



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Estudio de las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} en células hepáticas infectadas con el virus del dengue y su importancia en la replicación viral”

TESIS

Que presenta:

M en C. Cinthia Lizzette Dionicio Rodríguez

**Para obtener el grado de:
DOCTOR(A) EN CIENCIAS**

Director de la Tesis:

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Ciudad de México

Enero, 2017

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio 3 y 8 de Virología del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del I.P.N (**CINVESTAV**) Unidad Zacatenco, bajo la tutoría del Dr. Juan Ernesto Ludert León y la asesoría de la Dra. Rosa Ma. Del Ángel Nuñez, de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, del Dr. Ricardo Félix Grijalva (departamento de Biología Celular), del Dr. Juan Salas Benito (ENMH) y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) a través de la beca otorgada durante el periodo septiembre 2012 – julio 2016.

DEDICATORIA y AGRADECIMIENTOS

A mi mamá C. Edith Rodríguez Cárdenas que siempre me apoyas incondicionalmente y me regalas una palabra de aliento en el preciso momento para sobrellevar las adversidades y continuar con mis metas por más difíciles que se vean.

A mi papá José Dionicio Torres por impulsar cada paso de mi educación, y enseñarme en cada momento que la ética es una herramienta clave para el éxito profesional y por su apoyo incondicional.

A mi hermana Miriam Elizabeth Dionicio Rodríguez, por su apoyo y palabras de aliento para alcanzar mis metas.

A mis sobrinos, Luisito, Miriam y Sara por hacerme gratos los momentos de convivencia familiar

Al Dr. Ludert, por aceptarme en su grupo de trabajo, por todos sus consejos, paciencia, enseñanzas y siempre ver con entusiasmo cada resultado. Por brindarme las herramientas necesarias para concluir este trabajo y por brindarme su confianza y apoyo incondicional.

A la Dra. Del Ángel y la Dra. Lorena por su todo su apoyo, enseñanzas, consejos y herramientas para concluir con este proyecto, así como por compartir conmigo su amplia experiencia en el área de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas	VI
Lista de figuras y tablas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
1) INTRODUCCIÓN	1
1.1) Epidemiología	2
1.2) Ciclo replicativo	3 – 4
1.3) Homeóstasis y coreografía de la señalización de Ca ²⁺	5 – 6
1.4) Los virus y su relación con Ca ²⁺	6 – 10
1.5) Generalidades de la vía entrada capacitativa de Ca ²⁺	10 – 11
1.5.1) Infección por <i>Flavivirus</i> y cambios en la homeóstasis de Ca ²⁺	11 – 12
2) JUSTIFICACIÓN	13
3) HIPOTESIS	13
4) OBJETIVOS	
4.1) Objetivo general	14
4.2) Objetivos particulares	
5) MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1) Cultivo celular y cepa viral	15
5.2) Inmunofluorescencias	15
5.3) Ensayo de focos	15
5.4) Mediciones de Ca ²⁺	16 - 18
5.5) Ensayo de viabilidad celular	18
5.6) Alteraciones de los niveles de Ca ²⁺ y su efecto en el ciclo viral	17
5.7) Determinación del antígeno viral NS1	20
5.8) Ensayo de Western Blot	20
5.9) Inmunofluorescencia para evaluar Stim1 y Orail	21
5.10) RT-PCR un solo paso	20
4.11) Purificación de los productos de RT – PCR	20
4.12) PCR en tiempo real	21
4.13) Análisis estadístico	22

6) RESULTADOS	22
6.1) DENV altera la homóstasis de Ca^{2+} en células hepáticas	22 – 30
6.2) Incremento de la permeabilidad relacionada a la vía SOCE	29 – 35
6.3) El Ca^{2+} juega un papel relevante en el ciclo replicativo de DENV	31 - 33 34 – 39
7) DISCUSIÓN	42 - 52
8) CONCLUSIONES	53
9) PERSPECTIVAS	53
10) REFERENCIAS	54 – 60

ABREVIATURAS.

[Ca ²⁺]	Concentración de calcio
μM	Micromolar
2 – APB	2-aminoethoxydiphenyl borate
ARN	Ácido ribonucléico
BAPTA – AM	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,- N',N'- tetraacetic acid tetraacetoxy Methyl ester
CRAC	Canales de Ca ²⁺ activada por liberación de Ca ²⁺
Ct	Curve threshold
DC's	Células dendríticas
DENV	Virus Dengue
DF	Fiebre por Dengue
DHF	Fiebre hemorrágica por Dengue
DSS	Síndrome de Shock por Dengue
EGTA	Ácido Tetraacético Etilen Glicol
hpi	Horas post - infección
IP ₃ R	Receptor de Inositol trifosfato
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
mM	miliMolar
MO	Monocitos
MØ	Macrófagos
MOI	Membrana plasmática
MP	Multiplicidad de infección
NS	No estructural
NXC	Intercambiador Sodio/ Calcio
Pb	Pares de bases
PLCγ	Fosfolipasa C gama
PMCA	ATP – asa de calcio de MP
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Canales operados por receptor
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATP – asa del RE/ sarcoplásmico
SOC	Canales Operados por reserva
SOCE	Entrada de Ca ²⁺ Operada por Reserva
SPCA	ATP – asa de la vía secretoria
STIM1	Molécula 1 de interacción estromal
Tg	Tapsigargina
TRPC	Canal iónico de potencial re receptor transitorio
UFP/mL	Unidades formadoras de placas / mililitro
VOC	Canales operados por voltaje

Figura 1.- Distribución geográfica del virus del dengue	3
Figura 2.- Ciclo replicativo del virus del dengue	4
Figura 3.- Esquema de las vías de señalización de Ca^{2+} y ejemplos de alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} inducida por virus	8
Figura 4.- La infección por virus selectivamente altera la señalización de Ca^{2+} pro – apoptótica y de supervivencia vía RE – Mitocondria	9
Figura 5.- Estructura del MTS y su producto reducido, el azul de formazan	19
Figura 6 .- Células HepG2 y Huh7 Infechadas con DENV4	23
Figura 7.- Concentraciones de Ca^{2+} citosólicas	24
Figura 8.- Permeabilidad a Ca^{2+} por parte de las células infectadas	26
Figura 9.- Niveles de Ca^{2+} liberados del RE	28
Figura 10.- Cambios en los niveles de Ca^{2+} en células Huh7 infectadas con DENV.	30
Figura 11.- <i>Western Blot</i> y análisis densitométrico de Stim1 y Orai1	31 y 32
Figura 12.- Microscopía confocal de Stim1 y Orai1	34 y 35
Figura 13.- Concentración de las diferentes drogas que no comprometían la viabilidad de las células drogas	37
Figura 14.- La señalización de Ca^{2+} intracelular es importante para la eficiente replicación viral	39
Figura 15.- La alteración de los niveles de Ca^{2+} intra y extracelular repercute en la producción y secreción de NS1	41
Tabla 1.- Niveles de Ca^{2+} liberados por RE de experimentos independientes	27

RESUMEN.

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante para los humanos. Cursa con un amplio rango de cuadros clínicos que van desde las formas leves (fiebre por dengue), hasta las formas severas (Dengue Severo). El virus Dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* y se han descrito 4 serotipos. El Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero controlando diversos procesos celulares. La célula mantiene los niveles fisiológicos de Ca^{2+} a través de la activación de una maquinaria compleja de canales y bombas en membrana plasmática y en organelos como el Retículo Endoplásmico (RE) que sirve como reserva de Ca^{2+} . Existe evidencia importante que sugiere el Ca^{2+} juega un papel importante en el ciclo replicativo de algunos agentes virales, incluidos algunos flavivirus. Sin embargo, la participación del Ca^{2+} durante el ciclo replicativo del dengue se desconoce. Por tal motivo, el siguiente trabajo busca dilucidar la posible participación del Ca^{2+} y de algunas proteínas reguladoras de los niveles de este ión durante la infección por DENV. Experimentos realizados en líneas celulares hepáticas, HepG2 y Huh7 infectadas con DENV4 y cargadas con fura 2 – AM y fluo 4 – AM, respectivamente, sugieren que la infección induce un incremento significativo en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática y una reducción en los niveles de Ca^{2+} libre en RE. Ensayos de WB sugieren que no hay cambios considerables en los niveles de las proteínas principalmente involucradas en SOCE, Stim1 y Orail1, a las 12 hpi. No obstante, éstas proteínas mostraron colocalización mediante análisis de microscopía confocal en células infectadas y no en células mock infectadas. En conjunto éstos resultados sugieren que el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática en células infectadas parece ser debida a la activación de los componentes involucrados en la entrada capacitativa más que un incremento de la traducción protéica. Finalmente la manipulación de los niveles de Ca^{2+} intra y extracelular de células hepáticas mediante tratamientos con los quelantes de Ca^{2+} , BAPTA – AM y EGTA, así como el empleo de inhibidores de canales de Ca^{2+} de membrana plasmática (MRS1845 y SKF96365), un antagonista del receptor de IP3 (IP3R) 2 – APB y el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extracelular}}$ reducen significativamente la síntesis de proteínas virales y producción de partículas virales infecciosas sin afectar la viabilidad celular. Tomando en conjunto todos los resultados sugieren cambios inducidos en la homeostasis de Ca^{2+} durante la infección por DENV son requeridos para una eficiente replicación viral.

ABSTRACT.

The dengue virus (DENV) belongs to the family *Flaviviridae* and 4 serotypes have been described. Ca^{2+} is a second messenger controlling many intracellular processes in mammalian cells. Some evidence indicates that Ca^{2+} plays an important role in the replication cycle of several viruses, including several *Flavivirus*. Since, the participation of Ca^{2+} during the replicative cycle of DENV has not been studied, the involvement of Ca^{2+} and regulatory proteins of this ion levels during DENV infection of human hepatic cells was analyzed. Human hepatic cells (HepG2 and Huh7) infected with DENV-4 and loaded with fura 2 – AM and fluo4 – AM, showed that DENV infection significantly increased plasma membrane permeability to Ca^{2+} and causes a significant reduction in the levels of Ca^{2+} releasable from the endoplasmic reticulum. WB analysis of proteins STIM1 and Orai1 showed no changes in their expression levels during infection. However, they were shown to co-localize by confocal microscopy in DENV infected, but not in mock infected cells. Thus, the increase in plasma membrane permeability in infected cells appears to be due to the activation of components involved in capacitive entry, rather than an increase in protein production. Finally, manipulation in infected cells of the intra and extracellular Ca^{2+} levels by Ca^{2+} chelators (BAPTA-AM and EGTA), Ca^{2+} channels inhibitors (MRS1845, SKF96365), IP3 Receptor (IP3R) antagonists (2APB) and the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extracellular}}$ significantly reduced viral protein synthesis and virus yield, without affecting cell viability. These results show DENV infection alters Ca^{2+} homeostasis and activates the capacitive entry pathway in infected cells and those changes are required for an efficient viral replication.

1) INTRODUCCIÓN.

El Dengue es la infección viral transmitida por mosquitos más común del mundo con un estimado de 390 millones de infecciones por año y 3.9 billones de personas se encuentran en riesgo en más de 128 países (Bhatt et al., 2013; Brady et al., 2012; WHO, 2016b). Con base a ensayos de neutralización han sido distinguidos 4 serotipos (DENV-1, -2, -3, -4) y la infección puede causar un amplio rango de síntomas que va desde una forma febril autolimitada, llamada Fiebre por Dengue (DF), hasta formas más severas conocidas como Dengue Severo (DS) (WHO, 2016a). A pesar de la alta incidencia la enfermedad asociada a la infección con virus dengue, apenas recientemente se ha licenciado la primera vacuna contra el dengue y aun no hay tratamiento específico para la enfermedad (Simmons et al., 2012).

El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y posee un genoma de ARN de polaridad positiva y cadena sencilla (aprox. 11 Kb) con un solo marco de lectura que codifica para una poliproteína la cual es procesada en 3 proteínas estructurales llamadas de envoltura (E), cápside (C) y prM (pre – Membrana) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)(Clyde et al., 2006). El ciclo replicativo del DENV se inicia con la unión del virión a sus receptores, seguida por la internalización por endocitosis y subsecuente liberación del genoma en el citoplasma de la célula infectada. La traducción de las proteínas virales se lleva a cabo en un complejo de membranas derivadas del Retículo Endoplásmico Rugoso (RE) y la morfogénesis viral en la red trans-Golgi. Posteriormente, las partículas virales maduras viajan en vesículas para salir de la célula por exocitosis, y así ser capaces de infectar otras células (Mackenzie and Westaway, 2001; Miller et al., 2008; Mosso et al., 2008; Yu et al., 2008)

El Ca^{2+} es un segundo mensajero, que actúa en el control de diversos procesos celulares (Berridge et al., 2000; Carafoli et al., 2001; Jaiswal, 2001) modulando la actividad de componentes de señalización, como canales iónicos, efectores de Ca^{2+} y enzimas sensibles a Ca^{2+} , entre otros (Berridge et al., 2003). Además, existe abundante evidencia que indica que el Ca^{2+} juega un papel importante en el ciclo replicativo de varios agentes virales, incluyendo miembros de la familia *Flaviviridae* (Zhou et al., 2009). Sin embargo, la importancia del Ca^{2+} durante el ciclo replicativo del DENV se desconoce. Es por ello, que el siguiente trabajo busca dilucidar la participación del Ca^{2+} y de distintos mediadores de los niveles de este ión en la célula durante una infección por DENV.

