



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

“Relocalización Subcelular De La Proteína De Unión a RNA
hnRNP-F durante la infección por el Virus Del Dengue y el virus
Zika”

T E S I S

Que presenta

CIRCE INGRID LORANCA VEGA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

Directora de Tesis: Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Ciudad de México

Diciembre, 2019

AGRADECIMIENTOS

Contenido

<i>Listado de Figuras</i>	4
<i>Listado de Abreviaturas</i>	5
<i>RESUMEN</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	7
I. Introducción	8
<i>Género Flavivirus</i>	8
Estructura de los Flavivirus	10
Organización Genómica	11
Proteínas Virales	14
Ciclo Replicativo	21
II. Antecedentes Generales	24
<i>Proteínas virales que se translocan al núcleo</i>	25
Proteína C	26
Proteína NS5	27
<i>Proteínas celulares que se translocan al citoplasma</i>	28
Familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares	29
III. Antecedentes Específicos	32
Relocalización de diferentes hnRNP y su papel en la replicación viral	33
Miembros de la familia hnRNP involucrados en la replicación del DENV	34
hnRNP-F	35
IV. Justificación	37
V. Hipótesis	38
VI. Objetivos	38
<i>General</i>	38
<i>Particulares</i>	38
VII. Diagrama de Flujo de Trabajo	38
VIII. Materiales y Métodos	39
<i>Cultivos Celulares y Virales</i>	39
Cultivo de células Huh-7 (Hepatocarcinoma Humano)	39
Propagación DENV y ZIKV	39
<i>Infección con DENV y ZIKV</i>	40
<i>Ensayo de Focos</i>	40
<i>Determinación de Infección de células Huh-7</i>	41
Microscopía Confocal	41
<i>Localización subcelular de hnRNP-F</i>	42
Microscopía Confocal	42
Fraccionamiento núcleo/citoplasma	42

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
Western-Blot	43
<i>Colocalización de hnRNP-F con proteínas virales</i>	44
Microscopía Confocal.....	44
<i>Análisis de Intensidad de Flourescencia</i>	44
<i>Análisis Estadístico</i>	45
<i>Análisis de Colocalización</i>	45
IX. Resultados	45
<i>Titulación del virus propagado en Ratones CD-1 Lactantes</i>	45
<i>Determinación de Infección de células Huh-7</i>	46
<i>Determinación de la localización subcelular de hnRNP-F</i>	48
<i>Determinación de Intensidad de Flourescencia en núcleo y citoplasma</i>	53
<i>Fraccionamiento celular en núcleo y citoplasma</i>	54
<i>Colocalización de hnRNP-F con la Proteína NS4A</i>	55
<i>Colocalización de hnRNP-F con la Proteína C</i>	57
<i>Análisis de Colocalización</i>	59
X. Discusión	61
XI. Conclusiones	69
XII. Perspectivas	70
XIII. Bibliografía	71

Listado de Figuras

- ◆ **Figura 1.** Modelo esquemático de una partícula de Flavivirus madura.
- ◆ **Figura 2.** Genoma de los Flavivirus.
- ◆ **Figura 3.** Estructura de la región terminal 5' del genoma Flaviviral.
- ◆ **Figura 4.** Estructura de la región terminal 3' del genoma Flaviviral.
- ◆ **Figura 5.** Topología de la membrana de las proteínas virales maduras de los Flavivirus.
- ◆ **Figura 6.** Homodímero de la proteína de la Cápside.
- ◆ **Figura 7.** Traducción del RNA y Escisión de la poliproteína viral.
- ◆ **Figura 8.** Formación de Complejos de Ensamblaje y Replicación viral.
- ◆ **Figura 9.** Representación esquemática del Ciclo Replicativo de los Flavivirus.
- ◆ **Figura 10.** Complejo Replicativo de los Flavivirus.
- ◆ **Figura 11.** Localización nuclear de la C tras la infección con los 4 serotipos de DENV.
- ◆ **Figura 12.** Localización nuclear de NS5 tras la infección con los 4 serotipos de DENV.
- ◆ **Figura 13.** Familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares (hnRNP).
- ◆ **Figura 14.** Funciones nucleares y citoplasmáticas de hnRNP.
- ◆ **Figura 15.** Representación estructural de proteína hnRNP-F.
- ◆ **Figura 16.** Translocación de hnRNP-F tras la infección con DENV-2.
- ◆ **Figura 17.** Análisis de la presencia de hnRNP-F durante la infección con DENV-2.
- ◆ **Figura 18.** Infección con los cuatro serotipos de DENV y ZIKV en células Huh-7.
- ◆ **Figura 19.** Localización de hnRNP-F en ausencia de infección en células Huh-7.
- ◆ **Figura 20.** Localización de hnRNP-F en células Huh-7 a las 24hpi con DENV y ZIKV.
- ◆ **Figura 21.** Localización de hnRNP-F en células Huh-7 a las 48hpi con DENV y ZIKV.
- ◆ **Figura 22.** Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de hnRNP-F tanto en núcleo como en citoplasma a las 48hpi con DENV y ZIKV.
- ◆ **Figura 23.** Presencia de la proteína de hnRNP-F en la fracción nuclear y citoplasmática a las 48hpi con DENV y ZIKV.
- ◆ **Figura 24.** Colocalización de hnRNP-F con la proteína viral NS4A a las 48hpi con

DENV y ZIKV

◆ **Figura 25.** Colocalización de hnRNP-F con la proteína viral C a las 48hpi con DENV y ZIKV.

◆ **Figura 26.** Representaciones gráficas del coeficiente de correlación de Pearson.

Listado de Abreviaturas

◆ BSA.....	Seroalbúmina Bovina
◆ DAPI.....	4',6-Diamidino-2-fenilindol
◆ DENV.....	Virus Dengue
◆ DMEM.....	Medio Dulbelco´s Eagle Mínimo Esencial
◆ HCV.....	Virus de la Hepatitis C
◆ hnRNP.....	Ribonucleoproteína Heterogénea Nuclear
◆ Huh-7.....	Línea celular de Hepatocarcinoma Humano
◆ Hpi.....	Horas post-infección
◆ IgG.....	Inmunoglobulina G
◆ JEV.....	Virus de la Encefalitis Japonesa
◆ MOI.....	Multiplicidad de infección
◆ NLS.....	Señal de Localización Nuclear
◆ NPC.....	Complejo de Poro Nuclear
◆ NTR.....	Región No Traducida
◆ OMS.....	Organización Mundial de la Salud
◆ ORF.....	Marco de Lectura Abierto
◆ RC.....	Complejo de Replicación
◆ RE.....	Retículo endoplásmico
◆ RNA.....	Ácido Ribonucleico
◆ SDS.....	Diodecil Sulfato Sódico
◆ SFB.....	Suero Fetal Bovino
◆ SP.....	Solución Permeabilizadora

- ◆ TA.....Temperatura Ambiente
- ◆ UFF/ml.....Unidades formadoras de focos por mililitro
- ◆ WNV.....Virus del Nilo Occidental
- ◆ YFV.....Virus de la Fiebre Amarilla
- ◆ ZIKV.....Virus Zika

RESUMEN

Entre los arbovirus más relevantes dentro del sector salud a nivel mundial, se encuentran aquéllos pertenecientes al género *Flavivirus*, incluidos el virus del dengue (DENV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y más recientemente el virus Zika (ZIKV). DENV es una enfermedad que se encuentra muy extendida en los trópicos y es endémica en más de 100 países. Se estima que DENV genera alrededor de 390 millones de infecciones al año de las cuales aproximadamente 96 millones manifiestan los síntomas clínicos de la enfermedad. Zika es otro flavivirus que recientemente ha captado la atención del mundo, pues a pesar de haber sido descubierto en 1953 y mantenerse como una enfermedad tropical poco conocida su diseminación a partir de 2015 a más de 33 países fue considerablemente rápida.

Al ser parásitos intracelulares obligados, los virus son capaces de secuestrar y manipular proteínas de la célula huésped para facilitar su ciclo de replicación viral. Se ha descrito que durante la infección con DENV se movilizan proteínas nucleares como DDX21, La y PTB hacia el citoplasma siendo importantes para el ciclo de replicación. Asimismo, se ha reportado que otras proteínas nucleares de unión a RNA como la hnRNP A1/C1/K y H también participan en el ciclo de replicación de DENV a través de su interacción tanto con proteínas virales como con el genoma viral. En nuestro laboratorio se describió la interacción entre la proteína hnRNP-F con la proteína NS5 de DENV-2, sugiriendo su posible papel en la replicación viral; sin embargo, no se conocía si esta interacción estaba conservada entre los distintos serotipos y en otros miembros del género *Flavivirus* como ZIKV. En el presente trabajo encontramos que la proteína hnRNP-F se relocaliza del núcleo al citoplasma durante la infección con los 4 serotipos de DENV y con ZIKV, sugiriendo que es un

fenómeno conservado entre ellos. Asimismo, encontramos que la proteína hnRNP-F se asocia en el citoplasma específicamente en los complejos de replicación con diferentes factores virales como las proteínas C, NS3, NS4A, esta última un componente de los complejos de replicación. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la proteína hnRNP-F participa activamente en la replicación de estos virus.

ABSTRACT

Among the most relevant arboviruses in the health sector worldwide, are those belonging to the Flavivirus genus, including dengue virus (DENV), Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV), yellow fever virus (YFV) and more recently the Zika virus (ZIKV). DENV is a disease that is widespread in the tropics and is endemic in more than 100 countries. It is estimated that DENV generates about 390 million infections per year, of which approximately 96 million show the clinical symptoms of the disease. Zika is another flavivirus that has recently caught the world's attention, because despite having been discovered in 1953 and remaining a little known tropical disease, its spread from 2015 to more than 33 countries was quickly rapid.

Being obligate intracellular parasites, viruses are able to sequester and manipulate host cell proteins to facilitate their viral replication cycle. It has been described that during infection with DENV, nuclear proteins such as DDX21 are mobilized, La and PTB made the cytoplasm important for the replication cycle. It has also been reported that other nuclear RNA binding proteins such as hnRNP A1 / C1 / K and H also participate in the DENV replication cycle through their interaction with both viral proteins and the viral genome. In our laboratory, describe the interaction between hnRNP-F protein with DENV-2 NS5 protein, suggesting its possible role in viral replication; however, it was not known if this interaction was conserved between the different serotypes and in other members of the Flavivirus genus such as ZIKV. In the present work we find that the hnRNP-F protein is relocated from the nucleus to the cytoplasm during infection with the 4 DENV serotypes and with ZIKV, suggesting that it is a conserved phenomenon among them. Likewise, we found the hnRNP-F protein is associated in the specific cytoplasm in replication complexes with different

viral factors such as C, NS3, NS4A proteins, the latter a component of replication complexes. These findings strongly affect the hnRNP-F protein actively participates in the replication of these viruses.

I. Introducción

Género *Flavivirus*

El género *Flavivirus* pertenece a la familia *Flaviviridae* y comprende más de 70 especies de virus diferentes (M. A. BRINTON & BASU, 2015) (OLIVEIRA, MOHANA-BORGES, DE ALENCASTRO, & HORTA, 2017), transmitidos principalmente por artrópodos que se desarrollan en zonas húmedas, tropicales y subtropicales. Alrededor del mundo se han experimentado diferentes brotes por arbovirus incluidos el virus del dengue (DENV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y más recientemente el virus Zika (ZIKV) (GEROLD, BRUENING, WEIGEL, & PIETSCHMANN, 2017). Las infecciones transmitidas por estos virus suelen manifestarse clínicamente como un síndrome febril que puede estar o no acompañado de diversos síntomas. Mientras que la severidad de estas infecciones es variable y pueden llegar a ser letales (PRADA-ARISMENDY & CASTELLANOS, 2006).

Hasta hace poco, varios flavivirus se caracterizaban por ser endémicos, sin embargo, en la actualidad algunos de ellos representan amenazas como patógenos emergentes y reemergentes (CARPIO-ORANTES, 2016), sufriendo una transformación notable en sus patrones de distribución. Esta transformación puede deberse a diversos factores como: el aumento del turismo, el traslado de mercancías, la globalización, el cambio climático y la intensificación de los fenómenos meteorológicos extremos que promueven alteraciones en el comportamiento de los vectores impulsando así, su movilidad y generando el establecimiento de especies en zonas donde no solían estar presentes (COLLAO, PRADO, GONZÁLEZ, & VÁSQUEZ, 2015).

Dengue

Actualmente el virus del Dengue (DENV) es el agente causal de la enfermedad viral transmitido por artrópodos más prevalente del mundo y una de las de mayor importancia médica, esta enfermedad se encuentra muy extendida en los trópicos y es endémica en más de 100 países de las regiones de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (BRADY ET AL., 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) mientras mayor es la velocidad con la que se transportan las personas, desde y hacia las zonas endémicas mayor ha sido el crecimiento de esta enfermedad, es por esto que alrededor de la mitad de la población mundial corre el riesgo de contraerla. Se estima que DENV genera alrededor de 390 millones de infecciones al año de las cuales aproximadamente 96 millones manifiestan los síntomas clínicos de la enfermedad (BHATT ET AL., 2013).

DENV es transmitido principalmente por mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti* y en menor grado por *A. Albopictus* (LWANDE ET AL., 2019). Su serocomplejo está conformado por cuatro serotipos y cada uno tiene diferentes interacciones con los anticuerpos en el suero sanguíneo humano, estos serotipos son conocidos como: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 los cuales, sin excepción, causan la enfermedad (CARMO ET AL., 2017). La infección por DENV produce síntomas como: fiebre, cefaléa, dolor retro-ocular, mialgias y artralgias, náusea, vómito, linfangitis y exantema. Algunos pacientes también pueden presentar dolor abdominal intenso, vómito persistente, taquipnea y petequias (ALVARADO-CASTRO ET AL., 2016). Sin embargo y a pesar de que la infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por ese serotipo; la infección sucesiva con dos serotipos diferentes es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (MARTINA, KORAKA, & OSTERHAUS, 2009)(MARTINA ET AL., 2009) (JÁCOME ET AL., 2019), que se suele presentar por hemorragia en mucosas, fuga vascular y una falla sistémica que puede conducir a la muerte (ALVARADO-CASTRO ET AL., 2016).

La incidencia de Dengue está regulada por interacciones entre el virus, el vector y el ser humano en el ecosistema, razón por la cual los diversos factores (demográficos, socioeconómicos, de vivienda, climáticos y geográficos) que afectan

a estos tres elementos repercuten directamente en la dinámica de transmisión (MENA, TROYO, BONILLA-CARRIÓN, & CALDERÓN-ARGUEDAS, 2011), además de conferirle una de sus características más importantes al virus que es la hiperendemicidad de los múltiples serotipos en diversos países y la alarmante repercusión en la salud humana, así como en la economía mundial.

Zika

El virus Zika (ZIKV) es otro *Flavivirus* que recientemente ha captado la atención del mundo, pues a pesar de haber sido descubierto en 1953 y mantenerse como una enfermedad tropical poco conocida (LESSLER ET AL., 2016) su diseminación a partir de 2015 a más de 33 países y territorios de América, África y Asia fue considerablemente rápida (PETERSEN, JAMIESON, POWERS, & HONEIN, 2016). Debido a esto y a su relación con complicaciones neurológicas graves fue considerada en febrero del 2016 por la OMS como una emergencia de salud pública de interés internacional (ARAUJO, SILVA, & ARAUJO, 2016).

ZIKV es transmitido a los humanos a través de un mosquito hembra de la especie *Aedes aegypti*. Sin embargo, recientemente se han reconocido otros modos de transmisión no vectoriales, como transmisión sexual, transmisión perinatal y transfusión sanguínea (MOHD, ZAINAL, TAN, & ABUBAKAR, 2019). Los primeros síntomas clínicos de la infección por ZIKV, son bastantes similares a los síntomas de otras infecciones por *Flavivirus* como el Dengue, presentando fiebre, cefalea, erupciones en la piel, dolor de articulaciones y musculares (ESPINOZA, 2017). Sin embargo, las complicaciones causadas por este virus se han relacionado con condiciones neurológicas graves como el síndrome de Guillain-Barré en adultos y la microcefalia en las primeras etapas gestacionales (OLIVEIRA ET AL., 2017) (MOHD ET AL., 2019).

Estructura de los Flavivirus

Los *Flavivirus* comparten una estructura común de viriones, y entre ellas las estructuras de DENV y ZIKV están particularmente bien caracterizadas. En su forma madura ambos virus poseen una envoltura icosaédrica de aproximadamente 50nm de diámetro, compuesta por 180 copias de la proteína de Envoltura (E) en combinación con la proteína de Membrana (M) (BARROWS ET AL., 2018). Estas proteínas se

encuentran ancladas a la superficie de una bicapa lipídica de 10nm de espesor mediante dominios transmembranales, para recubrir a la nucleocápside conformada por la proteína C y el genoma viral (OLIVEIRA ET AL., 2017).

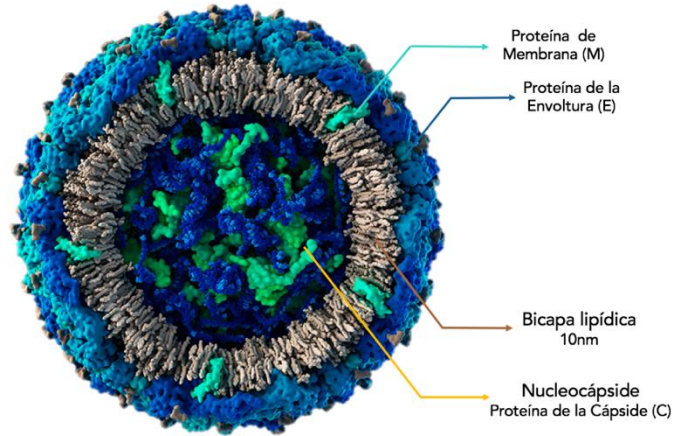


Figura 1. Modelo esquemático de una partícula de Flavivirus madura.

Organización Genómica

El genoma de estos *Flavivirus* está compuesto por una única molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con una longitud de aproximadamente 11 kb (M. A. BRINTON & BASU, 2015). Contiene un único marco de lectura abierto (*ORF*) flanqueado por dos regiones no traducidas 5' y 3' (NTR).

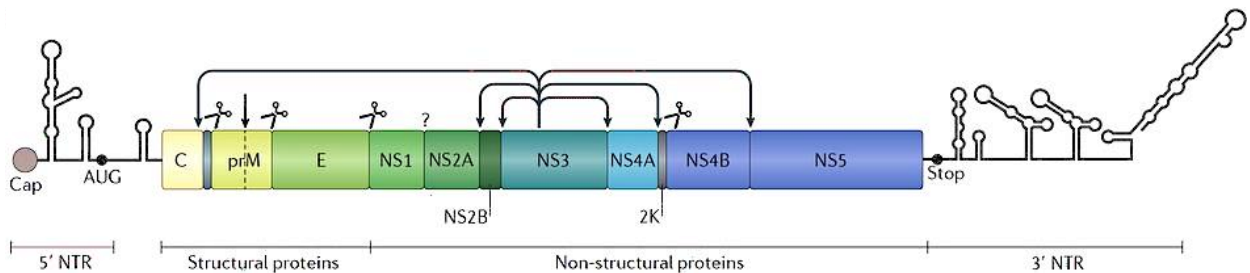


Figura 2. Genoma de los Flavivirus. Se muestra el marco de lectura abierto que codifica para las proteínas estructurales (C-prM-E) y no estructurales (NS1-NS2AB-NS3-NS4AB-NS5), flanqueado por las regiones virales 5' y 3' no traducidas (NTR). El genoma contiene una estructura de tapa tipo 1 en el extremo 5'. La escisión de la poliproteína por señales de peptidasas celulares se indica con tijeras, las flechas denotan la escisión por la proteasa viral, mientras que la flecha vertical indica la escisión por la proteasa furina residente en el aparato de Golgi. El signo de interrogación denota una escisión de poliproteína realizada por una proteasa desconocida.

El extremo 5'-NTR posee un CAP y una longitud de entre 95-101 nucleótidos que se dividen en dos dominios con distintas funciones durante la síntesis del RNA viral. Se ha reportado que el primer dominio es de 70 nucleótidos y se pliega en una estructura tallo-asa (SL-A), la cual actúa como promotor de la polimerasa viral NS5 (RdRp) para la síntesis del RNA viral (FILOMATORI ET AL., 2006) (YU, NOMAGUCHI, PADMANABHAN, & MARKOFF, 2008), mientras que el segundo dominio forma un bucle de tallo corto (SL-B), que contiene secuencias esenciales para la interacción RNA-RNA de largo alcance y la replicación del genoma (ALVAREZ, LODEIRO, LUDUEÑA, PIETRASANTA, & GAMARNIK, 2005). Ambos dominios están separados por una secuencia de oligo (U), que funciona como un espaciador para la función adecuada de los dos bucles. Finalmente, dentro de la secuencia codificante del genoma, justo debajo del codón de iniciación de la traducción AUG, se encuentra una horquilla estable de la cápside (cHP) que también se requiere para la replicación viral del RNA (GEBHARD, FILOMATORI, & GAMARNIK, 2011).

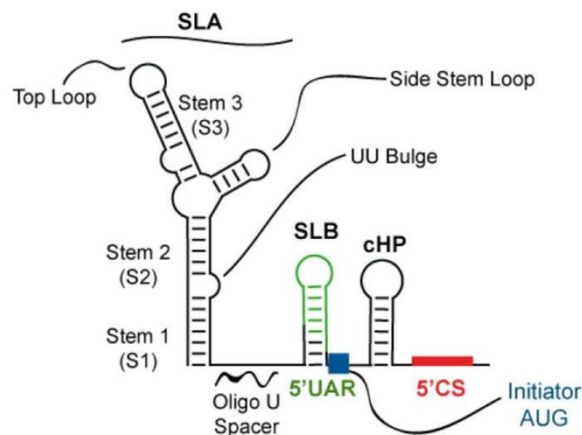


Figura 3. Estructura de la región terminal 5' del genoma Flaviviral. Se muestran los elementos estructurales ubicados en el extremo 5': tallo-asa A (SLA), tallo-asa B (SLB), espaciador oligo (U), iniciador de traducción AUG, horquilla de región de la cápside (cHP) y el elemento 5'CS.

