, S., Sakaida, H., Hori, T., Uchiyama, T., Adachi, A., Hayami, M., Fujiwara, T., & Yoshie, O. (1999). Small Amino Acid Changes in the V3 Loop of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Determines the Coreceptor Usage for CXCR4 and CCR5. *Virology*, *264*(1), 237–243. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0006>
- Isogai, S., Morimoto, D., Arita, K., Unzai, S., Tenno, T., Hasegawa, J., Sou, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M., & Tochio, H. (2011). Crystal Structure of the Ubiquitin-associated (UBA) Domain of p62 and Its Interaction with Ubiquitin.

- Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31864–31874.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259630>
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S. E., & Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*, 15(12), 2340–2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., & Tokunaga, K. (2009). HIV-1 Accessory Protein Vpu Internalizes Cell-surface BST-2/Tetherin through Transmembrane Interactions Leading to Lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 35060–35072.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058305>
- Iwata, A., Christianson, J. C., Bucci, M., Ellerby, L. M., Nukina, N., Forno, L. S., & Kopito, R. R. (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37), 13135–13140. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505801102>
- Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A., & Kopito, R. R. (2005). HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40282–40292.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M508786200>
- Jacobs, B. C., Rothbarth, P. H., van der Meché, F. G. A., Herbrink, P., Schmitz, P. I. M., de Klerk, M. A., & van Doorn, P. A. (1998). The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, 51(4), 1110–1115.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.51.4.1110>
- Jaglin, X. H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X. P., Bomont, P., Castelnau-Ptakhine, L., Odent, S., Loget, P., Kossorotoff, M., Snoeck, I., Plessis, G., Parent, P., Beldjord, C., Cardoso, C., ... Chelly, J. (2009). Mutations in the  $\beta$ -tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nature Genetics*, 41(6), 746–752.  
<https://doi.org/10.1038/ng.380>
- Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Current Biology*, 27(23), R1287–R1292.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>
- Jensen, S., & Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, 86(6), 2900–2910. <https://doi.org/10.1128/JVI.05738-11>
- Jhonson, K. M. (1993). Emerging viruses in context: an overview of viral hemorrhagic fevers. In Morse SS (Ed.), *Emerging viruses* (pp. 46–47). New York: Oxford University Press.
- Ji, W., & Luo, G. (2020). Zika virus NS5 nuclear accumulation is protective of protein degradation and is required for viral RNA replication. *Virology*, 541, 124–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.10.010>
- Jia, H., Zhong, Y., Peng, C., & Gong, P. (2022). Crystal Structures of Flavivirus NS5 Guanylyltransferase Reveal a GMP-Arginine Adduct. *Journal of Virology*, 96(14).  
<https://doi.org/10.1128/jvi.00418-22>
- Jiang, D., Guo, H., Xu, C., Chang, J., Gu, B., Wang, L., Block, T. M., & Guo, J.-T. (2008). Identification of Three Interferon-Inducible Cellular Enzymes That Inhibit the

- Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 82(4), 1665–1678.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02113-07>
- Jiang, D., Weidner, J. M., Qing, M., Pan, X.-B., Guo, H., Xu, C., Zhang, X., Birk, A., Chang, J., Shi, P.-Y., Block, T. M., & Guo, J.-T. (2010). Identification of Five Interferon-Induced Cellular Proteins That Inhibit West Nile Virus and Dengue Virus Infections. *Journal of Virology*, 84(16), 8332–8341. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-09>
- Job, D., Valiron, O., & Oakley, B. (2003). Microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00003-0)
- Johansson, M., Brooks, A. J., Jans, D. A., & Vasudevan, S. G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- $\beta$  and the viral helicase, NS3. *Journal of General Virology*, 82(4), 735–745.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-735>
- Johnson, R. P. (1999). Live attenuated AIDS vaccines: Hazards and hopes. *Nature Medicine*, 5(2), 154–155. <https://doi.org/10.1038/5515>
- Johnston, J. A., Illing, M. E., & Kopito, R. R. (2002). Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 53(1), 26–38. <https://doi.org/10.1002/cm.10057>
- Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *Journal of Cell Biology*, 143(7), 1883–1898.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1883>
- Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., & Pfeiffer, D. U. (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8399–8404.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Josefsson, L., von Stockenstrom, S., Faria, N. R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Tan, A., Ho, T., Lemey, P., Shao, W., Hunt, P. W., Somsouk, M., Wylie, W., Douek, D. C., Loeb, L., Custer, J., Hoh, R., Poole, L., ... Palmer, S. (2013). The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.1308313110>
- Joseph, U., Su, Y. C. F., Vijaykrishna, D., & Smith, G. J. D. (2017). The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 11(1), 74–84. <https://doi.org/10.1111/irv.12412>
- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M., & Wileman, T. (2004). Transport of African Swine Fever Virus from Assembly Sites to the Plasma Membrane Is Dependent on Microtubules and Conventional Kinesin. *Journal of Virology*, 78(15), 7990–8001.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.7990-8001.2004>
- Jovasevic, V., Naghavi, M. H., & Walsh, D. (2015). Microtubule plus end-associated CLIP-170 initiates HSV-1 retrograde transport in primary human cells. *Journal of Cell Biology*, 211(2), 323–337. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505123>

- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.-P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., & Meyerhans, A. (2002). Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, *418*(6894), 144–144. <https://doi.org/10.1038/418144a>
- Kang, C., Keller, T. H., & Luo, D. (2017). Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target. *Trends in Microbiology*, *25*(10), 797–808. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.001>
- Kao, C. C., Singh, P., & Ecker, D. J. (2001). De Novo Initiation of Viral RNA-Dependent RNA Synthesis. *Virology*, *287*(2), 251–260. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1039>
- Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1995). Association between NS3 and NS5 Proteins of Dengue Virus Type 2 in the Putative RNA Replicase Is Linked to Differential Phosphorylation of NS5. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(32), 19100–19106. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100>
- Kassaye, S., Johnston, E., McColgan, B., Kantor, R., Zijenah, L., & Katzenstein, D. (2009). Envelope Coreceptor Tropism, Drug Resistance, and Viral Evolution Among Subtype C HIV-1-Infected Individuals Receiving Nonsuppressive Antiretroviral Therapy. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *50*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31818ffdf>
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, *441*(7089), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>
- Kaufmann, B., & Rossmann, M. G. (2011). Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005>
- Kaur, S., Rajoria, P., & Chopra, M. (2022). HDAC6: A unique HDAC family member as a cancer target. *Cellular Oncology*, *45*(5), 779–829. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00704-6>
- Kawaguchi, Y., Ito, A., Appella, E., & Yao, T.-P. (2006). Charge Modification at Multiple C-terminal Lysine Residues Regulates p53 Oligomerization and Its Nucleus-Cytoplasm Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(3), 1394–1400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505772200>
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., & Yao, T.-P. (2003). The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*, *115*(6), 727–738. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00939-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00939-5)
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Keays, D. A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.-J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P. L., Fray, M., Harvey, R. J., Molnár, Z., Piñon, M. C., Dear, N., Valdar, W., Brown, S. D. M., Davies, K. E., Rawlins, J. N. P., Cowan, N. J., Nolan, P., Chelly, J., & Flint, J. (2007). Mutations in  $\alpha$ -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell*, *128*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.017>

- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., & Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *85*(1), 115–122. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01642.x>
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L.-H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., ... Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(21), 7552–7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105>
- Keele, B. F., Tazi, L., Gartner, S., Liu, Y., Burgon, T. B., Estes, J. D., Thacker, T. C., Crandall, K. A., McArthur, J. C., & Burton, G. F. (2008). Characterization of the Follicular Dendritic Cell Reservoir of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, *82*(11), 5548–5561. <https://doi.org/10.1128/JVI.00124-08>
- Kell, A. M., & Gale, M. (2015). RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, *479–480*, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.017>
- Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/6803098>
- Khodiyar, V. K., Maltais, L. J., Sneddon, K. M. B., Smith, J. R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S. K., Harvey, R. J., Lafanechère, L., Murray, J. M., Nogales, E., Piquemal, D., Stanchi, F., Povey, S., & Lovering, R. C. (2007). A revised nomenclature for the human and rodent  $\alpha$ -tubulin gene family. *Genomics*, *90*(2), 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.04.008>
- Kim, N., Kim, M.-J., Sung, P. S., Bae, Y. C., Shin, E.-C., & Yoo, J.-Y. (2016). Interferon-inducible protein SCOTIN interferes with HCV replication through the autolysosomal degradation of NS5A. *Nature Communications*, *7*(1), 10631. <https://doi.org/10.1038/ncomms10631>
- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. v., White, M., Yang, X.-J., & Zhao, Y. (2006). Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. *Molecular Cell*, *23*(4), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.026>
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, *94*(9), 675–686C. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.171082>
- Kitchen, C. M. R., Philpott, S., Burger, H., Weiser, B., Anastos, K., & Suchard, M. A. (2004). Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Usage during Antiretroviral Therapy: a Bayesian Approach. *Journal of Virology*, *78*(20), 11296–11302. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11296-11302.2004>
- Kitrinos, K. M., Hoffman, N. G., Nelson, J. A. E., & Swanstrom, R. (2003). Turnover of env Variable Region 1 and 2 Genotypes in Subjects with Late-Stage Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, *77*(12), 6811–6822. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.12.6811-6822.2003>
- Kitrinos, K. M., Nelson, J. A. E., Resch, W., & Swanstrom, R. (2005). Effect of a Protease Inhibitor-Induced Genetic Bottleneck on Human Immunodeficiency Virus Type 1

- env Gene Populations. *Journal of Virology*, 79(16), 10627–10637.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10627-10637.2005>
- Klaitong, P., & Smith, D. R. (2021). Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses*, 13(10), 2077. <https://doi.org/10.3390/v13102077>
- Kleber de Oliveira, W., Cortez-Escalante, J., de Oliveira, W. T. G. H., do Carmo, G. M. I., Henriques, C. M. P., Coelho, G. E., & Araújo de França, G. V. (2016). Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(9), 242–247. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6509e2>
- Klein, R. S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A. D., Tollett, J., Samuel, M. A., Engle, M., & Diamond, M. S. (2005). Neuronal CXCL10 Directs CD8+ T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. *Journal of Virology*, 79(17), 11457–11466. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005>
- Klema, V., Padmanabhan, R., & Choi, K. (2015). Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*, 7(8), 4640–4656. <https://doi.org/10.3390/v7082837>
- Knyazhanskaya, E., Morais, M. C., & Choi, K. H. (2021). *Flavivirus enzymes and their inhibitors* (pp. 265–303). <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2021.07.006>
- Koenig, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Dal Canto, M. C., Pezeshkpour, G. H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M. A., & Fauci, A. S. (1986). Detection of AIDS Virus in Macrophages in Brain Tissue from AIDS Patients with Encephalopathy. *Science*, 233(4768), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.3016903>
- Kogan, M., & Rappaport, J. (2011). HIV-1 Accessory Protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-25>
- Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L., & Agard, D. A. (2011). Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrm3209>
- Kollman, J. M., Polka, J. K., Zelter, A., Davis, T. N., & Agard, D. A. (2010). Microtubule nucleating  $\gamma$ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*, 466(7308), 879–882. <https://doi.org/10.1038/nature09207>
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature04723>
- Kontomanolis, E. N., Michalopoulos, S., Gkasdaris, G., & Fasoulakis, Z. (2017). The social stigma of HIV-AIDS: society's role. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care, Volume 9*, 111–118. <https://doi.org/10.2147/HIV.S129992>
- Koot, M. (1993). Prognostic Value of HIV-1 Syncytium-Inducing Phenotype for Rate of CD4+ Cell Depletion and Progression to AIDS. *Annals of Internal Medicine*, 118(9), 681. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-9-199305010-00004>
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 524–530. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01852-3)

- Kopito, R. R. (2003). The Missing Linker: An Unexpected Role for a Histone Deacetylase. *Molecular Cell*, *12*(6), 1349–1351. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00498-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00498-2)
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J. S. G., Shi, J., & Lok, S.-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, *533*(7603), 425–428. <https://doi.org/10.1038/nature17994>
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J. M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C. v., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., & Yao, T.-P. (2005). HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell*, *18*(5), 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.021>
- Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2003). Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Research*, *967*(1–2), 152–160. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04243-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04243-9)
- Krishnan, L., & Engelman, A. (2012). Retroviral Integrase Proteins and HIV-1 DNA Integration. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(49), 40858–40866. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.397760>
- Kruize, Z., & Kootstra, N. A. (2019). The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02828>
- Kuenzel, S., Till, A., Winkler, M., Häsler, R., Lipinski, S., Jung, S., Grötzinger, J., Fickenscher, H., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2010). The Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor NLRC5 Is Involved in IFN-Dependent Antiviral Immune Responses. *The Journal of Immunology*, *184*(4), 1990–2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900557>
- Kulpa, D. A., & Chomont, N. (2015). HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *Journal of Virus Eradication*, *1*(2), 59–66.
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A. M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., & Hobman, T. C. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports*, *17*(12), 1766–1775. <https://doi.org/10.15252/embr.201642627>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, *152*(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Kuse, N., Murakoshi, H., Akahoshi, T., Chikata, T., James, K. L., Gatanaga, H., Rowland-Jones, S. L., Oka, S., & Takiguchi, M. (2021). Collaboration of a Detrimental HLA-B\*35:01 Allele with HLA-A\*24:02 in Coevolution of HIV-1 with T Cells Leading to Poorer Clinical Outcomes. *Journal of Virology*, *95*(23). <https://doi.org/10.1128/JVI.01259-21>
- Kusunoki, S., Kaida, K., & Ueda, M. (2008). Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain–Barré syndrome: New aspects of research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1780*(3), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.10.001>