1.1) EPIDEMIOLOGÍA

El Dengue es transmitido por el mosquito hembra del género *Aedes* y es considerada la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante en áreas tropicales y subtropicales, con un estimado de más de 96 millones de casos y un total de 390 millones de infecciones por año de las cuales se estiman 500 mil hospitalizaciones y 25 mil muertes (Bhatt et al., 2013; Guzman et al., 2010). Los cambios sociales y demográficos como crecimiento de poblaciones, urbanización y transporte moderno han contribuido ampliamente al incremento de la incidencia y propagación geográfica de la enfermedad (Gubler, 2002)

Hoy en día el dengue es endémico en más de 100 países incluyendo México. Según la Secretaría de Salud de nuestro país, el número de casos de pacientes con dengue clásico como con dengue grave ha reducido en aproximadamente un 30% durante el 2016, con respecto al 2015. Sin embargo, el número de casos se mantiene en estado de alarma, confirmando la relevancia de esta infección en el sector salud de nuestro país con el 53% de los casos

confirmados, correspondientes a Guerrero, Veracruz, Jalisco, Michoacán y Nuevo León, según los reportes emitidos el 28 de Noviembre de 2016 por la Secretaria de Salud.

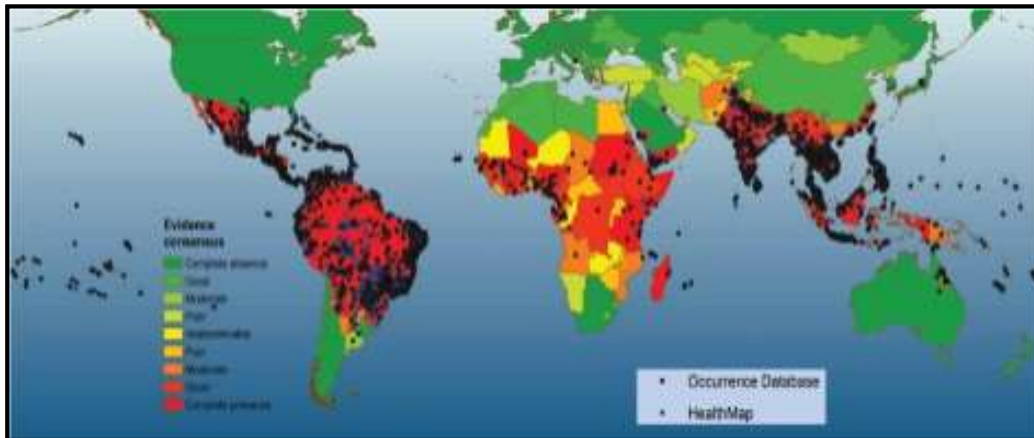


Figura 1.- Distribución geográfica de Dengue (Bhatt et al., 2013)

1.2) CICLO REPLICATIVO DE DENV

Durante la infección primaria, las células de la línea fagocítica mononuclear MO, MØ y DCs, incluyendo las células de Langerhans, son los primeros blancos de infección. No obstante, datos *in vitro* y estudios de autopsia han sugerido que el DENV posee tropismo no sólo por células del sistema inmune, sino también, por células del hígado, endotelio, bazo, nódulos linfoides, riñón, médula ósea, pulmón, timo y cerebro, por lo cual se considera al dengue como una infección sistémica (Diamond et al., 2000; Jessie et al., 2004; Noisakran et al., 2010; Pova et al., 2014; Wu et al., 2000). El primer paso en la infección por DENV es la unión a receptores celulares sobre la superficie de las células blanco (Miller et al., 2008; Sreaton et al., 2015). Esta interacción induce la internalización del virión por endocitosis mediada por clatrina y subsecuente fusión del virus con la membrana endosomal, lo cual libera el genoma en el citoplasma de la célula infectada. La fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma está mediada por la proteína E y requiere del bajo pH de las vesículas endocíticas. El ARN de polaridad positiva de inmediato se asocia con el RE donde se traduce. Durante la traducción del genoma viral, se producen cambios celulares como la inducción de estructuras de membrana que

proporcionan un microambiente limitado por membrana requerido para la formación de complejos replicativos, en los cuales se lleva a cabo la síntesis del ARN y la morfogénesis viral. Después de la replicación del ARN viral, las partículas virales inmaduras viajan en vesículas al aparato de Golgi donde la proteína E se somete a glicosilaciones. Posteriormente los viriones inmaduros viajan en vesículas para salir de la célula. Durante esta fase, la furina corta a la proteína prM en M para generar viriones maduros los cuales salen de la célula a través de la vía secretoria y finalmente son capaces de infectar otras células como se muestra en la **Figura 2** (Mackenzie and Westaway, 2001; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Screaton et al., 2015; van der Schaar et al., 2008; van der Schaar et al., 2007; Yu et al., 2008)

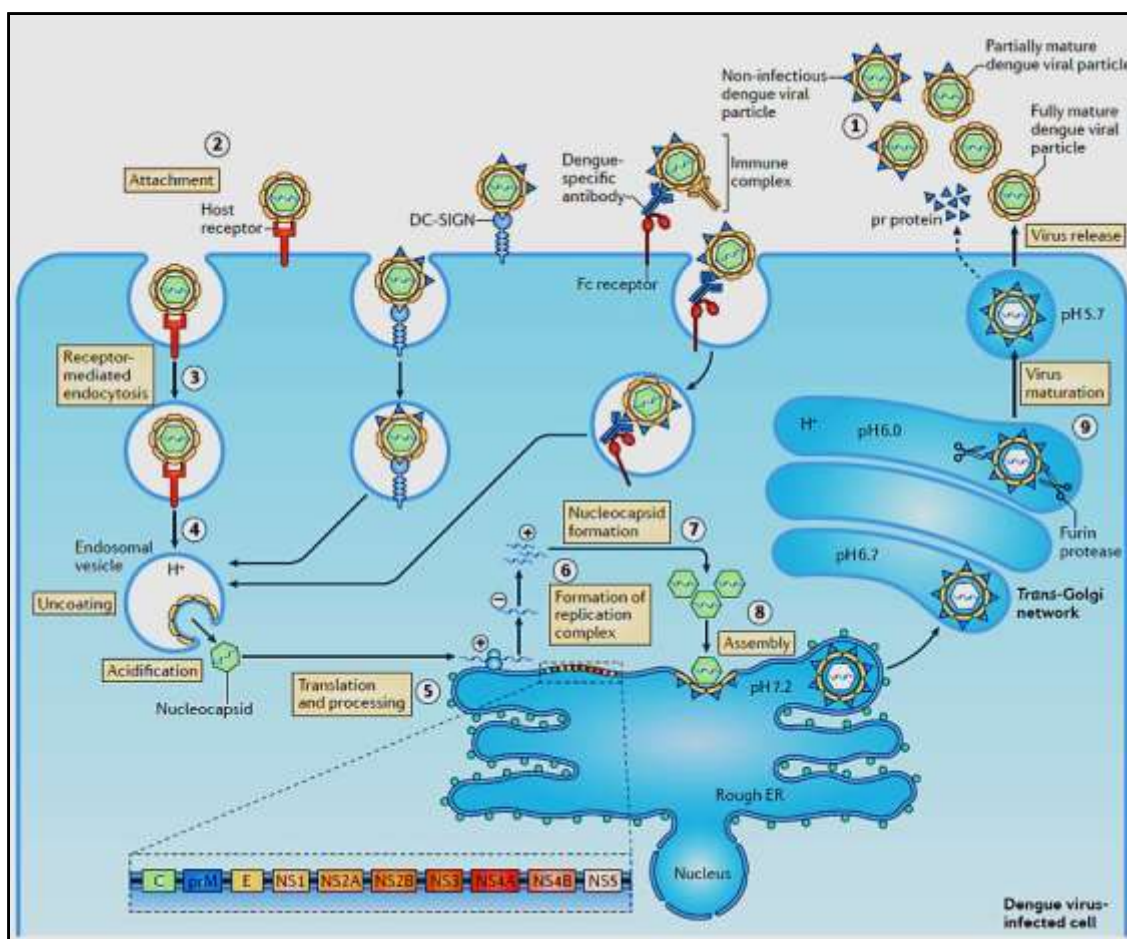


Figura 2.- Ciclo de replicaivo de DENV.(Screaton et al., 2015)

1.3) HOMEÓSTASIS Y COREOGRAFÍA DE LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+}

El Ca^{2+} ha sido elegido por la naturaleza a través de la evolución como uno de los transportadores más universales y versátiles de señales en células eucariotes al actuar como un segundo mensajero en diversas vías de señalización, las cuales, tienen diversos resultados en función de los aspectos espaciotemporales de la liberación de calcio (Berridge et al., 2000; Carafoli et al., 2001; Jaiswal, 2001; Verkhratsky, 2007). Su versatilidad permite controlar distintos procesos celulares a través de la regulación estricta de la actividad de un repertorio de componentes de señalización, que incluyen receptores, canales iónicos, bombas, intercambiadores, amortiguadores de Ca^{2+} , efectores de Ca^{2+} , enzimas sensibles a Ca^{2+} y factores de transcripción, en varios compartimientos celulares, con la finalidad de mantener un balance de los niveles fisiológicos (Berridge et al. 2003).

Se ha identificado que la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular se encuentra en el rango de mM, mientras que en la célula la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{CITOSOL}}$ y $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ se mantienen en el orden de los nM y μM , respectivamente. Por lo tanto la célula mantiene los niveles fisiológicos adecuados activando componentes de la homeostasis de Ca^{2+} para evitar fluctuaciones en sus concentraciones intracelulares (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007; Parekh and Putney, 2005; Pozzan et al., 1994). La señalización de Ca^{2+} citosólica se hace posible aprovechando los gradientes de concentración entre el citoplasma y dos fuentes principales: la reserva interna del RE y la del medio extracelular. La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es usualmente activada por estímulos que incluyen la despolarización de la membrana, agonistas externos, la depleción de las reservas internas y mensajeros intracelulares y dicha permeabilidad está mediada por receptores específicos y canales de Ca^{2+} . Por su parte, la movilización de Ca^{2+} a partir de las reservas internas (RE) en respuesta a mensajeros intracelulares, es mediada por receptores del

Inositol tri-fosfato (IP3R) principalmente y de rianodina (RyR) (Hamilton, 2005; Mikoshiba and Hattori, 2000; Zeng et al., 2003)

Son varios los mecanismos responsables de secuestrar Ca^{2+} del citosol para mantener los niveles fisiológicos normales. Éstos pueden ser a través del transporte al medio extracelular o hacia el interior de diferentes compartimentos intracelulares y dependen de varios sistemas como por ejemplo la ATP – asa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), la ATP – asa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico/ sarcoplásmico (SERCA), la ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretoria (SPCA), el intercambiador Na/ Ca^{2+} (NCX) y el uniporte mitocondrial. Por otro lado, varios canales en la membrana plasmática como canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC), canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROC) y canales Ca^{2+} operados por reserva (SOC) son responsables de permitir la entrada de Ca^{2+} extracelular al citosol (Berridge et al., 2003; Putney and Ribeiro, 2000).

Datos obtenidos a partir del estudio con agentes virales indican que durante una infección por estos microorganismos, los componentes encargados de mantener los niveles fisiológicos de Ca^{2+} a menudo se convierten en el objetivo inmediato de ataque de las proteínas virales produciendo una actividad o activación aberrante de dichos componentes alterando los niveles intracelulares de dicho ión (Zhou et al., 2009)

1.4) LOS VIRUS Y SU RELACIÓN CON Ca^{2+}

Dado que los niveles de Ca^{2+} intracelular regulan diversos procesos celulares, no es sorprendente que patógenos virales, debido a su limitada capacidad genética, hayan desarrollado estrategias a través de la evolución para secuestrar la maquinaria celular e interrumpir las vías de

señalización y otros procesos dependientes de $[Ca^{2+}]$ con la finalidad optimizar los mecanismos requeridos para facilitar la entrada viral, la replicación y su diseminación.

De lo anterior surge la siguiente pregunta. ¿Cómo es que los niveles alterados de Ca^{2+} participan el ciclo replicativo de los virus? Primero, niveles incrementados de Ca^{2+} citosólico por la activación contraproducente de canales de la membrana plasmática pueden activar o acelerar un número de procesos enzimáticos dependientes de Ca^{2+} , así como factores de transcripción sensibles a Ca^{2+} (p.ej. NFAT) para promover la replicación viral o establecer una infección persistente, como se observa durante una infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana – 1 (VIH – 1), el Virus Linfotrópico – T Humano – 1 (HTLV-1), Virus de la Hepatitis C (VHC) y el Epstein – Barr (EBV) (Albrecht et al., 2002; Bergqvist and Rice, 2001; Bergqvist et al., 2003; Ding et al., 2002; Kinoshita et al., 1997). También se ha descrito que algunos virus como rotavirus, incrementan la permeabilidad de la membrana plasmática y se especula que este fenómeno se activa para mantener los niveles de Ca^{2+} de la reserva de RE, los cuales son requeridos para la maduración y estabilidad del virión (Perez et al., 1999). Por otro lado, la liberación de Ca^{2+} de las reservas del RE y el incremento en la admisión de este ión por parte de la mitocondria, impulsa la producción de ATP para satisfacer las demandas energéticas requeridas en la continua replicación viral, como en el caso de una infección por VHC y CMV (Citomegalovirus) (Li et al., 2007; Sharon-Friling et al., 2006). Segundo, una disminución de las $[Ca^{2+}]_{ER}$ y $[Ca^{2+}]_{GOLGI}$ puede inhibir el tráfico de proteínas y así alterar o interrumpir la respuesta inmune antiviral. Adicionalmente, se ha demostrado que la acumulación intracelular de vesículas secretoras derivadas de ER o del Golgi (donde tiene lugar la replicación del genoma de virus de ARN), crea un ambiente que favorece la replicación viral, como en el caso de Enterovirus (Doedens and Kirkegaard, 1995; van Kuppeveld et al., 2005). Finalmente, la modulación del Ca^{2+}

en el ER y en las mitocondrias puede evitar o inducir la apoptosis dependiendo del tipo de virus y de los estados de su ciclo de vida (Pinton et al., 2000; Pinton et al., 2001).

La **Figura 3** tomada de Zhou et al., (2009) resume las alteraciones a las que es sometida la maquinaria celular encargada de mantener los niveles fisiológicos de Ca^{2+} , durante la infección con agentes virales.