Por su parte el extremo 3'-NTR, carece de cola de poliA y posee una longitud mayor de aproximadamente 450 nucleótidos que se dividen en tres dominios, los cuales juegan papeles cruciales en la síntesis del RNA viral (ALVAREZ ET AL., 2005). El dominio I se encuentra inmediatamente después del codón de paro, y es la región más variable entre *Flavivirus*; el dominio II incluye estructuras características conocidas como DumbBell (DB), los elementos DB contienen secuencias conservadas llamadas RCS2 y CS2 presentes en todos los *flavivirus* transmitidos por mosquitos (HAHN ET AL.,

1987) (FUNK ET AL., 2010). Además, se ha propuesto que estas secuencias están involucradas en dos estructuras de pseudo nudos que parecen tener un papel funcional durante la traducción viral y la síntesis del RNA. Aunque los elementos de RNA dentro de los dominios I y II se consideran prescindibles para la replicación de *flavivirus*, estas estructuras sirven como potenciadores de los procesos virales (MANZANO ET AL., 2011). El dominio III es la región más conservada del 3'-NTR, lleva un elemento CS1 que contiene una secuencia implicada en la interacción de RNA-RNA de largo alcance entre los extremos del genoma viral seguido de una estructura terminal de bucle (3'SL), conformada de dos estructuras adyacentes, una de bucle de tallo corto de 14 nucleótidos (sHP) y otra de bucle de tallo grande de 79 nucleótidos (GEBHARD ET AL., 2011).

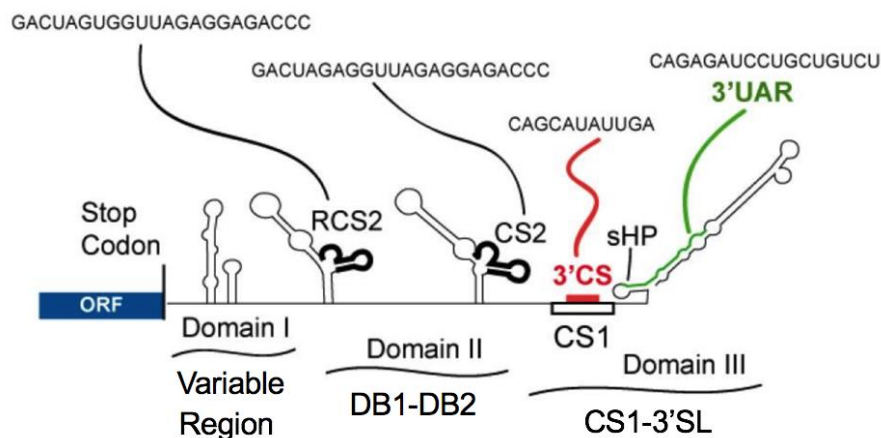


Figura 4. Estructura de la región terminal 3' del genoma Flaviviral. Se indican las estructuras secundarias de los tres dominios ubicados en el extremo 3': dominio I (región variable, VR), dominio II (estructuras con mancuernas (DB1 y DB2) y dominio III (secuencia conservada CS1 y 3'SL). Además, se muestran la ubicación y secuencia de cada uno de los elementos conservados correspondientes a RCS2, CS2, 3'CS y 3'UAR.

Este marco de lectura abierto codifica para una sola poliproteína (AZHAR ET AL., 2015), que al ser escindida por la proteasa viral y proteasas celulares da lugar a tres proteínas estructurales (Cápside [C], Pre-membrana [prM/M] y Envoltura [E]) que forman la partícula viral y juegan un papel en la entrada del virus en la célula huésped, así como en el ensamblaje y liberación de nuevos viriones; y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) implicadas en distintas funciones durante el ciclo replicativo, como la remodelación de membranas especializadas del Retículo Endoplásmico (RE) para la formación de los Complejos de Replicación (CR) (BEST, 2017).

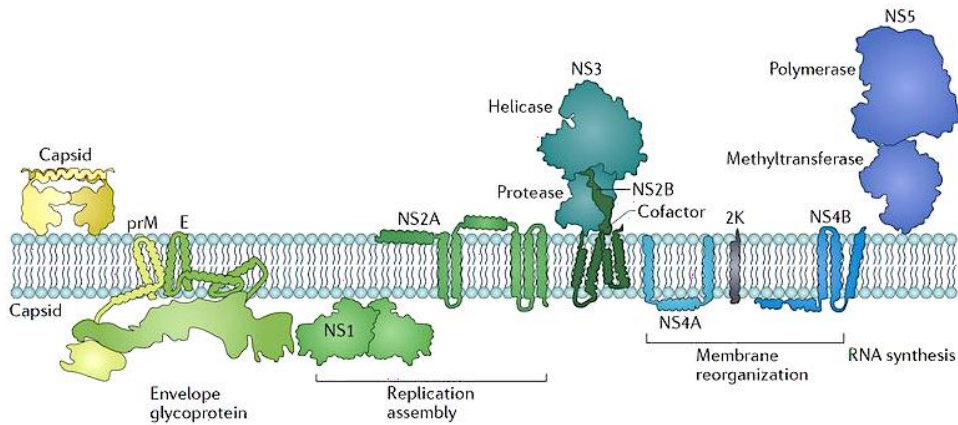


Figura 5. Topología de la membrana de las proteínas virales maduras de los Flavivirus. Se muestran las proteínas estructurales de los *Flavivirus*: proteína C, prM y E que son componentes del virión; así como las proteínas no estructurales: NS1, la única proteína no estructural que reside en la luz del retículo endoplásmico (RE), y NS2A son esenciales para la replicación del virus y la producción de partículas infecciosas; la subunidad de serina proteasa NS2B que actúa como cofactor para la serina proteasa NS3 la cual además es una proteína multifuncional con actividades de RNA 5'trifosfatasa y helicasa; NS4A es una proteína de membrana integral con actividad inductora de curvatura de membrana; el péptido 2K sirve como péptido señal para la inserción de NS4B co-traduccional en la membrana RE; NS4B es una proteína sin actividad enzimática informada que interactúa con NS3 y es absolutamente necesaria para la replicación del virus; NS5 consiste en un dominio N-terminal que posee actividades de guanililtransferasa, guanina-N7-metiltransferasa y nucleósido-2'-O-metiltransferasa involucradas en la captación de 5'-RNA y la metilación del genoma viral, además posee un dominio C-terminal con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) responsable de la síntesis del RNA viral.

Proteínas Virales

Proteína C

La proteína C, también conocida como proteína *core* o de la cápside, es una proteína con un peso molecular de 12 kDa que forma homodímeros en solución con afinidad por ácidos nucleicos y membranas lipídicas.

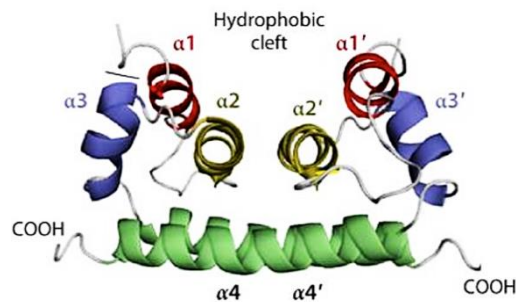


Figura 6. Homodímero de la proteína de la Cápside. Se representa el homodímero y se indican las cuatro hélices α : hélices $\alpha 1$ (rojo), $\alpha 2$ (amarillo), $\alpha 3$ (azul) y $\alpha 4$ (verde). Las etiquetas para una de las dos

subunidades del dímero se designan con símbolos primos (hélices $\alpha 1'$, $\alpha 2'$, $\alpha 3'$ y $\alpha 4'$). Se indica la hendidura hidrofóbica.

La estructura de sus monómeros está conformada por cuatro hélices alfa ($\alpha 1$ a $\alpha 4$) hidrofóbicas que cumplen con diferentes funciones durante el ensamblaje y morfogénesis viral (BYK & GAMARNIK, 2016). Las primeras tres alfa hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 3$) forman un paquete que comprende el núcleo del monómero, sin embargo, las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son las encargadas de anclar la proteína a la membrana del Retículo Endoplásmico. Por su parte, la hélice $\alpha 4$ posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado, formando así un complejo conocido como nucleocápside. Este complejo protege el RNA viral de la degradación y promueve su organización en el interior de la partícula viral en formación. La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros anti paralelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de RNA viral (SAMSA ET AL., 2009).

Se ha reportado que residuos hidrofóbicos de la hélice $\alpha 2$ están involucrados en la asociación de pequeñas gotas lipídicas (Lipid Droplets), presentes en el citoplasma, para promover la formación de la partícula viral (MARTINS ET AL., 2012). Adicionalmente, puede actuar como bisagra para favorecer el acercamiento del RNA viral a la proteína C ya anclada al RE (BYK & GAMARNIK, 2016). Una vez anclada a la membrana del RE, C interactúa con las proteínas precursora de membrana (prM) y de envoltura (E), para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (NEMÉSIO, PALOMARES-JEREZ, & VILLALAIN, 2013).

Proteína prM y M

La proteína precursora de membrana (prM) es una proteína con un peso molecular aproximado de 19-23 kDa, contiene 166 aminoácidos y se localiza en viriones inmaduros, encargada de protegerlos contra la fusión prematura con la membrana del huésped (L. LI ET AL., 2008). El proceso de maduración de los flavivirus convierte al virus inerte en partículas infecciosas y está dirigido por la escisión proteolítica de prM en la posición 91 por la proteasa celular furina del huésped localizada en la red trans-

Golgi (PENG ET AL., 2018), generando el péptido pr y la proteína M con un peso molecular de 9 kDa que consiste en un bucle N-terminal (primeros 20 residuos), un dominio α -helicoidal (MH) y dos dominios transmembrana (MT1 y MT2) y se localiza en la membrana del Retículo Endoplásmico fungiendo un papel importante en la regulación de la salida del virus (WONG, HAQSHENAS, GOWANS, & MACKENZIE, 2012).

Proteína E

La proteína E de los Flavivirus tiene un peso molecular de 53 a 60 kDa, se encuentra distribuida sobre la superficie del virus y está organizada en tres dominios EDI, EDII y EDIII que son estructuralmente distintos. Los tres están conectados a la membrana viral a través de un anclaje helicoidal y entre sí por bisagras flexibles que median cambios irreversibles de conformación durante el ciclo de vida viral (PENG ET AL., 2018). En el entorno endosomal ácido, el dímero E expone el péptido de fusión (PF) altamente conservado en la punta de EDII, necesario para la fusión con la membrana endosomal del huésped, promoviendo el reordenamiento de la proteína E en la superficie del virión de dímero a trímero (BARROWS ET AL., 2018).

La proteína E posee cuatro residuos de histidina en las posiciones 144, 246, 284 y 319, que se encuentran en el interdominio de la interfaz del dímero E y se conservan entre todas las proteínas E del *flavivirus*. Estas histidinas conservadas pueden ser funcionalmente relevantes tanto para el paso sin recubrimiento viral durante la etapa inicial del ciclo de vida del *flavivirus* como para regular la trimerización de la proteína E en condiciones de pH ácido. E además es indispensable en el ciclo replicativo de los flavivirus, pues participa en la unión a los receptores celulares y es el blanco de los anticuerpos neutralizantes. También es responsable de dirigir la penetración, la hemaglutinación y el tropismo celular, además está asociada con la virulencia, la atenuación, el ensamblaje del virión, la estabilidad y maduración (ZHANG ET AL., 2017).

NS1

La proteína no estructural 1 (NS1) de los flavivirus tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa que depende del estado de glicosilación de la proteína (MULLER & YOUNG, 2013). Está sintetizada y modificada en el retículo endoplasmático rugoso, para posteriormente ser transportada al aparato de Golgi donde completa su glicosilación, siendo capaz de formar dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas (rafts) de la membrana plasmática (NOISAKRAN ET AL., 2008).

Esta proteína tiene múltiples funciones en la biología de los flavivirus. NS1 dimérico es esencial para la replicación del genoma viral dentro de las células huésped a través de posibles interacciones con las proteínas transmembranales NS4A y NS4B, mientras que el NS1 hexamérico se secreta e interactúa con múltiples componentes de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, desempeñando un papel en la evasión del sistema inmunológico. NS1 no sólo es esencial para la replicación del genoma de flavivirus y la evasión del sistema inmunológico, también participa en la patogénesis viral y es considerado el principal marcador antigénico de la infección viral (AKEY ET AL., 2014).

NS2A

La proteína no estructural 2A, es una proteína hidrofóbica integral de membrana, multifuncional, con un peso molecular de 22 kDa, esencial para la replicación del RNA. Contiene 5 hélices transmembrana que abarcan la bicapa lipídica del RE y que se requieren para el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1; los residuos N-terminal se generan en el lumen del RE por una proteasa del huésped que se desconoce y la región C-terminal se genera en el citoplasma por la proteasa viral. Se une con alta especificidad a la región 3' UTR del RNA viral y a otros componentes del complejo de replicación como NS3 y NS5 (XIE, GAYEN, KANG, YUAN, & SHI, 2013). Además, el NS2A desempeña funciones en la modulación de la respuesta del interferón antiviral del huésped y el ensamblaje / secreción de partículas virales (LEUNG ET AL., 2008).

NS2B

Proteína con un peso molecular de aproximadamente 14 kDa que posee una región hidrofílica central conservada de 48-89 residuos involucrada en la unión al dominio proteasa de NS3 para actuar como estabilizador y cofactor de ésta, y dos regiones hidrófobas terminales que son responsables de anclar a la membrana del retículo endoplásmico el complejo NS2B/NS3 (BARROWS ET AL., 2018). Este complejo es responsable, junto con la peptidasa señal del hospedero, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales NS2A-NS2B-NS3-NS4A y NS4B-NS5, y de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C (BOLLATI ET AL., 2010). También se encontró que NS2B es capaz de interactuar con las otras tres proteínas asociadas a la membrana, NS2A, NS4A y NS4B, y por lo tanto parece ser la proteína crítica para unir estas cuatro proteínas en un complejo (M. BRINTON & BRINTON, 2013).

NS3

La proteína hidrofóbica NS3 tiene un peso molecular de 70 kDa y se encuentra muy conservada entre los flavivirus. Es una proteína que posee en su extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) que está conectada por un enlazador de 10 residuos a la helicasa. Esta proteasa es una serina proteasa de tipo quimotripsina que participa en la proteólisis de la poliproteína, para liberar las proteínas virales individuales. La proteasa requiere el dominio central de NS2B como cofactor para un correcto plegado y aunque la presencia de los residuos 49 a 67 de NS2B es suficiente para estabilizar el dominio de proteasa (KLEMA ET AL., 2016), se requiere de los residuos 49-96 que son esenciales para la actividad y estabilidad enzimática (SAW, PAN, SUBRAMANIAN MANIMEKALAI, GRÜBER, & GRÜBER, 2018).

Mientras que en el extremo C-terminal, NS3 posee un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y como RNA helicasa (NS3Hel); ambas funciones son indispensables en la replicación viral. Estas funciones están involucradas en el capping y en el desenrollamiento del RNA bicatenario durante la replicación del RNA utilizando la energía suministrada por la hidrólisis de ATP, para favorecer la unión

de la polimerasa NS5 sobre el RNA y dar inicio a la replicación (BOLLATI ET AL., 2010). Recientemente, se ha encontrado que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje (HEATON ET AL., 2010).

NS4A

Proteína integral de membrana de ~16 kDa esencial para la replicación viral. Su región N-terminal de NS4A consta de tres hélices anfipáticas que interactúan con la membrana celular, mientras que la región C-terminal consta de tres regiones transmembrana potenciales (YAN LI, LEE, LOH, & KANG, 2018). Una vez que el genoma viral se traduce, la proteína NS4A se produce en el citoplasma por el complejo de proteasa viral NS2B-NS3 (ZOU ET AL., 2015). El dominio transmembrana de NS4A es escindido por la señalasa del huésped en la luz del RE, una vez madura la proteína NS4A promueve los reordenamientos de la membrana induciendo la curvatura de la membrana del RE (MILLER, KASTNER, KRIJNSE-LOCKER, BÜHLER, & BARTENSCHLAGER, 2007) (BEST, 2017). NS4A colocaliza con la proteína NS3 y el RNA bicatenario (ACOSTA, KUMAR, & BARTENSCHLAGER, 2014); además, ayuda a la eficiencia de la síntesis del RNA viral al interactuar con la proteína NS1, lo que sugiere que NS4A es el sitio de acoplamiento para el complejo de replicación (LINDENBACH & RICE, 1999). NS4A también se asocia con la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) de la célula huésped para unirse indirectamente al RNA bicatenario, estabilizando los intermedios genómicos virales bicatenarios (JIANG, YAO, DUAN, LU, & LIU, 2009) (MCLEAN, WUDZINSKA, DATAN, QUAGLINO, & ZAKERI, 2011).

Se ha reportado que NS4A induce la autofagia para prevenir la muerte celular y facilitar la replicación viral (ZOU ET AL., 2015). Aunque está claro que NS4A está involucrado en la replicación del virus, los mecanismos aún son inciertos.

NS4B

NS4B es una proteína integral de membrana no enzimática y altamente hidrofóbica. Se libera de NS4A y NS5 por medio de la proteasa viral y por un segundo corte mediado por la célula huésped que remueve el péptido 2K para generar la forma

madura de NS4B con un peso molecular aproximado de 28 kDa (CHATEL-CHAIX ET AL., 2015). Los 100 aa N-terminales de NS4B forman dos dominios transmembrana predichos (pTMD1 y pTMD2) que se ubican en el lumen del RE, y tres segmentos transmembranales C-terminales (TDM3, TDM4 y TDM5) que atraviesan la membrana desde el lado luminal al citoplásmico (XIE ET AL., 2013). Las diferentes regiones de NS4B desempeñan diferentes funciones en la replicación viral, así como en las interacciones virus-huésped. Los primeros 125 aminoácidos de NS4B son responsables de la supresión de la señalización de interferón alfa / beta (IFN- α / β) y sus dominios TMD3 y TMD5 contribuyen a la supresión de la respuesta de RNA de interferencia (RNAi) del huésped (XIE ET AL., 2013). Además, NS4B interactúa con el dominio helicasa de NS3 y la disocia del RNA monocatenario modulando así la replicación viral (ZOU ET AL., 2014). Finalmente, NS4A y NS4B pueden funcionar cooperativamente en la replicación viral y en la respuesta del huésped ya que son componentes esenciales del complejo de replicación asociado a membrana del RE.

NS5

Proteína de mayor tamaño y más conservada entre los *flavivirus* (BOLLATI ET AL., 2010), con un peso molecular de 103 kDa. Tiene un dominio N-terminal que posee actividades enzimáticas de metiltransferasa (MTasa) (XIE ET AL., 2013) (guanililtransferasa, guanina-N7-metiltransferasa, y nucleósido-2'O-metiltransferasa), necesarias para la síntesis del *cap* y la metilación del extremo 5' del RNA genómico. Esta metilación evita su reconocimiento y promueve la traducción. Por otro lado, en su dominio C-terminal, se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRps), esencial para la replicación viral pues es donde está la actividad catalítica que realiza la síntesis *de novo* de RNA en la ausencia de un iniciador de RNA (KLEMA ET AL., 2016).

Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señal de localización nuclear en la proteína NS5 que facilita su importe al núcleo (FRASER, RAWLINSON, WANG, JANS, & WAGSTAFF, 2014). En células infectadas NS5, se encuentra predominantemente en el núcleo, donde se cree que desempeña un papel en la evasión de la respuesta inmune innata, pues es también

el antagonista más potente y directo de la señalización JAK-STAT dependiente de IFN-I codificada por todos los flavivirus examinados hasta ahora (BEST, 2017).

Ciclo Replicativo

El proceso de infección comienza con la unión del virus a la superficie de las células susceptibles. Se ha reportado que la proteína E se une a diferentes receptores celulares de alta y baja afinidad que permiten la entrada del virus a la célula (ACOSTA ET AL., 2014). Una vez unidos, los receptores inducen la internalización del virus a través de vesículas de clatrina mediadas por recetores. Los endosomas maduran a endosomas tardíos, donde su acidificación induce cambios conformacionales en la proteína E que permiten la fusión entre la membrana del virus y la del endosoma, promoviendo así el desprendimiento de la nucleocápside y la liberación del RNA viral al citoplasma de la célula; una vez en el citoplasma, el genoma viral actúa como RNA mensajero para asociarse a los ribosomas y posteriormente migrar al retículo endoplásmico rugoso, donde será traducido en una sola poliproteína que al ser escindida por la proteasa viral y las proteasas celulares dará lugar a tres proteínas estructurales (C, prM/M, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (BEST, 2017).

Las proteínas estructurales forman nuevos viriones mediante la unión del RNA viral a la proteína C, cubiertas con proteínas prM y E. Mientras que las proteínas no estructurales son responsables de la replicación viral, la atenuación de la respuesta inmune del huésped, la manipulación de las estructuras y funciones celulares, así como otras interacciones aún no conocidas con las proteínas del huésped (ROTHAN & KUMAR, 2019).

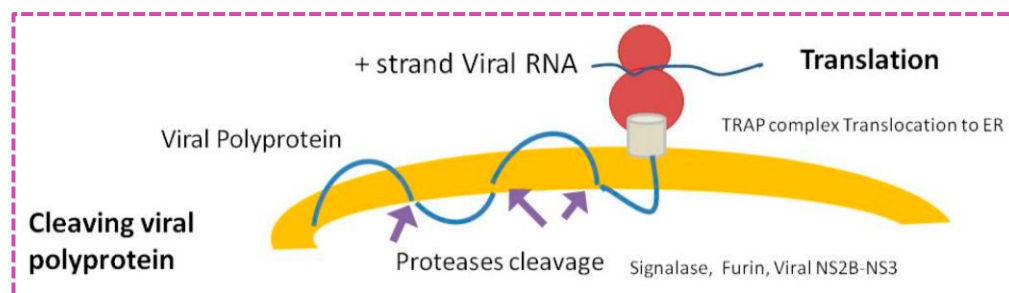


Figura 7. Traducción del RNA y Escisión de la poliproteína viral. Una vez que el ribosoma asociado al RE traduce el RNA viral, el complejo del RE llamado proteína asociada al translocon de mamífero (TRAP)

transloca la poliproteína viral recién sintetizada a la luz del RE, donde es integrada. La escisión de la poliproteína viral ocurre cuando las proteasas de la célula huésped (furina y signalasa) obtienen acceso a los sitios de escisión, liberando así unidades de proteasa viral que posteriormente escindirán a la poliproteína en varios sitios, dando lugar a las proteínas estructurales y no estructurales.