- Kutluay, S. B., Perez-Caballero, D., & Bieniasz, P. D. (2013). Fates of Retroviral Core Components during Unrestricted and TRIM5-Restricted Infection. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003214. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003214>
- Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I., & Deretic, V. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *Journal of Cell Biology*, 186(2), 255–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903070>
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., & Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N. R., Kim, B., & Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature Immunology*, 13(3), 223–228. <https://doi.org/10.1038/ni.2236>
- Lai, M. M. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 61–79. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.61-79.1992>
- Lam, S. K., & Chua, K. B. (2002). Nipah Virus Encephalitis Outbreak in Malaysia. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement\_2), S48–S51. <https://doi.org/10.1086/338818>
- Lamotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., & Delfraissy, J.-F. (2005). HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clinical Infectious Diseases*, 41(7), 1053–1056. <https://doi.org/10.1086/433188>
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Stanfield, S. M., & Duffy, M. R. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Lassen, K. G., Lobritz, M. A., Bailey, J. R., Johnston, S., Nguyen, S., Lee, B., Chou, T., Siliciano, R. F., Markowitz, M., & Arts, E. J. (2009). Elite Suppressor-Derived HIV-1 Envelope Glycoproteins Exhibit Reduced Entry Efficiency and Kinetics. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000377>
- Lauretí, M., Narayanan, D., Rodríguez-Andrés, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Lazear, H. M., Daniels, B. P., Pinto, A. K., Huang, A. C., Vick, S. C., Doyle, S. E., Gale, M., Klein, R. S., & Diamond, M. S. (2015). Interferon-λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Science Translational Medicine*, 7(284). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4304>
- Lazear, H. M., Nice, T. J., & Diamond, M. S. (2015). Interferon-λ: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity*, 43(1), 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.001>



- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, *50*(4), 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- le Tortorec, A., Willey, S., & Neil, S. J. D. (2011). Antiviral Inhibition of Enveloped Virus Release by Tetherin/BST-2: Action and Counteraction. *Viruses*, *3*(5), 520–540. <https://doi.org/10.3390/v3050520>
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., & Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the Absence of the Vif Protein. *Science*, *300*(5622), 1112–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1083338>
- Ledermann, J. P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S. C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., Duffy, M. R., Hancock, W. T., Ho-Chen, T., & Powers, A. M. (2014). *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(10), e3188. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188>
- Ledur, P. F., Karmirian, K., Pedrosa, C. da S. G., Souza, L. R. Q., Assis-de-Lemos, G., Martins, T. M., Ferreira, J. de C. C. G., de Azevedo Reis, G. F., Silva, E. S., Silva, D., Salerno, J. A., Ornelas, I. M., Devalle, S., Madeiro da Costa, R. F., Goto-Silva, L., Higa, L. M., Melo, A., Tanuri, A., Chimelli, L., ... Rehen, S. K. (2020). Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific Reports*, *10*(1), 1218. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57914-x>
- Lee, A. J., & Ashkar, A. A. (2018). The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>
- Lee, H., Ren, J., Nacadello, S., Rice, A. J., Ojeda, I., Light, S., Minasov, G., Vargas, J., Nagarathnam, D., Anderson, W. F., & Johnson, M. E. (2017). Identification of novel small molecule inhibitors against NS2B/NS3 serine protease from Zika virus. *Antiviral Research*, *139*, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.12.016>
- Lee, H.-J., Shin, S. Y., Choi, C., Lee, Y. H., & Lee, S.-J. (2002). Formation and Removal of  $\alpha$ -Synuclein Aggregates in Cells Exposed to Mitochondrial Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(7), 5411–5417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105326200>
- Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N., & Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5817), 1398–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1136880>
- Lee, J.-Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.-S., Pandey, U. B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., Taylor, J. P., Cuervo, A. M., & Yao, T.-P. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*, *29*(5), 969–980. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.405>
- Lee, K. K., & Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(4), 284–295. <https://doi.org/10.1038/nrm2145>
- Lee, L. J., Komarasamy, T. V., Adnan, N. A. A., James, W., & RMT Balasubramaniam, V. (2021). Hide and Seek: The Interplay Between Zika Virus and the Host Immune Response. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750365>

- Lee, Y.-S., Lim, K.-H., Guo, X., Kawaguchi, Y., Gao, Y., Barrientos, T., Ordentlich, P., Wang, X.-F., Counter, C. M., & Yao, T.-P. (2008). The Cytoplasmic Deacetylase HDAC6 Is Required for Efficient Oncogenic Tumorigenesis. *Cancer Research*, *68*(18), 7561–7569. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0188>
- Leitner, T., & Albert, J. (1999). The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(19), 10752–10757. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10752>
- Lempicki, R. A., Kovacs, J. A., Baseler, M. W., Adelsberger, J. W., Dewar, R. L., Natarajan, V., Bosche, M. C., Metcalf, J. A., Stevens, R. A., Lambert, L. A., Alvord, W. G., Polis, M. A., Davey, R. T., Dimitrov, D. S., & Lane, H. C. (2000). Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(25), 13778–13783. <https://doi.org/10.1073/pnas.250472097>
- Leone, P. A. (2006). Early HIV Infection: Recognizing the not so obvious with no time to lose. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*(4), 222–224. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(06\)73766-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(06)73766-1)
- Leonhard, S. E., Bresani-Salvi, C. C., Lyra Batista, J. D., Cunha, S., Jacobs, B. C., Brito Ferreira, M. L., & P. Militão de Albuquerque, M. de F. (2020). Guillain-Barré syndrome related to Zika virus infection: A systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(4), e0008264. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008264>
- Leung, D., Schroder, K., White, H., Fang, N.-X., Stoermer, M. J., Abbenante, G., Martin, J. L., Young, P. R., & Fairlie, D. P. (2001). Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(49), 45762–45771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107360200>
- Leung, D. W., & Amarasinghe, G. K. (2016). When your cap matters: structural insights into self vs non-self recognition of 5' RNA by immunomodulatory host proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *36*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.02.001>
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, *82*(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-08>
- Li, A., Wang, W., Wang, Y., Chen, K., Xiao, F., Hu, D., Hui, L., Liu, W., Feng, Y., Li, G., Tan, Q., Liu, Y., Wu, K., & Wu, J. (2020). NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00051>
- Li, F., Wang, P.-R., Qu, L.-B., Yi, C.-H., Zhang, F.-C., Tang, X.-P., Zhang, L.-G., & Chen, L. (2017). AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. *Emerging Microbes & Infections*, *6*(1), 1–2. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.10>
- Li, G., Bos, S., Tsetsarkin, K., Pletnev, A., Desprès, P., Gadea, G., & Zhao, R. (2019). The Roles of prM-E Proteins in Historical and Epidemic Zika Virus-mediated Infection and Neurocytotoxicity. *Viruses*, *11*(2), 157. <https://doi.org/10.3390/v11020157>
- Li, G., Jiang, H., Chang, M., Xie, H., & Hu, L. (2011). HDAC6  $\alpha$ -tubulin deacetylase: A potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, *304*(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.02.017>

- Li, G.-H., Henderson, L., & Nath, A. (2016). Astrocytes as an HIV Reservoir: Mechanism of HIV Infection. *Current HIV Research*, 14(5), 373–381. <https://doi.org/10.2174/1570162X14666161006121455>
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1999). The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *Journal of Virology*, 73(4), 3108–3116. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.4.3108-3116.1999>
- Li, L., & Yang, X.-J. (2015). Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22), 4237–4255. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2000-5>
- Li, M. I., Wong, P. S. J., Ng, L. C., & Tan, C. H. (2012). Oral Susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001792>
- Li, M., Zhuang, Y., & Shan, B. (2016). *Analysis of Expression and Functions of Histone Deacetylase 6 (HDAC6)* (pp. 85–94). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3667-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3667-0_6)
- Li, Q., & Kang, C. (2021). Structure and Dynamics of Zika Virus Protease and Its Insights into Inhibitor Design. *Biomedicines*, 9(8), 1044. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081044>
- Li, S., Gong, M., Zhao, F., Shao, J., Xie, Y., Zhang, Y., & Chang, H. (2018). Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(5), 2377–2396. <https://doi.org/10.1159/000495897>
- Li, W., Wong, S.-K., Li, F., Kuhn, J. H., Huang, I.-C., Choe, H., & Farzan, M. (2006). Animal Origins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: Insight from ACE2-S-Protein Interactions. *Journal of Virology*, 80(9), 4211–4219. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4211-4219.2006>
- Li, Y., Shin, D., & Kwon, S. H. (2012). Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS Journal*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/febs.12079>
- Lian, X., Gao, C., Sun, X., Jiang, C., Einkauf, K. B., Seiger, K. W., Chevalier, J. M., Yuki, Y., Martin, M., Hoh, R., Peluso, M. J., Carrington, M., Ruiz-Mateos, E., Deeks, S. G., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2021). Signatures of immune selection in intact and defective proviruses distinguish HIV-1 elite controllers. *Science Translational Medicine*, 13(624). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl4097>
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., & Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, 19(5), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Liang, S., Wu, Y.-S., Li, D.-Y., Tang, J.-X., & Liu, H.-F. (2021). Autophagy in Viral Infection and Pathogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.766142>

- Lim, K.-L., & Tan, J. M. (2007). Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochemistry*, *8*(Suppl 1), S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-S1-S13>
- Lima, M. C., Mendonça, L. R. de, Rezende, A. M., Carrera, R. M., Aníbal-Silva, C. E., Demers, M., D'Aiuto, L., Wood, J., Chowdari, K. v., Griffiths, M., Lucena-Araujo, A. R., Barral-Netto, M., Azevedo, E. A. N., Alves, R. W., Farias, P. C. S., Marques, E. T. A., Castanha, P. M. S., Donald, C. L., Kohl, A., ... Franca, R. F. O. (2019). The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01928>
- Lin, H.-H., Yip, B.-S., Huang, L.-M., & Wu, S.-C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004>
- Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J. D., Ma, Z., Yang, L., Pierce, B. G., Tang, Q., & Zhang, Y.-J. (2019). Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology*, *527*, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.009>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). *Molecular biology of flaviviruses* (pp. 23–61). [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59002-9)
- Liu, H. M., Jiang, F., Loo, Y. M., Hsu, S., Hsiang, T. Y., Marcotrigiano, J., & Gale, M., Jr (2016). Regulation of Retinoic Acid Inducible Gene-I (RIG-I) Activation by the Histone Deacetylase 6. *EBioMedicine*, *9*, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.015>
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., & Stiles, J. K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., & Landau, N. R. (1996). Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell*, *86*(3), 367–377. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80110-5)
- Liu, Y., Belkina, N. v., & Shaw, S. (2009). HIV Infection of T Cells: Actin-in and Actin-out. *Science Signaling*, *2*(66). <https://doi.org/10.1126/scisignal.266pe23>
- Liu, Y., Curlin, M. E., Diem, K., Zhao, H., Ghosh, A. K., Zhu, H., Woodward, A. S., Maenza, J., Stevens, C. E., Stekler, J., Collier, A. C., Genowati, I., Deng, W., Zioni, R., Corey, L., Zhu, T., & Mullins, J. I. (2008). Env length and N-linked glycosylation following transmission of human immunodeficiency virus Type 1 subtype B viruses. *Virology*, *374*(2), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.029>
- Liu, Y., Gordesky-Gold, B., Leney-Greene, M., Weinbren, N. L., Tudor, M., & Cherry, S. (2018). Inflammation-Induced, STING-Dependent Autophagy Restricts Zika Virus Infection in the Drosophila Brain. *Cell Host & Microbe*, *24*(1), 57-68.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.022>
- Liu, Y., Peng, L., Seto, E., Huang, S., & Qiu, Y. (2012). Modulation of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Nuclear Import and Tubulin Deacetylase Activity through Acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(34), 29168–29174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371120>

- Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F., & Liang, C. (2013). The Interferon-Inducible MxB Protein Inhibits HIV-1 Infection. *Cell Host & Microbe*, 14(4), 398–410. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.015>
- Loeb, D. D., Hutchison, C. A., Edgell, M. H., Farmerie, W. G., & Swanstrom, R. (1989). Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. *Journal of Virology*, 63(1), 111–121. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.1.111-121.1989>
- Loo, Y.-M., & Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity*, 34(5), 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>
- Louten, J. (2016). Emerging and Reemerging Viral Diseases. In *Essential Human Virology* (pp. 291–310). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00016-8>
- Lowe, R., Barcellos, C., Brasil, P., Cruz, O., Honório, N., Kuper, H., & Carvalho, M. (2018). The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010096>
- Lu, C.-Y., Chang, Y.-C., Hua, C.-H., Chuang, C., Huang, S.-H., Kung, S.-H., Hour, M.-J., & Lin, C.-W. (2017). Tubacin, an HDAC6 Selective Inhibitor, Reduces the Replication of the Japanese Encephalitis Virus via the Decrease of Viral RNA Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 954. <https://doi.org/10.3390/ijms18050954>
- Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S.-L., & Liang, C. (2011). The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, 85(5), 2126–2137. <https://doi.org/10.1128/JVI.01531-10>
- Lucas, G. M. (2005). Antiretroviral adherence, drug resistance, viral fitness and HIV disease progression: a tangled web is woven. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 413–416. <https://doi.org/10.1093/jac/dki042>
- Ludueña, R. F. (1997). *Multiple Forms of Tubulin: Different Gene Products and Covalent Modifications* (pp. 207–275). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62138-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62138-5)
- Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., & Campbell, E. M. (2014). HIV-1 Uncoating Is Facilitated by Dynein and Kinesin 1. *Journal of Virology*, 88(23), 13613–13625. <https://doi.org/10.1128/JVI.02219-14>
- Lum, F.-M., Low, D. K. S., Fan, Y., Tan, J. J. L., Lee, B., Chan, J. K. Y., Rénia, L., Ginhoux, F., & Ng, L. F. P. (2017). Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clinical Infectious Diseases*, 64(7), 914–920. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw878>
- Lundberg, Melén, Westenius, Jiang, Österlund, Khan, Vapalahti, Julkunen, & Kakkola. (2019). Zika Virus Non-Structural Protein NS5 Inhibits the RIG-I Pathway and Interferon Lambda 1 Promoter Activation by Targeting IKK Epsilon. *Viruses*, 11(11), 1024. <https://doi.org/10.3390/v11111024>
- Ma, J., Ketkar, H., Geng, T., Lo, E., Wang, L., Xi, J., Sun, Q., Zhu, Z., Cui, Y., Yang, L., & Wang, P. (2018). Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01350>
- Machyna, M., Heyn, P., & Neugebauer, K. M. (2013). Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), 17–34. <https://doi.org/10.1002/wrna.1139>

- Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P., & Poüs, C. (2013). Autophagy and microtubules – new story, old players. *Journal of Cell Science*, *126*(5), 1071–1080. <https://doi.org/10.1242/jcs.115626>
- Mackeh, R., Lorin, S., Ratier, A., Mejdoubi-Charef, N., Baillet, A., Bruneel, A., Hamäi, A., Codogno, P., Poüs, C., & Perdiz, D. (2014). Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase-1 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17)-dependent microtubule hyperacetylation during cell stress. *The Journal of biological chemistry*, *289*(17), 11816–11828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507400>
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *48*(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)
- MacRae, T. H., & Langdon, C. M. (1989). Tubulin synthesis, structure, and function: what are the relationships? *Biochemistry and Cell Biology*, *67*(11–12), 770–790. <https://doi.org/10.1139/o89-116>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. v, & Clark, D. P. (2009). *Brock Biología de los microorganismos* (12th ed.). Pearson Educación.
- Magiera, M. M., & Janke, C. (2014). Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology*, *24*(9), R351–R354. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.032>
- Majerová, T., Novotný, P., Krýsová, E., & Konvalinka, J. (2019). Exploiting the unique features of Zika and Dengue proteases for inhibitor design. *Biochimie*, *166*, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.05.004>
- Malikov, V., da Silva, E. S., Jovasevic, V., Bennett, G., de Souza Aranha Vieira, D. A., Schulte, B., Diaz-Griffero, F., Walsh, D., & Naghavi, M. H. (2015). HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus. *Nature Communications*, *6*(1), 6660. <https://doi.org/10.1038/ncomms7660>
- Mangeat, B., Gers-Huber, G., Lehmann, M., Zufferey, M., Luban, J., & Pignatelli, V. (2009). HIV-1 Vpu Neutralizes the Antiviral Factor Tetherin/BST-2 by Binding It and Directing Its Beta-TrCP2-Dependent Degradation. *PLoS Pathogens*, *5*(9), e1000574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000574>
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., & Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, *424*(6944), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature01709>
- Mao, J., Lin, E., He, L., Yu, J., Tan, P., & Zhou, Y. (2019). *Autophagy and Viral Infection* (pp. 55–78). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0606-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0606-2_5)
- Mao, Y. S., Zhang, B., & Spector, D. L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics*, *27*(8), 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.006>
- Marmorstein, R. (2001). Structure of Histone Deacetylases: insights into Substrate Recognition and Catalysis. *Structure*, *9*(12), 1127–1133. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00690-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00690-6)
- Marozin, S., Prank, U., & Sodeik, B. (2004). Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell–cell contact sites. *Journal of General Virology*, *85*(4), 775–786. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19530-0>

- Márquez-Jurado, S., Nogales, A., Ávila-Pérez, G., Iborra, F., Martínez-Sobrido, L., & Almazán, F. (2018). An Alanine-to-Valine Substitution in the Residue 175 of Zika Virus NS2A Protein Affects Viral RNA Synthesis and Attenuates the Virus In Vivo. *Viruses*, *10*(10), 547. <https://doi.org/10.3390/v10100547>
- Marrero-Hernández, S., Márquez-Arce, D., Cabrera-Rodríguez, R., Estévez-Herrera, J., Pérez-Yanes, S., Barroso-González, J., Madrid, R., Machado, J.-D., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2019). HIV-1 Nef Targets HDAC6 to Assure Viral Production and Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02437>
- Martines, R. B., Bhatnagar, J., de Oliveira Ramos, A. M., Davi, H. P. F., Iglezias, S. D., Kanamura, C. T., Keating, M. K., Hale, G., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Ritter, J., Gary, J., Rollin, D., Goldsmith, C. S., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Suzuki, T., Luz, K. G., de Oliveira, W. K., ... Zaki, S. R. (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*, *388*(10047), 898–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30883-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30883-2)
- Martines, R. B., Bhatnagar, J., Keating, M. K., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Gary, J., Goldsmith, C., Hale, G., Ritter, J., Rollin, D., Shieh, W.-J., Luz, K. G., Ramos, A. M. de O., Davi, H. P. F., Kleber de Oliveria, W., Lanciotti, R., Lambert, A., & Zaki, S. (2016). Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(06), 159–160. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6506e1>
- Martínez-Hernández, J., Parato, J., Sharma, A., Soleilhac, J.-M., Qu, X., Tein, E., Sproul, A., Andrieux, A., Goldberg, Y., Moutin, M.-J., Bartolini, F., & Peris, L. (2022). Crosstalk between acetylation and the tyrosination/detyrosination cycle of  $\alpha$ -tubulin in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.926914>
- Massey, A. C., Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2006). *Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease* (pp. 205–235). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)73007-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)73007-6)
- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., & Fässler, R. (2006). CylD Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, *125*(4), 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.041>
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology*, *11*(4), 385–396. <https://doi.org/10.1038/ncb1846>
- Matsuyama, A. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, *21*(24), 6820–6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682>
- Matthias, P., Yoshida, M., & Khochbin, S. (2008). HDAC6 a new cellular stress surveillance factor. *Cell Cycle*, *7*(1), 7–10. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5186>
- Mbisa, J. L., Barr, R., Thomas, J. A., Vandegraaff, N., Dorweiler, I. J., Svarovskaia, E. S., Brown, W. L., Mansky, L. M., Gorelick, R. J., Harris, R. S., Engelman, A., & Pathak, V. K. (2007). Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNAs Produced in the Presence of APOBEC3G Exhibit Defects in Plus-Strand DNA Transfer and

- Integration. *Journal of Virology*, 81(13), 7099–7110.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00272-07>
- McArthur, J. C., Brew, B. J., & Nath, A. (2005). Neurological complications of HIV infection. *The Lancet Neurology*, 4(9), 543–555. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70165-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70165-4)
- McCune, J. M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*, 410(6831), 974–979. <https://doi.org/10.1038/35073648>
- McDonald, E. M., Duggal, N. K., Ritter, J. M., & Brault, A. C. (2018). Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), e0006691. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006691>
- McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22147–22159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500>
- McMichael, A., & Hanke, T. (2002). The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nature Reviews Immunology*, 2(4), 283–291. <https://doi.org/10.1038/nri779>
- McMichael, A. J. (2004). Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1447), 1049–1058. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1480>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- McNamara, L. A., Onafuwa-Nuga, A., Sebastian, N. T., Riddell, J., Bixby, D., & Collins, K. L. (2013). CD133+ Hematopoietic Progenitor Cells Harbor HIV Genomes in a Subset of Optimally Treated People With Long-Term Viral Suppression. *Journal of Infectious Diseases*, 207(12), 1807–1816. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit118>
- Mead, P. S., Duggal, N. K., Hook, S. A., Delorey, M., Fischer, M., Olzenak McGuire, D., Becksted, H., Max, R. J., Anishchenko, M., Schwartz, A. M., Tzeng, W.-P., Nelson, C. A., McDonald, E. M., Brooks, J. T., Brault, A. C., & Hinckley, A. F. (2018). Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1377–1385. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1711038>
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., le Charpentier, T., Hafirassou, M. L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., Croupier, M., Missé, D., Jouvenet, N., Tabibiazar, R., Gressens, P., Schwartz, O., & Amara, A. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, 18(2), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., & Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine*, 200(6), 761–770. <https://doi.org/10.1084/jem.20041196>
- Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., & Gabuzda, D. (2004). Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its



- Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7792–7798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313093200>
- Melén, K., Keskinen, P., Ronni, T., Sareneva, T., Lounatmaa, K., & Julkunen, I. (1996). Human MxB Protein, an Interferon- $\alpha$ -inducible GTPase, Contains a Nuclear Targeting Signal and Is Localized in the Heterochromatin Region beneath the Nuclear Envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23478–23486. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23478>
- Mellors, J. W. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Annals of Internal Medicine*, 122(8), 573. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-8-199504150-00003>
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., & Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science*, 272(5265), 1167–1170. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1167>
- Menezes-Neto, A., Castilho, M. da C., Calvet, G. A., Kara, E. O., Bötto-Menezes, C. H. A., Lacerda, M. V. G., Pereira, G. F. M., Giozza, S. P., Bermudez, X. P. D., Lima, N. S., Modjarrad, K., Broutet, N., de Filippis, A. M. B., & Franca, R. F. O. (2020). Zika virus RNA excretion in sweat with concomitant detection in other body fluid specimens. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200339>
- Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijster, M. J., Keet, R. P. M., & Miedema, F. (1992). Programmed Death of T Cells in HIV-1 Infection. *Science*, 257(5067), 217–219. <https://doi.org/10.1126/science.1352911>
- Miedema, F., Tersmette, M., & van Lier, René A. W. (1990). AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunology Today*, 11, 293–297. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90116-Q](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90116-Q)
- Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., Baarle, D. van, Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., & Connors, M. (2002). HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology*, 3(11), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/ni845>
- Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W., Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J., & Connors, M. (2000). HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2709–2714. <https://doi.org/10.1073/pnas.050567397>
- Miller, R. J., Cairns, J. S., Bridges, S., & Sarver, N. (2000). Human Immunodeficiency Virus and AIDS: Insights from Animal Lentiviruses. *Journal of Virology*, 74(16), 7187–7195. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7187-7195.2000>
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8873–8882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200>
- Miner, J. J., Cao, B., Govero, J., Smith, A. M., Fernandez, E., Cabrera, O. H., Garber, C., Noll, M., Klein, R. S., Noguchi, K. K., Mysorekar, I. U., & Diamond, M. S. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, 165(5), 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>

- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Miorin, L., Maestre, A. M., Fernandez-Sesma, A., & García-Sastre, A. (2017). Antagonism of type I interferon by flaviviruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.146>
- Mishra, N., Makhdoomi, M. A., Sharma, S., Kumar, S., Dobhal, A., Kumar, D., Chawla, H., Singh, R., Kanga, U., Das, B. K., Lodha, R., Kabra, S. K., & Luthra, K. (2019). Viral Characteristics Associated with Maintenance of Elite Neutralizing Activity in Chronically HIV-1 Clade C-Infected Monozygotic Pediatric Twins. *Journal of Virology*, 93(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00654-19>
- Miyakawa, K., Ryo, A., Murakami, T., Ohba, K., Yamaoka, S., Fukuda, M., Guatelli, J., & Yamamoto, N. (2009). BCA2/Rabring7 Promotes Tetherin-Dependent HIV-1 Restriction. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000700>
- Mizushima, N. (2011). Autophagy in Protein and Organelle Turnover. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76(0), 397–402. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.011023>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Mladinich, M. C., Schwedes, J., & Mackow, E. R. (2017). Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *MBio*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00952-17>
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., & Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Mocroft, A., Vella, S., Benfield, T., Chiesi, A., Miller, V., Gargalianos, P., Monforte, A. d'Arminio, Yust, I., Bruun, J., Phillips, A., & Lundgren, J. (1998). Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. *The Lancet*, 352(9142), 1725–1730. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03201-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03201-2)
- Moir, S., Chun, T.-W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 223–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130254>
- Monath T. P. (1993). Arthropod-borne viruses. In Morse SS (Ed.), *Emerging viruses* (pp. 138–147). New York: Oxford University Press.
- Moore, P. L., Gray, E. S., Choge, I. A., Ranchope, N., Mlisana, K., Abdool Karim, S. S., Williamson, C., & Morris, L. (2008). The C3-V4 Region Is a Major Target of Autologous Neutralizing Antibodies in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *Journal of Virology*, 82(4), 1860–1869. <https://doi.org/10.1128/JVI.02187-07>