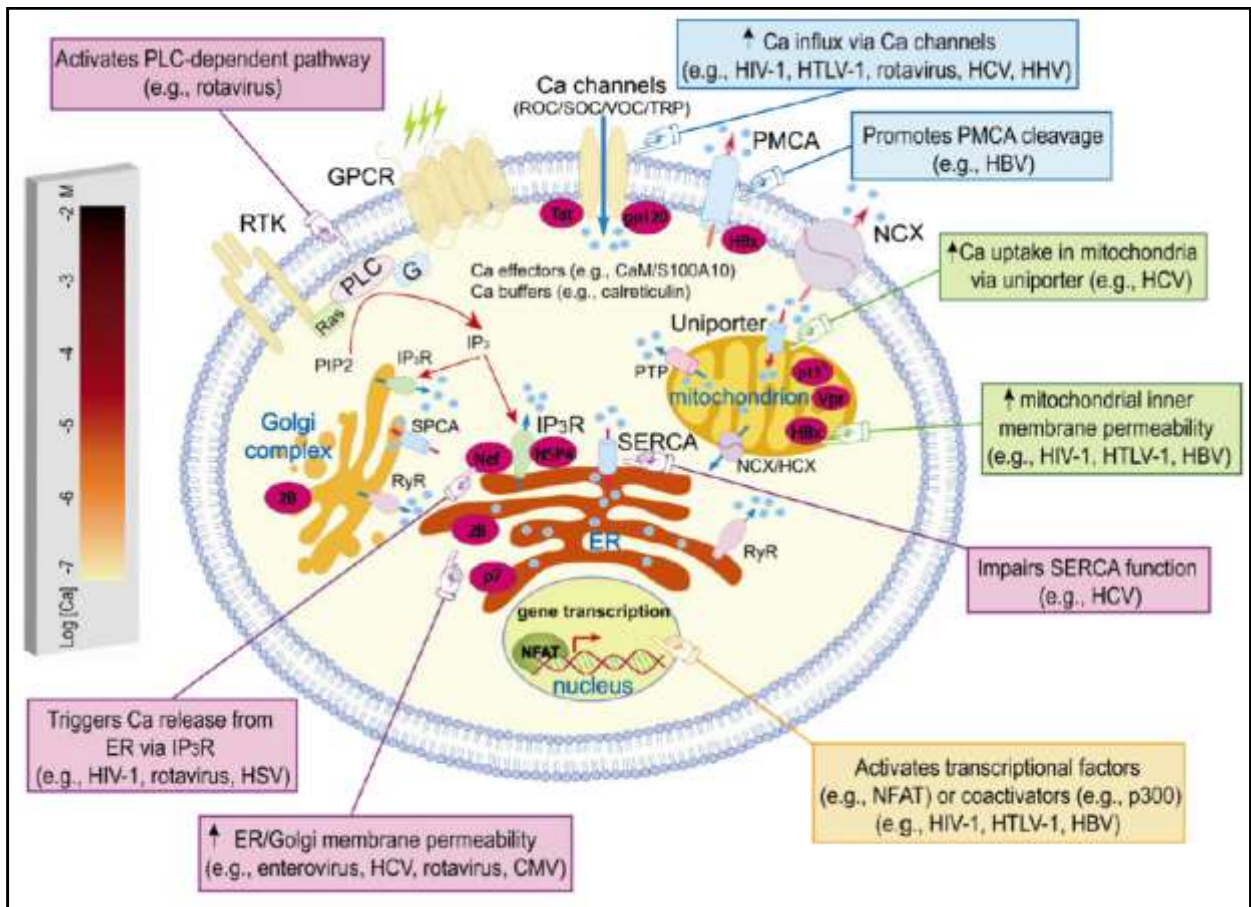


Figura 3.- Esquema de las vías de señalización de Ca^{2+} y ejemplos de alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} inducidas por varios agentes virales (Zhou et al., 2009).

Durante las infecciones virales, la apoptosis usualmente es disparada como un mecanismo de defensa innata para contrarrestar la infección por virus y controlar su reproducción. Algunos virus como Coxsackievirus (Campanella et al., 2004; van Kuppeveld et al., 1997) y CMV (Arnoult et al., 2004; Poncet et al., 2004) tienen como blanco importantes puntos de chequeo apoptóticos para evitar ser eliminados por el sistema inmune y promover su replicación. Caso contrario ocurre con otros virus, como VIH, VHB, VHC, los cuales aceleran o inducen la muerte celular apoptótica para facilitar su liberación y maximizar su diseminación (Benali-Furet et al., 2005; Chami et al., 2003; Kruman et al., 1998) (**Figura 4**).

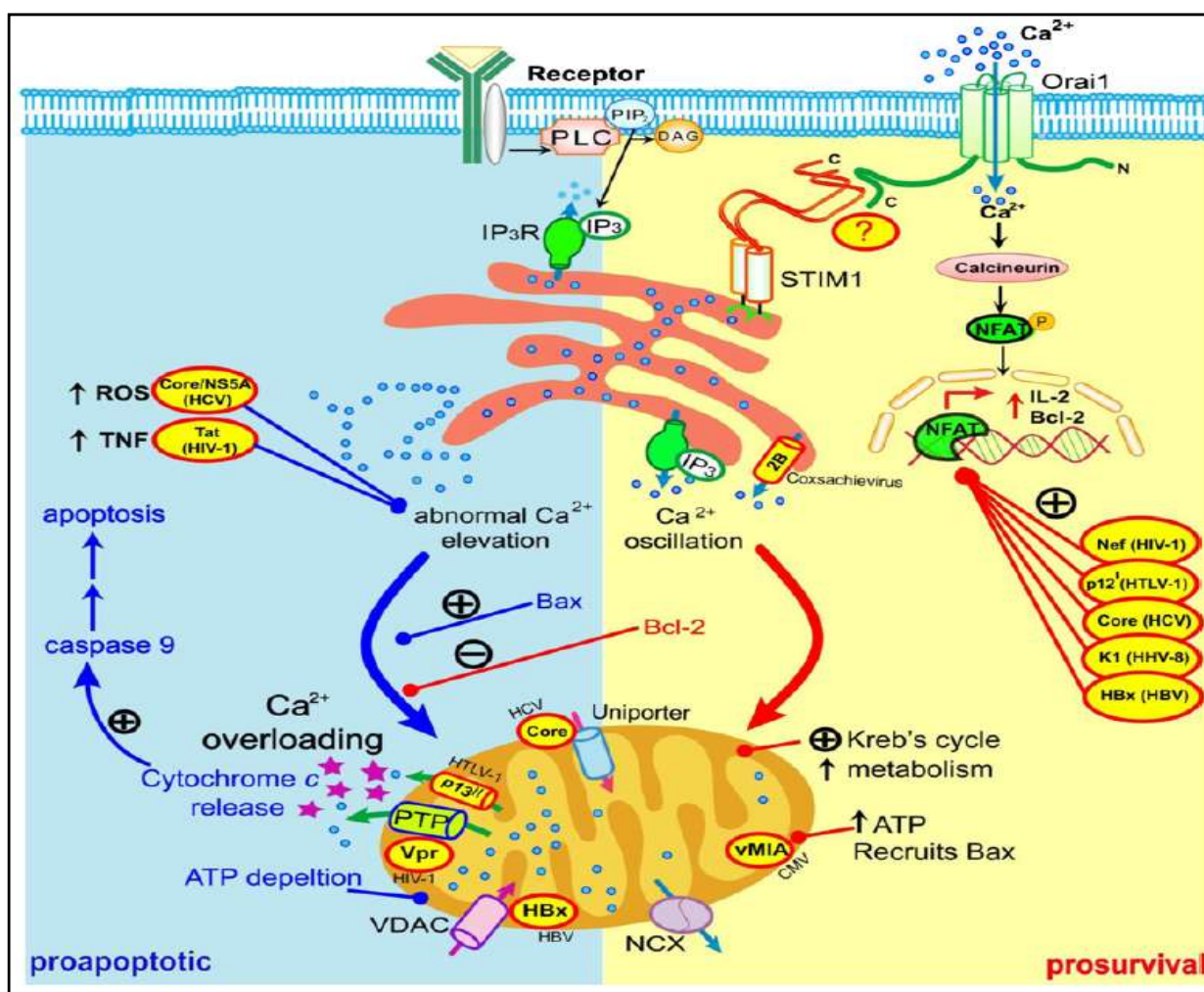


Figura 4.- La infección por virus selectivamente altera la señalización Ca^{2+} pro – apoptótica y de supervivencia vía ER – Mitocondria (Zhou et al., 2009).

A manera de resumen se puede decir que las interacciones entre el Ca^{2+} y los virus en las células infectadas se puede agrupar en 3 categorías principales: 1) proteínas virales que directa o indirectamente alteran la homeostasis de Ca^{2+} modificando la permeabilidad de la membrana y/o manipulando componentes claves de la señalización de Ca^{2+} ; 2) proteínas virales que se unen directamente a Ca^{2+} para mantener su integridad estructural o funcionalidad; y 3) interacciones virus – huésped que dependen de proteínas o vías reguladas por Ca^{2+} (Zhou et al., 2009).

1.5) GENERALIDADES DE LA VIA DE ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}

La membrana plasmática (MP) es una barrera semipermeable, que media el paso de una gran variedad de moléculas a través de ella. Cuando se presenta un estímulo extracelular, los niveles de Ca^{2+} en el citosol se incrementan por una entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática vía canales de Ca^{2+} . Entre ellos se encuentran los canales operados por voltaje (VOC), los operados por receptor (ROC), los canales de potencial de receptor transitorio (TRP) y los canales operados por reserva (SOC) (Berridge et al., 2003). Durante una infección por patógenos virales, éstos componentes de señalización de Ca^{2+} en la MP, se someten a activaciones contraproducentes para la fisiología de las células blanco que a su vez favorecen la infección por parte de éstos microorganismos.

En cuanto a los canales SOCs, se sabe que participan en la vía denominada entrada capacitativa. La depleción de Ca^{2+} de las reservas en el ER a menudo dispara la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática para la reposición de las reservas. Esta vía de permeabilización de Ca^{2+} es conocida como entrada de Ca^{2+} operada por reserva (SOCE) o entrada capacitativa, y se caracteriza por una corriente de Ca^{2+} a través del canal SOC, Orai1, activada por la liberación de Ca^{2+} del RE (Venkatachalam et al., 2002). La proteína STIM1,

ubicada en la membrana del RE, controla el SOCE censando las $[Ca^{2+}]_{RE}$, (Liou et al., 2005) y se transloca a la membrana plasmática donde activa al canal Orai1 (Lewis, 2007; Prakriya et al., 2006) (Figura 4).

Con respecto a la capacidad que tienen los virus de alterar la maquinaria de la MP y por tanto la señalización de Ca^{2+} , existe evidencia de que proteínas virales como la LMP-1 de Epstein Barr, tienen la capacidad de incrementar la permeabilidad de la membrana plasmática de linfocitos B, como lo sugirió un incremento del influjo de Ca^{2+} en células B que expresaron la proteína viral. Adicionalmente, Dellis y cols (2011) demostraron que la expresión de la proteína viral LMP-1 en células B, producía un incremento de la expresión de la proteína Orai1 pero no de la proteína Stim1, a los cuales se les conoce como los principales componentes del SOC. Además, argumentaron que este fenómeno era el responsable de producir una entrada más pronunciada de Ca^{2+} en los linfocitos B (Dellis et al., 2011).

Por otra parte, IP_3R y RyR han sido identificados como dos componentes centrales en el apagado y encendido de la liberación de Ca^{2+} a partir de las reservas (Mikoshiba and Hattori, 2000). La unión de agonistas a los receptores celulares de superficie activa $PLC\gamma$ para la producción de IP_3 , el cual se une y activa a IP_3R , disparando la liberación de Ca^{2+} de ER (Bootman and Lipp, 1999). La reposición de Ca^{2+} de las reservas es realizada por el influjo de Ca^{2+} a través de SOCE y el bombeado del Ca^{2+} hacia el interior del ER vía la bomba SERCA. A la fecha se ha reportado que algunos virus con genoma de ARN como VHC, manipulan la movilización de Ca^{2+} mediada por IP_3R o alteran la actividad de la bomba SERCA (Benali-Furet et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, el VHC, un miembro de la familia *Flaviviridae*, tiene la capacidad de alterar los niveles de Ca^{2+} en sus células blanco, creando un ambiente favorable para un eficiente ciclo replicativo (Benali-Furet et al., 2005; Bergqvist et al., 2003; Zhou et al., 2009). Sin embargo, existe evidencia de que más miembros de esta familia, tienen el potencial de inducir cambios en los niveles de Ca^{2+} en las células infectadas, repercutiendo en una eficiente producción de partículas virales. Un estudio reciente realizado por Scherbik & Brinton (2010) demuestra que durante la infección con el virus del Oeste del Nilo (WNV, por sus siglas en inglés), otro miembro del género *Flavivirus* transmitido por artrópodos, se genera un incremento rápido y sostenido del influjo de Ca^{2+} . Por otro lado, datos obtenidos mediante el uso de bloqueadores de canales de Ca^{2+} sugieren que la entrada del WNV dispara la apertura de uno o más canales de Ca^{2+} sobre la superficie celular permitiendo el influjo de Ca^{2+} requerido para un eficiente replicación viral (Scherbik and Brinton, 2010). No obstante se desconoce si tales efectos también ocurren durante la infección con otros flavivirus, incluyendo DENV.

2) JUSTIFICACIÓN.