El proceso de replicación de los Flavivirus inicia cuando las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS4A y NS4B; en conjunto con proteínas del huésped, inducen invaginaciones de membrana en el lumen del RE, conocidas como Complejos de Replicación (RC), estos complejos se encuentran cercanos al núcleo y están vinculados al citoplasma por medio de aberturas similares a poros de 11 nm (LESCAR ET AL., 2018). Además, albergan a las proteínas virales NS3 y NS5, las cuales poseen actividades enzimáticas que son necesarias para llevar a cabo la replicación viral. La proteína NS3 tiene actividad de helicasa necesaria para desenrollar el RNA bicatenario utilizando la energía química derivada de la hidrólisis de ATP (ROTHAN & KUMAR, 2019). Mientras que la proteína NS5 es la responsable de la amplificación del genoma; iniciando con su unión a la región 5' del RNA genómico, una vez unidos, los complejos permiten que se realicen copias a partir de la cadena de polaridad positiva, generando cadenas de polaridad negativa, que a su vez son utilizadas como molde para generar múltiples copias de RNA genómico de polaridad positiva que pueden tener tres destinos: pueden servir nuevamente como moldes para la síntesis de RNA, como moldes para la traducción o bien, asociarse con proteínas de la cápside (PRADA-ARISMENDY & CASTELLANOS, 2006).

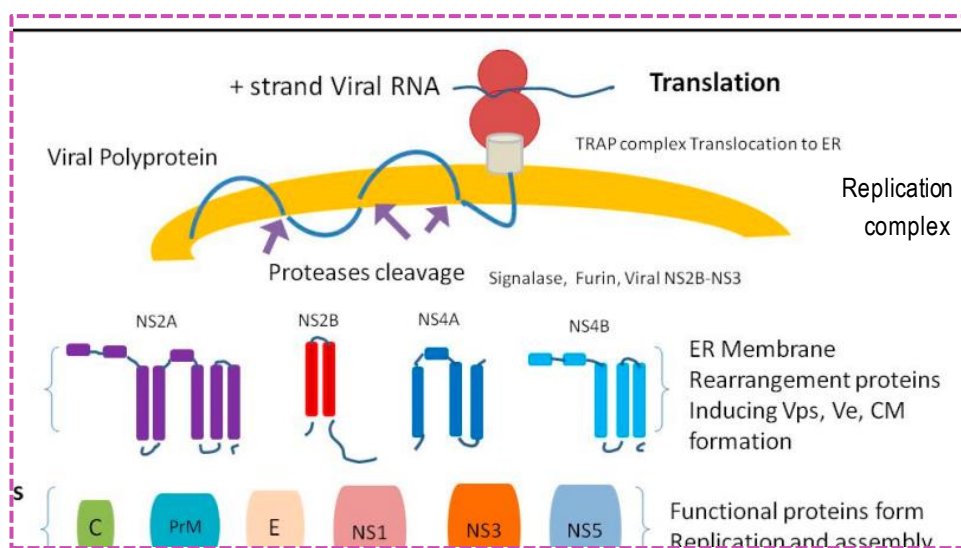


Figura 8. Formación de Complejos de Ensamblaje y Replicación viral. La membrana del retículo endoplásmico (RE) sufre una amplia reorganización después de liberar proteínas virales creando estructuras conocidas como complejos de replicación. El RNA genómico contenido en estos complejos pueden tener tres destinos: puede servir como molde para la síntesis de RNA, como molde para la traducción o bien, asociarse con proteínas de la cápside para formar nuevos viriones.

Al asociarse con C, la nucleocápside resultante se empaqueta dentro de una envoltura lipídica derivada del huésped que contiene 180 copias de cada una de las proteínas estructurales prM y E formando así nuevos viriones inmaduros. Esta partícula inmadura es transportada a lo largo de la ruta secretora, a través del complejo de Golgi, donde se produce su maduración. Ésta incluye el procesamiento de la glicoproteína prM por una proteasa celular de tipo furina, dando lugar a la forma madura (M). El corte se produce dentro de los compartimentos ácidos de la red que constituyen el trans-Golgi y permite la reorganización de la glicoproteína E para dar lugar a partículas maduras infecciosas que finalmente se liberan al medio extracelular (ACEBES & SAIZ, 2012) para interactuar con otras células permisivas y dar secuencia a un nuevo ciclo infeccioso.

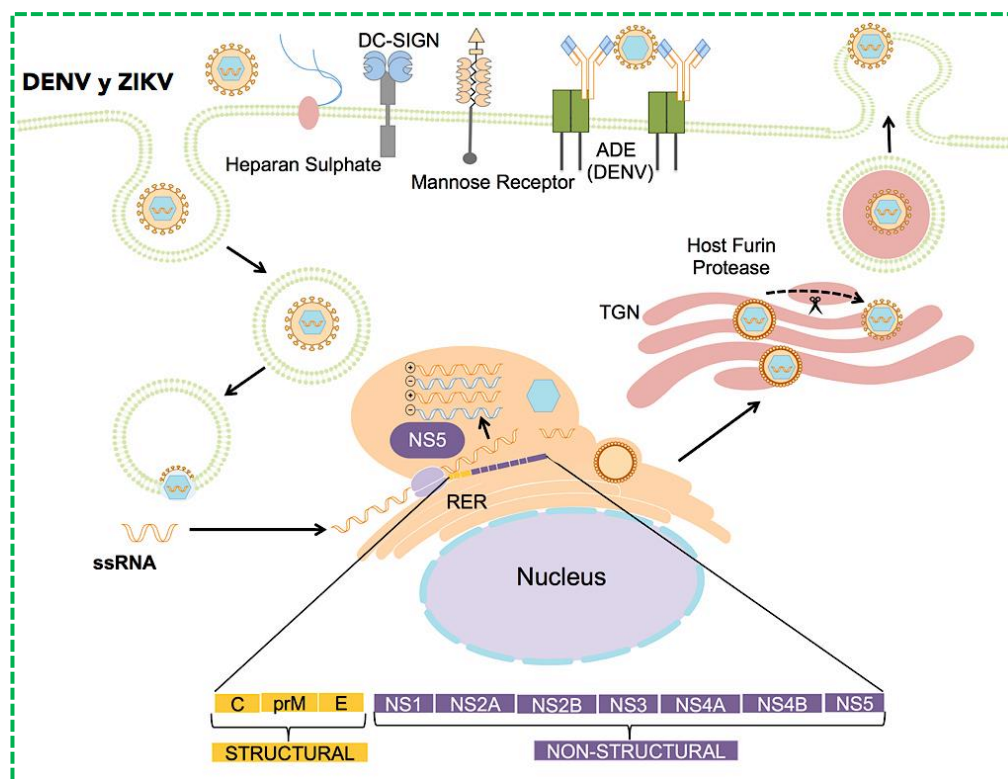


Figura 9. Representación esquemática del Ciclo Replicativo de los Flavivirus. El virus se une a su receptor de la célula huésped (DC-SIGN, heparán sulfato, receptor de manosa, etc.) y entra a la célula a través de endocitosis. Una vez en el endosoma, los cambios de pH promueven la eliminación de la nucleocápside

y la liberación del RNA viral al citoplasma. En el citoplasma, el RNA se une a los ribosomas en el retículo endoplásmico y genera una sola poliproteína, que se escinde proteolíticamente para producir tres proteínas estructurales y siete no estructurales. La polimerasa NS5 replica el genoma y el RNA resultante se une a la nucleocápside, y el ensamblaje se lleva a cabo en la sala de emergencias. El virión inmaduro se transloca al aparato de Golgi, y la proteasa furina del huésped escinde el péptido pr para generar viriones maduros, que salen de la célula para repetir el ciclo.

II. Antecedentes Generales

El ciclo replicativo de los Flavivirus no solo requiere de los componentes del virus para ser exitoso y producir progenie, sino que también requiere de una estrecha interacción con diferentes factores celulares y la neutralización de muchos otros que protegen a la célula de la infección.

El interferón de tipo I (IFN-I) por ejemplo, se produce en respuesta a infecciones virales y desempeña un papel importante en la inmunidad innata frente a la infección viral. Los flavivirus son capaces de antagonizar la respuesta del IFN-I del huésped utilizando diferentes mecanismos (BEST, 2017). En el caso de DENV, puede inhibir tanto la producción de IFN-I como la señalización en células humanas susceptibles, incluidas las células dendríticas (CD). El complejo de proteasa NS2B-NS3 de DENV funciona como un antagonista de la producción del IFN-I, y su actividad proteolítica es necesaria para esta función (RODRIGUEZ-MADOZ ET AL., 2010). A su vez las proteínas NS2A, NS4A, NS4B y NS5 son capaces de antagonizar la señalización de IFN-I al bloquear los diferentes componentes de la vía de señalización JAK-STAT (MORRISON, AGUIRRE, & FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Una segunda estrategia de evasión de la respuesta inmune, consiste en la mimetización del RNA del huésped mediante la modificación del RNA viral, incorporando en el extremo 5' del genoma (dentro del gen NS5) una 2'-O-metiltransferasa (2'-O-MTasa) (MIORIN, MAESTRE, FERNANDEZ-SESMA, & GARCÍA-SASTRE, 2017). De esta manera, los miembros de la familia de proteínas inducidas por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos (IFIT) no pueden unirse y secuestrar el RNA viral para detener su traducción (BARROWS ET AL., 2018).

Otro mecanismo utilizado por los flavivirus para la evasión de la respuesta inmune son los Complejos de Replicación, estos secuestran y protegen el RNA bicatenario

así como el RNA viral recién sintetizado (AKTEPE & MACKENZIE, 2018), evitando así su detección por Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR) y por proteínas antivirales como la Proteína Quinasa R (PKR) hasta que se produce suficiente progenie. Este es un mecanismo pasivo que se logra observar durante las primeras etapas de la infección (MIORIN ET AL., 2017).

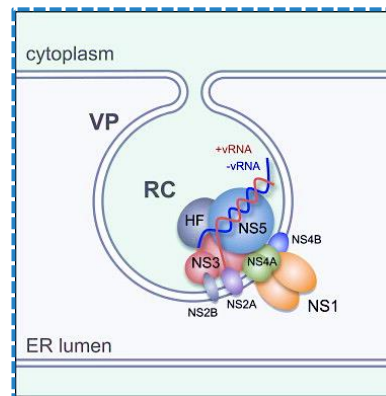


Figura 10. Complejo Replicativo de los Flavivirus.

La formación de complejos de replicación durante la infección por flavivirus, requiere de una alteración en la composición lipídica de la membrana de las células del huésped (SOTO-ACOSTA, BAUTISTA-CARBAJAL, CERVANTES-SALAZAR, ANGEL-AMBROCIO, & ANGEL, 2017) y de dos enzimas celulares involucradas en el metabolismo de ácidos grasos (Ácido graso sintasa [FAS] y la acetil-CoA carboxilasa 1 [ACACA]). NS4A inicialmente induce la curvatura de la membrana seguida por el reclutamiento de FAS al complejo de replicación a través de la interacción con la proteasa viral NS3 (HEATON ET AL., 2010), donde aumenta la formación de ácidos grasos a partir de acetil-CoA. La longitud de las cadenas de ácidos grasos y el nivel de colesterol pueden modular la curvatura y la plasticidad de las membranas, lo que nos permite inferir que son procesos importantes para la formación del Complejo Replicativo (REID, AIRO, & HOBMAN, 2015).

Proteínas virales que se translocan al núcleo

Es bien sabido que los flavivirus modulan la composición y estructura de las membranas en el citoplasma que son cruciales para una replicación eficiente y para evadir la detección de la respuesta inmune. Debido a que el genoma de flavivirus consta de RNA de sentido positivo, la replicación puede ocurrir completamente

dentro del citoplasma. Sin embargo, se ha reportado que algunas proteínas virales también tienen la capacidad de translocarse al núcleo, con roles potenciales en la replicación y la perturbación del sistema inmunológico (LOPEZ-DENMAN & MACKENZIE, 2017).

Proteína C

La proteína C, posee tres señales de localización nuclear (NLS) (SANGIAMBUT ET AL., 2008) que le permiten translocarse de manera activa desde el citoplasma hacia el núcleo mediante su interacción con la proteína alfa-importina (TIWARY & CECILIA, 2017). En el caso de DENV, se ha reportado que la localización nuclear de C es independiente del serotipo.

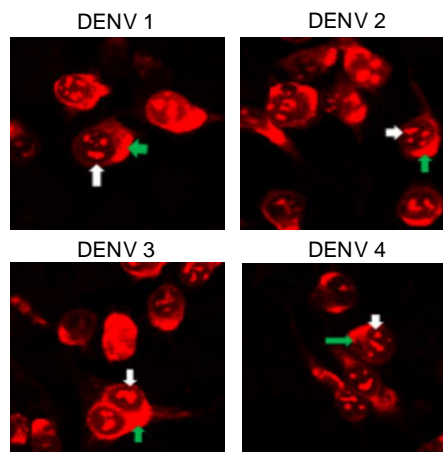


Figura 11. Localización nuclear de C tras la infección con los cuatro serotipos de DENV. La localización nuclear de C del DENV es común para los cuatro serotipos. Las flechas blancas muestran la acumulación de C en el núcleo y las flechas verdes muestran la acumulación de C en el citoplasma.

Además de su función estructural, se ha demostrado que la proteína C, tiene otras funciones relevantes derivadas de su presencia en el núcleo (OLIVEIRA ET AL., 2017). Una vez en el entorno nuclear, la proteína C puede actuar como tipo-histona, interactuando con las histonas centrales e interrumpiendo la formación de nucleosomas (COLPITTS, BARTHEL, WANG, & FIKRIG, 2011), también se ha descrito que la proteína C de flavivirus interactúa con otras proteínas nucleares del huésped como: Daxx, sensibilizando a las células hepáticas a la apoptosis mediada por Fas (LIMJINDAPORN ET AL., 2007) (NETSAWANG ET AL., 2010); así como con la proteína hnRNP-K (CHANG ET AL., 2001) (BRUNETTI, SCOLARO, & CASTILLA, 2015). La proteína C, interactúa en el nucléolo con la Nucleolina, la cual es importante para la formación de nucleocápsides estables y funcionales. En este estudio demostró que la

interrupción de dicha interacción dio como resultado una infectividad reducida de los viriones (BALINSKY ET AL., 2013).

Proteína NS5

Por su parte, la proteína NS5 tiene una localización nuclear es serotipo específica. Mientras que para DENV2 y DENV3 la localización de NS5 es predominantemente nuclear, para DENV1 y DENV4 es principalmente citoplásmica (TAY ET AL., 2013) (HANNEMANN ET AL., 2013).

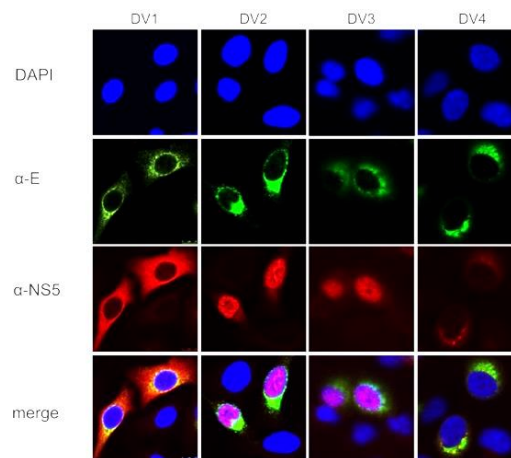


Figura 12. Localización de NS5 tras la infección con los cuatro serotipos de DENV. La localización NS5 (rojo) del DENV es independiente del serotipo. DENV-2 y DENV-3 muestran una acumulación de NS5 predominante en el núcleo, mientras que DENV-1 y DENV-4 tienen una mayor acumulación de NS5 en el citoplasma.

Desafortunadamente, tanto la importancia de la distribución subcelular de NS5 como su papel en el núcleo, aún son desconocido. Hasta ahora la única función bien caracterizada de NS5 en núcleo es la de unirse al espliceosoma e inhibirlo, inhibiendo así el splicing de los RNAs en el núcleo. Esto generaría una pobre migración de mensajeros celulares maduros hacia el citoplasma, lo que resultaría en una menor competencia para los mensajeros virales y un entorno propicio para la replicación del virus (ZHAO ET AL., 2015).

Proteínas celulares que se translocan al citoplasma

Al ser parásitos intracelulares obligados, los virus son capaces de secuestrar y manipular proteínas, componentes y procesos de la célula huésped para facilitar desde su unión a las células, su entrada a las mismas, el inicio y la regulación de la transcripción, la replicación de sus ácidos nucleicos, así como el aumento y la regulación de la traducción de sus RNAm, el transporte de sus proteínas dentro de la célula infectada, hasta el ensamblaje y la maduración de viriones de la progenie viral. Se ha reportado que durante la infección por *Flavivirus* se altera la localización subcelular de algunas proteínas del huésped, siendo esta movilización importante para el proceso de replicación de estos virus.

Las “Dead box helicases” son un grupo grande de proteínas, con funciones variadas. Muchas de estas proteínas han sido identificadas como cofactores para la replicación o para ayudar en la respuesta antiviral, demostrando que su secuestro podría ser esencial para la replicación de los flavivirus. La proteína DDX3, por ejemplo, es una proteína localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo, se ha reportado que se redistribuye a los sitios de replicación del JEV en el citoplasma y que una vez ahí interactúa con las regiones 5' y 3' del genoma viral, así como con NS5 y NS3 participando en la infección por JEV (C. LI ET AL., 2014). La DDX56, es otra proteína que se transloca del núcleo hacia los sitios de replicación del WNV en donde interactúa con la cápside participando en el correcto ensamblaje de partículas infecciosas (XU & HOBMAN, 2012) (REID & HOBMAN, 2017). DDX21 por su parte, es una proteína nuclear que se relocaliza hacia el citoplasma de la célula infectada para activar la respuesta inmune innata y, por lo tanto, inhibe la replicación de DENV en las primeras etapas de la infección. Por tanto, DDX21 se degrada por el complejo viral NS2B-NS3 para así inhibir la inmunidad innata y facilitar la replicación de DENV (DONG ET AL., 2016).

Otro conjunto de proteínas que se transportan desde el núcleo al citoplasma durante la infección por flavivirus, son las proteínas TIAR y TIA1, las cuales interactúan con la región 3' NTR del WNV, ayudando a la replicación viral (W. LI ET AL., 2002). El secuestro de estas proteínas tiene una ventaja adicional pues también están

asociadas con la formación de gránulos de estrés (SG) y, al inhibir la formación de SG, pueden evitar el cebado de la respuesta inmune innata (EMARA, LIU, DAVIS, & BRINTON, 2008). Por su parte, la proteína La es una ribonucleoproteína que se encuentra en el núcleo de las células sanas; Sin embargo, se ha demostrado que también es una proteína que se redistribuye al citoplasma durante la infección por DENV (YOCUPICIO-MONROY, PADMANABHAN, MEDINA, & DEL ANGEL, 2007) y que se une a las regiones 5' y 3' NTR de los flavivirus, así como a las proteínas virales NS5 y NS3 favoreciendo la replicación viral (GARCÍA-MONTALVO, MEDINA, & DEL ANGEL, 2004).

Finalmente, durante las infecciones por DENV, se ha sugerido una translocación clara de la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) desde el núcleo hacia el citoplasma desempeñando un papel en la replicación viral (AGIS-JUÁREZ ET AL., 2009). La proteína PTB pertenece a la familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares (hnRNP) y está implicada en varios aspectos del metabolismo celular del RNAm incluyendo el empalme, la estabilidad del RNA, y en la traducción de los RNAm virales y celulares (BHULLAR, JALODIA, KALIA, & VRATI, 2014).

Familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares

Los miembros de la familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares (hnRNP), son un grupo de proteínas celulares de unión a RNA (RBP), en asociación con RNA nuclear heterogéneo. Esta familia comprende alrededor de 20 miembros cuyos pesos moleculares varían de 34 a 120 kDa (DIWAKER, MISHRA, GANJU, & SINGH, 2016), y se nombran alfabéticamente de hnRNP-A a hnRNP-U. Se ha reportado que muchos hnRNP están presentes en los mismos complejos, sin embargo, y aunque comparten algunas características generales, pueden variar en términos de composición de dominio y propiedades funcionales (CHAUDHURY, CHANDER, & HOWE, 2010). Todos los hnRNP contienen al menos un motivo de unión a RNA, ya sea un motivo de reconocimiento de RNA (RRM), un motivo de reconocimiento de cuasi-RNA (qRRM), un dominio homólogo a K (KH) o bien un dominio que consiste en repeticiones Arg-Gly-Gly (RGG); así como dominios auxiliares, tales como los

motivos ricos en Glicina cruciales para las interacciones proteína-proteína y la localización subcelular (GEUENS, BOUHY, & TIMMERMAN, 2016).

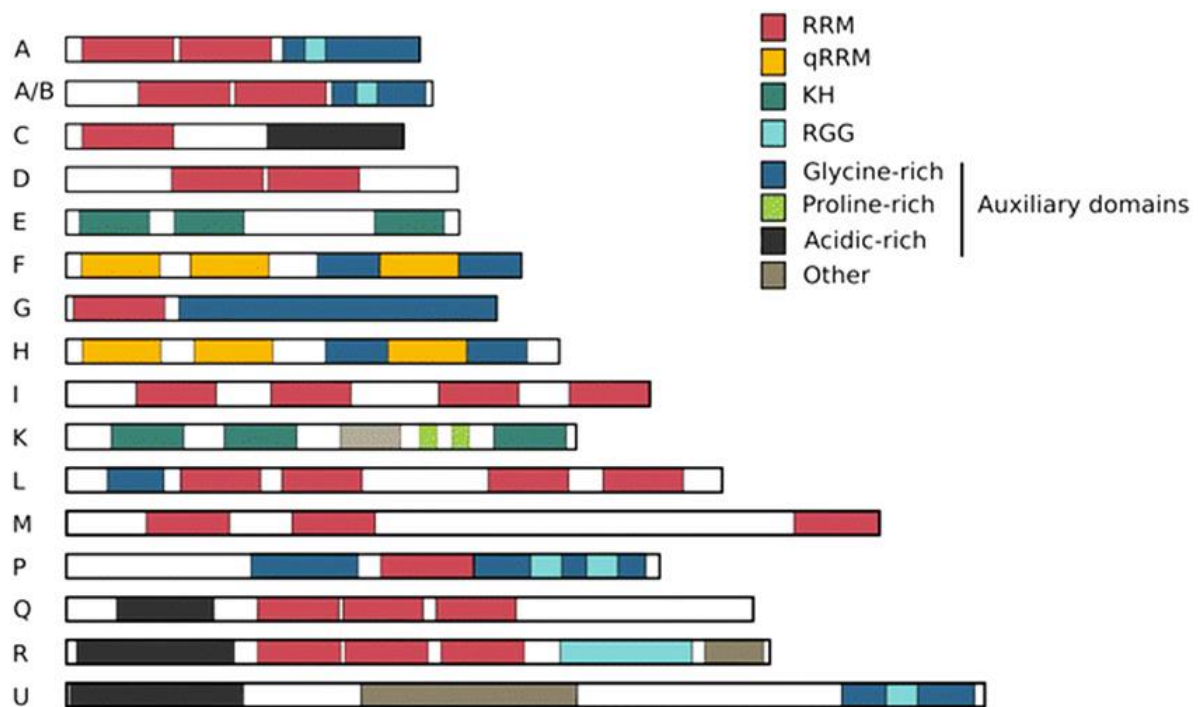


Figura 13. Familia de las Ribonucleoproteínas Heterogéneas Nucleares (hnRNP).