- Morens, D. M., Daszak, P., & Taubenberger, J. K. (2020). Escaping Pandora's Box — Another Novel Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, *382*(14), 1293–1295. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2002106>
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*, *182*(5), 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.021>
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, *430*, 242–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature02759>
- Mori, M., & Kuwabara, S. (2011). Fisher Syndrome. *Current Treatment Options in Neurology*, *13*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s11940-010-0103-8>
- Morris, E. J., Nader, G. P. F., Ramalingam, N., Bartolini, F., & Gundersen, G. G. (2014). Kif4 Interacts with EB1 and Stabilizes Microtubules Downstream of Rho-mDia in Migrating Fibroblasts. *PLoS ONE*, *9*(3), e91568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091568>
- Morse, S. S. (1995). Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, *1*(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>
- Moseley, G. W., Lahaye, X., Roth, D. M., Oksayan, S., Filmer, R. P., Rowe, C. L., Blondel, D., & Jans, D. A. (2009). Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response. *Journal of Cell Science*, *122*(20), 3652–3662. <https://doi.org/10.1242/jcs.045542>
- Moses, A., Nelson, J., & Bagby, G. C. (1998). The Influence of Human Immunodeficiency Virus-1 on Hematopoiesis. *Blood*, *91*(5), 1479–1495. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.5.1479>
- Moukambi, F., Rodrigues, V., Fortier, Y., Rabazanahary, H., Borde, C., Krust, B., Andreani, G., Silvestre, R., Petrovas, C., Laforge, M., & Estaquier, J. (2017). CD4 T Follicular Helper Cells and HIV Infection: Friends or Enemies? *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00135>
- Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J.-C. (2013). Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(3), 448–461. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-13>
- Müller, S., Möller, P., Bick, M. J., Wurr, S., Becker, S., Günther, S., & Kümmerer, B. M. (2007). Inhibition of Filovirus Replication by the Zinc Finger Antiviral Protein. *Journal of Virology*, *81*(5), 2391–2400. <https://doi.org/10.1128/JVI.01601-06>
- Muñoz, A., Wang, M.-C., Bass, S., Taylor, J. M. G., Kingsley, L. A., Chmiel, J. S., & Polk, B. F. (1989). ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME (AIDS)-FREE TIME AFTER HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) SEROCONVERSION IN HOMOSEXUAL MEN. *American Journal of Epidemiology*, *130*(3), 530–539. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115367>
- Muñoz, L. S., Parra, B., & Pardo, C. A. (2017). Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl\_10), S897–S905. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix511>
- Muñoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & García-Sastre, A. (2005). Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of Virology*, *79*(13), 8004–8013. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005>
- Murphey-Corb, M. (1997). Live-attenuated HIV vaccines: How safe is safe enough? *Nature Medicine*, *3*(1), 17–18. <https://doi.org/10.1038/nm0197-17>

- 
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Yan, A., Cao-Lormeau, V. M., & Brout, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, *19*(14).  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(2), 359–361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
- Mzingwane, M. L., & Tiemessen, C. T. (2017). Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Reviews in Medical Virology*, *27*(2), e1924.  
<https://doi.org/10.1002/rmv.1924>
- Naghavi, M. H., & Walsh, D. (2017). Microtubule Regulation and Function during Virus Infection. *Journal of Virology*, *91*(16). <https://doi.org/10.1128/JVI.00538-17>
- Naif, H. M. (2013). Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports*, *5*(11), e6.  
<https://doi.org/10.4081/idr.2013.s1.e6>
- Nambala, P., & Su, W.-C. (2018). Role of Zika Virus prM Protein in Viral Pathogenicity and Use in Vaccine Development. *Frontiers in Microbiology*, *9*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01797>
- Nanaware, N., Banerjee, A., Mullick Bagchi, S., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021). Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses*, *13*(10), 1967. <https://doi.org/10.3390/v13101967>
- Naranatt, P. P., Krishnan, H. H., Smith, M. S., & Chandran, B. (2005). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Modulates Microtubule Dynamics via RhoA-GTP-Diaphanous 2 Signaling and Utilizes the Dynein Motors To Deliver Its DNA to the Nucleus. *Journal of Virology*, *79*(2), 1191–1206.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1191-1206.2005>
- Nardacci, R., Ciccocanti, F., Marsella, C., Ippolito, G., Piacentini, M., & Fimia, G. M. (2017). Role of autophagy in HIV infection and pathogenesis. *Journal of Internal Medicine*, *281*(5), 422–432. <https://doi.org/10.1111/joim.12596>
- Nasr, N., Maddocks, S., Turville, S. G., Harman, A. N., Woolger, N., Helbig, K. J., Wilkinson, J., Bye, C. R., Wright, T. K., Rambukwelle, D., Donaghy, H., Beard, M. R., & Cunningham, A. L. (2012). HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production. *Blood*, *120*(4), 778–788.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407395>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023a). *PubChem Compound Summary for CID 65663, Aloxistatin*.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aloxistatin>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023b). *PubChem Compound Summary for CID 462382, Z-Leu-leu-leu-al*.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Z-Leu-leu-leu-al>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023c). *PubChem Compound Summary for CID 5478883, Pepstatin*.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pepstatin>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023d). *PubChem Compound Summary for CID 5702538, Bafilomycin A*.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bafilomycin-A>
-

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023e). *PubChem Compound Summary for CID 135398661, 3-Methyladenine*.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Methyladenine>
- National Institutes of Health (NIH). (2023, March 9). *HDAC6 histone deacetylase 6 [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10013#gene-expression>
- Nawrocki, S. T., Carew, J. S., Pino, M. S., Highshaw, R. A., Andtbacka, R. H. I., Dunner, K., Pal, A., Bornmann, W. G., Chiao, P. J., Huang, P., Xiong, H., Abbruzzese, J. L., & McConkey, D. J. (2006). Aggressive Disruption: A Novel Strategy to Enhance Bortezomib-Induced Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, *66*(7), 3773–3781. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2961>
- Neher, R. A., & Leitner, T. (2010). Recombination Rate and Selection Strength in HIV Intra-patient Evolution. *PLoS Computational Biology*, *6*(1), e1000660. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000660>
- Nehete, P. N., Lewis, D. E., Tang, D. N. G., Pollack, M. S., & Sastry, K. J. (1998). Presence of HLA-C-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Responses in Long-Term Nonprogressors Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Viral Immunology*, *11*(3), 119–129. <https://doi.org/10.1089/vim.1998.11.119>
- Ng, I. H. W., Chan, K. W.-K., Tan, M. J. A., Gwee, C. P., Smith, K. M., Jeffress, S. J., Saw, W.-G., Swarbrick, C. M. D., Watanabe, S., Jans, D. A., Grüber, G., Forwood, J. K., & Vasudevan, S. G. (2019). Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- $\alpha$  and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. *ACS Infectious Diseases*, *5*(6), 932–948. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00373>
- Ngueyen, T. T. N., Kim, S.-J., Lee, J. Y., & Myoung, J. (2019). Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN- $\beta$  Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(10), 1665–1674. <https://doi.org/10.4014/jmb.1909.09017>
- Ng'uni, T., Chasara, C., & Ndhlovu, Z. M. (2020). Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590780>
- Nicastri, E., Castilletti, C., Liuzzi, G., Iannetta, M., Capobianchi, M. R., & Ippolito, G. (2016). Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance*, *21*(32). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30314>
- Nishimura, T., & Tooze, S. A. (2020). Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discovery*, *6*(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0161-3>
- Nogales, E., Wolf, S. G., & Downing, K. H. (1998). Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, *391*(6663), 199–203. <https://doi.org/10.1038/34465>
- Norman, J. M., Mashiba, M., McNamara, L. A., Onafuwa-Nuga, A., Chiari-Fort, E., Shen, W., & Collins, K. L. (2011). The antiviral factor APOBEC3G enhances the recognition of HIV-infected primary T cells by natural killer cells. *Nature Immunology*, *12*(10), 975–983. <https://doi.org/10.1038/ni.2087>

- Noronha, L. de, Zanluca, C., Azevedo, M. L. V., Luz, K. G., & Santos, C. N. D. dos. (2016). Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(5), 287–293. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160085>
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD<sup>+</sup>-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*, *11*(2), 437–444. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00038-8)
- Novella, I. S., Presloid, J. B., & Taylor, R. T. (2014). RNA replication errors and the evolution of virus pathogenicity and virulence. *Current Opinion in Virology*, *9*, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.017>
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *18*(5), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012>
- Oakley, B. R. (1992).  $\gamma$ -Tubulin: the microtubule organizer? *Trends in Cell Biology*, *2*(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90125-7)
- Oakley, B. R., Paolillo, V., & Zheng, Y. (2015).  $\gamma$ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(17), 2957–2962. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1514>
- O'Connell, K. A., Bailey, J. R., & Blankson, J. N. (2009). Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(12), 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.09.005>
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D., & Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, *19*(9). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
- O'Hare, T., Williams, C. L., & Ezoviski, A. (1996). Fear of AIDS and Homophobia: Implications for Direct Practice and Advocacy. *Social Work*, *41*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1093/sw/41.1.51>
- Ohka, S., Sakai, M., Bohnert, S., Igarashi, H., Deinhardt, K., Schiavo, G., & Nomoto, A. (2009). Receptor-Dependent and -Independent Axonal Retrograde Transport of Poliovirus in Motor Neurons. *Journal of Virology*, *83*(10), 4995–5004. <https://doi.org/10.1128/JVI.02225-08>
- Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B. K., & Dolan, M. J. (2009). Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(11), 1714–1723. <https://doi.org/10.1086/646609>
- Olagnier, D., Amatore, D., Castiello, L., Ferrari, M., Palermo, E., Diamond, M. S., Palamara, A. T., & Hiscott, J. (2016). Dengue Virus Immunopathogenesis: Lessons Applicable to the Emergence of Zika Virus. *Journal of Molecular Biology*, *428*(17), 3429–3448. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.024>
- Oliveira Melo, A. S., Malinge, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *47*(1), 6–7. <https://doi.org/10.1002/uog.15831>

- Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, & Triwibowo. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389–393. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90100-0)
- Olzmann, J. A., Li, L., Chudaev, M. v., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D., & Chin, L.-S. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *Journal of Cell Biology*, 178(6), 1025–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611128>
- Onorati, M., Li, Z., Liu, F., Sousa, A. M. M., Nakagawa, N., Li, M., Dell'Anno, M. T., Gulden, F. O., Pochareddy, S., Tebbenkamp, A. T. N., Han, W., Pletikos, M., Gao, T., Zhu, Y., Bichsel, C., Varela, L., Szigeti-Buck, K., Lisgo, S., Zhang, Y., ... Sestan, N. (2016). Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Reports*, 16(10), 2576–2592. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.038>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022, July 27). *Infeción por el VIH*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., & Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein. *Cell Host & Microbe*, 1(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2006.12.001>
- Orvedahl, A., & Levine, B. (2009). *Autophagy in Mammalian Antiviral Immunity* (pp. 267–285). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_13)
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., & Levine, B. (2010). Autophagy Protects against Sindbis Virus Infection of the Central Nervous System. *Cell Host & Microbe*, 7(2), 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.007>
- Ouyang, H., Ali, Y. O., Ravichandran, M., Dong, A., Qiu, W., MacKenzie, F., Dhe-Paganon, S., Arrowsmith, C. H., & Zhai, R. G. (2012). Protein Aggregates Are Recruited to Aggresome by Histone Deacetylase 6 via Unanchored Ubiquitin C Termini. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2317–2327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.273730>
- Pai, M.-T., Tzeng, S.-R., Kovacs, J. J., Keaton, M. A., Li, S. S.-C., Yao, T.-P., & Zhou, P. (2007). Solution Structure of the Ubp-M BUZ Domain, a Highly Specific Protein Module that Recognizes the C-terminal Tail of Free Ubiquitin. *Journal of Molecular Biology*, 370(2), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.015>
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., & Münz, C. (2005). Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy. *Science*, 307(5709), 593–596. <https://doi.org/10.1126/science.1104904>
- Paluh, J. L., Nogales, E., Oakley, B. R., McDonald, K., Pidoux, A. L., & Cande, W. Z. (2000). A Mutation in  $\gamma$ -Tubulin Alters Microtubule Dynamics and Organization and Is Synthetically Lethal with the Kinesin-like Protein Pkl1p. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4), 1225–1239. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1225>
- Pan American Health Organization (PAHO). (n.d.-a). *Epidemiological Update for Dengue, Chikungunya and Zika in 2022*. Retrieved January 26, 2023, from [https://ais.paho.org/ha\\_viz/arbo/pdf/PAHO%20Arbo%20Bulletin%202022.pdf](https://ais.paho.org/ha_viz/arbo/pdf/PAHO%20Arbo%20Bulletin%202022.pdf)

- 
- Pan American Health Organization (PAHO). (n.d.-b). *Zika virus Cumulative Cases 2022 in The Americas*. Retrieved January 26, 2023, from <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika-weekly-en/>
- Pan American Health Organization (PAHO). (2016, April). *Timeline of Emergence of Zika virus in the Americas*. [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en#gsc.tab=0)
- Panayiotou, C., Lindqvist, R., Kurhade, C., Vonderstein, K., Pasto, J., Edlund, K., Upadhyay, A. S., & Överby, A. K. (2018). Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation. *Journal of Virology*, *92*(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02054-17>
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T.-P., Baehrecke, E. H., & Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, *447*(7146), 860–864. <https://doi.org/10.1038/nature05853>
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
- Pantophlet, R., & Burton, D. R. (2006). GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annual Review of Immunology*, *24*(1), 739–769. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090557>
- Parker, J. S. L., Broering, T. J., Kim, J., Higgins, D. E., & Nibert, M. L. (2002). Reovirus Core Protein  $\mu 2$  Determines the Filamentous Morphology of Viral Inclusion Bodies by Interacting with and Stabilizing Microtubules. *Journal of Virology*, *76*(9), 4483–4496. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4483-4496.2002>
- Parmigiani, R. B., Xu, W. S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., & Marks, P. A. (2008). HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(28), 9633–9638. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803749105>
- Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M., Park, E.-C., Burke, D. S., Calisher, C. H., Laughlin, C. A., Saif, L. J., & Daszak, P. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *72*(3), 457–470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-08>
- Pasdeloup, D., McElwee, M., Beilstein, F., Labetoulle, M., & Rixon, F. J. (2013). Herpesvirus Tegument Protein pUL37 Interacts with Dystonin/BPAG1 To Promote Capsid Transport on Microtubules during Egress. *Journal of Virology*, *87*(5), 2857–2867. <https://doi.org/10.1128/JVI.02676-12>
- Patterson, S., & Knight, S. C. (1987). Susceptibility of Human Peripheral Blood Dendritic Cells to Infection by Human Immunodeficiency Virus. *Journal of General Virology*, *68*(4), 1177–1181. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-4-1177>
-