La importancia de las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} durante el ciclo replicativo de varios agentes virales, incluidos algunos flavivirus, ha sido bien documentada. Sin embargo, no existen reportes acerca de la relación entre el Ca^{2+} y la infección por DENV. Por lo tanto, el presente estudio busca explorar por primera vez las posibles alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} en células infectadas y su participación en el ciclo replicativo de DENV. La eficiente infección y replicación del DENV en líneas celulares humanas hepáticas como Huh7 y HepG2 ha sido bien documentada (Lin et al., 2000; Puerta-Guardo et al., 2012; Soto-Acosta et al., 2013; Suksanpaisan et al., 2009) y aunque el dengue es una infección sistémica, el hígado es uno de los principales órganos de replicación viral. Por lo tanto, consideramos que el estudio de la relación Ca^{2+} y DENV durante la replicación viral, arrojará conocimientos importantes para entender mejor la relación virus – célula y la biología de este importante patógeno viral.

3) HIPÓTESIS

Dado que el Ca^{2+} juega un papel importante en un gran número de procesos celulares como segundo mensajero y que existen evidencias con otros sistemas virales, incluyendo otros *Flavivirus*, de que una infección viral puede manipular la maquinaria celular responsable de mantener los niveles fisiológicos de Ca^{2+} , alterando la homeostasis de dicho catión con la finalidad de llevar a cabo una eficiente replicación viral, es nuestra hipótesis que la infección con DENV induce cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular que favorecen la replicación viral.

4) OBJETIVOS

4.1) Objetivo General: Determinar cambios en la homeostasis de Ca^{2+} durante la infección por DENV y evaluar su importancia en el ciclo replicativo.

4.2) Objetivos Particulares:

- a) Determinar cambios en la homeóstasis de Ca^{2+} en células hepáticas infectadas con DENV4.

- b) Evaluar los mecanismos involucrados en alterar la homeostasis de Ca^{2+} .

- c) Evaluar la importancia de las alteraciones en $[\text{Ca}^{2+}]$ para la replicación del DENV.

5) MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1) Cultivos celulares y cepa viral. Las líneas celulares, Huh7 y HepG2 (líneas celulares hepáticas, así como las células Vero (células de riñón de mono Rhesus) se cultivaron con medio esencial, DMEM Advance y MEM Advance (Gibco), respectivamente, suplementado con 7% de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM glutamina, penicilina (5×10^4 U/ml) - estreptomicina (50 μ g/ml) (InVitro S.A., México) y 5% de CO₂. La propagación del DENV serotipo 4 (cepa H241) fue realizada en cerebros de ratones CD1 lactantes (Gould and Clegg, 1991) y el título de los extractos virales fue determinado por ensayo de focos en células Vero. El cerebro mock infectado de ratones lactantes fue usado como control.

5.2) Inmunofluorescencia. El número de células hepáticas infectadas fue determinado por microscopía usando inmunofluorescencia (IF). Las células hepáticas se crecieron en placas de 96 pozos y se infectaron con DENV4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. A las 24 horas post infección (hpi), las células fueron fijadas con metanol frío (- 20°C) y la proteína E viral se detectó por IF indirecta usando el anticuerpo anti – ratón IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies; cat: A11001) y DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) para contrastar los núcleos. El promedio de células positivas a la señal de fluorescencia contadas en 3 campos usando el objetivo 10X de un microscopio de la marca Nikon, se expresó como porcentaje (%).

5.3) Ensayo de focos. Células Vero fueron cultivadas y crecidas en placas de 96 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY) hasta alcanzar confluencia. La monocapa celular fue infectada con diluciones seriadas en base 10 de virus y la adsorción viral se permitió durante 1 hora a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Posteriormente, se removió el virus que no ingresó a la célula mediante lavados con medio DMEM, se adicionó medio de mantenimiento suplementado con SFB y se

dejó correr la infección durante 24 horas. Al término de ese tiempo, el medio de cultivo fue removido y las células se fijaron con 50 μ l/pozo de metanol frío (-20°C) por 20 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con PBS (Sigma, cat: P4417) y se prosiguió a la inmunodetección indirecta de la proteína viral E mediante el anticuerpo monoclonal 4G2, anti-DENV E y el anticuerpo anti – ratón IgG conjugado a peroxidasa (Jackson Immuno Research, cat: 115 – 035 - 003). Ambos anticuerpos fueron diluidos en PBS – FBS 1% e incubados con la monocapa durante 1.5 horas a 37°C. El exceso de anticuerpos no unidos, se removió mediante 5 lavados con PBS. La Diaminobenzidina (DAB, Thermofisher Scientific, cat 34065) se utilizó como sustrato cromogénico y se monitoreo el desarrollo del color a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante un lavado con 100 μ l/pozo de PBS y el número de células infectadas por virus se determinó por microscopía de campo claro. El número de células infectadas se reportó como porcentaje (%) de producción viral.

5.4) Mediciones de calcio intracelular en células en suspensión y células independientes. Los cambios en la homeostasis de Ca^{2+} fueron medidos con el colorante radiométrico sensible a Ca^{2+} , fura 2 – AM y con la ayuda de un espectrofluorímetro. Se cultivaron células HepG2 en frascos de 25 mm, T25. La monocapa confluyente se infectó con DENV4 a una MOI de 3 durante 1 hora a 37°C en 5% de CO_2 y las células control se incubaron en paralelo con extracto de cerebro de ratón libre de virus (células “mock” infectadas). Una vez retirado el inóculo las células fueron suplementadas con medio DMEM y la infección se dejó proseguir por 6, 12 y 18 horas post – infección (h.p.i.) a cuyo tiempo las células fueron cosechadas para proceder a las mediciones de Ca^{2+} . Al momento de la medición, las células se lavaron con PBS, se despegaron con tripsina – EDTA y aproximadamente 3.7×10^6 células/ml se cargaron con fura 2 –AM a 4 μ M concentración final, durante 1 hora a 37°C suspendidas en un buffer que contiene NaCl 130 mM; KCl 5mM; 1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20mM HEPES (pH 7.4); y 0.1% albumina. Las células se lavaron por

centrifugación utilizando el mismo *buffer* de carga. Para determinar las $[Ca^{2+}]_i$, alícuotas de la suspensión celular fueron resuspendidas en el buffer en un volumen final de 2 ml. La señal del fura 2 – AM fue medida en un espectrofluorímetro (Photon Technology International) equipado con un agitador y fue calibrada empleando excitaciones con 2 longitudes de onda: λ_{exc} 340 nm que nos reporta los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ como un aumento en la fluorescencia a esta longitud de onda y λ_{exc} 380 nm que nos indica la elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ como una disminución en la fluorescencia a esta longitud de onda y la fluorescencia emitida se obtuvo a 510 nm. Los datos de fluorescencia se calibran obteniendo una fluorescencia máxima (F_{max}) y una fluorescencia mínima (F_{min}). La F_{max} se obtiene añadiendo digitonina a 80 μ g/ml a las células y lograr así que el fura 2 – AM intracelular se sature totalmente con el calcio del medio externo. La fluorescencia mínima (F_{min}) se obtiene añadiendo 80 mM de EGTA para reducir los niveles de Ca^{2+} intracelular, y lograr así que el colorante se encuentra ahora en un estado libre de Ca^{2+} . Para calcular $[Ca^{2+}]_i$ se utilizó la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985)

$$[Ca^{2+}]_i \text{ nM} = Kd * (R - R_{min}/R_{max} - R)$$

En donde:

Kd = constante de disociación aparente del fura 2 – AM (224nM)

$$F = F_{\lambda_{exc} 340m} / F_{\lambda_{exc} 380m}$$

$$F_{min} (EGTA) = F_{min\lambda_{exc} 340 \text{ nm}} / (F_{min\lambda_{exc} 380 \text{ nm}}$$

$$F_{max} (digitonina) = F_{max\lambda_{exc} 340 \text{ nm}} / (F_{max\lambda_{exc} 380 \text{ nm}}$$

Para las mediciones de Ca^{2+} en células independientes, se cultivaron células Huh7 en cubreobjetos sobre placas Petri de 35 mm. La monocapa confluyente se mock infectó o se infectó

con DENV4 a una MOI de 3 durante 1 hora a 37°C en 5% de CO₂. Una vez retirado el inóculo las células fueron suplementadas con medio DMEM y la infección se dejó proseguir 12 y 18 hpi a cuyo tiempo la monocapa fue incubada con 5 μM de fluo4 – AM, concentración final, durante 1 hora a 37°C en 5% de CO₂. La señal de fluorescencia se obtuvo con la ayuda de un microscopio de fluorescencia equipado con un sistema de perfusión computarizado. Las células se perfundieron con buffer que contenía 145 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 11mM glucosa, 20 mM HEPES (pH 7.4) y con estímulos de 5 mM Ca²⁺ y 250 μM ATP. Las células cargadas con fluo 4 fueron excitadas a 494 nM y la señal fue recolectada a 506 nM. Los datos de la intensidad de fluorescencia del fluo4 fueron normalizados y los cambios expresados como: $(F - F_0)/F_0 = (F_{494} - F_{494_{\text{basal}}})/ (F_{494_{\text{basal}}})$, donde: F_{494_{basal}} es la señal de fluorescencia basal emitida por células no estimuladas. Se seleccionaron más de 25 células infectadas al azar para medir la fluorescencia.

5.5) Ensayo de viabilidad celular para tratamientos con drogas que alteran los niveles de Ca²⁺. Los ensayos de viabilidad para las distintas drogas y o tratamientos se realizaron con el *kit* CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Para ello, se evaluaron varias concentraciones de las diferentes drogas y de CaCl₂ (BAPTA – AM, 50μM, 25 μM, 10 μM y 5 μM; EGTA, 2mM, 1mM, 0.5 mM y 0.1mM; 2 – APB, 200 μM, 100 μM, 50 μM y 25μM; CaCl₂, 2mM, 1mM, 0.5mM y 0.1 mM) sobre los cultivos de células hepáticas durante 24 has. Transcurrido este tiempo se determinó la viabilidad celular con base en la bio-reducción de la sal [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) hacia formazán, un compuesto coloreado que es soluble en el medio de cultivo en células metabólicamente activas.

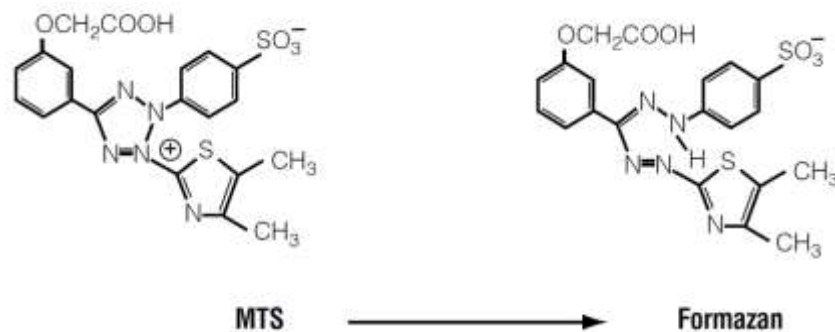


Figura 5.- Estructura del MTS y su producto, el azul de formazan.

A células cultivadas en una placa de 96 pozos se les retiró el medio de cultivo en el cual fueron crecidas y se adicionaron 5 μ l de la solución CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent dentro de cada pozo que a su vez contenía 50 μ l del medio de cultivo. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. La lectura de la absorbancia se determinó a 490 nm, en el lector de placas de 96 pozos Biotec (Elx808 Absorbance Microplate Reader) y la absorbancia registrada es proporcional al número de células viables. Los resultados se expresaron en % tomando como 100% de viabilidad células tratadas únicamente con DMEM y DMSO (0,25% concentración final), usado como vehículo para la dilución de los diferentes compuestos.

5.6) Alteraciones de los niveles de Ca²⁺ y su efecto en la replicación viral. Monocapas confluentes de células HepG2 y Huh7 cultivadas en placas de 24 pozos se infectaron con DENV4 a una MOI de 3, posterior a la infección se manipularon las concentraciones de Ca²⁺ intra – y extracelular empleando quelantes de Ca²⁺ a una concentración que no alterara la viabilidad de las células; es decir, BAPTA – AM, 25 μ M en HepG2 y 10 μ M en Huh7; EGTA al 2mM para ambas líneas celulares, 2 – APB, 100 μ M en HepG2 y 50 μ M en Huh7 y un exceso de Ca²⁺ extracelular mediante el empleo de CaCl₂, 5 mM en HepG2 y 2mM en Huh7. Los fármacos se diluyeron a las concentraciones deseadas DMEM suplementado con 7% de SFB y se dejó transcurrir la infección

durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se evaluó la infección determinando la cantidad de partículas virales infecciosas mediante ensayo de focos en células Vero y mediante ensayo de plaqueo en células BHK según el protocolo estándar del laboratorio (Mosso et al., 2008).

5.7) Determinación del antígeno viral NS1 en lisados celulares y sobrenadantes. La prueba se realizó empleando el estuche comercial Platelia^{MT} Dengue NS1 Ag (BIORAD), que consiste en un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich, en formato de microplaca, para la detección cualitativa o semicuantitativa del Ag NS1 del virus dengue en suero humano o en sobrenadantes de cultivos celulares (Ludert et al., 2008). La prueba utiliza anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) para la captura y el revelado. En presencia del antígeno NS1 de la muestra, se forma un complejo inmune AcM – NS1 – AcM/ peroxidasa, que es revelado mediante el empleo de una solución sustrato que desarrolla una reacción coloreada. La determinación de NS1 se determinó en base a las recomendaciones del fabricante y la absorbancia se registró a 459 nm en un lector de placas de 96 pozos. Los resultados se expresaron en % tomando como 100% de NS1, la proteína de lisados celulares o sobrenadantes de células infectadas y tratadas con DMSO (0,25% concentración final), usado como vehículo para la dilución de los diferentes compuestos

5.8) Ensayo de *Western blot*. *Cultivos confluentes de células HepG2 y Huh7 en placas Petri de 60 mm de diámetro, fueron infectadas o no con DENV4 a MOI 3, se cosecharon a diferentes tiempos post – infección (6,12 y 18 h.p.i), removiéndoles el medio de cultivo celular, se lavaron 2 veces con PBS y finalmente se lisaron empleando 100 µl de buffer de lisis (Tris HCl 50 mM a pH8; NaCl 300 mM; Glicerol 10% y Tritón x-100) adicionado con 5 µl un cóctel de inhibidores de proteasas 25X (EDTA 2 mM, fluoruro de fenil metil sulfonilo 0.5 mM, benzonidina 2 mM, aprotinina 5µg/ml, pepstatina, 5µg/ml leupeptina y 5µg/ml quimostatina) (MiniComplete,*

Roche). Los extractos de proteínas se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS – PAGE) al 10% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm , mediante una cámara de transferencia húmeda a 120 voltios durante 90 minutos. La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 10% en PBS con 1.5% de Tween 20. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para la detección de Orai1 (1:5,000; Ab policlonal producido en conejo), Stim1 (1:10,000; Ab monoclonal producido en ratón) en una solución de PBS – Tween20 1.5%, toda la noche a 4°C. En todos los casos se emplearon anticuerpos secundarios específicos contra los anticuerpos primarios acoplados a peroxidasa, los cuales fueron incubados con las membranas por 90 minutos a temperatura ambiente en PBS – Tween 20 al 1.5%. Para revelar la reacción del ensayo, se utilizó el *kit* West – Femto (Pierce). Las bandas obtenidas por radiografía fueron escaneadas y analizadas densitométricamente utilizando el programa ImageJ 1.45.