Estas proteínas poseen diversas funciones nucleares y citoplasmáticas. Se ha reportado que los hnRNP están involucrados en diferentes etapas del metabolismo del RNAm que van desde ayudar a controlar la maduración de los RNA nucleares heterogéneos recién formados (RNAs / pre-RNAm) en RNA mensajeros (RNAm) hasta estabilizarlos durante su transporte celular y controlar su traducción (CHAUDHURY

ET AL., 2010) (GEUENS ET AL., 2016).

Teniendo en cuenta su diversidad funcional y complejidad, los hnRNP actúan como proteínas clave en el metabolismo celular de los ácidos nucleicos. Comenzando con su unión a varios factores de transcripción y otras RBP, así como a secuencias promotoras y potenciadoras para dirigir la transcripción (1). Una vez que la RNA polimerasa II libera una parte del producto de la transcripción recién formado, las hnRNP y snRNP se unen rápidamente para estabilizarlo, ya formados los complejos RBP correctos, las secuencias intrónicas son eliminadas por el espliceosoma (2). Los RNAm maduros se estabilizan mediante la unión de

varios tipos de RBP, incluidos los hnRNP, que se consideran necesarios para la exportación a través del complejo de poro nuclear (NPC) y su transporte a través del citoplasma hasta que se inicia la traducción (3). Como los hnRNP tienen la capacidad de unirse a los 3'- y 5'-NTR de los RNAm, pueden controlar la represión o mejorar la traducción, dependiendo de la composición de los complejos en los sitios donde se unen los factores de iniciación de la traducción (4) (GEUENS ET AL., 2016).

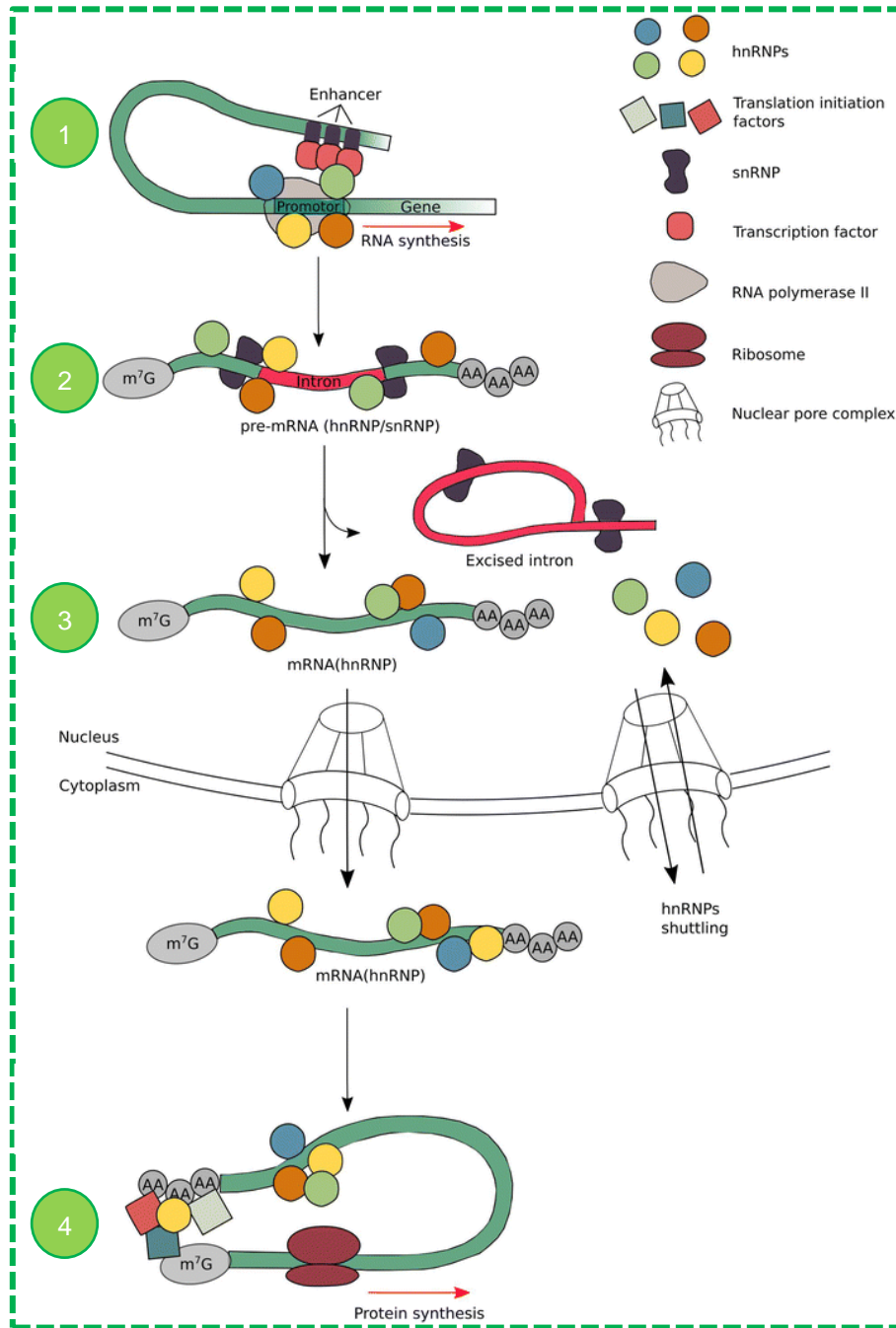


Figura 14. Funciones nucleares y citoplasmáticas de hnRNP.

III. Antecedentes Específicos

Las proteínas hnRNP con frecuencia se someten a modificaciones postraduccionales como metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, lo que produce cambios en su actividad biológica y localización subcelular (CHAUDHURY ET AL.,

2010). La mayoría de estas proteínas posee una señal de localización nuclear convencional (NLS) y están predominantemente presentes en el núcleo durante su estado estacionario. Sin embargo, pueden translocarse al citoplasma tras la estimulación postraduccional o mediante el reclutamiento de otros hnRNPs (HAN, TANG, & SMITH, 2010).

Relocalización de diferentes hnRNP y su papel en la replicación viral

Hasta el día de hoy, no se ha dilucidado exactamente qué proteínas virales se encargan del secuestro de proteínas del huésped, sin embargo, lo que sí tenemos claro es que muchos virus han evolucionado para mediar el desplazamiento núcleo-citoplasma de estas proteínas celulares, confiriéndoles un papel importante en la replicación viral.

En poliovirus, por ejemplo, se reportó que la proteína hnRNP-M se reubica del núcleo al citoplasma durante la infección, además, al inhibir su función demostró ser un factor celular crucial para facilitar la infección viral (JAGDEO ET AL., 2015). Por otro lado, en rotavirus, se describió la relocalización del núcleo hacia el citoplasma de diferentes hnRNP como: A1, C1, D, E, F, F/H, I, K, L, M y U; así como su colocalización con proteínas residentes de los viroplasma, estos viroplasma son análogos a los complejos de replicación en los Flavivirus. Adicional a esto, se demostró que estas proteínas celulares promueven la expresión de proteínas virales y la producción viral (DHILLON ET AL., 2018).

En el caso de un miembro de la familia *Flaviviridae*, como el Virus de la Hepatitis C (HCV), se ha reportado que hnRNP-A1 se transloca del núcleo al citoplasma y una vez en el citoplasma colocaliza con la polimerasa viral NS5b. hnRNP-A1 interactúa con la proteína de andamio Septina 6 y de manera interesante, al igual que la hnRNP-L interactúa con las regiones no traducidas 5' y 3' del virus promoviendo así su replicación (KIM, SEOL, SONG, PARK, & JANG, 2007) (YOU LI, MASAKI, SHIMAKAMI, & LEMON, 2014).

Específicamente en *Flavivirus*, se ha reportado que durante la infección por JEV, la proteína hnRNP-A2 se moviliza del núcleo al citoplasma y una vez ahí, colocaliza con la proteína C. Además de la proteína central, hnRNP-A2 también se asoció con

la proteína no estructural NS5 de JEV y con la región 5' no traducida del RNA de sentido negativo promoviendo la replicación viral (KATOH ET AL., 2011).

Estos hallazgos nos han permitido comprender un poco más los mecanismos que los virus utilizan para controlar la respuesta inmune y mejorar la producción de nuevas partículas virales aprovechando componentes de diferentes compartimentos.

Miembros de la familia hnRNP involucrados en la replicación del DENV

La síntesis de RNA de cadena positiva y negativa en flavivirus es un proceso complejo que requiere de la interacción de estructuras secundarias del RNA viral con componentes nucleares del huésped para facilitar la eficiencia de la replicación. Estas interacciones ocurren en diferentes etapas y tienen papeles importantes en la síntesis de RNA, así como en la circularización del genoma (LOPEZ-DENMAN & MACKENZIE, 2017). De manera interesante, la participación de diversas hnRNP en la replicación de DENV ha sido investigada por diferentes grupos, demostrando que no solo son cruciales en sus funciones celulares, sino que además son importantes para la replicación de este virus.

La proteína hnRNP-K y hnRNP-E2, son muy similares entre sí y se ha reportado que ambas interactúan con la proteína C del DENV en el núcleo para afectar la traducción del RNA viral y celular (CHANG ET AL., 2001).

Por su parte, las proteínas hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, hnRNP-Q y hnRNP H se unen específicamente y con alta afinidad a la región 3'-NTR, lo que sugiere que estas moléculas pueden desempeñar un papel biológicamente significativo en el ciclo de vida de DENV (PARANJAPÉ & HARRIS, 2007).

El complejo de proteínas hnRNP-C1/C2 también ha sido estudiado ampliamente, en principio se confirmó su asociación con la proteína no estructural NS1 del DENV, lo que sugirió que dicha interacción podría promover respuestas celulares favorables para la supervivencia del virus en las células huésped o bien tener implicaciones en la replicación del virus (NOISAKRAN ET AL., 2008).

Sin embargo y pesar de dichas sugerencias el papel de su asociación permaneció indefinido; hasta que se reportó la interacción del complejo hnRNP-C1/C2 con Vimentina, el cual es un filamento intermedio que apoya la integridad celular, este se recluta en la región perinuclear con un reordenamiento estructural denso durante la infección por DENV, y es necesario para el proceso de infección de DENV (CHEN ET AL., 2008) (KANLAYA, PATTANAKITSAKUL, SINCHAIKUL, CHEN, & THONGBOONKERD, 2010). Adicional a esto se demostró la asociación de hnRNP-C1/C2 con RNA viral, hallazgos que permitieron dilucidar la importancia de dicho complejo en la replicación viral (DECHTAWEWAT ET AL., 2015).

Otro estudio más reciente reportó que la infección por DENV-2 promovió la translocación citoplasmática de hnRNP-K, además de inhibir la multiplicación de DENV-2 al inducir su eliminación mediante RNA interferente, por lo que se demostró en este estudio que la proteína hnRNP-K es un factor del huésped requerido para la multiplicación del DENV (BRUNETTI ET AL., 2015).

Por otro lado, la glucoproteína NS1 del DENV es un modulador clave de la respuesta inmune del huésped y también está implicada en la replicación viral. Se ha reportado una interacción clave de NS1 con la proteína del huésped hnRNP-H que permite una replicación viral efectiva del DENV. Estos informes en conjunto, sugieren que la familia de proteínas hnRNP participa activamente en el proceso de replicación y maduración de este virus y que las proteínas virales interactúan directamente con las proteínas hnRNP del huésped o influyen indirectamente en la expresión de otras proteínas celulares vitales al causar la inducción de las hnRNP (DIWAKER ET AL., 2016).

hnRNP-F

En particular, la proteína hnRNP-F es una proteína estructuralmente similar a la ya mencionada hnRNP-H. Posee 3 dominios de unión a RNA conocidos como Motivos de Reconocimiento de cuasi RNA (q-RRM, debido a que no son conservados), que explican su unión específica al RNA rico en G y dos dominios auxiliares ricos en glicina (GRD) que se denominan dominios GY y GYR (aa 194 a 292), involucrados en las interacciones proteína-proteína (DUSEN, YEE, McNALLY, & McNALLY, 2010).

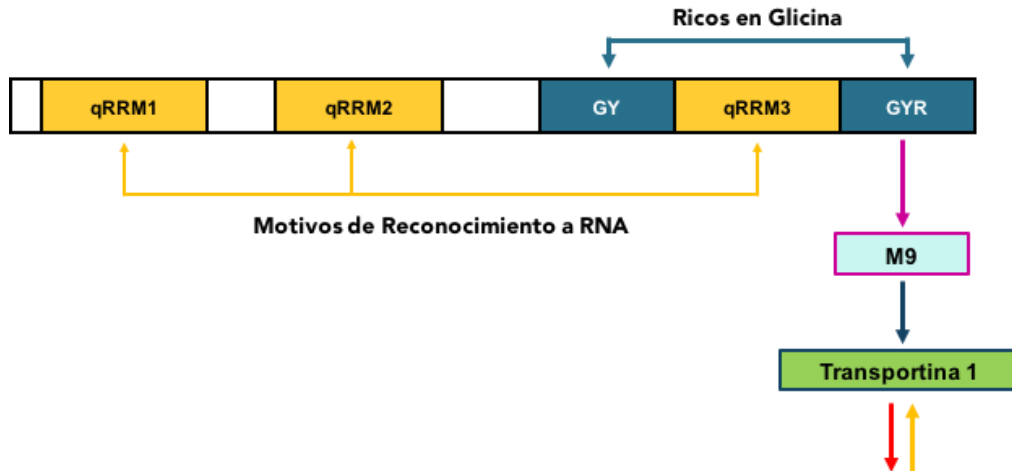


Figura 15. Representación estructural de proteína hnRNP-F.

hnRNP-F es una proteína con un peso molecular de 53 kDa, que tiene una localización principalmente nuclear, sin embargo, se ha reportado su localización citoplasmática junto con otras hnRNPs (HAN ET AL., 2010). La señal que media su desplazamiento entre el núcleo y el citoplasma se ha identificado como un dominio de 38 aminoácidos denominado M9 que reside dentro del dominio GYR, capaz de interactuar con el receptor de importación Trn1 (Transportina 1) de manera bidireccional (DUSEN ET AL., 2010).

Previamente en nuestro laboratorio se reportó que la proteína hnRNP-F interactúa con la proteína NS5 de DENV-2. Adicional a esto se reportó por medio de un ensayo de fluorescencia que hnRNP-F se transloca de núcleo a citoplasma durante el ciclo de replicación de este virus.

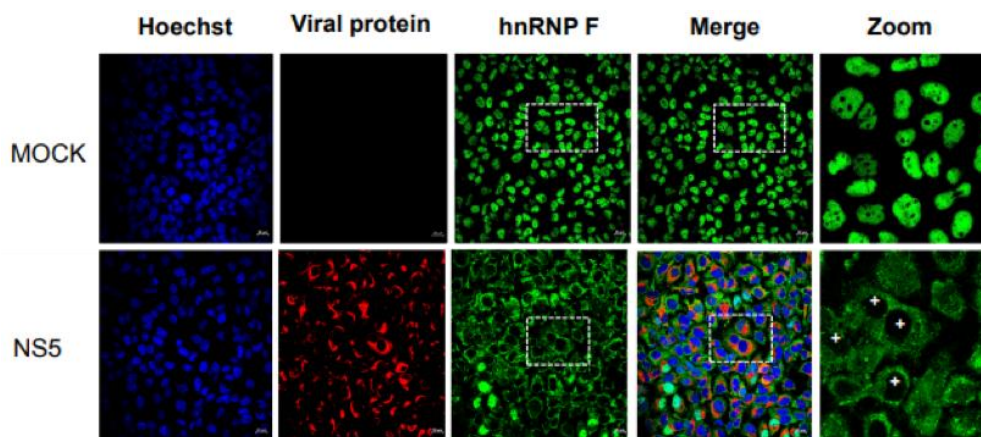


Figura 16. Translocación de hnRNP-F tras la infección con DENV-2.

Curiosamente al analizar por ensayos de Western Blot la presencia de la proteína hnRNP-F durante la infección, observaron que la cantidad de esta proteína no se modifica con el paso de la infección (CERVANTES-SALAZAR, GUTIERREZ-ESCOLANO, REYES-RUIZ, & ANGEL, 2018).

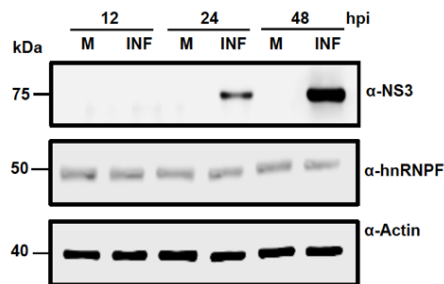


Figura 17. Análisis de la presencia de hnRNP-F durante la infección con DENV-2.

Hasta el momento se ha descrito la interacción de hnRNP-F con la proteína NS5 de DENV-2, así como su movilización del núcleo hacia el citoplasma, sugiriendo un posible papel en la replicación de este virus; sin embargo, se desconoce si esta movilización es conservada entre los distintos serotipos del virus Dengue y en otros miembros del género Flavivirus como ZIKV.

IV. Justificación

En el género Flavivirus se encuentran arbovirus de importancia médica como DENV y ZIKV. Se ha descrito que durante la infección con DENV se movilizan proteínas nucleares como DDX21, La y PTB hacia el citoplasma y que estas proteínas son importantes para el ciclo de replicación. De manera similar, se han reportado proteínas de unión a RNA como la hnRNP A1/C1/K y H participando en el ciclo de replicación de DENV a través de su interacción tanto con proteínas virales como con el genoma. Dado que se ha descrito que hnRNP-F se moviliza del núcleo al

citoplasma durante la infección con DENV-2, es importante analizar si esta movilización es conservada entre los distintos serotipos del DENV y en otros miembros del género *Flavivirus* como Zika. Esto nos ayudará a comprender mejor la función de hnRNP-F en la replicación de estos virus.

V. Hipótesis

hnRNP-F es capaz de translocarse del núcleo al citoplasma durante la infección por ZIKV y los cuatro serotipos de DENV.

VI. Objetivos

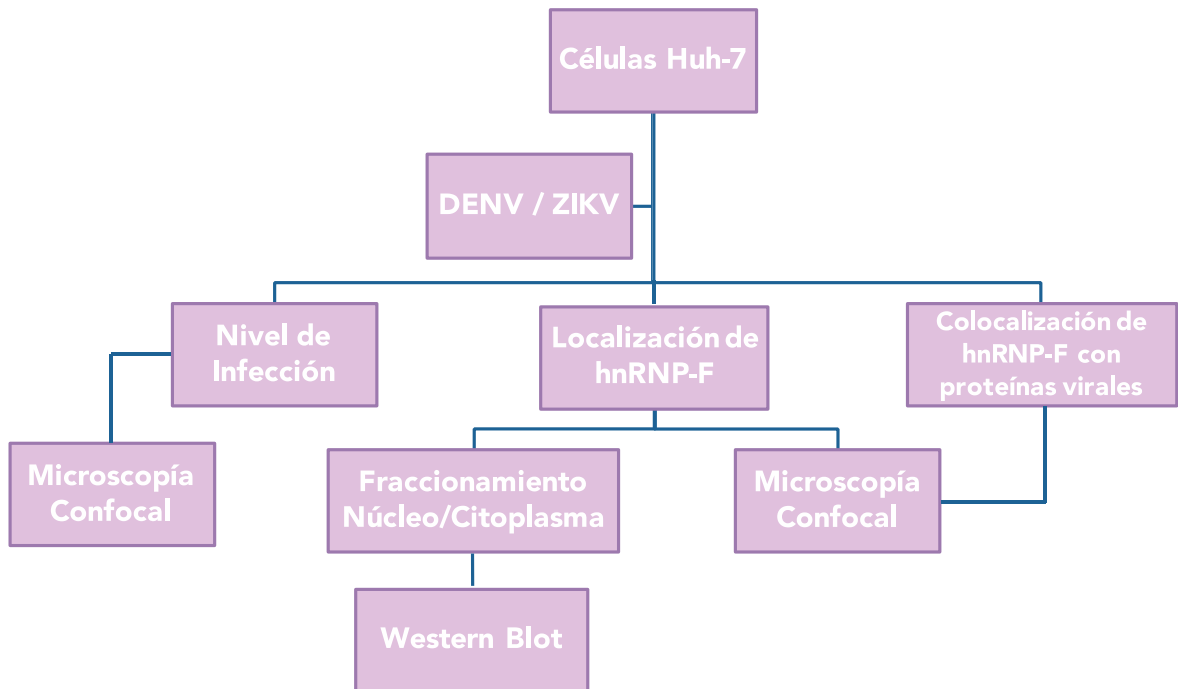
General

- Estudiar la distribución subcelular de hnRNP-F y su colocalización con distintos componentes virales durante la infección por ZIKV y los cuatro serotipos de DENV.

Particulares

- Analizar la localización subcelular de hnRNP-F durante la infección por ZIKV y los cuatro serotipos de DENV.
- Determinar la colocalización de hnRNP-F con diferentes proteínas virales durante la infección con DENV y ZIKV.

VII. Diagrama de Flujo de Trabajo



VIII. Materiales y Métodos

Cultivos Celulares y Virales

Para la evaluación de la relocalización de la proteína hnRNP-F se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7), así como el ZIKV y los cuatro serotipos del DENV.

Cultivo de células Huh-7 (Hepatocarcinoma Humano)

Las células Huh-7, se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en medio *DMEM* Advanced (Gibco), suplementado con glutamina 2 mM, penicilina (50,000 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), suero fetal bovino al 7% (FBS) y 1 ml/L de anfotericina B (Fungizone).

Propagación DENV y ZIKV

Para llevar a cabo la propagación del ZIKV, así como la de los cuatro serotipos del virus DENV se utilizaron ratones CD-1 lactantes proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), estos ratones fueron inoculados con el virus a propagar por vía intracraneal y después de 4 a 5

días de infección, el cerebro de los ratones fue recuperado, homogeneizado, clarificado mediante centrifugación y filtrado en una membrana de 0.22 μ M. El virus presente en el lisado celular fue titulado por ensayo de focos en células Huh-7.

Infección con DENV y ZIKV

Las células Huh-7, al 80% de confluencia fueron lavadas con medio HANKS e infectadas con DENV o ZIKV durante 2 horas a 37°C; una vez terminado este tiempo, el sobrenadante fue retirado y las células se lavaron con medio completo DMEM. Posteriormente, se añadió medio completo y se permitió la infección por un periodo de 24/48 horas a 37°C, para finalmente realizar los ensayos pertinentes con las células infectadas.