- Pattnaik, A., Sahoo, B. R., & Pattnaik, A. K. (2020). Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines*, *8*(2), 266. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020266>
- Payne, S. (2017). Introduction to RNA Viruses. In *Viruses* (pp. 97–105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00010-6>
- Peeters, M., D'Arc, M., & Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Reviews*, *16*(1), 23–34.
- Peiris, J. S. M., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. M. E., & Stöhr, K. (2003). The Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *349*(25), 2431–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032498>
- Perera, R., Khaliq, M., & Kuhn, R. J. (2008). Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, *80*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.004>
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., & Amara, A. (2013). Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses*, *6*(1), 69–88. <https://doi.org/10.3390/v6010069>
- Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufmann, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Rosenberg, E. S., & Walker, B. D. (2008). Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(4), 563–571. <https://doi.org/10.1086/526786>
- Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M. W., Gregory, D. A., Johnson, M. C., & Bieniasz, P. D. (2009). Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell*, *139*(3), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.039>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J. C., Palero, F., & González-Candelas, F. (2015). Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*, *30*, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.022>
- Pérez-Yanes, S., Pernas, M., Marfil, S., Cabrera-Rodríguez, R., Ortiz, R., Urrea, V., Roviroso, C., Estévez-Herrera, J., Olivares, I., Casado, C., Lopez-Galindez, C., Blanco, J., & Valenzuela-Fernández, A. (2022). The Characteristics of the HIV-1 Env Glycoprotein Are Linked With Viral Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.763039>
- Perreau, M., Savoye, A.-L., de Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E. K., de Leval, L., Graziosi, C., & Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(1), 143–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>
- Perron, M. J., Stremlau, M., Lee, M., Javanbakht, H., Song, B., & Sodroski, J. (2007). The Human TRIM5 $\alpha$  Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid. *Journal of Virology*, *81*(5), 2138–2148. <https://doi.org/10.1128/JVI.02318-06>
- Persaud, M., Martinez-Lopez, A., Buffone, C., Porcelli, S. A., & Diaz-Griffero, F. (2018). Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology*, *518*, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.009>
- Petersen, E., Wilson, M. E., Touch, S., McCloskey, B., Mwaba, P., Bates, M., Dar, O., Mattes, F., Kidd, M., Ippolito, G., Azhar, E. I., & Zumla, A. (2016). Rapid Spread of

- Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *International Journal of Infectious Diseases*, 44, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.001>
- Petridou, C., Bonsall, D., Ahmed, A., Roberts, M., Bell, C., de Cesare, M., Bowden, R., Graham, V., Bailey, D., Simpson, A., & Aarons, E. (2019). Prolonged Zika Virus RNA Detection in Semen of Immunosuppressed Patient. *Emerging Infectious Diseases*, 25(8), 1598–1600. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181543>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2012). Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Current Opinion in Virology*, 2(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.011>
- Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P.-Y., Hall, R. A., & Khromykh, A. A. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, 4(6), 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007>
- Piot, P., Bartos, M., Ghys, P. D., Walker, N., & Schwartländer, B. (2001). The global impact of HIV/AIDS. *Nature*, 410(6831), 968–973. <https://doi.org/10.1038/35073639>
- Piperno, G., LeDizet, M., & Chang, X. J. (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of Cell Biology*, 104(2), 289–302. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.2.289>
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., de Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871–872. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375–386. <https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185–1192. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>
- Plymale, D. R., Ng Tang, D. S., Comardelle, A. M., Fermin, C. D., Lewis, D. E., & Garry, R. F. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1-induced killing of CD4 cells. *AIDS*, 13(14), 1827–1839. <https://doi.org/10.1097/00002030-199910010-00004>
- Poirier, K., Keays, D. A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi, N., Manouvrier, S., Fallet-Bianco, C., Pasquier, L., Toutain, A., Tuy, F. P. D., Bienvenu, T., Joriot, S., Odent, S., Ville, D., Desguerre, I., Goldenberg, A., Moutard, M.-L., Fryns, J.-P., van Esch, H., ... Chelly, J. (2007). Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Human Mutation*, 28(11), 1055–1064. <https://doi.org/10.1002/humu.20572>
- Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X. H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I., Genevieve, D., Barnerias, C., Keren, B., Lebrun, N., Boddaert, N., Encha-Razavi, F., & Chelly, J. (2010). Mutations in the neuronal  $\beta$ -tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Human Molecular Genetics*, 19(22), 4462–4473. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq377>

- Pollakis, G., Baan, E., van Werkhoven, M. B., Berkhout, B., Bakker, M., Jurriaans, S., & Paxton, W. A. (2015). Association between gp120 envelope V1V2 and V4V5 variable loop profiles in a defined HIV-1 transmission cluster. *AIDS*, *29*(10), 1161–1171. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000692>
- Pond, W. L. (1963). Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *57*(5), 364–371. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(63\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(63)90100-7)
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., & Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nature Cell Biology*, *19*(4), 391–398. <https://doi.org/10.1038/ncb3481>
- Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(2), 184–186. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3352>
- Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA). (n.d.). *Hoja informativa-Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de SIDA*. Retrieved January 24, 2023, from <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- Pryor, M. J., Rawlinson, S. M., Butcher, R. E., Barton, C. L., Waterhouse, T. A., Vasudevan, S. G., Bardin, P. G., Wright, P. J., Jans, D. A., & Davidson, A. D. (2007). Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through Its Importin  $\alpha/\beta$ -Recognized Nuclear Localization Sequences is Integral to Viral Infection. *Traffic*, *8*(7), 795–807. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00579.x>
- Public Health Landscape. (2016, April). *A History of Zika Virus in Brazil*. <https://publichealthlandscape.com/volume-26-april-2016/a-history-of-zika-virus-in-brazil/>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., Espinosa, D. A., Biering, S. B., Patana, M., Ratnasiri, K., Wang, C., Beatty, P. R., & Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Reports*, *26*(6), 1598–1613.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.036>
- Qian, X., Nguyen, H. N., Song, M. M., Hadiono, C., Ogden, S. C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G. R., Jacob, F., Zhong, C., Yoon, K., Jeang, W., Lin, L., Li, Y., Thakor, J., Berg, D. A., Zhang, C., Kang, E., Chickering, M., ... Ming, G. (2016). Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, *165*(5), 1238–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032>
- Quan, Y., Liang, C., Brenner, B. G., & Wainberg, M. A. (2009). Multidrug-Resistant Variants of HIV Type 1 (HIV-1) Can Exist in Cells as Defective Quasispecies and Be Rescued by Superinfection with Other Defective HIV-1 Variants. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(9), 1479–1483. <https://doi.org/10.1086/606117>
- Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O’Neal, J. T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B. H., Pulendran, B., Schinazi, R. F., Chakraborty, R., & Suthar, M. S. (2016). Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host & Microbe*, *20*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T., & Gray, R. H. (2000). Viral Load and Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *New England Journal of Medicine*, *342*(13), 921–929. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003303421303>

- Rampersad, S., & Tennant, P. (2018). Replication and Expression Strategies of Viruses. In *Viruses* (pp. 55–82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6>
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *New England Journal of Medicine*, *374*(20), 1981–1987. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1604338>
- Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). Zika Virus: An Emerging Worldwide Threat. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01417>
- Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., & Park, Y.-H. (2017). Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00581>
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O’Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, *36*(6), 585–595. <https://doi.org/10.1038/ng1362>
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas, T. S., Zhou, Y., Li, H., & Shi, P.-Y. (2006). West Nile Virus 5’-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2’-O Methylations by Nonstructural Protein 5. *Journal of Virology*, *80*(17), 8362–8370. <https://doi.org/10.1128/JVI.00814-06>
- Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., & Verhey, K. J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology*, *16*(21), 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., & Simonsen, A. (2012). Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. *International Journal of Cell Biology*, *2012*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2012/219625>
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, *20*(9), 537–551. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Retallack, H., di Lullo, E., Arias, C., Knopp, K. A., Laurie, M. T., Sandoval-Espinosa, C., Mancía Leon, W. R., Krencik, R., Ullian, E. M., Spatazza, J., Pollen, A. A., Mandel-Brehm, C., Nowakowski, T. J., Kriegstein, A. R., & DeRisi, J. L. (2016). Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(50), 14408–14413. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618029113>
- Reynolds, I. J., Malaiyandi, L. M., Coash, M., & Rintoul, G. L. (2004). Mitochondrial Trafficking in Neurons: A Key Variable in Neurodegeneration? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *36*(4), 283–286. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041754.78313.c2>
- Rhee, S. S., & Marsh, J. W. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *Journal of Virology*, *68*(8), 5156–5163. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5156-5163.1994>

- Rhodes, D. I., Ashton, L., Solomon, A., Carr, A., Cooper, D., Kaldor, J., & Deacon, N. (2000). Characterization of Three nef-Defective Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Associated with Long-Term Nonprogression. *Journal of Virology*, 74(22), 10581–10588. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10581-10588.2000>
- Richter-Landsberg, C., & Leyk, J. (2013). Inclusion body formation, macroautophagy, and the role of HDAC6 in neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 126(6), 793–807. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1158-x>
- Rideout, H. J., Lang-Rollin, I., & Stefanis, L. (2004). Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2551–2562. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.008>
- Riedl, W., Acharya, D., Lee, J.-H., Liu, G., Serman, T., Chiang, C., Chan, Y. K., Diamond, M. S., & Gack, M. U. (2019). Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host & Microbe*, 26(4), 493-503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.012>
- Roche, M., Jakobsen, M. R., Sterjovski, J., Ellett, A., Posta, F., Lee, B., Jubb, B., Westby, M., Lewin, S. R., Ramsland, P. A., Churchill, M. J., & Gorry, P. R. (2011). HIV-1 Escape from the CCR5 Antagonist Maraviroc Associated with an Altered and Less-Efficient Mechanism of gp120-CCR5 Engagement That Attenuates Macrophage Tropism. *Journal of Virology*, 85(9), 4330–4342. <https://doi.org/10.1128/JVI.00106-11>
- Rodés, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., & Soriano, V. (2004). Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS*, 18(8), 1109–1116. <https://doi.org/10.1097/00002030-200405210-00004>
- Roederer, M., Dubs, J. G., Anderson, M. T., Raju, P. A., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1995). CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2061–2066. <https://doi.org/10.1172/JCI117892>
- Romani, B., Engelbrecht, S., & Glashoff, R. H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*, 91(1), 1–12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016303-0>
- Rong, R., Bibollet-Ruche, F., Mulenga, J., Allen, S., Blackwell, J. L., & Derdeyn, C. A. (2007). Role of V1V2 and Other Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Domains in Resistance to Autologous Neutralization during Clade C Infection. *Journal of Virology*, 81(3), 1350–1359. <https://doi.org/10.1128/JVI.01839-06>
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., & Souarès, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*, 19(41). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>
- Rothenberger, M. K., Keele, B. F., Wietgreffe, S. W., Fletcher, C. v, Beilman, G. J., Chipman, J. G., Khoruts, A., Estes, J. D., Anderson, J., Callisto, S. P., Schmidt, T. E., Thorkelson, A., Reilly, C., Perkey, K., Reimann, T. G., Utay, N. S., Nganou Makamdop, K., Stevenson, M., Douek, D. C., ... Schacker, T. W. (2015). Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 112(10), E1126-34.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414926112>
- Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(10), 687–702.  
<https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), 780–786.  
<https://doi.org/10.1038/nature05291>
- Rüdiger, A.-T., Mayrhofer, P., Ma-Lauer, Y., Pohlentz, G., Müthing, J., von Brunn, A., & Schwegmann-Weßels, C. (2016). Tubulins interact with porcine and human S proteins of the genus Alphacoronavirus and support successful assembly and release of infectious viral particles. *Virology*, 497, 185–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.022>
- Ruel, E., & Campbell, R. T. (2006). Homophobia and HIV/AIDS: Attitude Change in the Face of an Epidemic. *Social Forces*, 84(4), 2167–2178.  
<https://doi.org/10.1353/sof.2006.0110>
- Ruijter, A. J. M. de, Gennip, A. H. van, Caron, H. N., Kemp, S., & Kuilenburg, A. B. P. van. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370(3), 737–749.  
<https://doi.org/10.1042/bj20021321>
- Saade, M., Ferrero, D. S., Blanco-Ameijeiras, J., Gonzalez-Gobartt, E., Flores-Mendez, M., Ruiz-Arroyo, V. M., Martínez-Sáez, E., Ramón y Cajal, S., Akizu, N., Verdaguer, N., & Martí, E. (2020). Multimerization of Zika Virus-NS5 Causes Ciliopathy and Forces Premature Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 27(6), 920-936.e8.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.002>
- Sabo, Y., Walsh, D., Barry, D. S., Tinaztepe, S., de los Santos, K., Goff, S. P., Gundersen, G. G., & Naghavi, M. H. (2013). HIV-1 Induces the Formation of Stable Microtubules to Enhance Early Infection. *Cell Host & Microbe*, 14(5), 535–546.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.012>
- Sabouri, A. H., Marcondes, M. C. G., Flynn, C., Berger, M., Xiao, N., Fox, H. S., & Sarvetnick, N. E. (2014). TLR signaling controls lethal encephalitis in WNV-infected brain. *Brain Research*, 1574, 84–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.049>
- Sadoul, K., Wang, J., Diagouraga, B., & Khochbin, S. (2011). The Tale of Protein Lysine Acetylation in the Cytoplasm. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/970382>
- Sáez-Ciri6n, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., & Venet, A. (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6776–6781.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>
- Sagar, M., Wu, X., Lee, S., & Overbaugh, J. (2006). Human Immunodeficiency Virus Type 1 V1-V2 Envelope Loop Sequences Expand and Add Glycosylation Sites over the Course of Infection, and These Modifications Affect Antibody Neutralization Sensitivity. *Journal of Virology*, 80(19), 9586–9598.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00141-06>

- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., & Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(2), 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606699104>
- Sakkas, H., Bozidis, P., Giannakopoulos, X., Sofikitis, N., & Papadopoulou, C. (2018). An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens*, *7*(3), 66. <https://doi.org/10.3390/pathogens7030066>
- Salazar-Gonzalez, J. F., Bailes, E., Pham, K. T., Salazar, M. G., Guffey, M. B., Keele, B. F., Derdeyn, C. A., Farmer, P., Hunter, E., Allen, S., Manigart, O., Mulenga, J., Anderson, J. A., Swanstrom, R., Haynes, B. F., Athreya, G. S., Korber, B. T. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., & Hahn, B. H. (2008). Deciphering Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission and Early Envelope Diversification by Single-Genome Amplification and Sequencing. *Journal of Virology*, *82*(8), 3952–3970. <https://doi.org/10.1128/JVI.02660-07>
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.-M., Saragosti, S., Lapoumériou, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., ... Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, *382*(6593), 722–725. <https://doi.org/10.1038/382722a0>
- Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(23), 4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
- Santos, G., Valenzuela-Fernández, A., & Torres, N. v. (2014). Quantitative Analysis of the Processes and Signaling Events Involved in Early HIV-1 Infection of T Cells. *PLoS ONE*, *9*(8), e103845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103845>
- Sather, G. E., Schrack, W. D., & Hammon, W. McD. (1958). Serological Survey for Arthropod-Borne Virus Infections in the Philippines 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *7*(3), 323–328. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1958.7.323>
- Sathish, N., Zhu, F. X., & Yuan, Y. (2009). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF45 Interacts with Kinesin-2 Transporting Viral Capsid-Tegument Complexes along Microtubules. *PLoS Pathogens*, *5*(3), e1000332. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000332>
- Sauter, D., & Kirchhoff, F. (2019). Key Viral Adaptations Preceding the AIDS Pandemic. *Cell Host & Microbe*, *25*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.002>
- Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M., & Malik, H. S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 $\alpha$  identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(8), 2832–2837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409853102>
- Scherer, M., & Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *Journal of Virology*, *90*(13), 5850–5854. <https://doi.org/10.1128/JVI.01979-15>
- Schilling, M., Bridgeman, A., Gray, N., Hertzog, J., Hublitz, P., Kohl, A., & Rehwinkel, J. (2020). RIG-I Plays a Dominant Role in the Induction of Transcriptional Changes in Zika Virus-Infected Cells, which Protect from Virus-Induced Cell Death. *Cells*, *9*(6), 1476. <https://doi.org/10.3390/cells9061476>

- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schubert, U., Antón, L. C., Bačík, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orłowski, M., Strelbel, K., & Yewdell, J. W. (1998). CD4 Glycoprotein Degradation Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Requires the Function of Proteasomes and the Ubiquitin-Conjugating Pathway. *Journal of Virology*, 72(3), 2280–2288. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.2280-2288.1998>
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., Doriqui, M. J. R., Neri, J. I., Neto, J. M. de P., Wanderley, H. Y. C., Cernach, M., El-Husny, A. S., Pone, M. V. S., Seroo, C. L. C., & Sanseverino, M. T. v. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 59–62. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
- Schwartz, O., Maréchal, V., Gall, S. le, Lemonnier, F., & Heard, J.-M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine*, 2(3), 338–342. <https://doi.org/10.1038/nm0396-338>
- Sejvar, J. J., Kohl, K. S., Gidudu, J., Amato, A., Bakshi, N., Baxter, R., Burwen, D. R., Cornblath, D. R., Cleerhout, J., Edwards, K. M., Heininger, U., Hughes, R., Khuri-Bulos, N., Korinthenberg, R., Law, B. J., Munro, U., Maltezou, H. C., Nell, P., Oleske, J., ... Wiznitzer, M. (2011). Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*, 29(3), 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.003>
- Selisko, B., Potisopon, S., Agred, R., Priet, S., Varlet, I., Thillier, Y., Sallamand, C., Debart, F., Vasseur, J.-J., & Canard, B. (2012). Molecular Basis for Nucleotide Conservation at the Ends of the Dengue Virus Genome. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002912. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002912>
- Selisko, B., Wang, C., Harris, E., & Canard, B. (2014). Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Current Opinion in Virology*, 9, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.011>
- Seo, D., & Gammon, D. B. (2022). Manipulation of Host Microtubule Networks by Viral Microtubule-Associated Proteins. *Viruses*, 14(5), 979. <https://doi.org/10.3390/v14050979>
- Serman, T. M., & Gack, M. U. (2019). Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. *Viruses*, 11(10), 970. <https://doi.org/10.3390/v11100970>
- Serrador, J. M., Cabrero, J. R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A., & Sánchez-Madrid, F. (2004). HDAC6 Deacetylase Activity Links the Tubulin Cytoskeleton with Immune Synapse Organization. *Immunity*, 20(4), 417–428. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00078-0)
- Shahbazian, M. D., & Grunstein, M. (2007). Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>
- Shan, C., Muruato, A. E., Jagger, B. W., Richner, J., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Xie, X., Nunes, J. G. C., Morabito, K. M., Kong, W.-P., Pierson, T. C., Barrett, A. D., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Vasconcelos, P. F. C., Graham, B. S., Diamond, M. S., & Shi, P.-Y. (2017). A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus



- pregnancy transmission and testis damage. *Nature Communications*, 8(1), 676. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00737-8>
- Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D. B. A., Wakamiya, M., Tesh, R. B., Barrett, A. D., Wang, T., Weaver, S. C., Vasconcelos, P. F. C., Rossi, S. L., & Shi, P.-Y. (2017). A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*, 23(6), 763–767. <https://doi.org/10.1038/nm.4322>
- Shan, C., Xia, H., Haller, S. L., Azar, S. R., Liu, Y., Liu, J., Muruato, A. E., Chen, R., Rossi, S. L., Wakamiya, M., Vasilakis, N., Pei, R., Fontes-Garfias, C. R., Singh, S. K., Xie, X., Weaver, S. C., & Shi, P.-Y. (2020). A Zika virus envelope mutation preceding the 2015 epidemic enhances virulence and fitness for transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(33), 20190–20197. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005722117>
- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J., & Gao, G. F. (2018). Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *Journal of Molecular Biology*, 430(7), 948–962. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.006>
- Shao, W., Li, X., Goraya, M., Wang, S., & Chen, J.-L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., & Hahn, B. H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1410), 867–876. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0863>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006841–a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a006965–a006965. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation. *Molecular Cell*, 24(3), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.013>
- Sheng, Z., Gao, N., Fan, D., Wu, N., Zhang, Y., Han, D., Zhang, Y., Tan, W., Wang, P., & An, J. (2021). Zika virus disrupts the barrier structure and Absorption/Secretion functions of the epididymis in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), e0009211. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009211>
- Shi, B., Kitchen, C., Weiser, B., Mayers, D., Foley, B., Kemal, K., Anastos, K., Suchard, M., Parker, M., Brunner, C., & Burger, H. (2010). Evolution and recombination of genes encoding HIV-1 drug resistance and tropism during antiretroviral therapy. *Virology*, 404(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.008>
- Shi, Y., & Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>
- Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B., & Nachury, M. v. (2010). The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21517–21522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013728107>

- Shimazu, T., Horinouchi, S., & Yoshida, M. (2007). Multiple Histone Deacetylases and the CREB-binding Protein Regulate Pre-mRNA 3'-End Processing. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(7), 4470–4478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609745200>
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., & Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics*, *25*(3), 302–305. <https://doi.org/10.1038/77060>
- Shiver, J. W., Fu, T.-M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M.-E., Evans, R. K., Zhang, Z.-Q., Simon, A. J., Trigona, W. L., Dubey, S. A., Huang, L., Harris, V. A., Long, R. S., Liang, X., Handt, L., Schleif, W. A., Zhu, L., Freed, D. C., Persaud, N. v., ... Emini, E. A. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, *415*(6869), 331–335. <https://doi.org/10.1038/415331a>
- Shriner, D., Rodrigo, A. G., Nickle, D. C., & Mullins, J. I. (2004). Pervasive Genomic Recombination of HIV-1 in Vivo. *Genetics*, *167*(4), 1573–1583. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023382>
- Simões-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P.-A., & Cuendet, M. (2013). HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Molecular Neurodegeneration*, *8*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-7>
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barré-Sinoussi, F., & Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine*, *4*(9), 1032–1037. <https://doi.org/10.1038/2017>
- Simon, V., Ho, D. D., & Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*, *368*(9534), 489–504. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69157-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69157-5)
- Simonin, Y., Erkilic, N., Damodar, K., Clé, M., Desmetz, C., Bolloré, K., Taleb, M., Torriano, S., Barthelemy, J., Dubois, G., Lajoix, A. D., Foulongne, V., Tuailon, E., van de Perre, P., Kalatzis, V., & Salinas, S. (2019). Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBioMedicine*, *39*, 315–331. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.010>
- Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 617–626. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2614>
- Singh, K. K., & Tsai, L.-H. (2010). MicroTUB(B3)ules and Brain Development. *Cell*, *140*(1), 30–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.038>
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, *352*(6284), 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
- Skoge, R. H., Dölle, C., & Ziegler, M. (2014). Regulation of SIRT2-dependent  $\alpha$ -tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair*, *23*, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.04.011>
- Smit, J., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses*, *3*(2), 160–171. <https://doi.org/10.3390/v3020160>

- Smithburn, K. C., Kerr, J. A., & Gatne, P. B. (1954). Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *72*(4), 248–257.
- Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., & Gao, G. F. (2016). Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(5), 456–458. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3213>
- Soros, V. B., Yonemoto, W., & Greene, W. C. (2007). Newly Synthesized APOBEC3G Is Incorporated into HIV Virions, Inhibited by HIV RNA, and Subsequently Activated by RNase H. *PLoS Pathogens*, *3*(2), e15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030015>
- Speck, R. F., Wehrly, K., Platt, E. J., Atchison, R. E., Charo, I. F., Kabat, D., Chesebro, B., & Goldsmith, M. A. (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *Journal of Virology*, *71*(9), 7136–7139. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.7136-7139.1997>
- Spiegel, H., Herbst, H., Niedobitek, G., Foss, H. D., & Stein, H. (1992). Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *The American Journal of Pathology*, *140*(1), 15–22.
- Spilianakis, C., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2000). Acetylation by PCAF Enhances CIITA Nuclear Accumulation and Transactivation of Major Histocompatibility Complex Class II Genes. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(22), 8489–8498. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.22.8489-8498.2000>
- Stanifer, M. L., Guo, C., Doldan, P., & Boulant, S. (2020). Importance of Type I and III Interferons at Respiratory and Intestinal Barrier Surfaces. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608645>
- Staring, J., von Castelmur, E., Blomen, V. A., van den Hengel, L. G., Brockmann, M., Baggen, J., Thibaut, H. J., Nieuwenhuis, J., Janssen, H., van Kuppeveld, F. J. M., Perrakis, A., Carette, J. E., & Brummelkamp, T. R. (2017). PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of Picornaviridae. *Nature*, *541*(7637), 412–416. <https://doi.org/10.1038/nature21032>
- Starnes, M. C., & Cheng, Y. C. (1989). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(12), 7073–7077.
- Steinhauer, D. A., & Holland, J. J. (1987). Rapid Evolution of RNA Viruses. *Annual Review of Microbiology*, *41*(1), 409–431. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002205>
- Sterjovski, J., Churchill, M. J., Ellett, A., Gray, L. R., Roche, M. J., Dunfee, R. L., Purcell, D. F., Saksena, N., Wang, B., Sonza, S., Wesselingh, S. L., Karlsson, I., Fenyo, E.-M., Gabuzda, D., Cunningham, A. L., & Gorry, P. R. (2007). Asn 362 in gp120 contributes to enhanced fusogenicity by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with AIDS. *Retrovirology*, *4*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-89>
- Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, *9*(7), 853–860. <https://doi.org/10.1038/nm0703-853>

- Stiasny, K., Kössl, C., Lepault, J., Rey, F. A., & Heinz, F. X. (2007). Characterization of a Structural Intermediate of Flavivirus Membrane Fusion. *PLoS Pathogens*, *3*(2), e20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030020>
- Strain, M. C., Little, S. J., Daar, E. S., Havlir, D. V., Günthard, H. F., Lam, R. Y., Daly, O. A., Nguyen, J., Ignacio, C. C., Spina, C. A., Richman, D. D., & Wong, J. K. (2005). Effect of Treatment, during Primary Infection, on Establishment and Clearance of Cellular Reservoirs of HIV-1. *The Journal of Infectious Diseases*, *191*(9), 1410–1418. <https://doi.org/10.1086/428777>
- Strebel, K. (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Current Opinion in Virology*, *3*(6), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.004>
- Styczynski, A. R., Malta, J. M. A. S., Krow-Lucal, E. R., Percio, J., Nóbrega, M. E., Vargas, A., Lanzieri, T. M., Leite, P. L., Staples, J. E., Fischer, M. X., Powers, A. M., Chang, G.-J. J., Burns, P. L., Borland, E. M., Ledermann, J. P., Mossel, E. C., Schonberger, L. B., Belay, E. B., Salinas, J. L., ... Coelho, G. E. (2017). Increased rates of Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus outbreak in the Salvador metropolitan area, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(8), e0005869. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005869>
- Su, M., Shi, J.-J., Yang, Y.-P., Li, J., Zhang, Y.-L., Chen, J., Hu, L.-F., & Liu, C.-F. (2011). HDAC6 regulates aggresome-autophagy degradation pathway of  $\alpha$ -synuclein in response to MPP<sup>+</sup>-induced stress. *Journal of Neurochemistry*, *117*(1), 112–120. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07180.x>
- Sun, B., Sundström, K. B., Chew, J. J., Bist, P., Gan, E. S., Tan, H. C., Goh, K. C., Chawla, T., Tang, C. K., & Ooi, E. E. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Scientific Reports*, *7*(1), 3594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03932-1>
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*, *339*(6121), 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Sundquist, W. I., & Krausslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7), a006924–a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S., & Greber, U. F. (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *The EMBO Journal*, *20*(6), 1310–1319. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1310>
- Surana, P., Satchidanandam, V., & Nair, D. T. (2014). RNA-dependent RNA polymerase of Japanese encephalitis virus binds the initiator nucleotide GTP to form a mechanistically important pre-initiation state. *Nucleic Acids Research*, *42*(4), 2758–2773. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1106>
- Suthar, M. S., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2013). Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003541. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003541>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. v. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, *99*(1), 21–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Ta, T. M., Malik, S., Anderson, E. M., Jones, A. D., Perchik, J., Freylikh, M., Sardo, L., Klase, Z. A., & Izumi, T. (2022). Insights Into Persistent HIV-1 Infection and