5.9) Inmunofluorescencias para evaluar Stim1 y Orai1. Células hepáticas crecidas sobre portaobjetos en placas de 24 pozos fueron infectadas o no con DENV4 por 12 y 18 horas, fijadas con 4% paraformaldehído (PFA) por 15 minutos, bloqueadas con búfer de bloqueo (PBS, 10% SFB, 3% BSA and 10mM glicina) y marcadas con anti – Stim1 (Santa Cruz; cat:166840) y con anti – Orai1 (Santa Cruz; cat: 68895) seguido del marcaje con anti – ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies; cat: A11001) o con anti – conejo conjugado con Alexa Fluor 647 (Life Technologies; cat: A21245). Los núcleos fueron contrastados con DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (SIGMA; cat: D9542). Células no infectadas y tratadas con tapsigargina 5 μM (SIGMA; cat: T9033) por 5 minutos se usaron como control positivo. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss, equipado con una lente de inmersión 40x. Las imágenes se analizaron con el programa ZEN 2.3.

5.10) Análisis estadístico.- Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 6.0. La significancia estadística de las diferencias de los niveles de Ca^{2+} entre las células mock infectadas e infectadas fue determinada usando la prueba de *t – student* con la corrección de Welch. La misma prueba se utilizó para el análisis de los niveles de proteínas Stim1 y Orai1. La prueba de una vía ANOVA seguida de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples fue usada para analizar la significancia de la producción viral entre los diferentes tratamientos de las células infectadas y el grupo control.

6) RESULTADOS.

6.1) DENV4 altera la homeostasis de Ca^{2+} en células hepáticas. Aunque el dengue es una enfermedad sistémica que causa daño en varios órganos, el hígado es uno de los más afectados y es un sitio de replicación viral intensa. (Povoa et al., 2014; Samanta and Sharma, 2015) . Dado que no existe un modelo animal para el estudio de los aspectos moleculares de la patogénesis de la enfermedad, la infección con agentes virales es estudiada *in vitro* sobre cultivos celulares. Por lo tanto, en este estudio se utilizaron dos líneas celulares hepáticas. La infección de las células HepG2 y Huh7 a una MOI de 3 resultó en más del 50% y aproximadamente el 30% de las células infectadas a las 24 hpi, respectivamente, cómo se pudo observar por inmufluorescencia (**Figura 6**).

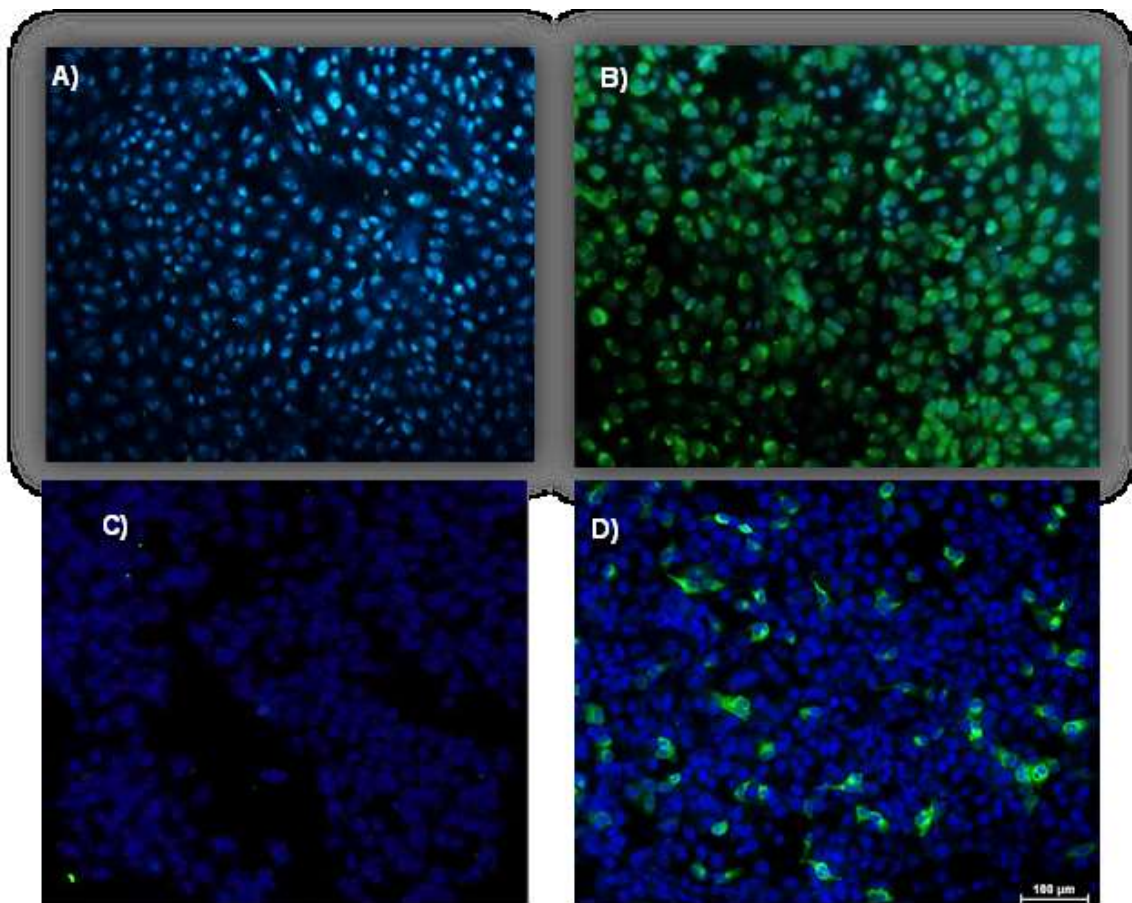


Figura 6.- Niveles de infección del DENV4 en células hepáticas. Monocapas de células HepG2 y Huh7 se infectaron con DENV4 a una MOI de 3, a las 24 hpi, se marcaron por inmunofluorescencia indirecta contra la proteína viral E y se obtuvo el promedio de las células positivas al marcaje en 3 campos. A y B corresponden a células HepG2 mock e infectadas, respectivamente. C y D corresponden a las células Huh7 no infectadas (mock) e infectadas, respectivamente. Los núcleos se marcaron con DAPI.

Diversos estudios han determinado que la homeostasis de las $[Ca^{2+}]_{\text{citosólicas}}$ es un parámetro crucial en la señalización intracelular que se encuentra alterado en las infecciones virales. Con el fin de explorar el mismo fenómeno en nuestro sistema de estudio, determinamos las $[Ca^{2+}]$ basal a las 6, 12 y 18 horas de cosecha en células infectadas y células no infectadas (“mock” infectadas) utilizadas como control, cargadas con el indicador de Ca^{2+} fura 2 – AM, el cual tiene la capacidad de unirse sólo al Ca^{2+} libre en el citosol. Las $[Ca^{2+}]_{\text{nM}}$ se obtuvieron a partir de los registros de la fluorescencia y empleando la ecuación de Grynkiewicz. La $[Ca^{2+}]$

basal se atribuye a la fluorescencia registrada durante los primeros segundos y antes de agregar algún estímulo, una vez iniciada la lectura.

La **Figura 7A** representa un esquema de algunos de los parámetros evaluados. El $[Ca^{2+}]$ basal hace referencia solamente a las concentraciones fisiológicas libres en el citosol en células no estimuladas y se representa como el promedio de los datos iniciales de fluorescencia registrados. Los datos obtenidos sugieren que no hay diferencias significativas entre las $[Ca^{2+}]$ basal de las células HepG2 infectadas a las 6,12, 18 hpi y de las células control, **Figura 7B**.

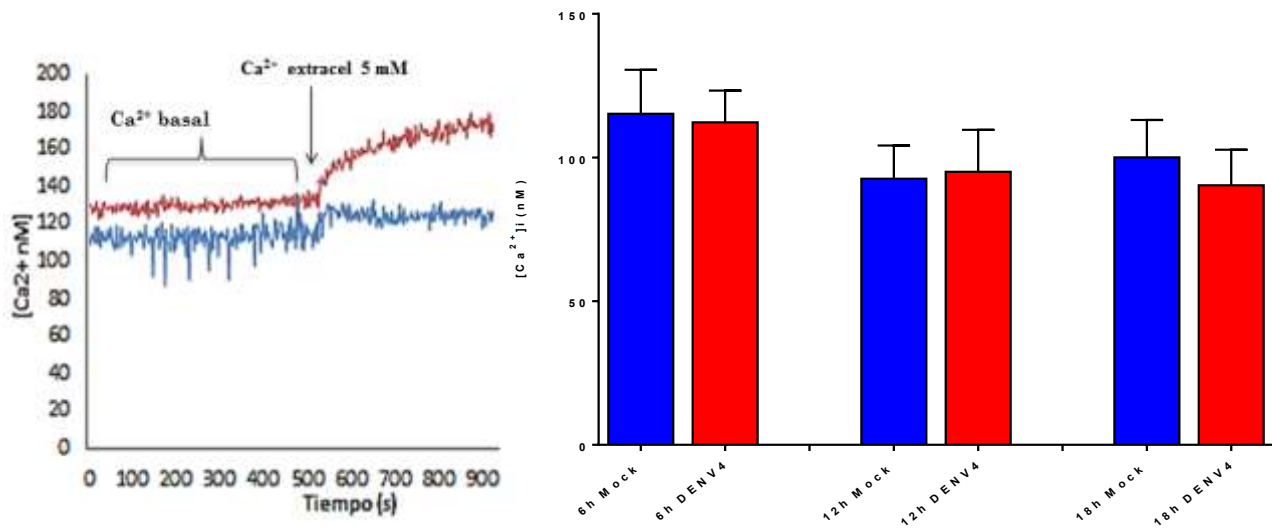


Figura 7.- Concentraciones de Ca^{2+} citosólicas, $[Ca^{2+}]$ basal. A) Células HepG2 mock infectadas o infectadas se cosecharon a diferentes tiempos post – infección (hpi), se cargaron con fura2 – AM y se determinaron los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos en suspensión, con la ayuda de un espectrofluorímetro equipado con un agitador. **B)** Los niveles de Ca^{2+} basal son representados como el promedio de los datos obtenidos durante los primeros segundos del registro y antes de agregar un estímulo. Las $[Ca^{2+}]$ fueron determinadas usando la ecuación de Grynkiewicz. Los valores de cada tiempo corresponden a $n \geq 6$ y las barras de error indican \pm desviación estándar.

Las $[Ca^{2+}]$ varían considerablemente dentro y fuera de la célula, desde los nM en el citoplasma y μ M en los diferentes organelos, hasta el rango de los mM en el medio extracelular. La célula cuenta con un sistema proteico complejo para mantener las $[Ca^{2+}]$ adecuadas en los diferentes compartimentos, controlando el gradiente a través de la membrana plasmática y de los

organelos (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007; Parekh and Putney, 2005) . Debido a que diversos agentes virales pueden modificar las $[Ca^{2+}]$ de los diferentes compartimentos celulares, evaluamos dos parámetros en nuestro sistema de infección: 1) el estado de permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática y 2) el estado de llenado de las reservas de Ca^{2+} sensibles a ATP, como el RE. Para determinar el primer parámetro, las células HepG2 cargadas con fura 2, mantenidas en suspensión y después de registrar la fluorescencia correspondiente al Ca^{2+} basal, se estimularon con un pulso de 5mM de Ca^{2+} ; los cambios en la intensidad de fluorescencia se tomaron como un indicador de la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática (**Figura 7A y 8A**). Debido a que no observamos cambios importantes en $[Ca^{2+}]$ basal, los datos obtenidos posteriormente se sometieron a una normalización con el mismo Ca^{2+} basal para reducir la variabilidad en los datos y observar los posibles cambios pequeños en los parámetros a evaluar. Para determinar la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática, obtuvimos las diferencias entre el promedio de los registros más altos después del pulso de Ca^{2+} y el promedio del Ca^{2+} basal en los diferentes tiempos. El análisis estadístico de las diferencias promedio sugiere que la infección por dengue produce un significativo incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática a las 6, 12, y 18 hpi (**Figura 8B**).

Con respecto al parámetro 2, comparamos los niveles de Ca^{2+} que se pueden liberar de la reserva del RE entre las células infectadas y las células control. Para esto, después de registrar los niveles de Ca^{2+} basal, las células se estimularon con un pulso de 250 μ M de ATP, el cual induce la liberación de Ca^{2+} del RE al activar la vía PLC/IP3/IP3R (Berridge et al., 2003; Berridge and Irvine, 1989).