Ensayo de Focos

La titulación del virus se llevo a cabo a través de ensayos de Focos. Apartir de cultivos de células Huh-7, se preparó una suspensión de 1×10^7 células en medio de cultivo DMEM con 7% de suero de fetal bovino y de la suspensión se colocaron 20 μ L por pozo en una multiplaca de 96 pozos. Una vez que las células llegaron al 80% de confluencia fueron infectadas con diluciones seriadas base 10 (Hasta la dilusión 10^{-8}) de DENV y ZIKV. Posteriormente, el virus fue incubado durante 48 horas a 37°C, una vez concluido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C. Terminado el tiempo de fijación, las células fueron lavadas tres veces con PBS para finalmente ser tratadas con la solución permeabilizadora (Suero Fetal Bovino al 1% y Saponina al 0,2% en PBS) por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Ya permeabilizadas las células se incubaron con un anticuerpo contra la proteína E de estos virus 4G2 anti-ratón (1:200), durante toda la noche a 4°C. Nuevamente, las células fueron lavadas con solución permeabilizadora e incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con AlexaFlour 488(1:1000), durante dos horas a temperatura ambiente, cuidando que las células no fueran expuestas a la

luz, para no intervenir con la reacción. Finalmente, las células se lavaron para retirar el anticuerpo secundario y fueron visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. Se realizó el conteo de focos y el título viral se expresó como unidades formadoras de focos por mililitro (FFU/ml), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral} = (\text{X Focos} * \text{Inversa de la dilución viral} * 1000) / 50$$

Donde:

$$X = \text{Promedio de los Focos contados}$$

Determinación de Infección de células Huh-7

Microscopía Confocal

Las células Huh-7 se crecieron en cubreobjetos en placas de 24 pozos, realizando cinéticas de infección con DENV 1-4 o ZIKV a una MOI de 3. Al término de cada ensayo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min a 4°C, concluido el tiempo de fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con solución permeabilizadora (SP) (SFB al 1% y Saponina al 0,2% en PBS) por 20 minutos a TA. Para detectar la infección, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-ratón 4G2 (1:200) durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día los anticuerpos primarios fueron lavados 3 veces con solución permeabilizadora para posteriormente incubar las células con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con AlexaFlour 488(1:200) durante dos horas a temperatura ambiente y cubriendo de la luz. Los anticuerpos secundarios fueron lavados para posteriormente teñir los núcleos con DAPI sin Vectashield por 15 minutos a temperatura ambiente. Como control negativo se simuló infecciones con Mock (medio Hanks sin partículas virales). Finalmente las preparaciones se montaron con 4 µl de Vectashield en portaobjetos y fueron observadas con un microscopio confocal Leica SP8 (63x inmersión en aceite), las imágenes obtenidas se analizaron y curaron mediante el Software LAS X de Leica.

Localización subcelular de hnRNP-F

Para estudiar la localización de la proteína hnRNP-F durante la infección por DENV y ZIKV, nos apoyamos de dos estrategias: la primera mediante un análisis de microscopía confocal, marcando a la proteína hnRNP-F así como a la proteína viral NS3. Y la segunda mediante un fraccionamiento núcleo/citoplasma que finalizará con un análisis de Western Blot, marcando a la proteína hnRNP-F y utilizando los controles correspondientes de núcleo y citoplasma.

Microscopía Confocal

En este caso, se llevo a cabo el mismo procedimiento ya descrito para microscopía confocal. Sin embargo, para este ensayo las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-conejo dirigido contra la proteína viral NS3(1:200) para detectar la infección y con el anticuerpo primario anti-ratón hnRNP-F (1:200) para detectar a la proteína celular hnRNP-F. De la misma manera los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C, para posteriormente incubar los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo conjugado con AlexaFluor 555(1:200) e IgG anti-ratón conjugado con AlexaFlour 488(1:200). Finalmente las preparaciones fueron montadas y observadas con un microscopio confocal Leica SP8 (63x inmersión en aceite), las imágenes obtenidas se analizaron y curaron mediante el Software LAS X de Leica.

Fraccionamiento núcleo/citoplasma

Para fraccionar las células infectadas se utilizó el kit... siguiendo las siguientes especificaciones. Células Huh-7 se crecieron hasta un 70% de confluencia para posteriormente ser infectadas con DENV 1-4, ZIKV o Mock a una MOI de 3 durante 48 horas. Al término de cada ensayo las células fueron tratadas con tripsina, posteriormente la tripsina fue retirada y sustituida por medio completo DMEM. A continuación, las células fueron levantadas y recuperadas para ser centrifugadas a 500g durante 5 minutos. La pastilla celular se resuspendió en 1ml de Buffer A y se cuantificó para asegurarnos de tomar 2.5×10^6 células. Una vez cuantificadas, las

células fueron tratadas con el Detergente I e incubadas en agitación constante durante 7 minutos para posteriormente ser centrifugadas nuevamente a 5000 g por un minuto a 4°C. La pastilla obtenida se conservó en hielo hasta su uso, mientras que el sobrenadante (fracción citoplasmática) fue centrifugado a 10000g por un minuto a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación, el nuevo sobrenadante fue recuperado y tratado con Buffer de lisis (Rippa/Invitrogen) en presencia de inhibidor de proteasas (Roche). El botón de células que se había conservado fue tratado con el Detergente II e incubado en agitación constante durante 10 min para posteriormente ser centrifugado a 5000g por un minuto a 4°C. Finalmente, el sobrenadante obtenido (fracción mitocondrial) fue desechado mientras que el botón (fracción nuclear) obtenido fue lavado con Buffer A, centrifugado y tratado con Buffer de lisis (Rippa/Invitrogen) en presencia de inhibidor de proteasas (Roche). Ambas fracciones fueron conservadas a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las fracciones tanto nucleares como citoplásmicas fueron cuantificadas con el kit de BSA y 30 µg de extracto nuclear y citoplasmático fueron calentados durante 10 min a una temperatura de 95°C. Los extractos fueron separados mediante electroforesis en un SDS-PAGE al 12% de Acrilamida/Bisacrilamida. Los geles se corrieron en cámaras de electroforesis BioRad para proteínas a un voltaje constante de 80 volts hasta que el frente de corrida salió.

Western-Blot

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia semi-seca (BioRad) a 18 volts por 45 minutos con amortiguador de transferencia (0.025M Tris base, 0.019 M glicina, 20% V/V metanol). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 10% en PBS por 1 hora a TA. Las proteínas celulares presentes se detectaron incubando toda la noche un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hnRNP F (1:7000, AbCam), mientras que la pureza de las fracciones se detectaron utilizando un

anticuerpo de ratón anti-histonas (1:5000) para el caso de la fracción nuclear y un anticuerpo de conejo anti-GAPDH (1:7000) para la fracción citoplásmica. Los anticuerpos secundarios fueron incubados por 2 horas a TA y la reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit “Supersignal West Femto” (Thermo Scientific).

Colocalización de hnRNP-F con proteínas virales

Una vez que se observó que la proteína hnRNP-F colocalizaba con la proteína viral NS3 quisimos profundizar en el tema y trabajar con dos proteínas virales más, una no estructural (NS4A) y otra estructural (C); ambas necesarias en puntos clave del ciclo de replicación viral.

Microscopía Confocal

Para estos últimos ensayos de microscopía confocal, de nueva cuenta se llevo a cabo el mismo procedimiento. Sin embargo, para estos ensayos las células se incubaron en ensayos independientes con anticuerpos primarios anti-conejo dirigidos contra las proteínas virales NS4A(1:200) y C(1:200) para detectar la infección y con el anticuerpo primario anti-ratón hnRNP-F (1:200) para detectar a la proteína celular hnRNP-F. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo conjugado con AlexaFluor 555(1:200) e IgG anti-ratón conjugado con AlexaFluor 488(1:200), para finalmente montar y observar las preparaciones.

Análisis de Intensidad de Fluorescencia

El estudio de cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína hnRNP-F en sus diferentes localizaciones subcelulares (núcleo y citoplasma) se realizó con ayuda del software ImageJ. Los perfiles de cuantificación del núcleo y citoplasma se realizaron en 30 células infectadas de 3 diferentes campos. VERIFICAR SI FALTA INFO

Análisis Estadístico

El software Graph Pad Prism versión 7.0 fue utilizado para el análisis estadístico. Los datos numéricos fueron graficados utilizando el valor de la media y su correspondiente desviación estándar para cada una de las repeticiones independientes. Para evaluar el porcentaje de intensidad de fluorescencia se utilizó una prueba ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, considerando una significancia estadística de 0.0001 ($p < 0.0001$).

Análisis de Colocalización

El estudio de colocalización de hnRNP-F con las proteínas virales NS3, NS4A y C se realizó con la herramienta Colocalization studio del programa Icy versión 2.0, que hace uso del coeficiente de Pearson para el establecimiento de la correlación entre dos intensidades. El rango de valores del coeficiente de Pearson comprende de -1 a +1, donde valores próximos al negativo hacen referencia a una colocalización inexistente y valores próximos a +1, a una colocalización total. El coeficiente de Pearson obtenido de cada una de las condiciones se acompañó de su correspondiente representación gráfica.

IX. Resultados

Titulación del virus propagado en Ratones CD-1 Lactantes

Para determinar la eficiencia de propagación de los cuatro serotipos de DENV y ZIKV en ratones CD-1 lactantes, se estableció el título viral mediante ensayos de focos en la línea celular Huh-7, observándose un incremento del conteo de unidades formadoras de focos desde el pase uno hasta el pase 5. Para el caso de DENV-1 ($3.5 \times 10^4 - 7 \times 10^6$ UFF/ml), DENV-2 ($7 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ UFF/ml), DENV-3

(4.2×10^4 – 2.5×10^6 UFF/ml), DENV-4 (1.5×10^4 – 2×10^6 UFF/ml) y finalmente, ZIKV (4.5×10^5 – 6.3×10^8 UFF/ml) (Datos no mostrados). Los resultados mostraron que el virus fue capaz de propagarse eficientemente en ratones CD-1 y que se generó una buena cantidad de partículas virales que posteriormente fueron utilizadas en los experimentos siguientes.

Determinación de Infección de células Huh-7

La infección en células Huh-7 se observó mediante microscopía confocal realizando cinéticas de infección a 12, 24, 36 y 48 hpi. La proteína viral E de los cuatro serotipos de DENV y ZIKV se marcó con el anticuerpo 4G2 (1:200) como anticuerpo primario, así como con IgG anti-ratón conjugado con AlexaFlour 488(1:200) como anticuerpo secundario. La marca de la proteína viral E se observó a partir de las 12 hpi y se observó un incremento gradual de ésta conforme avanzó el tiempo post-infección, lo que nos habla de que los virus se replicaron eficientemente en las células Huh-7 (*Figura 18*).

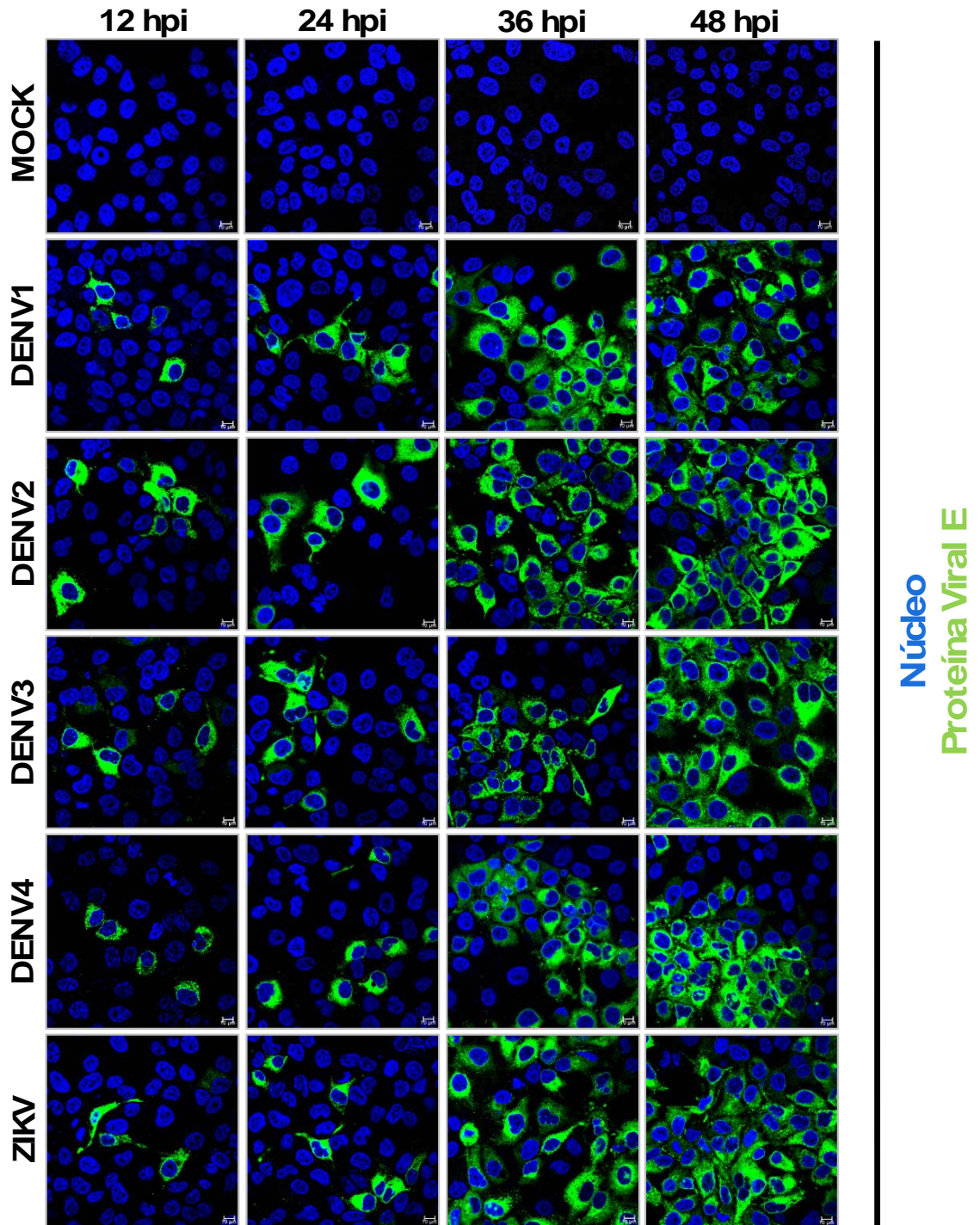


Figura 18. Infección con los cuatro serotipos con DENV y ZIKV en células Huh-7. Se infectaron células Huh-7 a una MOI de 3 con DENV o ZIKV durante 12, 24, 36 y 48 hpi. La distribución subcelular de las proteínas virales E (Verde) de DENV y ZIKV fue examinada por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas.

Determinación de la localización subcelular de hnRNP-F

Como primera herramienta para determinar si había cambios en la localización subcelular de hnRNP-F tras la infección viral, se utilizó la microscopía confocal.

Se realizaron cinéticas de infección con Mock (medio Hanks sin partículas virales) a las 24, 36 y 48 horas usando un anticuerpo dirigido contra la proteína hnRNP-F y un anticuerpo contra la proteína NS3 para monitorear la infección (*Figura 19*). Los resultados muestran que en ausencia de infección la localización de hnRNP-F a los diferentes tiempos se mantiene primordialmente en el núcleo, con una fracción mínima de ella en el citoplasma (*Figura 19*).

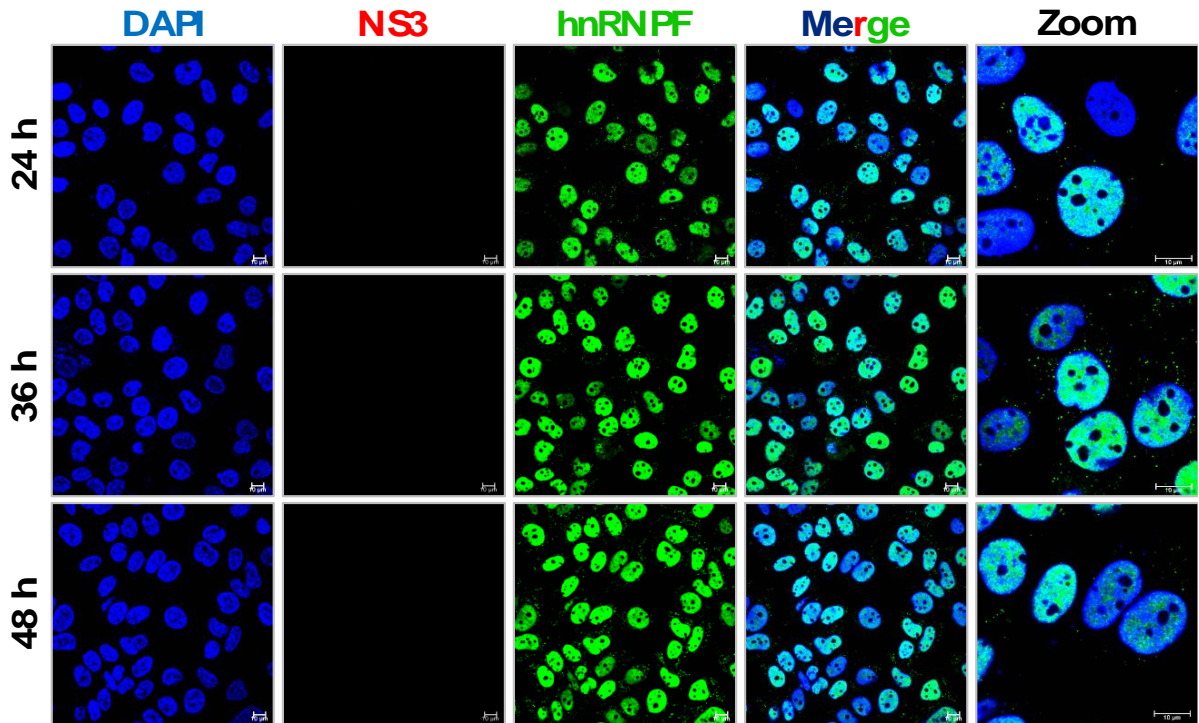


Figura 19. Localización de hnRNP-F en ausencia de infección en células Huh-7. Las células Huh-7 infectadas de manera simulada (MOCK) durante 24, 36 y 48 hpi. La distribución subcelular de la proteína hnRNP-F (Verde) fue examinada por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas de al menos tres experimentos independientes.

Para identificar los cambios en la localización subcelular de hnRNP-F durante la infección viral, se infectaron células Huh-7 con ZIKV y los cuatro serotipos de DENV a una MOI de 3 con cinéticas de infección a las 24 y 48 hpi.

Los resultados no mostraron cambios evidentes en la localización de hnRNP-F pues la proteína se mantenía primordialmente en el núcleo a las 24 hpi (*Figura 20*).

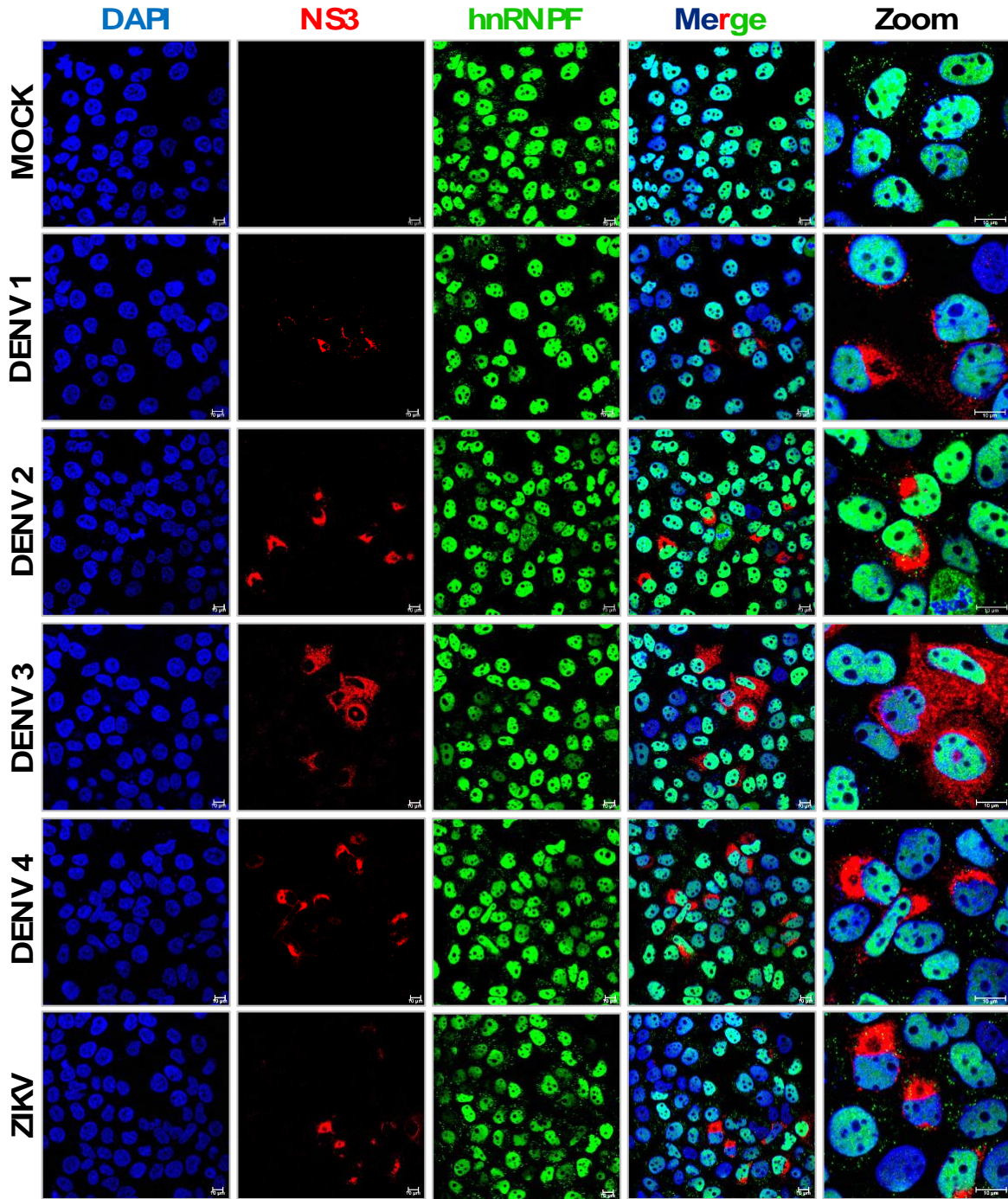


Figura 20. Localización de hnRNP-F en células Huh-7 a las 24hpi con DENV y ZIKV. Se infectaron o no células Huh-7 a una MOI de 3 con DENV y ZIKV durante 24hpi. La distribución subcelular de la proteína hnRNP-F (Verde) y la proteína viral NS3 (Rojo) fueron examinadas por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos por DAPI (Azul). Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas de al menos tres experimentos independientes.