- Functional Cure: Novel Capabilities and Strategies. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 862270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.862270>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Ng, I. H. W., Kong, S. Y. Z., Gwee, C. P., Watanabe, S., & Vasudevan, S. G. (2019). The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. *Cells*, *8*(12), 1519. <https://doi.org/10.3390/cells8121519>
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T.-S., Lim, X.-X., Zhang, S., Lim, X.-N., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C., Corti, D., & Lok, S.-M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature Communications*, *11*(1), 895. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tanaka, Y. (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Human Molecular Genetics*, *10*(9), 919–926. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.9.919>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., & Ming, G. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, *18*(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Tang, Q., Wang, X., & Gao, G. (2017). The Short Form of the Zinc Finger Antiviral Protein Inhibits Influenza A Virus Protein Expression and Is Antagonized by the Virus-Encoded NS1. *Journal of Virology*, *91*(2). <https://doi.org/10.1128/JVI.01909-16>
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(1), 15–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3201/eid1201.050979>
- Taucher, C., Berger, A., & Mandl, C. W. (2010). A trans-Complementing Recombination Trap Demonstrates a Low Propensity of Flaviviruses for Intermolecular Recombination. *Journal of Virology*, *84*(1), 599–611. <https://doi.org/10.1128/JVI.01063-09>
- Tay, M. Y. F., Smith, K., Ng, I. H. W., Chan, K. W. K., Zhao, Y., Ooi, E. E., Lescar, J., Luo, D., Jans, D. A., Forwood, J. K., & Vasudevan, S. G. (2016). The C-terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production. *PLOS Pathogens*, *12*(9), e1005886. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005886>
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *New England Journal of Medicine*, *358*(15), 1590–1602. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0706737>
- Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science*, *296*(5575), 1991–1995. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>
- Thevenet, L., Méjean, C., Moniot, B., Bonneaud, N., Galéotti, N., Aldrian-Herrada, G., Poulat, F., Berta, P., Benkirane, M., & Boizet-Bonhoure, B. (2004). Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *The EMBO Journal*, *23*(16), 3336–3345. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600352>

- Thomas, C. F., & Limper, A. H. (2007). Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(4), 298–308. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1621>
- Thurmond, S., Wang, B., Song, J., & Hai, R. (2018). Suppression of Type I Interferon Signaling by Flavivirus NS5. *Viruses*, *10*(12), 712. <https://doi.org/10.3390/v10120712>
- Tischfield, M. A., Baris, H. N., Wu, C., Rudolph, G., van Maldergem, L., He, W., Chan, W.-M., Andrews, C., Demer, J. L., Robertson, R. L., Mackey, D. A., Ruddle, J. B., Bird, T. D., Gottlob, I., Pieh, C., Traboulsi, E. I., Pomeroy, S. L., Hunter, D. G., Soul, J. S., ... Engle, E. C. (2010). Human TUBB3 Mutations Perturb Microtubule Dynamics, Kinesin Interactions, and Axon Guidance. *Cell*, *140*(1), 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.011>
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., Parra, B., Mora, J., Becerra, N., Lagos, N., Vera, L., Olivares, B., Vilches, M., & Fernández, J. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of Virology*, *161*(3), 665–668. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2695-5>
- Tran, A. D.-A., Marmo, T. P., Salam, A. A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H. S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., Sheetz, M. P., Yao, T.-P., & Bulinski, J. C. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of Cell Science*, *120*(8), 1469–1479. <https://doi.org/10.1242/jcs.03431>
- Trimmer, P. A., & Borland, M. K. (2005). Differentiated Alzheimer's Disease Transmitochondrial Cybrid Cell Lines Exhibit Reduced Organelle Movement. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(9–10), 1101–1109. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1101>
- Tripathi, S., Balasubramaniam, V. R. M. T., Brown, J. A., Mena, I., Grant, A., Bardina, S. v., Maringer, K., Schwarz, M. C., Maestre, A. M., Sourisseau, M., Albrecht, R. A., Krammer, F., Evans, M. J., Fernandez-Sesma, A., Lim, J. K., & García-Sastre, A. (2017). A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLOS Pathogens*, *13*(3), e1006258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006258>
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., & Moore, J. P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*, *384*(6605), 184–187. <https://doi.org/10.1038/384184a0>
- Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2006). “Fatal Attractions” of Proteins: A Comprehensive Hypothetical Mechanism Underlying Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *924*(1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05561.x>
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathogens*, *3*(12), e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
- Tuiskunen Bäck, A., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses – an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*, *3*(1), 19839. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>
- United Nations program on HIV/AIDS (UNAIDS). (2010). *Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic*.

- [http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123\\_GlobalReport\\_full\\_en.pdf](http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf)
- Upadhyay, A. K., Cyr, M., Longenecker, K., Tripathi, R., Sun, C., & Kempf, D. J. (2017). Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to *Japanese encephalitis virus* NS5. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 73(3), 116–122. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17001601>
- Uraki, R., Hwang, J., Jurado, K. A., Householder, S., Yockey, L. J., Hastings, A. K., Homer, R. J., Iwasaki, A., & Fikrig, E. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Science Advances*, 3(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602899>
- Valdebenito, S., Castellano, P., Ajasin, D., & Eugenin, E. A. (2021). Astrocytes are HIV reservoirs in the brain: A cell type with poor HIV infectivity and replication but efficient cell-to-cell viral transfer. *Journal of Neurochemistry*, 158(2), 429–443. <https://doi.org/10.1111/jnc.15336>
- Valenzuela, A., Blanco, J., Krust, B., Franco, R., & Hovanessian, A. G. (1997). Neutralizing antibodies against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 block the CD4-dependent and -independent binding of virus to cells. *Journal of Virology*, 71(11), 8289–8298. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8289-8298.1997>
- Valenzuela-Fernández, A., Álvarez, S., Gordon-Alonso, M., Barrero, M., Ursa, Á., Cabrero, J. R., Fernández, G., Naranjo-Suárez, S., Yáñez-Mo, M., Serrador, J. M., Muñoz-Fernández, M. Á., & Sánchez-Madrid, F. (2005). Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5445–5454. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0354>
- Valenzuela-Fernández, A., Cabrera-Rodríguez, R., Casado, C., Pérez-Yanes, S., Pernas, M., García-Luis, J., Marfil, S., Olivares, I., Estévez-Herrera, J., Trujillo-González, R., Blanco, J., & Lopez-Galindez, C. (2022). Contribution of the HIV-1 Envelope Glycoprotein to AIDS Pathogenesis and Clinical Progression. *Biomedicine*, 10(9), 2172. <https://doi.org/10.3390/biomedicine10092172>
- Valenzuela-Fernández, A., Cabrero, J. R., Serrador, J. M., & Sánchez-Madrid, F. (2008). HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell–cell interactions. *Trends in Cell Biology*, 18(6), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.04.003>
- Valera, M.-S., de Armas-Rillo, L., Barroso-González, J., Ziglio, S., Batisse, J., Dubois, N., Marrero-Hernández, S., Borel, S., García-Expósito, L., Biard-Piechaczyk, M., Paillart, J.-C., & Valenzuela-Fernández, A. (2015). The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0181-5>
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptué, L., Ndembi, N., Gürtler, L., Devare, S., & Brennan, C. A. (2011). Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology*, 85(3), 1403–1407. <https://doi.org/10.1128/JVI.02005-10>
- van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B., & Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host & Microbe*, 3(4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001>

- van den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C., & van Doorn, P. A. (2014). Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nature Reviews Neurology*, *10*(8), 469–482. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>
- van der Meché, F. G. A., van Doorn, P. A., Meulstee, J., & Jennekens, F. G. I. (2001). Diagnostic and Classification Criteria for the Guillain-Barré Syndrome. *European Neurology*, *45*(3), 133–139. <https://doi.org/10.1159/000052111>
- van Doorn, P. A., Ruts, L., & Jacobs, B. C. (2008). Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *The Lancet Neurology*, *7*(10), 939–950. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70215-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70215-1)
- van Gils, M. J., Bunnik, E. M., Boeser-Nunnink, B. D., Burger, J. A., Terlouw-Klein, M., Verwer, N., & Schuitemaker, H. (2011). Longer V1V2 Region with Increased Number of Potential N-Linked Glycosylation Sites in the HIV-1 Envelope Glycoprotein Protects against HIV-Specific Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, *85*(14), 6986–6995. <https://doi.org/10.1128/JVI.00268-11>
- Vanhamel, J., Bruggemans, A., & Debyser, Z. (2019). Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *Journal of Virus Eradication*, *5*(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S2055-6640\(20\)30275-2](https://doi.org/10.1016/S2055-6640(20)30275-2)
- Vanwalscappel, B., Tada, T., & Landau, N. R. (2018). Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication by inducing the antiviral protein viperin. *Virology*, *522*, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.014>
- Varbanov, M., Espert, L., & Biard-Piechaczyk, M. (2006). Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Reviews*, *8*(4), 221–236.
- Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M., & Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current Biology*, *10*(12), 747–749. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00542-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00542-X)
- Vidya Vijayan, K. K., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P., & Hanna, L. E. (2017). Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>
- Voelter-Mahlknecht, S., & Mahlknecht, U. (2003). Cloning and structural characterization of the human histone deacetylase 6 gene. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.12.1.87>
- Vue, D., & Tang, Q. (2021). Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. *Zoonoses*, *1*(1). <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2021-0017>
- Wack, A., Terczyńska-Dyla, E., & Hartmann, R. (2015). Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nature Immunology*, *16*(8), 802–809. <https://doi.org/10.1038/ni.3212>
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (2001). Accumulation of Mutant Huntingtin Fragments in Aggresome-like Inclusion Bodies as a Result of Insufficient Protein Degradation. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(5), 1393–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1393>
- Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2016). Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(4), 860–867. <https://doi.org/10.1128/JCM.00279-16>



- Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., & Jans, D. A. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin  $\alpha/\beta$ -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*, *443*(3), 851–856. <https://doi.org/10.1042/BJ20120150>
- Wallet, C., de Rovere, M., van Assche, J., Daouad, F., de Wit, S., Gautier, V., Mallon, P. W. G., Marcello, A., van Lint, C., Rohr, O., & Schwartz, C. (2019). Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00362>
- Wang, B., Tan, X.-F., Thurmond, S., Zhang, Z.-M., Lin, A., Hai, R., & Song, J. (2017). The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. *Nature Communications*, *8*(1), 14763. <https://doi.org/10.1038/ncomms14763>
- Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(10), 1723–1736. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>
- Wang, C., Yang, S. N. Y., Smith, K., Forwood, J. K., & Jans, D. A. (2017). Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(4), 1555–1559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.016>
- Wang, H., Cui, X., Cai, X., & An, T. (2022). Recombination in Positive-Strand RNA Viruses. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870759>
- Wang, R., Tan, J., Chen, T., Han, H., Tian, R., Tan, Y., Wu, Y., Cui, J., Chen, F., Li, J., Lv, L., Guan, X., Shang, S., Lu, J., & Zhang, Z. (2019). ATP13A2 facilitates HDAC6 recruitment to lysosome to promote autophagosome–lysosome fusion. *Journal of Cell Biology*, *218*(1), 267–284. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804165>
- Wang, S., Voronin, Y., Zhao, P., Ishihara, M., Mehta, N., Porterfield, M., Chen, Y., Bartley, C., Hu, G., Han, D., Wells, L., Tiemeyer, M., & Lu, S. (2020). Glycan Profiles of gp120 Protein Vaccines from Four Major HIV-1 Subtypes Produced from Different Host Cell Lines under Non-GMP or GMP Conditions. *Journal of Virology*, *94*(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.01968-19>
- Wang, X., Ao, Z., Chen, L., Kobinger, G., Peng, J., & Yao, X. (2012). The Cellular Antiviral Protein APOBEC3G Interacts with HIV-1 Reverse Transcriptase and Inhibits Its Function during Viral Replication. *Journal of Virology*, *86*(7), 3777–3786. <https://doi.org/10.1128/JVI.06594-11>
- Wang, X.-X., Wan, R.-Z., & Liu, Z.-P. (2018). Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *143*, 1406–1418. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.040>
- Wang, Z.-Y., Wang, Z., Zhen, Z.-D., Feng, K.-H., Guo, J., Gao, N., Fan, D.-Y., Han, D.-S., Wang, P.-G., & An, J. (2017). Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *Journal of General Virology*, *98*(8), 2061–2068. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000886>
- Warren, J. C., & Cassimeris, L. (2007). The contributions of microtubule stability and dynamic instability to adenovirus nuclear localization efficiency. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *64*(9), 675–689. <https://doi.org/10.1002/cm.20215>
- Watabe, M., & Nakaki, T. (2011). Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggresomes in response to stress. *Journal of Cell Science*, *124*(9), 1519–1532. <https://doi.org/10.1242/jcs.081778>