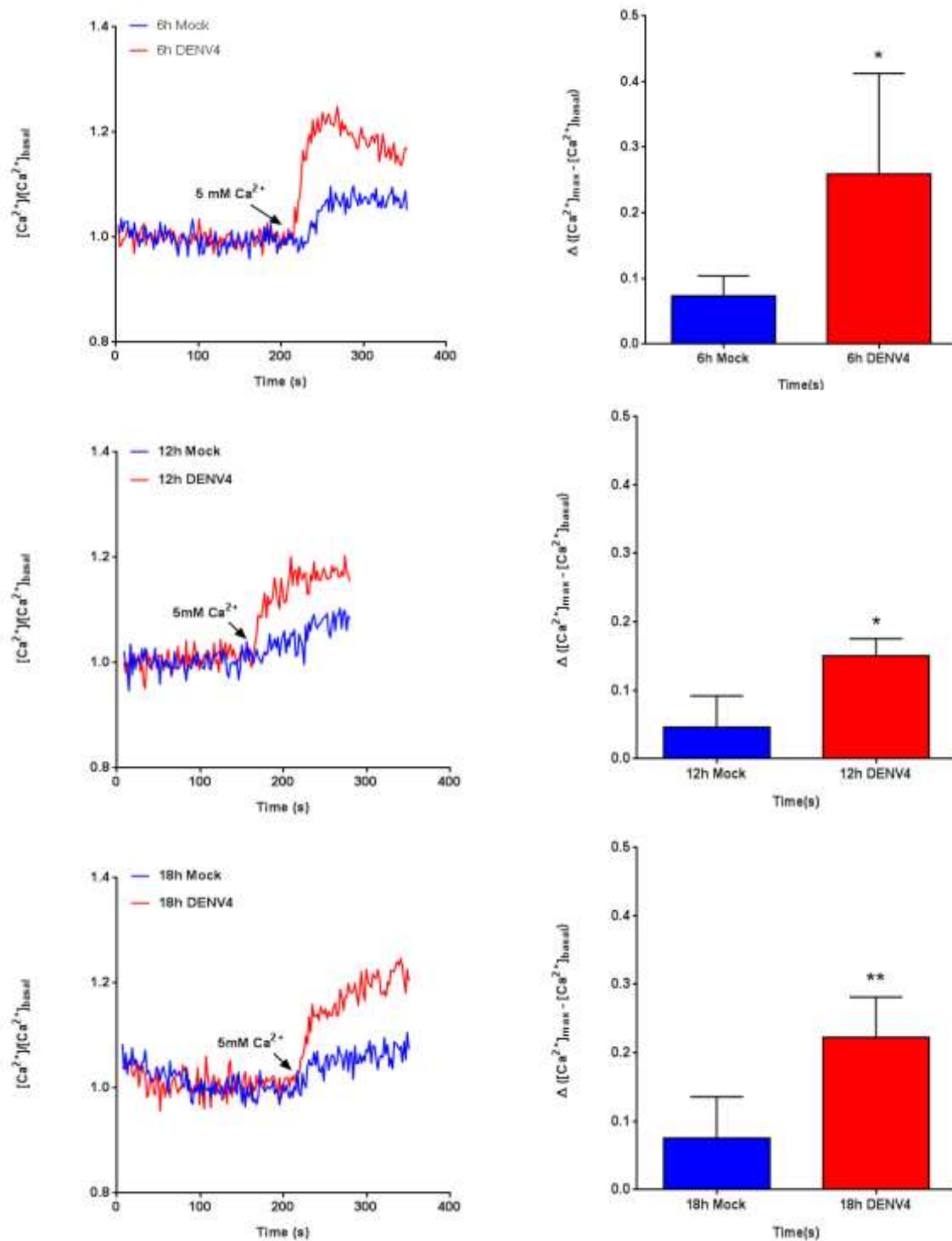


Figura 8.- Incremento de la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática en células HepG2 infectadas. Células no infectadas (mock) o infectadas se cosecharon a diferentes tiempos post- infección, se cargaron con fura2- AM y se determinó la intensidad de fluorescencia con la ayuda de un espectrofluorímetro equipado con un agitador y un monocromador que cambia la longitud de onda de 340 nm a 380 nm por medio de un sistema computarizado. A) Los datos se presentan normalizados al nivel del Ca^{2+} basal y los gráficos corresponden al promedio de $n \geq 4$ experimentos independientes; la flecha indica la adición del pulso de 5mM de Ca^{2+} . B) Los gráficos corresponden al promedio de las diferencias entre los niveles de $(Ca^{2+} \text{ max}) - (Ca^{2+} \text{ basal})$, donde $Ca^{2+} \text{ max}$ corresponde al nivel máximo alcanzado después del pulso de Ca^{2+} . Las barras indican \pm DE. (* $p < 0.05$).

Los cambios en la intensidad de fluorescencia que se producen después del estímulo con ATP, se atribuyen a la salida de Ca^{2+} del RE (**Figura 9A**). Para determinar la magnitud del Ca^{2+} liberado del RE, obtuvimos las diferencias entre el pico más alto del registro después del pulso de Ca^{2+} y el promedio del Ca^{2+} basal en los diferentes tiempos. Los datos obtenidos muestran una clara tendencia en la reducción de la cantidad de Ca^{2+} liberado del RE en células infectadas estimuladas con ATP a las 6,12 y 18 hpi, comparada con la cantidad de Ca^{2+} de las células control. A pesar de que la cantidad de Ca^{2+} liberado del RE en células infectadas fue significativamente menor a las 18 hpi con respecto a las células control (**figura 9B**), es importante mencionar que el análisis por separado de los datos de 4 experimentos independientes a las 12 hpi muestran una clara reducción de los niveles de Ca^{2+} que se liberan del RE en células infectadas con respecto a las células control (Tabla 1).

No. de experimento	6h Mock	6h DENV4	12h Mock	12h DENV4	18h Mock	18h DENV4
1	<i>1.864</i>	<i>0.2213</i>	<i>5.796</i>	<i>1.969</i>	<i>1.45</i>	<i>1.09</i>
2	<i>1.238</i>	<i>1.049</i>	<i>1.312</i>	<i>0.7279</i>	<i>2.023</i>	<i>1.294</i>
3	<i>1.846</i>	<i>1.187</i>	<i>0.9166</i>	<i>0.4109</i>	<i>1.949</i>	<i>0.7841</i>
4			<i>3.49</i>	<i>1.83</i>	1.336	1.361

Tabla 1. Niveles de Ca^{2+} liberados de RE por el estímulo de ATP en experimentos independientes. Las cifras en negritas e itálicas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$) entre la condición “mock” y la condición infectada.

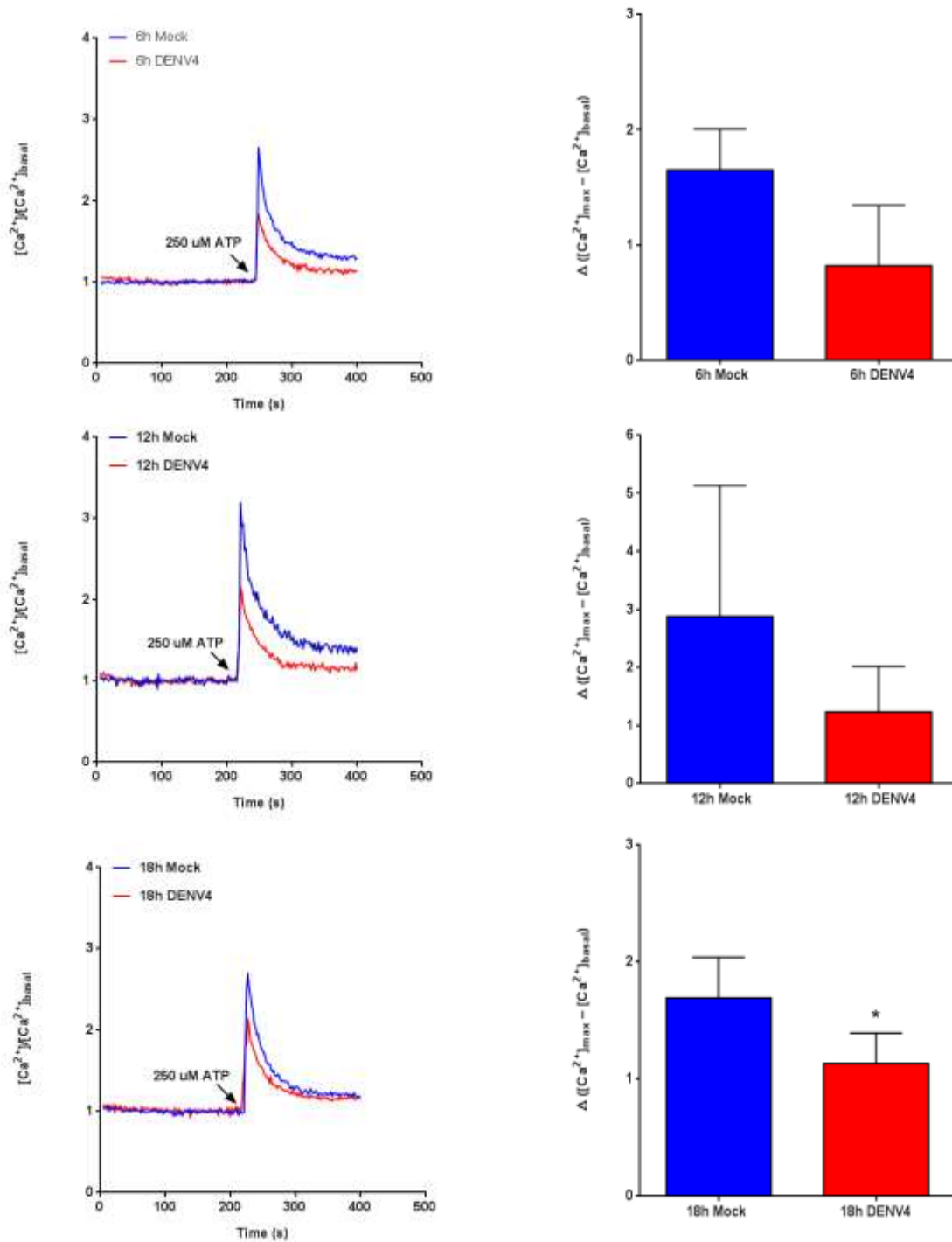


Figura 9.- Reducción de los niveles de Ca^{2+} que se liberan del RE en células HepG2 infectadas. Células mock infectadas o infectadas se cosecharon a diferentes tiempos post- infección, se cargaron con fura2- AM y se determinó la intensidad de fluorescencia con la ayuda de un espectrofluorímetro equipado con un agitador y un monocromador que cambia la longitud de onda de 340 nm a 380 nm por medio de un sistema computarizado. A) Los datos se presentan normalizados al nivel del Ca^{2+} basal y los gráficos corresponden al promedio de $n \geq 3$ experimentos independientes; la flecha indica la adición del pulso de 250 μ M de ATP. B) Los gráficos corresponden al promedio de las diferencias entre los niveles de $(Ca^{2+} max) - (Ca^{2+} basal)$, donde $Ca^{2+} max$ corresponde al nivel máximo alcanzado después del pulso de ATP. Las barras indican \pm DE. (* $p < 0.05$).

Para corroborar que las alteraciones de la homeóstasis de Ca^{2+} observadas en las células HepG2 pudieran ser reproducidas en otra línea celular hepática, realizamos experimentos en células Huh7 bajo las mismas condiciones de infección. Cabe mencionar que debido a problemas técnicos, es decir, al cosechar las células con tripsina – EDTA, éstas se deterioraban, provocando una respuesta casi nula a los diferentes estímulos. Para corregir esos problemas, las mediciones de Ca^{2+} en células Huh7 se realizaron *in situ*, mantenidas en monocapa sobre el plato de cultivo. Las lecturas de las intensidades de fluorescencia de las células cargadas con fluo4 – AM se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia. Las células Huh7 infectadas con DENV4 por 12 y 18h también mostraron un ligero incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática y una reducción significativa en la cantidad de Ca^{2+} que se libera de la reserva del RE sensible a ATP (**Figura 10 A y B**). Tomando en conjunto estos resultados sugieren que la infección por DENV induce considerables flujos de Ca^{2+} que alteran su homeóstasis en las líneas celulares hepáticas.