Sin embargo, al analizar la localización de hnRNP-F a las 48 hpi se observó que en las células infectadas con los diferentes serotipos DENV así como en las infectadas con ZIKV la proteína hnRNP-F se translocaba del núcleo hacia el citoplasma y una vez ahí, colocaliza con la proteína NS3 en la zona perinuclear (*Figura 21*). Este hecho nos sugiere que la movilización de la proteína hnRNP-F podría estar siendo dirigida a una localización específica en el citoplasma.

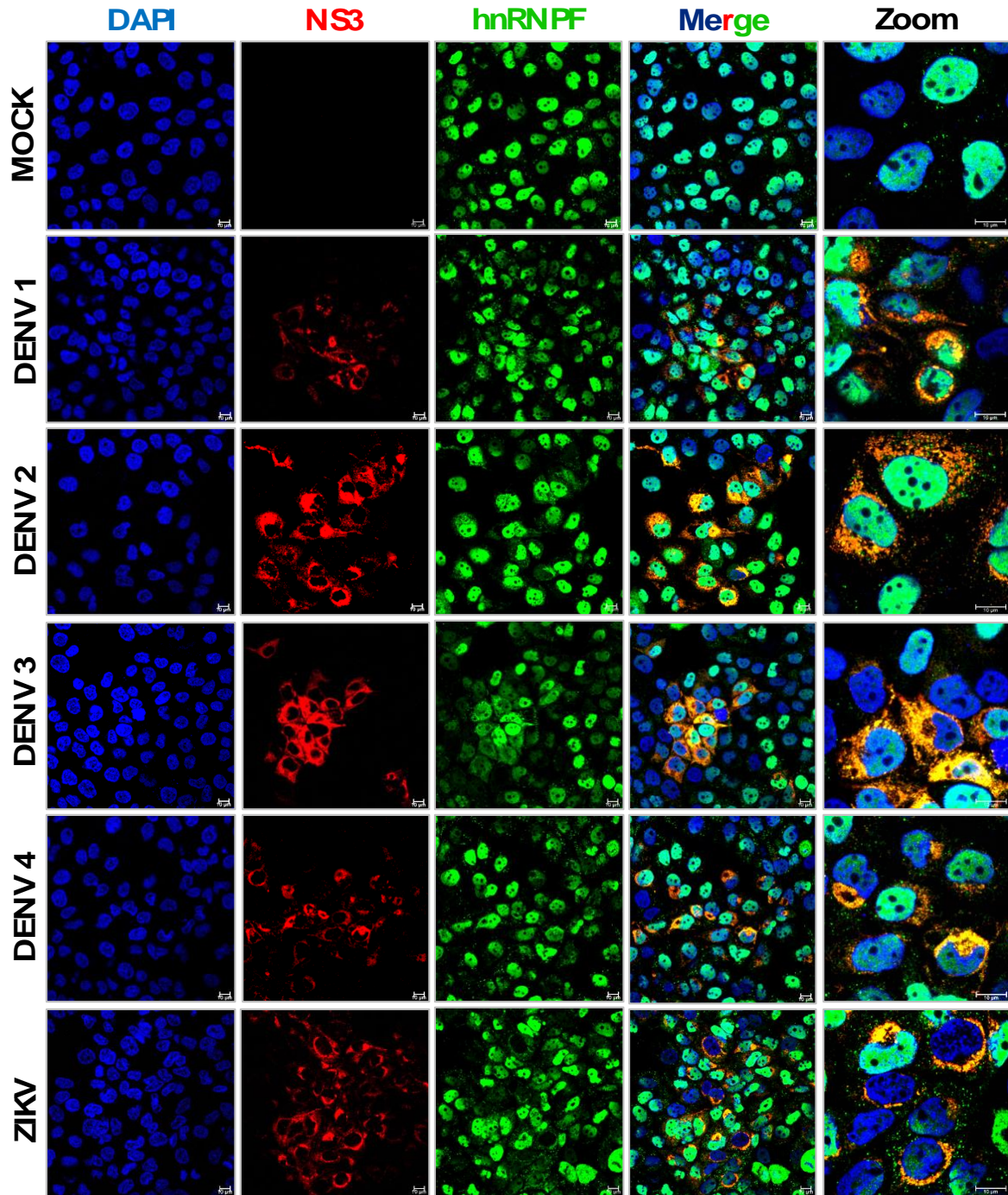


Figura 21. Localización de hnRNP-F en células Huh-7 a las 48hpi con DENV y ZIKV. Las células Huh-7 se infectaron o no a una MOI de 3 con DENV y ZIKV durante 48hpi. La distribución subcelular de la proteína hnRNP-F (Verde) y la proteína viral NS3 (Rojo) fueron examinadas por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes; los núcleos fueron teñidos por DAPI (Azul). Se muestra la colocalización de ambas proteínas (hnRNP-F y NS3) con una distribución perinuclear (Amarillo). Las selecciones de campos hechas tienen relativamente menos células infectadas para distinguir claramente el estado de localización de las proteínas huésped (hnRNP-F) en las células no infectadas. Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas de al menos tres experimentos independientes.

Determinación de Intensidad de Fluorescencia en núcleo y citoplasma

Como un ensayo confirmativo de la movilización de la proteína hnRNP-F, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia tanto del núcleo como del citoplasma. Esta cuantificación se llevó a cabo a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal, mediante el software ImageJ en un total de 30 células extraídas de 3 campos diferentes.

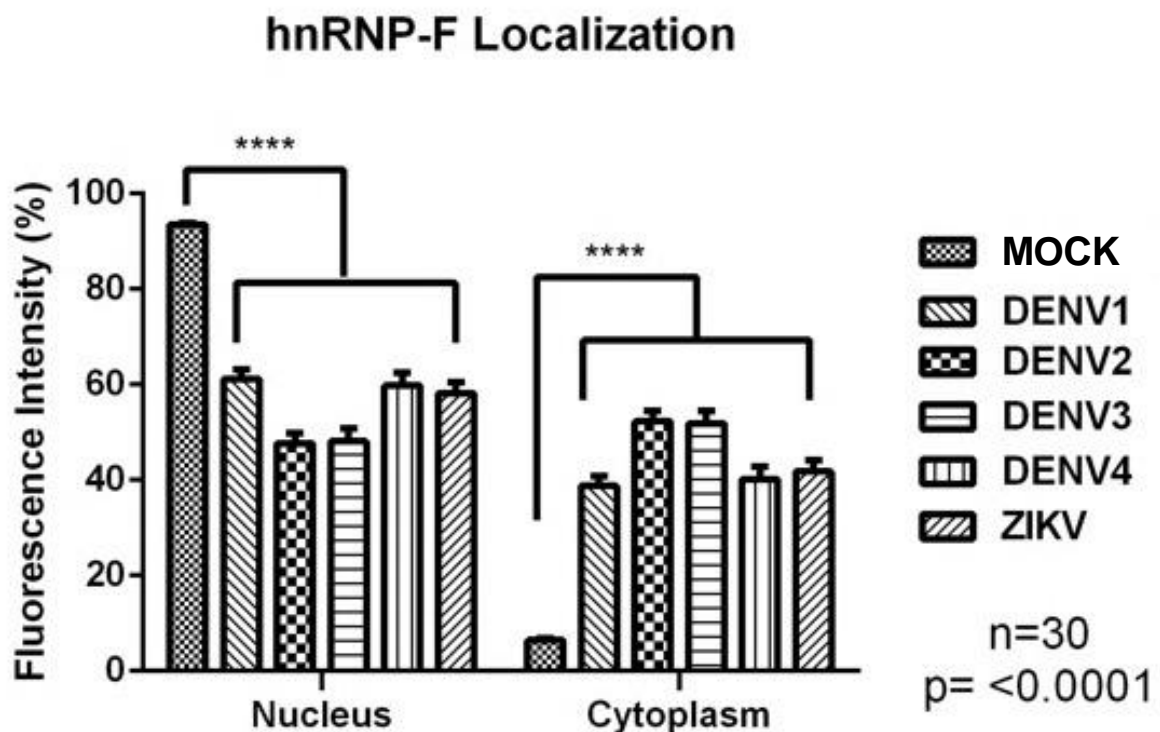


Figura 22. Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de hnRNP-F tanto en núcleo como en citoplasma a las 48hpi con DENV y ZIKV. La movilización de la proteína hnRNP-F se analizó mediante la cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de las diferentes localizaciones subcelulares (núcleo/citoplasma) donde se encontraba hnRNP-F. La cuantificación se realizó con ayuda del software ImageJ a un total de 30 células obtenidas de 3 campos diferentes adquiridos por microscopía confocal. Para evaluar el porcentaje de intensidad de fluorescencia se utilizó una prueba ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, considerando una significancia estadística de 0.0001 ($p < 0.0001$).

Como se observa, en las células infectadas de manera simulada (MOCK), la localización de la proteína hnRNP-F es principalmente nuclear en aproximadamente un 90% mientras que en el citoplasma es de aproximadamente

un 10%; en comparación con las células infectadas con los cuatro serotipos del DENV y las células infectadas con ZIKV en donde se observa una evidente reducción de la cantidad de proteína en el núcleo de aproximadamente el 45%. En contraste, en el citoplasma se observa un aumento de hnRNP-F con respecto a las células control (*Figura 22*). Este resultado nos corrobora, que la infección a las 48 horas por los cuatro serotipos del DENV y ZIKV, induce una translocación de hnRNP-F del núcleo al citoplasma.

Fraccionamiento celular en núcleo y citoplasma

La segunda estrategia empleada para estudiar la localización de la proteína hnRNP-F durante la infección por DENV y ZIKV se llevó a cabo mediante un ensayo de Western Blot a partir de lisados celulares obtenidos del fraccionamiento de células Huh-7 infectadas de manera simulada o con los cuatro serotipos de DENV y ZIKV a una MOI de 3 durante 48hpi.

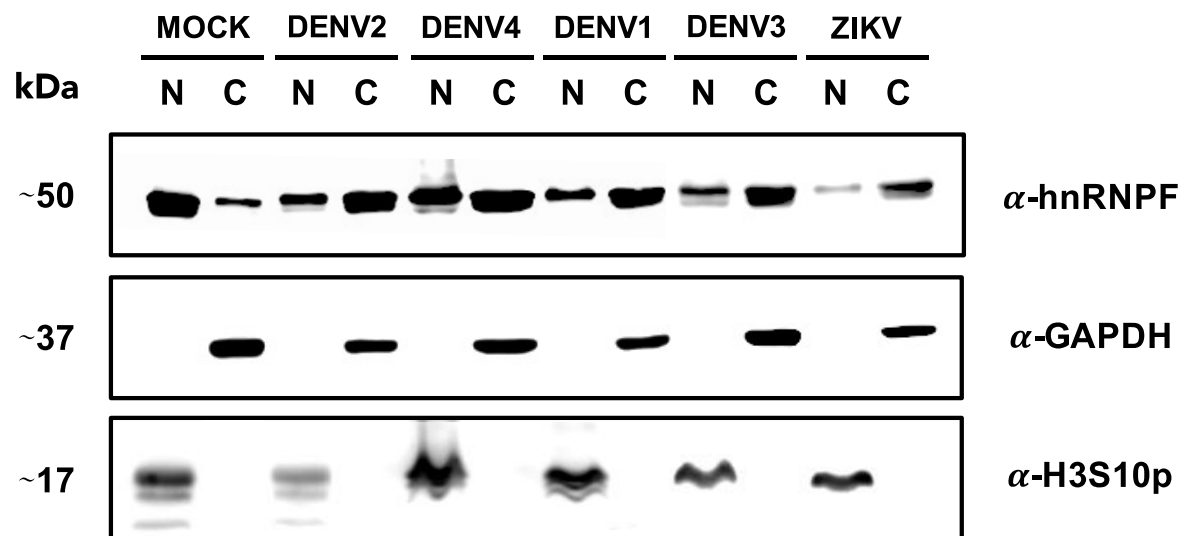


Figura 23. Presencia de la proteína de hnRNP-F en la fracción nuclear y citoplasmática a las 48hpi con DENV y ZIKV. La presencia de la proteína hnRNP-F se analizó mediante Western Blot a partir de lisados celulares fraccionados en núcleo y citoplasma, obtenidos de células Huh-7 infectadas de manera simulada o con los cuatro serotipos de DENV y ZIKV a una MOI de 3 durante 48hpi. Se utilizaron controles tanto de la fracción nuclear como de la citoplasmática.

La primera observación como se esperaba fue que proteína hnRNP-F era principalmente nuclear y su presencia es mínima en el citoplasma. Sin embargo, en las células infectadas con los diferentes serotipos de DENV y ZIKV a las 48hpi, la presencia de la proteína hnRNP-F se vio reducida en la fracción nuclear y se observó un claro aumento en la fracción citoplasmática. Estos resultados concuerdan con lo antes observado mediante microscopía confocal, lo que nos habla de una indudable reubicación de la proteína hnRNP-F durante la infección viral (*Figura 23*).

Colocalización de hnRNP-F con la Proteína NS4A

Una vez que supimos que hnRNP-F se transloca de núcleo a citoplasma durante la infección viral y que colocaliza con la proteína NS3. Nos preguntamos si la salida de hnRNP-F era al citoplasma en general o bien si se redistribuía a un lugar en específico. Dado que hnRNP-F mostró colocalización con NS3, decidimos analizar mediante microscopía confocal su colocalización con la proteína viral no estructural NS4A que se encuentra adosada en las membranas de los complejos replicativos por lo que se sabe que su localización es exclusiva de estos.

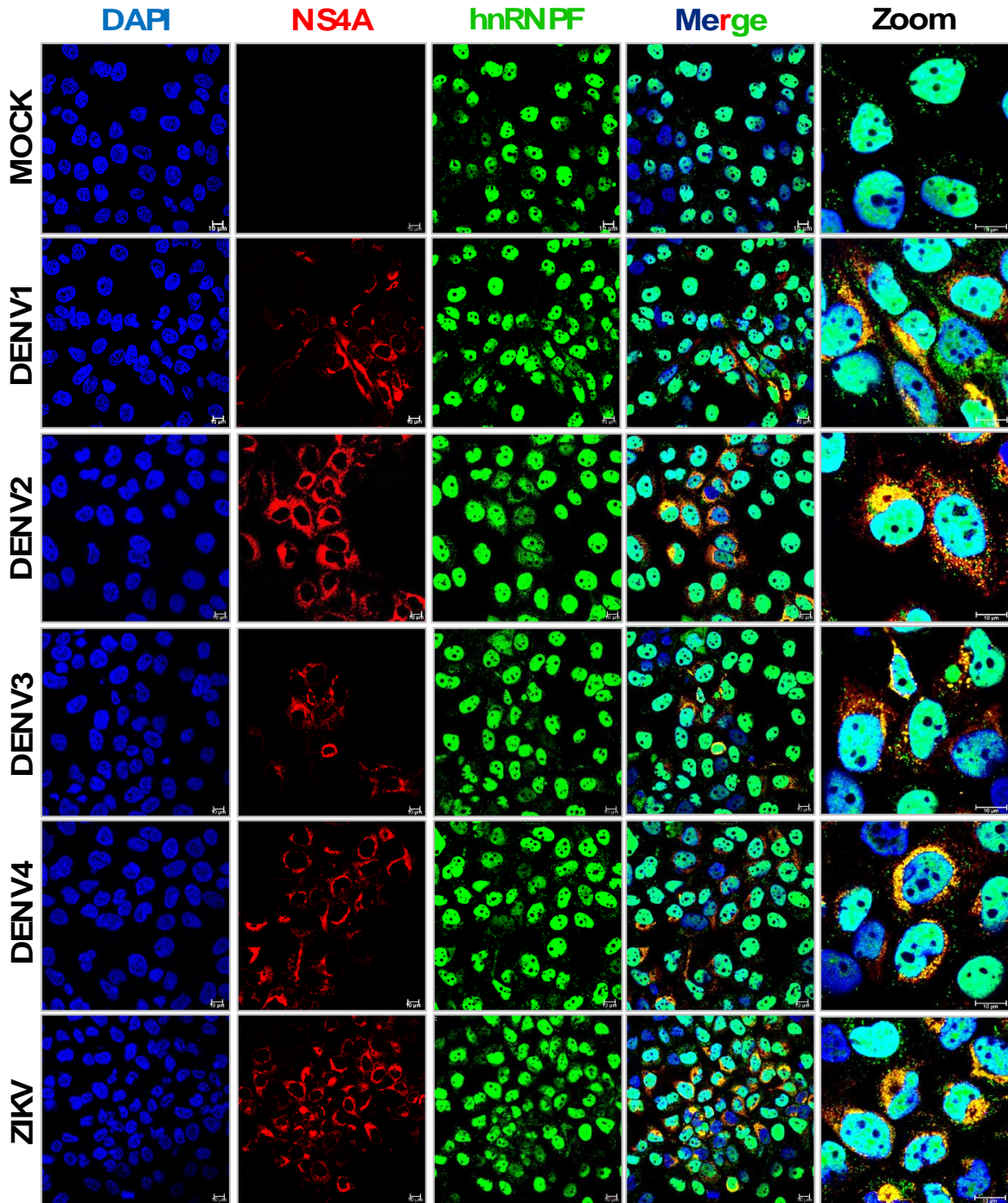


Figura 24. Colocalización de hnRNP-F con la proteína viral NS4A a las 48hpi con DENV y ZIKV. Se infectaron células Huh-7 o no a una MOI de 3 con DENV y ZIKV durante 48hpi. La distribución subcelular de la proteína hnRNP-F (Verde) y la proteína viral NS4A (Rojo) fueron examinadas por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes; los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Se muestra la colocalización de ambas proteínas (hnRNP-F y NS4A) con una distribución perinuclear (Amarillo). Las selecciones de campos hechas tienen relativamente menos células infectadas para distinguir claramente el estado de localización de las proteínas huésped (hnRNP-F) en las células no infectadas. Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas de al menos tres experimentos independientes.

Durante la infección, la colocalización de la proteína hnRNP-F con la proteína NS4A fue evidente. Pues a diferencia de las células control, en las células infectadas se aprecia que la proteína hnRNP-F se relocaliza al citoplasma colocalizando con la proteína NS4A (*Figura 24*). Estos resultados nos permiten comprobar que la proteína hnRNP-F efectivamente no se distribuye en todo el citoplasma, sino que se podría estar dirigiendo hacia los complejos de replicación.

Colocalización de hnRNP-F con la Proteína C

Después de saber que la salida de la proteína hnRNP-F podría estar dirigida hacia los complejos de replicación. El siguiente paso fue profundizar en la localización subcelular de la proteína hnRNP-F. Para este fin nos apoyamos de ensayos de microscopía confocal marcando a la proteína estructural C la cual se ha reportado tiene una localización cercana a los complejos de replicación participando en la morfogénesis viral.

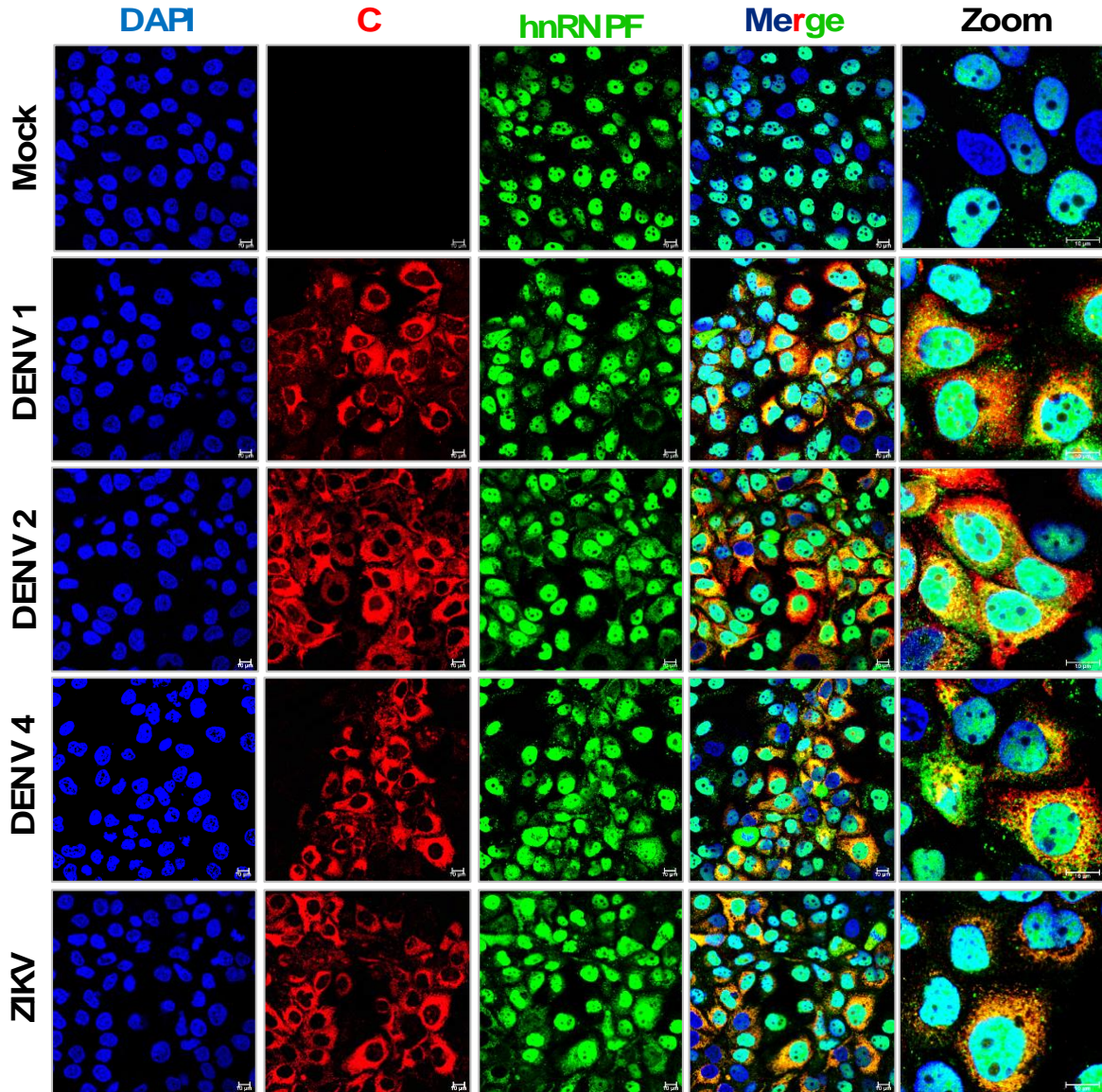


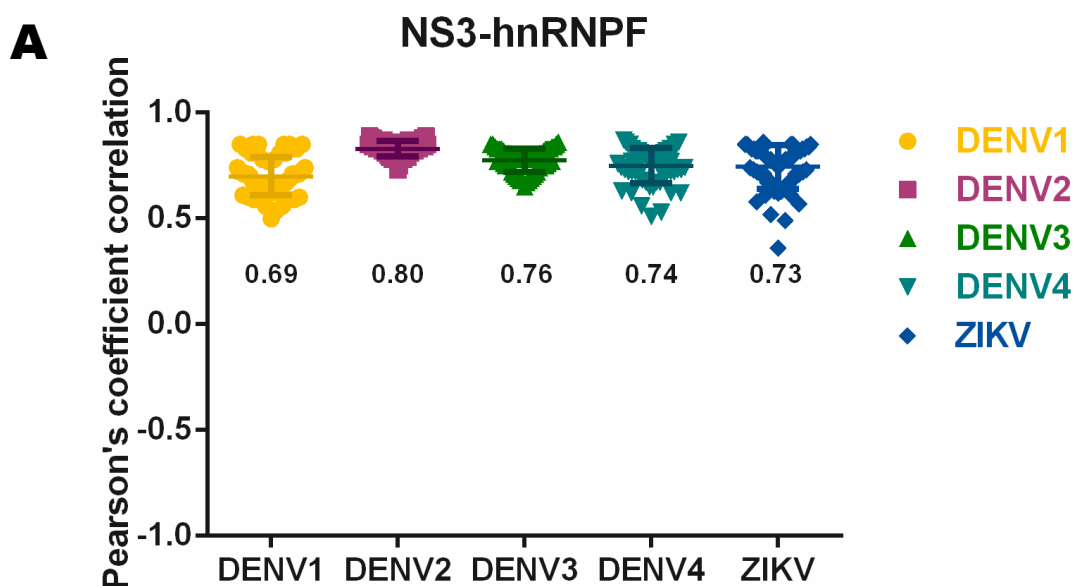
Figura 25. Colocalización de hnRNP-F con la proteína viral C a las 48hpi con DENV y ZIKV. Se infectaron células Huh-7 o no a una MOI de 3 con DENV y ZIKV durante 48hpi. La distribución subcelular de la proteína hnRNP-F (Verde) y la proteína viral C (Rojo) fueron examinadas por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes; los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Se muestra la colocalización de ambas proteínas (hnRNP-F y C) con una distribución perinuclear (Amarillo). Las selecciones de campos hechas tienen relativamente menos células infectadas para distinguir claramente el estado de localización de las proteínas huésped (hnRNP-F) en las células no infectadas. Las imágenes fueron capturadas por el microscopio confocal Leica SP8 con un lente de inmersión en aceite 63X. Se muestran las imágenes confocales representativas de al menos tres experimentos independientes.