- Watrín, L., Ghawché, F., Larre, P., Neau, J.-P., Mathis, S., & Fournier, E. (2016). Guillain-Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine*, *95*(14), e3257. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000003257>
- Watterson, D., Modhiran, N., & Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Research*, *130*, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.014>
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., & Hahn, B. H. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, *373*(6510), 117–122. <https://doi.org/10.1038/373117a0>
- Wen, J., & Shresta, S. (2019). Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine? *Current Opinion in Immunology*, *59*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.02.001>
- Wen, Z., Song, H., & Ming, G. (2017). How does Zika virus cause microcephaly? *Genes & Development*, *31*(9), 849–861. <https://doi.org/10.1101/gad.298216.117>
- Wengler, G., & Wengler, G. (1993). The NS 3 Nonstructural Protein of Flaviviruses Contains an RNA Triphosphatase Activity. *Virology*, *197*(1), 265–273. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1587>
- Wesselborg, S., & Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(24), 4721–4757. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2034-8>
- Wickström, S. A., Masoumi, K. C., Khochbin, S., Fässler, R., & Massoumi, R. (2010). CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *The EMBO Journal*, *29*(1), 131–144. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.317>
- Wilén, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8), a006866–a006866. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., & Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology*, *66*(12), 7193–7200. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.12.7193-7200.1992>
- Williams, D., Veenstra, M., Gaskill, P., Morgello, S., Calderon, T., & Berman, J. (2014). Monocytes Mediate HIV Neuropathogenesis: Mechanisms that Contribute to HIV Associated Neurocognitive Disorders. *Current HIV Research*, *12*(2), 85–96. <https://doi.org/10.2174/1570162X12666140526114526>
- Williams, K. A., Zhang, M., Xiang, S., Hu, C., Wu, J.-Y., Zhang, S., Ryan, M., Cox, A. D., Der, C. J., Fang, B., Koomen, J., Haura, E., Bepler, G., Nicosia, S. v., Matthias, P., Wang, C., Bai, W., & Zhang, X. (2013). Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Phosphorylates Histone Deacetylase 6 (HDAC6) at Serine 1035 to Stimulate Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33156–33170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472506>
- Wloga, D., & Gaertig, J. (2010). Post-translational modifications of microtubules. *Journal of Cell Science*, *123*(20), 3447–3455. <https://doi.org/10.1242/jcs.063727>

- Wolf, B., Diop, F., Ferraris, P., Wichit, S., Busso, C., Missé, D., & Gönczy, P. (2017). Zika virus causes supernumerary foci with centriolar proteins and impaired spindle positioning. *Open Biology*, 7(1), 160231. <https://doi.org/10.1098/rsob.160231>
- Wolf, Y. I., Kazlauskas, D., Iranzo, J., Lucía-Sanz, A., Kuhn, J. H., Krupovic, M., Dolja, V. v., & Koonin, E. v. (2018). Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *MBio*, 9(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02329-18>
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 13(7), 805–811. <https://doi.org/10.1038/nn.2575>
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., & Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *Journal of Virology*, 82(18), 9143–9153. <https://doi.org/10.1128/JVI.00641-08>
- Woolhouse, M. E. J., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1842–1847. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>
- Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T., & Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 238–244. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2005.02.009>
- World Health Organization (WHO). (n.d.-a). *Estimated antiretroviral therapy coverage among people living with HIV (%)*. Retrieved January 24, 2023, from [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-antiretroviral-therapy-coverage-among-people-living-with-hiv\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-antiretroviral-therapy-coverage-among-people-living-with-hiv(-))
- World Health Organization (WHO). (n.d.-b). *Estimated number of people (all ages) living with HIV*. Retrieved January 24, 2023, from <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people--living-with-hiv>
- World Health Organization (WHO). (n.d.-c). *Global HIV, Hepatitis and STIs Programmes*. Retrieved January 24, 2023, from <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strategies>
- World Health Organization (WHO). (n.d.-d). *HIV data and statistics*. Retrieved February 17, 2023, from <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics>
- World Health Organization (WHO). (2016a, February 1). *WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations*. [https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)
- World Health Organization (WHO). (2016b, February 7). *The history of ZIKA virus*. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>
- World Health Organization (WHO). (2016c, May 18). *WHO public health advice regarding the Olympics and Zika virus*. <https://www.who.int/news/item/28-05-2016-who-public-health-advice-regarding-the-olympics-and-zika-virus>
- World Health Organization (WHO). (2022a, February). *Zika Epidemiology Update*. <https://cdn.who.int/media/docs/default->

- source/documents/emergencies/zika/zika-epidemiology-update\_february-2022\_clean-version.pdf?sfvrsn=c4cec7b7\_13&download=true
- World Health Organization (WHO). (2022b, December 8). *Zika virus*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- Wu, K.-Y., Zuo, G.-L., Li, X.-F., Ye, Q., Deng, Y.-Q., Huang, X.-Y., Cao, W.-C., Qin, C.-F., & Luo, Z.-G. (2016). Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Research*, *26*(6), 645–654. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.58>
- Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., & Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*, *384*(6605), 179–183. <https://doi.org/10.1038/384179a0>
- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., & Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery*, *3*(1), 17006. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6>
- Wyatt, C. M., & Klotman, P. E. (2006). Antiretroviral therapy and the kidney: balancing benefit and risk in patients with HIV infection. *Expert Opinion on Drug Safety*, *5*(2), 275–287. <https://doi.org/10.1517/14740338.5.2.275>
- Wyatt, C. M., & Klotman, P. E. (2007). HIV-Associated Nephropathy in the Era of Antiretroviral Therapy. *The American Journal of Medicine*, *120*(6), 488–492. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.01.025>
- Wyatt, R., & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science*, *280*(5371), 1884–1888. <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1884>
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M. I., Vasconcelos, P. F. C., Weaver, S. C., Wang, T., Rajsbaum, R., & Shi, P.-Y. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, *9*(1), 414. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>
- Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2013). Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*, *87*(8), 4609–4622. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-12>
- Xie, X., Kum, D. B., Xia, H., Luo, H., Shan, C., Zou, J., Muruato, A. E., Medeiros, D. B. A., Nunes, B. T. D., Dallmeier, K., Rossi, S. L., Weaver, S. C., Neyts, J., Wang, T., Vasconcelos, P. F. C., & Shi, P.-Y. (2018). A Single-Dose Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with Controlled Infection Rounds that Protects against Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe*, *24*(4), 487-499.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.008>
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, *9*(10), 1102–1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
- Xing, H., Xu, S., Jia, F., Yang, Y., Xu, C., Qin, C., & Shi, L. (2020). Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. *Virus Research*, *275*, 197793. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197793>

- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, *26*(37), 5541–5552. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620>
- Yan, N., & Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*, *13*(3), 214–222. <https://doi.org/10.1038/ni.2229>
- Yan, Y., Wang, H., Wei, C., Xiang, Y., Liang, X., Phang, C.-W., & Jiao, R. (2019). HDAC6 regulates lipid droplet turnover in response to nutrient deprivation via p62-mediated selective autophagy. *Journal of Genetics and Genomics*, *46*(4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.03.008>
- Yang, C.-P., & Horwitz, S. (2017). Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8), 1733. <https://doi.org/10.3390/ijms18081733>
- Yang, X.-J., & Seto, E. (2008a). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(3), 206–218. <https://doi.org/10.1038/nrm2346>
- Yang, X.-J., & Seto, E. (2008b). Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications. *Molecular Cell*, *31*(4), 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.002>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>
- Yap, T. L., Xu, T., Chen, Y.-L., Malet, H., Egloff, M.-P., Canard, B., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2007). Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *Journal of Virology*, *81*(9), 4753–4765. <https://doi.org/10.1128/JVI.02283-06>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, *175*(5), 2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, *5*(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/ni1087>
- Yoon, K.-J., Song, G., Qian, X., Pan, J., Xu, D., Rho, H.-S., Kim, N.-S., Habela, C., Zheng, L., Jacob, F., Zhang, F., Lee, E. M., Huang, W.-K., Ringeling, F. R., Vissers, C., Li, C., Yuan, L., Kang, K., Kim, S., ... Ming, G. (2017). Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell*, *21*(3), 349–358.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.014>
- Yoon, S. Y., Ha, Y. E., Choi, J. E., Ahn, J., Lee, H., Kweon, H.-S., Lee, J.-Y., & Kim, D. H. (2008). Coxsackievirus B4 Uses Autophagy for Replication after Calpain Activation in Rat Primary Neurons. *Journal of Virology*, *82*(23), 11976–11978. <https://doi.org/10.1128/JVI.01028-08>
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*, *319*(5871), 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>

- Yuan, T., Li, J., & Zhang, M.-Y. (2013). HIV-1 Envelope Glycoprotein Variable Loops Are Indispensable for Envelope Structural Integrity and Virus Entry. *PLoS ONE*, *8*(8), e69789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069789>
- Yuki, N., & Hartung, H.-P. (2012). Guillain–Barré Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *366*(24), 2294–2304. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1114525>
- Yukl, S. A., Shergill, A. K., Ho, T., Killian, M., Girling, V., Epling, L., Li, P., Wong, L. K., Crouch, P., Deeks, S. G., Havlir, D. v., McQuaid, K., Sinclair, E., & Wong, J. K. (2013). The Distribution of HIV DNA and RNA in Cell Subsets Differs in Gut and Blood of HIV-Positive Patients on ART: Implications for Viral Persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, *208*(8), 1212–1220. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit308>
- Zalar, A., Figueroa, M. I., Ruibal-Ares, B., Baré, P., Cahn, P., de Bracco, M. M. de E., & Belmonte, L. (2010). Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Research*, *87*(2), 269–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.05.005>
- Zammarchi, L., Stella, G., Mantella, A., Bartolozzi, D., Tappe, D., Günther, S., Oestereich, L., Cadar, D., Muñoz-Fontela, C., Bartoloni, A., & Schmidt-Chanasit, J. (2015). Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of Clinical Virology*, *63*, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.005>
- Zanini, F., Pu, S.-Y., Bekerman, E., Einav, S., & Quake, S. R. (2018). Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.32942>
- Zeng, J., Dong, S., Luo, Z., Xie, X., Fu, B., Li, P., Liu, C., Yang, X., Chen, Y., Wang, X., Liu, Z., Wu, J., Yan, Y., Wang, F., Chen, J.-F., Zhang, J., Long, G., Goldman, S. A., Li, S., ... Liang, Q. (2020). The Zika Virus Capsid Disrupts Corticogenesis by Suppressing Dicer Activity and miRNA Biogenesis. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 618-632.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.012>
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C., & Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, *424*(6944), 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature01707>
- Zhang, L., Liu, S., Liu, N., Zhang, Y., Liu, M., Li, D., Seto, E., Yao, T.-P., Shui, W., & Zhou, J. (2015). Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity. *Protein & Cell*, *6*(1), 42–54. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0102-8>
- Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., Chen, X., & Shi, P.-Y. (2019). Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *MBio*, *10*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02375-19>
- Zhang, X., Xie, X., Zou, J., Xia, H., Shan, C., Chen, X., & Shi, P.-Y. (2019). Genetic and biochemical characterizations of Zika virus NS2A protein. *Emerging Microbes & Infections*, *8*(1), 585–602. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1598291>
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X.-J., Dent, S. R., Yao, T.-P., Lane, W. S., & Seto, E. (2007). HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell*, *27*(2), 197–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.033>

- Zhang, Y., Gao, W., Li, J., Wu, W., & Jiu, Y. (2019). The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. *Virologica Sinica*, *34*(1), 30–41. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00086-4>
- Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., & Matthias, P. (2006). Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(5), 2401–2404. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500241200>
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., & Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*, *22*(5), 1168–1179. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg115>
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y.-C., Vaughan, R. C., Sankaran, B., Kao, C. C., & Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nature Communications*, *8*(1), 14762. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>
- Zhao, L.-J., Subramanian, T., Zhou, Y., & Chinnadurai, G. (2006). Acetylation by p300 Regulates Nuclear Localization and Function of the Transcriptional Corepressor CtBP2. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4183–4189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509051200>
- Zhao, Z., Tao, M., Han, W., Fan, Z., Imran, M., Cao, S., & Ye, J. (2021). Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *Journal of General Virology*, *102*(3). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001376>
- Zheng, K., Jiang, Y., He, Z., Kitazato, K., & Wang, Y. (2017). Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *Journal of General Virology*, *98*(3), 322–337. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000679>
- Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., Jin, S., She, Y., Li, Y., & Cui, J. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. *The EMBO Journal*, *37*(18). <https://doi.org/10.15252/embj.201899347>
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., & Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature*, *378*(6557), 578–583. <https://doi.org/10.1038/378578a0>
- Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., & Pandolfi, P. P. (2000). Role of SUMO-1–modified PML in nuclear body formation. *Blood*, *95*(9), 2748–2752. [https://doi.org/10.1182/blood.V95.9.2748.009k31a\\_2748\\_2752](https://doi.org/10.1182/blood.V95.9.2748.009k31a_2748_2752)
- Zhu, Y., Chen, G., Lv, F., Wang, X., Ji, X., Xu, Y., Sun, J., Wu, L., Zheng, Y.-T., & Gao, G. (2011). Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 15834–15839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101676108>
- Zimmerman, S., & Chang, F. (2005). Effects of  $\gamma$ -Tubulin Complex Proteins on Microtubule Nucleation and Catastrophe in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(6), 2719–2733. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0676>
- Zou, H., Wu, Y., Navre, M., & Sang, B.-C. (2006). Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.144>