6.2) El incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} relacionada a la activación de la vía SOCE en las células infectadas. Existen reportes que sugieren que algunas proteínas virales como la gp120 de HIV-H tienen como blanco la activación de canales de Ca^{2+} en membrana plasmática (Holden et al., 1999; Zhou et al., 2009), otros estudios sugieren que durante la infección por el virus Epstein – Barr, la proteína viral LMP – 1 incrementa el influjo de Ca^{2+} extracelular debido a un incremento en la producción de uno de los componentes de la vía SOCE, Orai1 (Dellis et al., 2011)

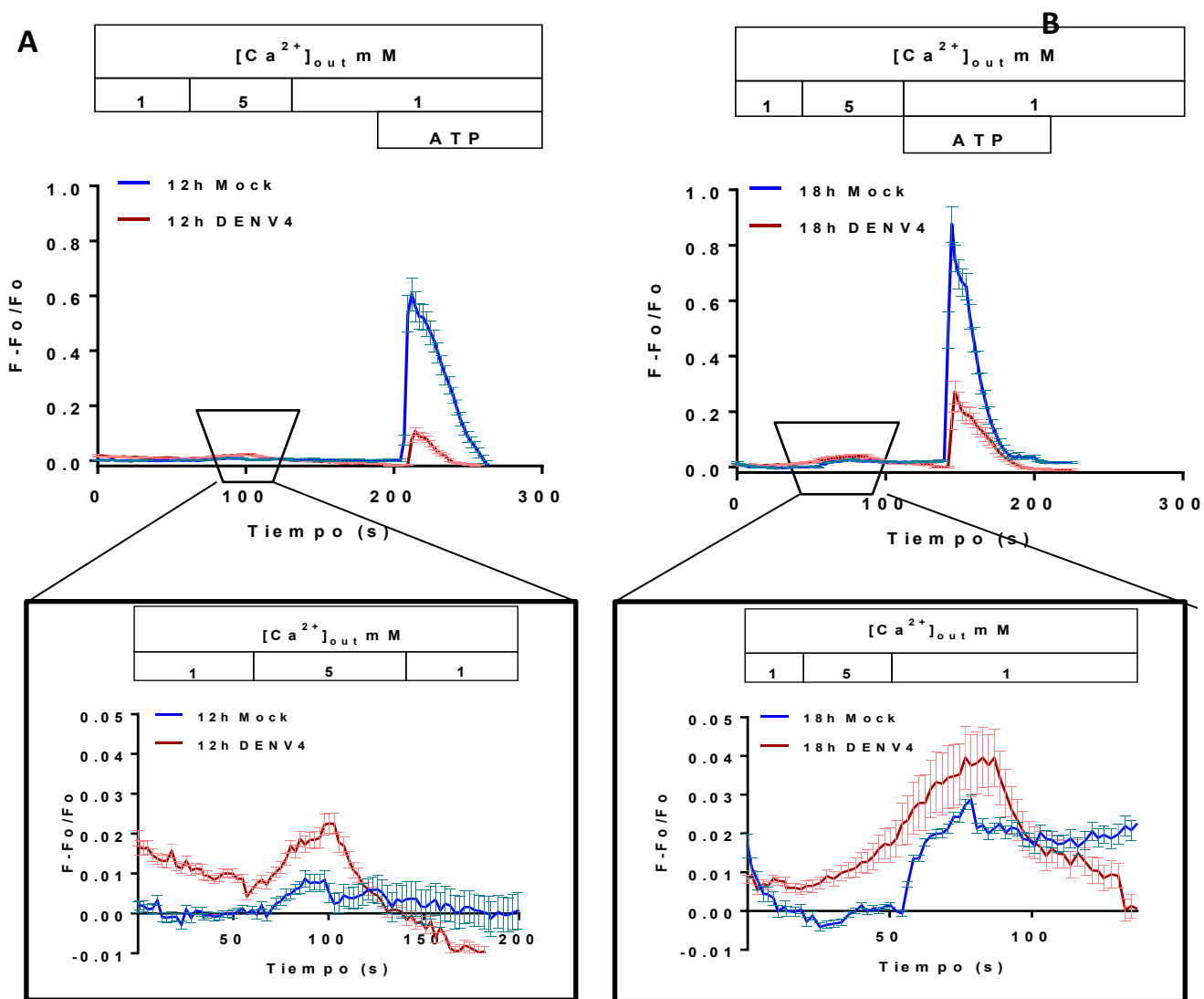
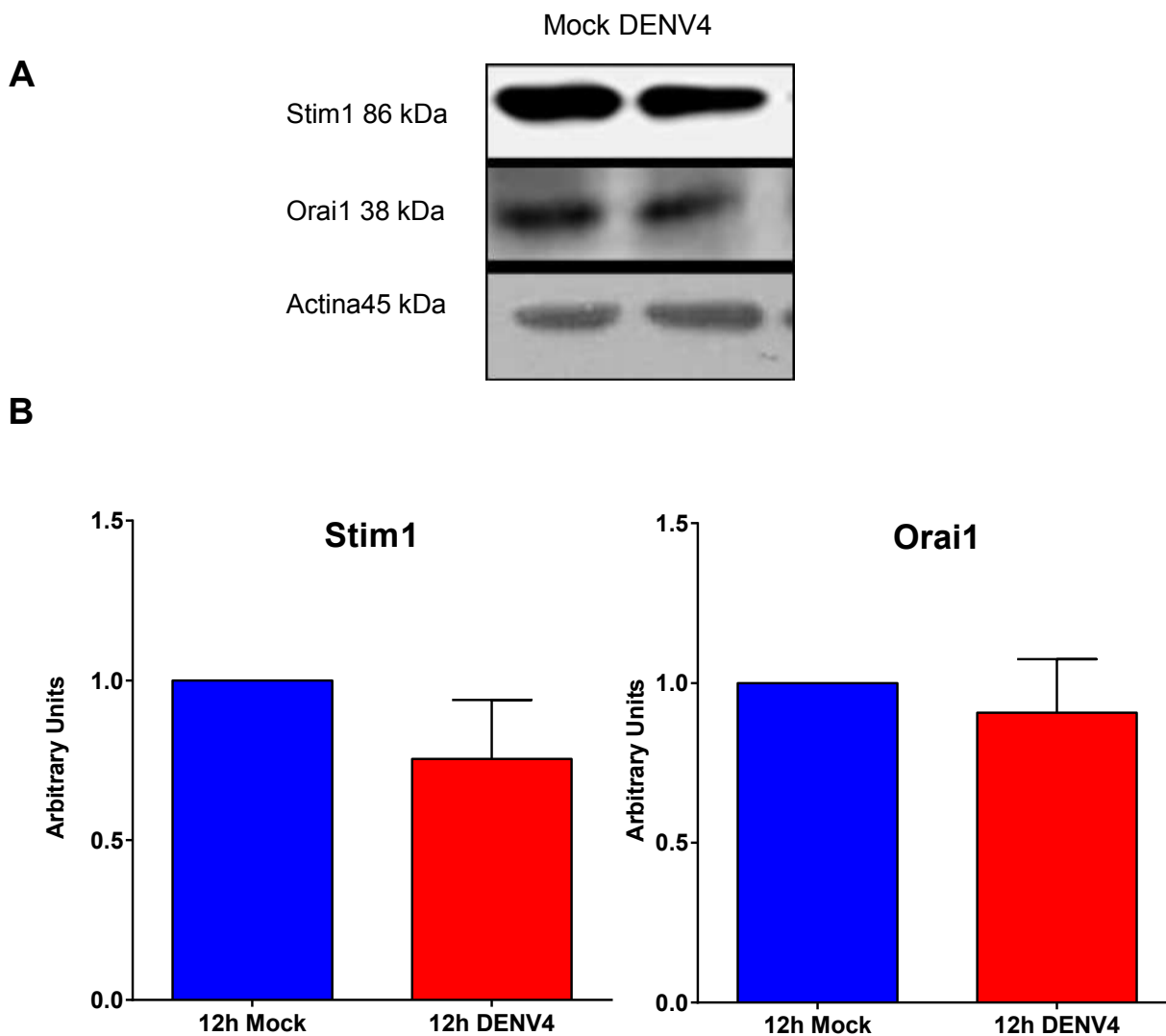


Figura 10.- Cambios en los niveles de Ca^{2+} en células Huh7 infectadas con DENV. Células crecidas en cubreobjetos se infectaron por 12 y 18 h, se cargaron con fluo4 y la intensidad de fluorescencia se determinó usando un microscopio de fluorescencia invertido equipado con un sistema de perfusión. Los datos graficados corresponden al promedio de al menos 25 células que respondieron mejor y las barras corresponden a la DE. Las flechas de los gráficos superiores indican el momento del estímulo con ATP y en la parte inferior se muestran ampliaciones de los registros para hacer más visibles los datos correspondientes al influjo de Ca^{2+} después del estímulo.

En nuestro estudio se han obtenido datos similares, es decir, que la infección por DENV altera los niveles de Ca^{2+} intracelular probablemente a través de la reducción en las reservas del RE y del incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática. Para determinar el o los

mecanismos que se están activando para llevar a cabo el incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} , se evaluaron los niveles proteicos del canal Ora1 presente en la membrana plasmática, y de la proteína activadora del canal y responsable de censar los niveles de Ca^{2+} residente de RE, Stim1. Ambas proteínas están principalmente involucradas en la vía SOCE para mantener las reservas de Ca^{2+} en células no excitables, como lo son los hepatocitos (Barritt et al., 2009; Luik et al., 2006; Parekh and Putney, 2005). Para esto cuantificamos por medio del *Western blot* los niveles de éstas proteínas en células hepáticas infectadas a MOI 3 y de células control cosechadas a un tiempo intermedio de infección, 12 hpi.



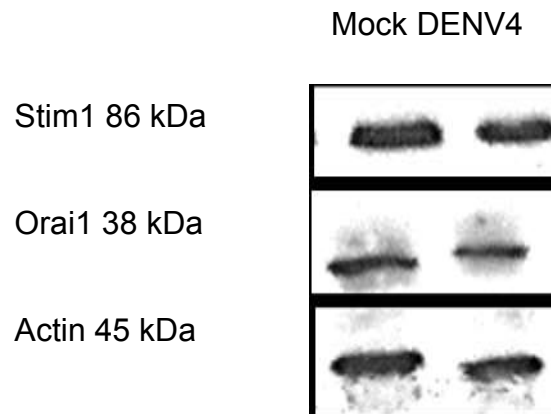
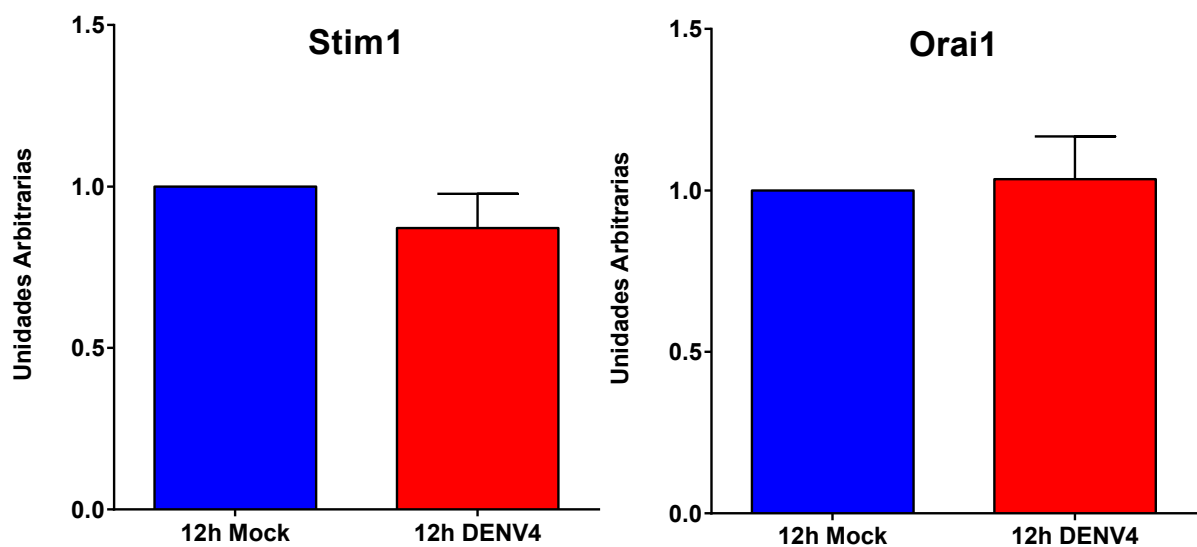
C**D**