En condiciones de infección se observó la evidente colocalización de la proteína hnRNP-F en el citoplasma con la proteína C (*Figura 25*). Sin embargo, a pesar de que la distribución de C también es perinuclear, se puede apreciar que la

colocalización de hnRNP-F y C no es absoluta, pues la proteína C se encuentra más ampliamente distribuida en el citoplasma. Este resultado nos permite afirmar que la salida de hnRNP-F no está distribuida libremente en el citoplasma, sino que está dirigida hacia los complejos de replicación. La colocalización de hnRNP-F con NS3, NS4A y C nos permite sugerir que hnRNP-F podría tener un papel funcional en la replicación viral.

Análisis de Colocalización

Finalmente, con el fin de analizar de manera más cuantitativa la colocalización de hnRNP-F con las proteínas virales NS3, NS4A y C, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. La colocalización de hnRNP-F con todas las proteínas virales de DENV y ZIKV es significativa pues el coeficiente de correlación de Pearson se acerca a +1 en todos los casos. Para NS3 el coeficiente de colocalización de Pearson va desde 0.69-0.84 (*Figura26-A*), mientras que para NS4A va de 0.67-0.77 (*Figura26-B*) y finalmente para el caso de C va desde 0.52-0.79 (*Figura26-C*), siendo DENV2 el virus que presenta mejor coeficiente de colocalización (*Figura 26*).



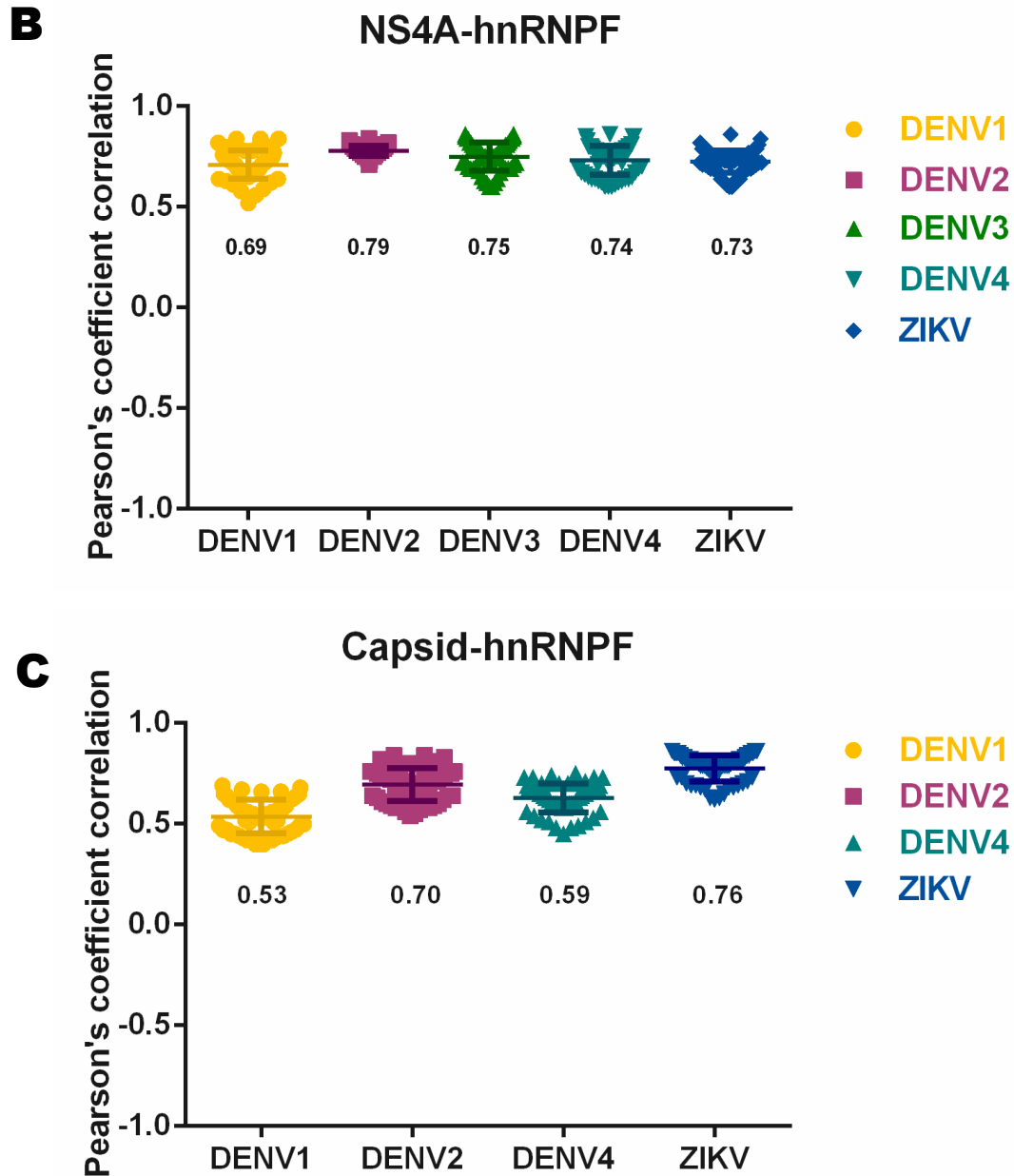


Figura 26. Representaciones gráficas del coeficiente de correlación de Pearson. Las gráficas muestran la colocalización entre la proteína hnRNP-F y las proteínas virales NS3 (A), NS4A (B) y C (C). El rango de valores del coeficiente de Pearson comprende de -1 a +1, donde valores próximos al negativo hacen referencia a una colocalización inexistente y valores próximos a +1, a una colocalización total.

Estos resultados en conjunto, nos permitieron sugerir que la proteína hnRNP-F se moviliza de núcleo a citoplasma y se asocia a los complejos de replicación donde se lleva a cabo el proceso de replicación viral.

X. Discusión

Entre los arbovirus más relevantes dentro del sector salud a nivel mundial, se encuentran aquéllos pertenecientes al género *Flavivirus*, los cuales hasta hace poco, se caracterizaban por ser endémicos. Sin embargo, en la actualidad algunos de ellos representan amenazas como patógenos emergentes y reemergentes (CARPIO-ORANTES, 2016), pues debido a diversos factores como el turismo, la globalización y el cambio climático, se han promovido alteraciones en el comportamiento de los vectores, impulsando así, la movilidad de estos y generando su establecimiento en zonas donde no solían estar presentes (COLLAO, PRADO, GONZÁLEZ, & VÁSQUEZ, 2015).

DENV es un miembro del género *Flavivirus* y es el agente causal de la enfermedad viral más prevalente del mundo. DENV es transmitido principalmente por mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti* y en menor grado por *A. Albopictus* (LWANDE ET AL., 2019). Estos mosquitos se desarrollan en zonas tropicales y subtropicales del mundo por lo que casi el 40% de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad. Modelos recientes estiman que se presentan alrededor de 390 millones de infecciones por DENV al año, causando una morbilidad significativa y un impacto económico negativo (BHATT ET AL., 2013). Es importante destacar que actualmente no hay antivirales para tratar la enfermedad asociada al DENV o una vacuna efectiva disponible para prevenir las infecciones por este virus. El descubrimiento de estrategias para prevenir o tratar la infección por DENV es fundamental y requiere un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares por los cuales el virus se replica.

Los virus, al ser parásitos intracelulares obligados, son capaces de secuestrar y manipular proteínas de la célula huésped para facilitar su ciclo de replicación viral. Se ha reportado que durante la infección por *Flavivirus* se altera la localización subcelular de algunas proteínas del huésped, siendo esta movilización importante para el proceso de replicación de estos virus.

La proteína DDX3 y DDX56, por ejemplo, se relocalizan del núcleo a los sitios de replicación del JEV y del WNV respectivamente (C. LI ET AL., 2014) (XU & HOBMAN, 2012) (REID & HOBMAN, 2017). Las proteínas TIAR y TIA1 se transportan desde el núcleo hacia el citoplasma

durante la infección por WNV y DENV (W. LI ET AL., 2002). Por su parte, la proteína La es una ribonucleoproteína, que al igual que PTB, se encuentra en el núcleo de las células sanas; sin embargo, se ha demostrado que también son proteínas que se redistribuyen al citoplasma durante la infección por DENV (Yocupicio-Monroy et al., 2007) (AGIS-JUÁREZ ET AL., 2009).

Debido a estos antecedentes, nos planteamos analizar la localización subcelular de la proteína de unión a RNA hnRNP-F y determinar si la infección con los distintos serotipos del DENV y ZIKV promovía la movilización de la proteína nuclear hacia el citoplasma de las células infectadas. Para ello, lo primero que hicimos fue analizar la localización subcelular de hnRNP-F en ausencia de infección y a diferentes tiempos por microscopía confocal. El ensayo demostró que al exponer células Huh-7 a una infección simulada con Mock (medio Hanks sin partículas virales) durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 hrs), encontramos que la proteína hnRNP-F se mantuvo primordialmente en el núcleo de las células con una pequeña fracción de ella en el citoplasma, lo que concuerda con reportes anteriores que indican que la proteína hnRNP-F es primordialmente nuclear.

Por otro lado, para identificar si existían cambios en la localización subcelular de hnRNP-F durante la infección viral, se realizaron nuevos ensayos de microscopía confocal, infectando células Huh-7 con los cuatro serotipos de DENV y con ZIKV a las 24 y 48 hpi. Observamos que a las 24 hpi no se modifica la localización de la proteína hnRNP-F pues se mantiene en el núcleo de las células infectadas de manera similar a las células control (Mock). Sin embargo, a las 48 hpi se observó un cambio en la células infectadas, pues en comparación con las células control, era evidente que la proteína hnRNP-F se había translocado del núcleo hacia el citoplasma. Al observar la movilización de la proteína hnRNP-F a las 48hpi nos preguntamos si esta salida podría ser tan solo un efecto del daño o estrés celular debido a la infección. Sin embargo, con ayuda del marcador de núcleos (DAPI) observamos que las células infectadas mantenían intacta su morfología, es por esto que con seguridad adjudicamos la salida de la proteína a un efecto que es promovido por la infección viral y no por un daño o estrés celular.

Con este resultado, también logramos observar la colocalización de la proteína hnRNP-F con la NS3 de los diferentes serotipos del DENV y del ZIKV en la zona perinuclear. Aunado a la movilización de hnRNP-F, el fenómeno de colocalización se visualizó sólo hasta las 48hpi, esto podríamos adjudicarlo a que a este tiempo de infección existe una replicación viral activa.

Como un ensayo confirmativo de la movilización de la proteína hnRNP-F hacia el citoplasma, se llevó a cabo una cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína hnRNP-F acumulada en el núcleo y en el citoplasma. Esta cuantificación se realizó mediante el software ImageJ tomando en cuenta un total de 30 células de cada una de las condiciones. De manera interesante, al realizar la cuantificación notamos como la intensidad de fluorescencia de las células control (Mock) se mantenía intacta y homogénea en el núcleo mientras que, en el citoplasma esta fluorescencia parecía ser mínima y muy dispersa. En comparación con todas las condiciones de infección, en donde, la fluorescencia en núcleo se apreciaba más tenue y se incrementaba la presencia de la proteína en el citoplasma, específicamente en la zona perinuclear, confirmando la evidente translocación de la proteína hnRNP-F del núcleo hacia el citoplasma.

Al evaluar el porcentaje de intensidad de fluorescencia los resultados obtenidos fueron significativos y nos permitieron corroborar lo antes observado, para el caso de las células control la localización de hnRNP-F en el núcleo era de aproximadamente el 90% mientras que en el citoplasma era de un 10%; en comparación con las células infectadas con los cuatro serotipos de DENV y con ZIKV en donde se observa la reducción de la proteína en el núcleo y su notable aumento en el citoplasma de aproximadamente un 45%.

Curiosamente, con este análisis y teniendo en mente que se ha reportado la interacción de la proteína hnRNP-F con la proteína viral NS5 de DENV-2, nos permitimos especular que la movilización de hnRNP-F podría correlacionarse con la distribución nuclear de la proteína viral NS5, pues en los serotipos 2 y 3 donde NS5 es predominantemente nuclear hay una mayor relocalización de hnRNP-F en comparación con los serotipos 1 y 4 donde la distribución de NS5 es principalmente

citoplasmática. Sin embargo, para comprobar esta especulación se requeriría de otros ensayos confirmatorios.

Además de los ensayos por microscopía confocal quisimos emplear una segunda estrategia para estudiar la translocación de la proteína hnRNP-F durante la infección por DENV y ZIKV. Para este fin, se llevó a cabo un ensayo de Western Blot a partir de lisados celulares que fueron obtenidos posterior al fraccionamiento de células infectadas de manera simulada (Mock) o con los cuatro serotipos de DENV y ZIKV durante 48hpi. La primera observación de este resultado, fue que para el caso de las células control (Mock), la presencia de la proteína hnRNP-F se visualizaba principalmente nuclear, encontrándose una cantidad mínima en el citoplasma. En contraste en las células infectadas con DENV y ZIKV a las 48hpi, que se observó que la presencia de la proteína hnRNP-F en la fracción nuclear se apreciaba reducida, mientras que en el citoplasma aumentaba. Estos resultados concuerdan con lo antes observado mediante microscopía confocal, lo que nos habla de una indudable translocación de la proteína hnRNP-F durante la infección viral.

Este fenómeno de translocación no solo ha sido observado por nuestro equipo de trabajo, pues otros estudios han reportado que tras la infección viral se observa la translocación del núcleo hacia el citoplasma de diferentes hnRNPs y que esta es crucial para el ciclo replicativo viral.

En poliovirus, por ejemplo, se reportó que la proteína hnRNP-M se reubica del núcleo al citoplasma durante la infección (JAGDEO ET AL., 2015). En rotavirus, se describió esta misma movilización pero de diferentes hnRNP como: A1, C1, D, E, F, F/H, I, K, L, M y U (DHILLON ET AL., 2018); en el caso de un miembro de la familia *Flaviviridae*, como el Virus de la Hepatitis C (HCV), se ha reportado, pero con la proteína hnRNP-A1 (KIM, SEOL, SONG, PARK, & JANG, 2007 y específicamente en *Flavivirus*, se ha reportado que durante la infección por JEV se da esta misma movilización de la proteína hnRNP-A2 (KATO ET AL., 2011).

La translocación de las diferentes hnRNPs no ha sido el único hallazgo reportado por estos estudios, sino, también su colocalización en el citoplasma con

diferentes proteínas virales. Por lo que no fue extraño, que en el presente trabajo encontramos que la proteína hnRNP-F colocaliza con la proteína NS3, la cual es una proteína que participa en la proteólisis de la poliproteína para liberar las proteínas virales individuales. Además posee actividades de helicasa implicadas en el desenrollamiento del RNA bicatenario durante la replicación viral (BOLLATI ET AL., 2010) (MAZEAUD, FREPPEL, & CHATEL-CHAIX, 2018). En este último punto hay una especulación importante a considerar, ya que la proteína hnRNP-F al ser una proteína de unión al RNA podría estar contribuyendo junto con NS3 a desenrollar estructuras secundarias y terciarias del RNA genómico o bien ayudandola a llevar a cabo el desenrollamiento del dúplex de RNA para que las cadenas positivas neosintetizadas se puedan traducir o empaquetar en partículas virales de ensamblaje, por lo que tendría un papel importante en el la replicación viral.

Partiendo de estas premisas y con nuestro propio antecedente donde la proteína hnRNP-F colocaliza con la proteína viral NS3, nos preguntamos si la salida de hnRNP-F implicaba que tuviese alguna otra posible función en el ciclo de replicación viral, por lo que nos planteamos averiguar si esta salida estaba dirigida hacia un lugar en específico en el citoplasma. Para este fin nos apoyamos de ensayos de microscopia confocal marcando a la proteína no estructural NS4A que se encuentra adosada en las membranas de los complejos replicativos por lo que se sabe que su localización es exclusiva de estos. Durante la infección, la colocalización de la proteína hnRNP-F con la proteína NS4A fue evidente, conservando la peculiaridad de encontrarse en la zona perinuclear, por lo que esto nos corroboró que la proteína hnRNP-F efectivamente no se distribuye en todo el citoplasma, sino que se podría estar dirigiendo hacia los complejos de replicación y por ende tener una función importante ahí.

Como recordaremos la replicación de los flavivirus tiene lugar en reordenamientos de membrana del RE inducidos por la proteína NS4A conocidos como complejos de replicación. Estos complejos de replicación contienen tanto proteínas no estructurales como RNA viral y factores del huésped esenciales para la replicación (Rothan & Kumar, 2019). Además, los complejos de replicación son indispensables para evitar la inducción de la inmunidad innata, es por esto, que es

de suma importancia que las proteínas no estructurales en conjunto con factores del huésped participen de forma coordinada para su formación (Lescar et al., 2018). Con esto en mente y con el antecedente de que la proteína hnRNP-A1 forma un complejo con la proteína viral NS5b del HCV y con la proteína Septina 6 en los complejos de replicación para promover la replicación viral (Kim et al., 2007), es posible proponer que la proteína hnRNP-F al colocalizar con la proteína NS4A podría estar funcionando como una proteína de andamiaje para la formación de los complejos de replicación.

Se sabe también, que los complejos de replicación están conectados al citoplasma por poros que permiten la salida del RNA recién sintetizado a los sitios de traducción y a los sitios del ensamblaje de partículas virales (Welsch et al., 2009) (Lescar et al., 2018). Tomando en cuenta la capacidad bien caracterizada de la familia hnRNP F de unirse al RNA nos permitimos especular que otra posible función de la proteína hnRNP-F sea la de unirse al RNA viral para protegerlo y estabilizarlo durante su transporte hacia los procesos de traducción, replicación o ensamblaje. Sin embargo, para comprobar estas especulaciones requeriríamos de otros ensayos en donde se marque al RNA viral así como a la proteína hnRNP-F y determinar si estas colocalizan.

Otra proteína importante para los Flavivirus es la proteína C, se ha reportado que esta se ubica cercana a los sitios de replicación del RNA viral. Además, posee grupos de aminoácidos básicos que están ubicados en sus extremos amino y carboxilo, por lo que tiene la capacidad de formar una nucleocápside que interactúa con el RNA viral para protegerlo. Un informe reciente demostró un acoplamiento entre la síntesis de RNA viral y su encapsidación (Katoh et al., 2011). Por lo tanto, la proteína C de los flavivirus desempeña funciones cruciales no solo en el ciclo de vida viral, incluida la replicación y el ensamblaje del RNA, sino también en la patogénesis viral.

Debido a esto y con nuestro antecedente de que hnRNP-F podría estar dirigida hacia los complejos de replicación. El siguiente paso fue profundizar aún más en la localización subcelular de hnRNP-F. Para este fin nos apoyamos de

ensayos de microscopia confocal marcando a la proteína estructural C y encontramos que durante la infección hay colocalización con la proteína hnRNP-F en el citoplasma. Sin embargo, observamos que a pesar de la típica colocalización en la zona perinuclear, observamos que la proteína C se encontraba distribuida de manera más amplia en el citoplasma, gracias a esto podemos afirmar que la salida de hnRNP-F es dirigida hacia los complejos de replicación y no distribuida libremente en el citoplasma.

Existe evidencia experimental que demuestra que muchas proteínas de unión a RNA, incluidas las hnRNP, participan en los ciclos de vida de varios virus de RNA de cadena positiva, a través de su interacción con las regiones 5' y 3' NTR. En el caso de poliovirus, se ha demostrado que hnRNP-C1/C2 está involucrada en el inicio de la síntesis del RNA viral a través de su interacción con la 3'NTR (Brunner et al., 2005). Mientras que en enterovirus se ha reportado que las proteínas hnRNP-K y hnRNP-A1 interactúan con la región 5'NTR (Lin et al., 2009). Para HCV, se demuestra que hnRNP-A1 no solo es capaz de interactuar con la región 5' sino también con la región 3'NTR (Kim et al., 2007). En el caso particular de dos Flavivirus, se ha reportado que en JEV la proteína hnRNP-A2 interactúa con la región 5'NTR (Katoh et al., 2011), mientras que en DENV se ha reportado que diversas hnRNP como: hnRNP-A1, A2/B1 y Q interactúan con la región 3'NTR (Paranjape & Harris, 2007).

Recordemos que la proteína NS5 requiere de las regiones 5' y 3' NTR para iniciar la síntesis de RNA de cadena negativa. Por lo que para la síntesis de este antígeno, el RNA viral debe adoptar una estructura circular a través de interacciones RNA-RNA de largo alcance de las secuencias conservadas (CS) de las regiones 5' y 3' NTR. Esta conformación permite colocar a la región 5' muy cerca de la 3'NTR para así, transferir a la proteína NS5 que está unida al SL-A del 5'NTR al bucle del vástago de 3' (3'SL) ubicado en el extremo del 3'NTR. (MAZEAUD, FREPPEL, & CHATEL-CHAIX, 2018). Es bien sabido que se requiere un equilibrio adecuado entre las formas lineales y circulares del genoma para asegurar el inicio de la síntesis de RNA, la encapsidación e incluso el cambio de la traducción a la replicación, por lo que la circularización del genoma funciona como un sistema de control que regula la

progresión del ciclo infeccioso del flavivirus (FERNÁNDEZ-SANLÉS, RÍOS-MARCO, ROMERO-LÓPEZ, & BERZAL-HERRANZ, 2017).

Teniendo como antecedente de nuestro laboratorio que la proteína NS5 de DENV-2 interactúa con hnRNP-F, podemos especular que hay una posibilidad de que hnRNP-F pudiera también estar participando en la iniciación de la síntesis del RNA viral o bien podría interactuar en los complejos de replicación con las regiones 5' y 3' NTR de DENV y ZIKV para promover la circularización del genoma viral y por ende potenciar la replicación viral.

En resumen, todos los resultados de este trabajo indican que la proteína del huésped hnRNP-F se relocaliza del núcleo a los complejos de replicación viral lo que podría sugerir que ésta proteína juega un papel importante en la replicación del DENV y ZIKV.

XI. Conclusiones

Las conclusiones que se han obtenido en esta Tesis de Maestría han sido las siguientes:

- ◆ hnRNP-F se transloca del núcleo al citoplasma durante la infección por ZIKV y los cuatro serotipos de DENV.
- ◆ La proteína hnRNP-F se relocaliza hacia los complejos de replicación viral.
- ◆ hnRNP-F colocaliza con proteínas virales estructurales como C y no estructurales como NS3 y NS4A del DENV y ZIKV, lo que puede sugerir que hnRNP-F podría tener un papel en la replicación viral.

XII. Perspectivas

- ❖ Realizar ensayos de microscopía electrónica de transmisión, para corroborar que hnRNP-F se moviliza hacia los complejos de replicación generados durante la infección con DENV y ZIKV.
- ❖ Determinar por medio de ensayos de microscopía confocal, la colocalización de hnRNP-F con RNA viral.
- ❖ Realizar fraccionamiento celular en núcleo y citoplasma a las 24hpi, así como las repeticiones faltantes a las 48hpi.
- ❖ Silenciar a la proteína hnRNP-F mediante un siRNA y determinar su papel durante el ciclo replicativo de DENV y ZIKV.
- ❖ Determinar por ensayos de retardamiento si hnRNP-F interactúa con las regiones 5' y 3' NTR del DENV y ZIKV.

XIII. Bibliografía

- ❖ Acebes, M. Á. M., & Saiz, J. C. (2012). *FLAVIVIRUS QUE INFECTAN EL SISTEMA NERVIOSO*. 15, 8.
- ❖ Acosta, E. G., Kumar, A., & Bartenschlager, R. (2014). Revisiting dengue virus-host cell interaction: New insights into molecular and cellular virology. *Advances in Virus Research*, 88, 1-109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00001-5>
- ❖ Agis-Juárez, R. A., Galván, I., Medina, F., Daikoku, T., Padmanabhan, R., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2009). Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is required during dengue virus infection in Vero cells. *Journal of General Virology*, 90(12), 2893-2901. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013433-0>
- ❖ Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., ... Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science*, 343(6173), 881-885. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>
- ❖ Aktepe, T. E., & Mackenzie, J. M. (2018). Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cellular Microbiology*, 20(8), e12884. <https://doi.org/10.1111/cmi.12884>
- ❖ Alvarado-Castro, V. M., Ramírez-Hernández, E., Paredes-Solís, S., Legorreta Soberanis, J., Saldaña-Herrera, V. G., Salas-Franco, L. S., ... Andersson, N. (2016). Caracterización clínica del dengue y variables predictoras de gravedad en pacientes pediátricos en un hospital de segundo nivel en Chilpancingo, Guerrero, México: Serie de casos. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 73(4), 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2016.06.004>
- ❖ Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Pietrasanta, L. I., & Gamarnik, A. V. (2005). Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(11), 6631-6643.

<https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6631-6643.2005>

- ◆ 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>
- ◆ Azhar, E. I., Hashem, A. M., El-Kafrawy, S. A., Abol-Ela, S., Abd-Alla, A. M., Sohrab, S. S., ... Jamjoom, G. (2015). Complete genome sequencing and phylogenetic analysis of dengue type 1 virus isolated from Jeddah, Saudi Arabia. *Virology Journal*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0235-7>
- ◆ Balinsky, C. A., Schmeisser, H., Ganesan, S., Singh, K., Pierson, T. C., & Zoon, K. C. (2013). Nucleolin Interacts with the Dengue Virus Capsid Protein and Plays a Role in Formation of Infectious Virus Particles. *Journal of Virology*, 87(24), 13094-13106. <https://doi.org/10.1128/JVI.00704-13>
- ◆ Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., ... 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>
- ◆ 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>
- ◆ Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- ◆ Bhullar, D., Jalodia, R., Kalia, M., & Vрати, S. (2014). Cytoplasmic Translocation of Polypyrimidine Tract-Binding Protein and Its Binding to Viral RNA during Japanese Encephalitis Virus Infection Inhibits Virus Replication. *PLOS ONE*, 9(12), e114931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114931>
- ◆ Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., ... 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>

- ◆ Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., ... Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- ◆ Brinton, M. A., & Basu, M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus., Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. *Virus Research*, 206, 108-119.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.006>,
[10.1016/j.virusres.2015.02.006](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.006)
- ◆ Brinton, M., & Brinton, M. A. (2013). Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses*, 6(1), 13-53.
<https://doi.org/10.3390/v6010013>
- ◆ Brunetti, J. E., Sclaro, L. A., & Castilla, V. (2015). The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a host factor required for dengue virus and Junín virus multiplication. *Virus Research*, 203, 84-91.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.04.001>
- ◆ Brunner, J. E., Nguyen, J. H. C., Roehl, H. H., Ho, T. V., Swiderek, K. M., & Semler, B. L. (2005). Functional Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C with Poliovirus RNA Synthesis Initiation Complexes. *Journal of Virology*, 79(6), 3254-3266.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3254-3266.2005>
- ◆ Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual review of virology*, 3(1), 263-281.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042334>
- ◆ Carmo, A. M. dos S., Suzuki, R. B., Cabral, A. D., Costa, R. T. da, Massari, G. P., Riquena, M. M., ... Sperança, M. A. (2017). Co-circulating serotypes

in a dengue fever outbreak: Differential hematological profiles and phylogenetic relationships among viruses. *Journal of Clinical Virology*, 90, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.001>

- ❖ Carpio-Orantes, L. del. (2016). Arbovirus emergentes en México: Chikunguña y zika. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(3), 278-279.
- ❖ Cervantes-Salazar, M., Gutierrez-Escolano, A. L., Reyes-Ruiz, J. M., & Angel, R. M. del. (2018). The Nonstructural Proteins 3 And 5 From Flavivirus Modulate Nuclear-Cytoplasmic Transport And Innate Immune Response Targeting Nuclear Proteins. *BioRxiv*, 375899. <https://doi.org/10.1101/375899>
- ❖ Chang, C.-J., Luh, H.-W., Wang, S.-H., Lin, H.-J., Lee, S.-C., & Hu, S.-T. (2001). The Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP K) Interacts with Dengue Virus Core Protein. *DNA and Cell Biology*, 20(9), 569-577. <https://doi.org/10.1089/104454901317094981>
- ❖ Chatel-Chaix, L., Fischl, W., Scaturro, P., Cortese, M., Kallis, S., Bartenschlager, M., ... 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>
- ❖ Chaudhury, A., Chander, P., & Howe, P. H. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*, 16(8), 1449-1462. <https://doi.org/10.1261/rna.2254110>
- ❖ Chen, W., Gao, N., Wang, J., Tian, Y., Chen, Z., & An, J. (2008). Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Archives of Virology*, 153(9), 1777-1781. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0183-x>
- ❖ Colpitts, T. M., Barthel, S., Wang, P., & Fikrig, E. (2011). Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in

Human Liver Cells. *PLOS ONE*, 6(9), e24365.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024365>

- ◆ Dechtawewat, T., Songprakhon, P., Limjindaporn, T., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Saitornuang, S., ... Noisakran, S. (2015). Role of human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 in dengue virus replication. *Virology Journal*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0219-7>
- ◆ Dhillon, P., Tandra, V. N., Chorghade, S. G., Namsa, N. D., Sahoo, L., & Rao, C. D. (2018). Cytoplasmic Relocalization and Colocalization with Viroplasm of Host Cell Proteins, and Their Role in Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, 92(15). <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-18>
- ◆ Diwaker, D., Mishra, K. P., Ganju, L., & Singh, S. B. (2016). Dengue virus non-structural 1 protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H in human monocytic cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(2), 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.015>
- ◆ Dong, Y., Ye, W., Yang, J., Han, P., Wang, Y., Ye, C., ... Lei, Y. (2016). DDX21 translocates from nucleus to cytoplasm and stimulates the innate immune response due to dengue virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(2), 648-653. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.120>
- ◆ Dusen, C. M. V., Yee, L., McNally, L. M., & McNally, M. T. (2010). A Glycine-Rich Domain of hnRNP H/F Promotes Nucleocytoplasmic Shuttling and Nuclear Import through an Interaction with Transportin 1. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10), 2552-2562. <https://doi.org/10.1128/MCB.00230-09>
- ◆ Emara, M. M., Liu, H., Davis, W. G., & Brinton, M. A. (2008). Mutation of Mapped TIA-1/TIAR Binding Sites in the 3' Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Minus-Strand RNA in an Infectious Clone Negatively Affects Genomic RNA Amplification. *Journal of Virology*, 82(21), 10657-10670. <https://doi.org/10.1128/JVI.00991-08>

- ◆ Espinoza, M. M. (2017). Aspectos clínicos de la infección por el virus zika. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(1), 79-82. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i1.13026>
- ◆ Filomatori, C. V., Lodeiro, M. F., Alvarez, D. E., Samsa, M. M., Pietrasanta, L., & Gamarnik, A. V. (2006). A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & Development*, 20(16), 2238-2249. <https://doi.org/10.1101/gad.1444206>
- ◆ Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Wang, C., Jans, D. A., & Wagstaff, K. M. (2014). Investigating Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Nuclear Import. En R. Padmanabhan & S. G. Vasudevan (Eds.), *Dengue: Methods and Protocols* (pp. 301-328). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_19
- ◆ Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., ... Khromykh, A. A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *Journal of Virology*, 84(21), 11407-11417. <https://doi.org/10.1128/JVI.01159-10>
- ◆ García-Montalvo, B. M., Medina, F., & del Angel, R. M. (2004). La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Research*, 102(2), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.024>
- ◆ Gebhard, L. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome. *Viruses*, 3(9), 1739-1756. <https://doi.org/10.3390/v3091739>
- ◆ Gerold, G., Bruening, J., Weigel, B., & Pietschmann, T. (2017). Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 16(4 Suppl 1), S75-S91. <https://doi.org/10.1074/mcp.R116.065649>
- ◆ Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: Insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, 135(8), 851-867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>

- ◆ Hahn, C. S., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1987). Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *Journal of Molecular Biology*, 198(1), 33-41. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90455-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90455-4)
- ◆ Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: Past, present and perspectives. *Biochemical Journal*, 430(3), 379-392. <https://doi.org/10.1042/BJ20100396>
- ◆ Hannemann, H., Sung, P.-Y., Chiu, H.-C., Yousuf, A., Bird, J., Lim, S. P., & Davidson, A. D. (2013). Serotype-specific Differences in Dengue Virus Non-structural Protein 5 Nuclear Localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22621-22635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481382>
- ◆ Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., LaCount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17345-17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107>
- ◆ Jácome, F. C., Teixeira, A. L., Coutinho, D. D., Costa, A. D., Caldas, G. C., Nunes, M. A., ... Barreto-Vieira, D. F. (2019). Secondary dengue infection in immunocompetent murine model leads to heart tissue damage. *Acta Virologica*, 63(3), 292-300. https://doi.org/10.4149/av_2019_309
- ◆ Jagdeo, J. M., Dufour, A., Fung, G., Luo, H., Kleifeld, O., Overall, C. M., & Jan, E. (2015). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M Facilitates Enterovirus Infection. *Journal of Virology*, 89(14), 7064-7078. <https://doi.org/10.1128/JVI.02977-14>
- ◆ Jiang, L., Yao, H., Duan, X., Lu, X., & Liu, Y. (2009). Polypyrimidine tract-binding protein influences negative strand RNA synthesis of dengue virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(2), 187-192.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.036>

- ◆ Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., & Thongboonkerd, V. (2010). Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Molecular BioSystems*, 6(5), 795-806. <https://doi.org/10.1039/B923864F>
- ◆ Katoh, H., Mori, Y., Kambara, H., Abe, T., Fukuhara, T., Morita, E., ... Matsuura, Y. (2011). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Participates in the Replication of Japanese Encephalitis Virus through an Interaction with Viral Proteins and RNA. *Journal of Virology*, 85(21), 10976-10988. <https://doi.org/10.1128/JVI.00846-11>
- ◆ Kim, C. S., Seol, S. K., Song, O.-K., Park, J. H., & Jang, S. K. (2007). An RNA-Binding Protein, hnRNP A1, and a Scaffold Protein, Septin 6, Facilitate Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology*, 81(8), 3852-3865. <https://doi.org/10.1128/JVI.01311-06>
- ◆ Klema, V. J., Ye, M., Hindupur, A., Teramoto, T., Gottipati, K., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLOS Pathogens*, 12(2), e1005451. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005451>
- ◆ Lescar, J., Soh, S., Lee, L. T., Vasudevan, S. G., Kang, C., & Lim, S. P. (2018). The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. En R. Hilgenfeld & S. G. Vasudevan (Eds.), *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies* (pp. 115-129). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_9
- ◆ Lessler, J., Chaisson, L. H., Kucirka, L. M., Bi, Q., Grantz, K., Salje, H., ... Rodriguez-Barraquer, I. (2016). Assessing the global threat from Zika virus. *Science*, aaf8160. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8160>
- ◆ 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, C., Ge, L., Li, P., Wang, Y., Dai, J., Sun, M., ... Mao, X. (2014). Cellular DDX3 regulates Japanese encephalitis virus replication by interacting with viral un-translated regions. *Virology*, 449, 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.008>
- ◆ Li, L., Lok, S.-M., Yu, I.-M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science*, 319(5871), 1830-1834. <https://doi.org/10.1126/science.1153263>
- ◆ Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K. M., ... Brinton, M. A. (2002). Cell Proteins TIA-1 and TIAR Interact with the 3' Stem-Loop of the West Nile Virus Complementary Minus-Strand RNA and Facilitate Virus Replication. *Journal of Virology*, 76(23), 11989-12000. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.11989-12000.2002>
- ◆ Li, Yan, Lee, M. Y., Loh, Y. R., & Kang, C. (2018). Secondary structure and membrane topology of dengue virus NS4A protein in micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(2), 442-450. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.016>
- ◆ Li, You, Masaki, T., Shimakami, T., & Lemon, S. M. (2014). HnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *Journal of Virology*, 88(13), 7199. <https://doi.org/10.1128/JVI.00225-14>
- ◆ Limjindaporn, T., Netsawang, J., Noisakran, S., Thiemmecca, S., Wongwiwat, W., Sudsaward, S., ... Malasit, P. (2007). Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(2), 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.194>
- ◆ Lin, J.-Y., Shih, S.-R., Pan, M., Li, C., Lue, C.-F., Stollar, V., & Li, M.-L.

- (2009). HnRNP A1 Interacts with the 5' Untranslated Regions of Enterovirus 71 and Sindbis Virus RNA and Is Required for Viral Replication. *Journal of Virology*, 83(12), 6106-6114. <https://doi.org/10.1128/JVI.02476-08>
- ◆ Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *Journal of Virology*, 73(6), 4611-4621.
 - ◆ Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017). The IMPORTance of the Nucleus during Flavivirus Replication. *Viruses*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/v9010014>
 - ◆ Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., & Bucht, G. (2019). Globe-Trotting Aedes aegypti and Aedes albopictus: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2486>
 - ◆ Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: An Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564-581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>
 - ◆ Martins, I. C., Gomes-Neto, F., Faustino, A. F., Carvalho, F. A., Carneiro, F. A., Bozza, P. T., ... Da Poian, A. T. (2012). The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochemical Journal*, 444(3), 405-415. <https://doi.org/10.1042/BJ20112219>
 - ◆ McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22147-22159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500>
 - ◆ Mena, N., Troyo, A., Bonilla-Carrión, R., & Calderón-Arguedas, O. (2011). [Factors associated with incidence of dengue in Costa Rica]. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 29(4), 234-242. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892011000400004>
 - ◆ 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>
- ◆ 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>
 - ◆ Mohd, A., Zainal, N., Tan, K.-K., & AbuBakar, S. (2019). Resveratrol affects Zika virus replication in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50674-3>
 - ◆ Morrison, J., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2012). Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses*, 4(3), 397-413. <https://doi.org/10.3390/v4030397>
 - ◆ Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2), 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
 - ◆ Nemésio, H., Palomares-Jerez, M. F., & Villalaín, J. (2013). Hydrophobic segment of dengue virus C protein. Interaction with model membranes. *Molecular Membrane Biology*, 30(4), 273-287. <https://doi.org/10.3109/09687688.2013.805835>
 - ◆ Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., ... Limjindaporn, T. (2010). Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Research*, 147(2), 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.012>
 - ◆ Noisakran, S., Dechtawewat, T., Avirutnan, P., Kinoshita, T., Siripanyaphinyo, U., Puttikhunt, C., ... Sittisombut, N. (2008). Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *Journal of General Virology*, 89(10), 2492-2500. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83620-0>

- ❖ Oliveira, E. R. A., Mohana-Borges, R., de Alencastro, R. B., & Horta, B. A. C. (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research*, 227, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.005>
- ❖ Paranjape, S. M., & Harris, E. (2007). Y Box-binding Protein-1 Binds to the Dengue Virus 3'-Untranslated Region and Mediates Antiviral Effects. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30497-30508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705755200>
- ❖ Peng, M., Swarbrick, C. M. D., Chan, K. W.-K., Luo, D., Zhang, W., Lai, X., ... Vasudevan, S. G. (2018). Luteolin escape mutants of dengue virus map to prM and NS2B and reveal viral plasticity during maturation. *Antiviral Research*, 154, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.013>
- ❖ Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1552-1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- ❖ Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J. E. (2006). Susceptibility/Resistance Genes to Flavivirus, Implications on Disease Severity. *Acta Biológica Colombiana*, 11(2), 21-30.
- ❖ Reid, C. R., Airo, A. M., & Hobman, T. C. (2015). The Virus-Host Interplay: Biogenesis of +RNA Replication Complexes. *Viruses*, 7(8), 4385-4413. <https://doi.org/10.3390/v7082825>
- ❖ Rodriguez-Madoz, J. R., Belicha-Villanueva, A., Bernal-Rubio, D., Ashour, J., Ayllon, J., & Fernandez-Sesma, A. (2010). Inhibition of the Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active NS2B3 Complex. *Journal of Virology*, 84(19), 9760-9774. <https://doi.org/10.1128/JVI.01051-10>
- ❖ Rothan, H. A., & Kumar, M. (2019). Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Proteins in Flavivirus Replication and Assembly Complexes. *Pathogens*, 8(3), 148. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030148>
- ❖ Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I.,

- Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., ... Gamarnik, A. V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathogens*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632>
- ❖ Sangiambut, S., Keelapang, P., Aaskov, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., & Sittisombut, N. (2008). Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *Journal of General Virology*, 89(5), 1254-1264. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83264-0>
- ❖ Saw, W. G., Pan, A., Subramanian Manimekalai, M. S., Grüber, A., & Grüber, G. (2018). Structure and flexibility of non-structural proteins 3 and -5 of Dengue- and Zika viruses in solution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.008>
- ❖ Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & Angel, R. M. del. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257>
- ❖ Tay, M. Y. F., Fraser, J. E., Chan, W. K. K., Moreland, N. J., Rathore, A. P., Wang, C., ... Jans, D. A. (2013). Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Research*, 99(3), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002>
- ❖ Tiwary, A. K., & Cecilia, D. (2017). Kinetics of the association of dengue virus capsid protein with the granular component of nucleolus. *Virology*, 502, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.013>
- ❖ Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., ... Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- ❖ Wong, S.-S., Haqshenas, G., Gowans, E. J., & Mackenzie, J. (2012). The

dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. *FEBS Letters*, 586(7), 1032-1037. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.047>

- ❖ 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>
- ❖ Xu, Z., & Hobman, T. C. (2012). The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. *Virology*, 433(1), 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.011>
- ❖ Yocupicio-Monroy, M., Padmanabhan, R., Medina, F., & del Angel, R. M. (2007). Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology*, 357(1), 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.042>
- ❖ Yu, L., Nomaguchi, M., Padmanabhan, R., & Markoff, L. (2008). Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*, 374(1), 170-185. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.035>
- ❖ Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- ❖ Zhao, Y., Soh, T. S., Zheng, J., Chan, K. W. K., Phoo, W. W., Lee, C. C., ... Luo, D. (2015). A Crystal Structure of the Dengue Virus NS5 Protein Reveals a Novel Inter-domain Interface Essential for Protein Flexibility and Virus Replication. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004682. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004682>
- ❖ Zou, J., Xie, X., Lee, L. T., Chandrasekaran, R., Reynaud, A., Yap, L., ... Shi, P.-Y. (2014). Dimerization of Flavivirus NS4B Protein. *Journal of Virology*, 88(6), 3379-3391. <https://doi.org/10.1128/JVI.02782-13>
- ❖ Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., ... Shi, P.-Y.

(2015). Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology*, 89(7), 3455-3470.
<https://doi.org/10.1128/JVI.03453-14>