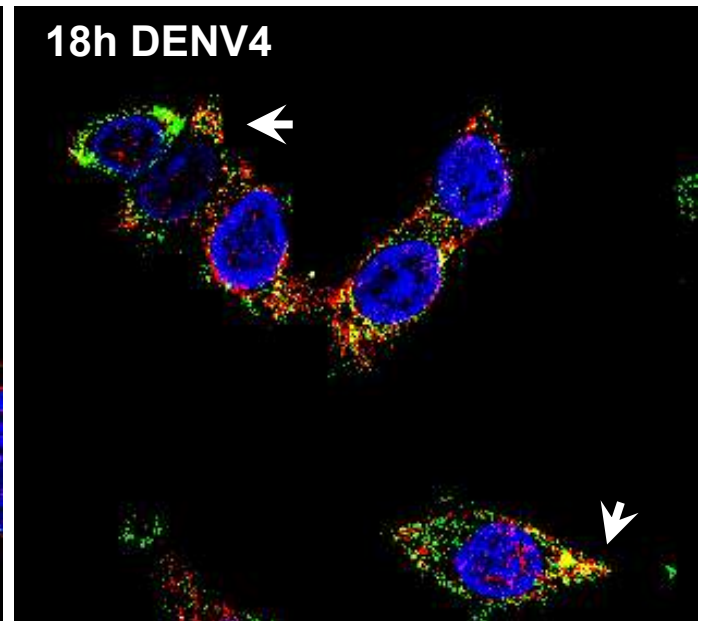
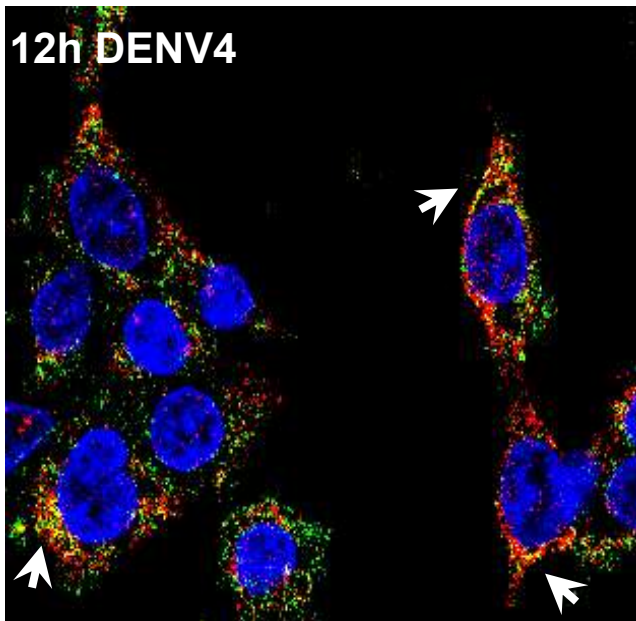
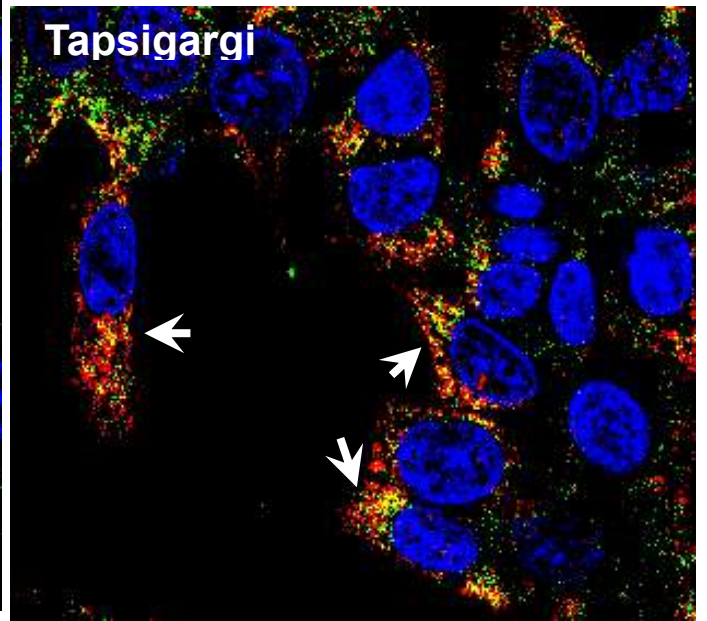
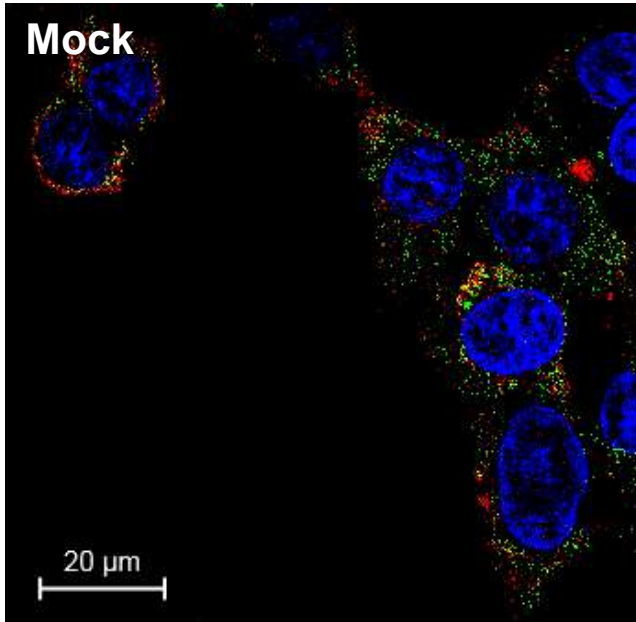
Figura 11.- El incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} durante la infección por DENV no está relacionado a la síntesis de las proteínas involucradas en SOCE. La síntesis de los principales componentes de SOCE fue evaluada por *Western blot* a partir de extractos totales de proteínas de células HepG2 (A) y Huh7(C) mock infectadas o infectadas con DENV a MOI 3 y cosechadas a 12hpi. Se muestra el WB de Stim y Orai1 con su respectivo control de carga, actina, y los correspondientes pesos moleculares, 86 KDa para Stim1, 38 KDa para Orai1 y 45 KDa para actina. (B y D) Histograma del análisis densitométrico de la expresión de Stim y Orai1. Los resultados son la media \pm DE obtenidos de 3 experimentos independientes.

Los ensayos de WB se realizaron a partir de proteínas totales obtenidas a las 12 h.p.i; como control de carga interno se detectó la proteína actina. La cuantificación de los resultados se realizó haciendo un análisis densitométrico cuyos resultados se sometieron posteriormente a un análisis estadístico para determinar significancia. Los resultados del *Western blot* y de la

densitometría se muestran en la **Figura 11**. El análisis estadístico reveló que ni la proteína Stim1, o la proteína Orai1, mostraron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión en células infectadas cosechadas a las 12h.p.i. Los resultados sugieren que durante la infección por DENV no se ven comprometidos o alterados los niveles de las proteínas involucradas en la vía SOCE.

Debido a que no observamos cambios en la síntesis de las proteínas de la vía SOCE, evaluamos su localización en las células hepáticas infectadas, mediante microscopía confocal. Las proteínas Stim1 y Orai1 se analizaron usando inmunofluorescencia indirecta en mococapas de células HepG2 y Huh7 infectadas y cosechadas a las 12 y 18 h. La **Figura 12** nos muestra la localización de ambas proteínas bajo la depleción de las reservas Ca^{2+} en áreas específicas del citosol (puncta). Como se puede observar, existe una moderada y marcada colocalización de Stim1 y Orai1 en las células HepG2 (A) y Huh7 (B) a las 12 y 18 hpi, respectivamente. Este comportamiento de localización es coherente con el mostrado por las células mock infectadas y tratadas con el inhibidor de la bomba SERCA, tapsigargina; usadas como control positivo de depleción de Ca^{2+} de RE y la activación de SOCE. En el caso de las células no infectadas y no tratadas, utilizadas como control negativo, no observamos este patrón de localización y/o distribución de ambas proteínas. Tomando en conjunto éstos resultados nos sugieren que el incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} en las células infectadas puede estar ocasionado en cierta medida o parcialmente por una activación de la vía SOCE, mediada por la activación del canal Orai1, a través del sensor de Ca^{2+} Stim1, sin modificar los niveles de su síntesis.

A



B

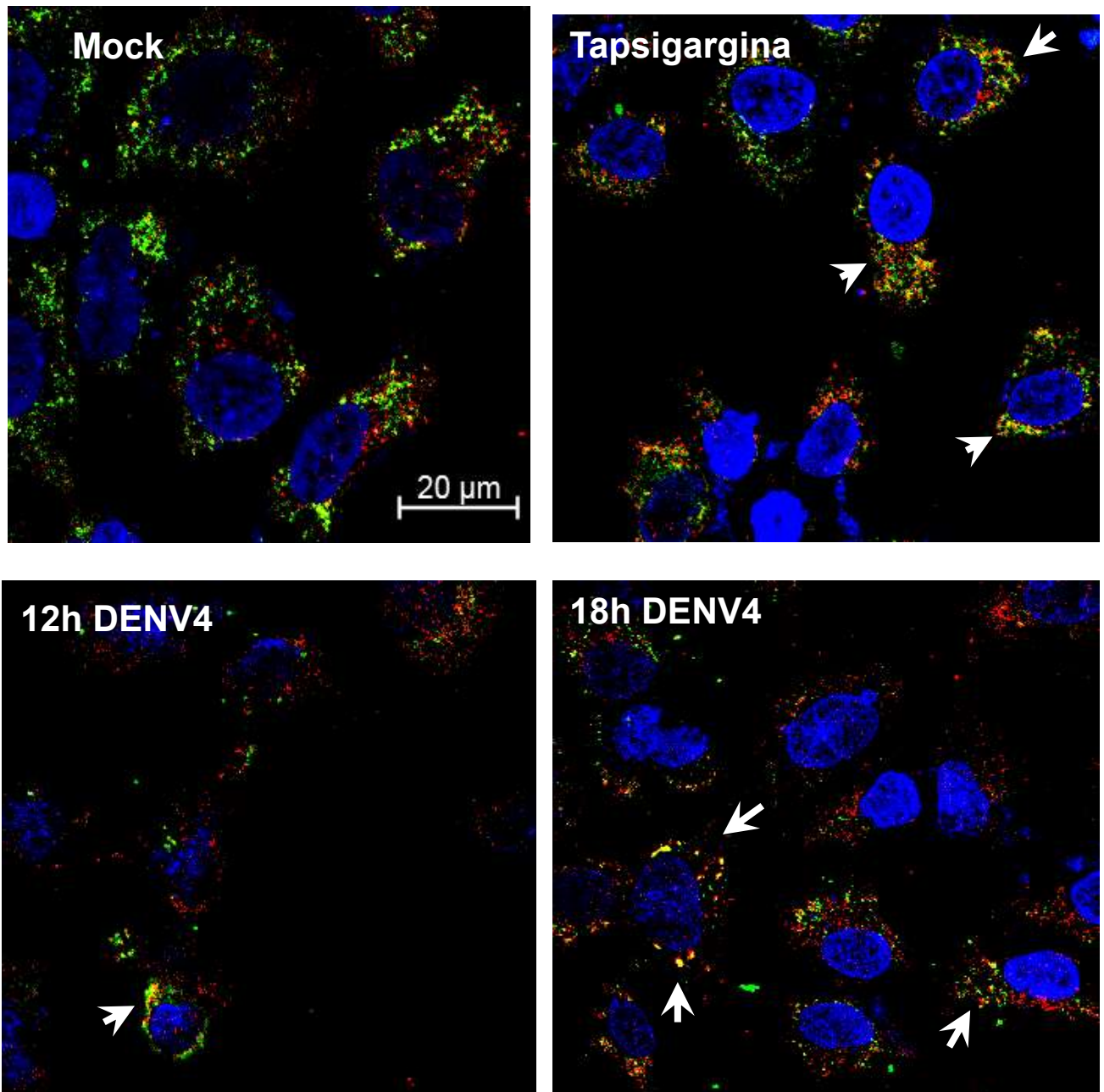


Figura 12.- La infección por DENV activa la vía SOCE. La distribución y/o localización de los principales componentes de SOCE fue evaluada por microscopía confocal a través de un marcaje con inmunofluorescencia indirecta en células HepG2 (A) y Huh7 (B) infectadas con DENV a MOI 3 y fijadas a 12 y 18hpi. Células no infectadas y tratadas o no con 5 μM de tapsigargina se usaron como controles positivo y negativos, respectivamente de distribución y localización de Stim1 (verde) y Orai1 (rojo). Los núcleos fueron contrastados con DAPI y las flechas indican las zonas en color amarillo, en dónde Stim1 y Orai1 colocalizan. Los resultados son imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

6.3) El Ca^{2+} juega un papel relevante en el ciclo replicativo de DENV. Datos previamente reportados indican que la manipulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} durante una infección con algunos *Flavivirus*, como el WNV, afectan de manera importante la replicación viral (Scherbik and Brinton, 2010). Para evaluar si las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} inducida por la infección con DENV eran relevantes en el ciclo de replicación viral, realizamos ensayos de infectividad empleando diferentes tratamientos destinados a manipular los niveles de Ca^{2+} intra y extracelulares. Los tratamientos consistieron en llevar a cabo la infección en presencia de BAPTA – AM (quelante de Ca^{2+} intracelular), EGTA (quelante de Ca^{2+} extracelular), 2 – APB (un antagonista del IP_3R que inhibe la salida de Ca^{2+} de la reserva del RE) y un exceso de Ca^{2+} extracelular; en algunos casos se utilizaron también bloqueadores de canales de Ca^{2+} de membrana plasmática. Previamente se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en donde monocapas de células no infectadas fueron expuestas a varias concentraciones de dichos compuestos y la viabilidad de la monocapa tratada durante 24 horas se evaluó utilizando un ensayo colorimétrico, basado en la reducción de MTT (**Figura 13**).

Con base en estos resultados y a datos reportados en la literatura, se decidió emplear las concentraciones de BAPTA –AM al 25 y 10 μM ; EGTA al 2mM en ambas líneas celulares, 2 – APB al 100 y 50 μM ; Ca^{2+} al 5 y 2 mM en HepG2 y Huh7, respectivamente, para realizar los tratamientos de las células infectadas. Con respecto a los bloqueadores de canales de Ca^{2+} , sólo se emplearon en células HepG2; el MRS1845 a 25 μM y el SKF a 1 μM .

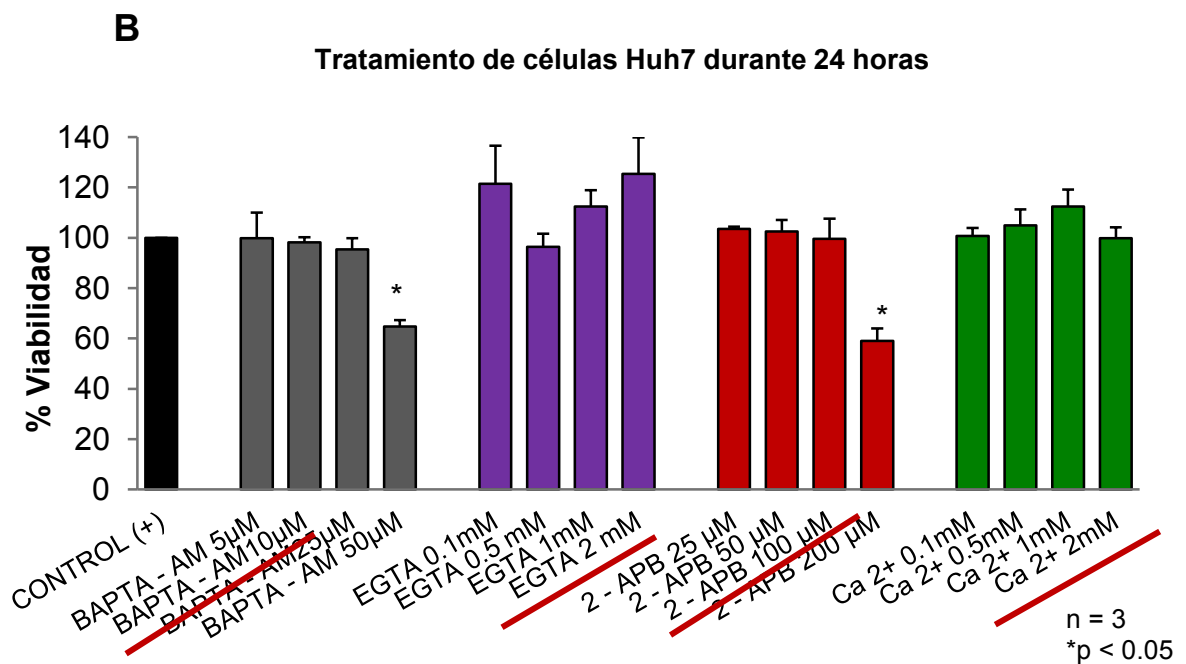
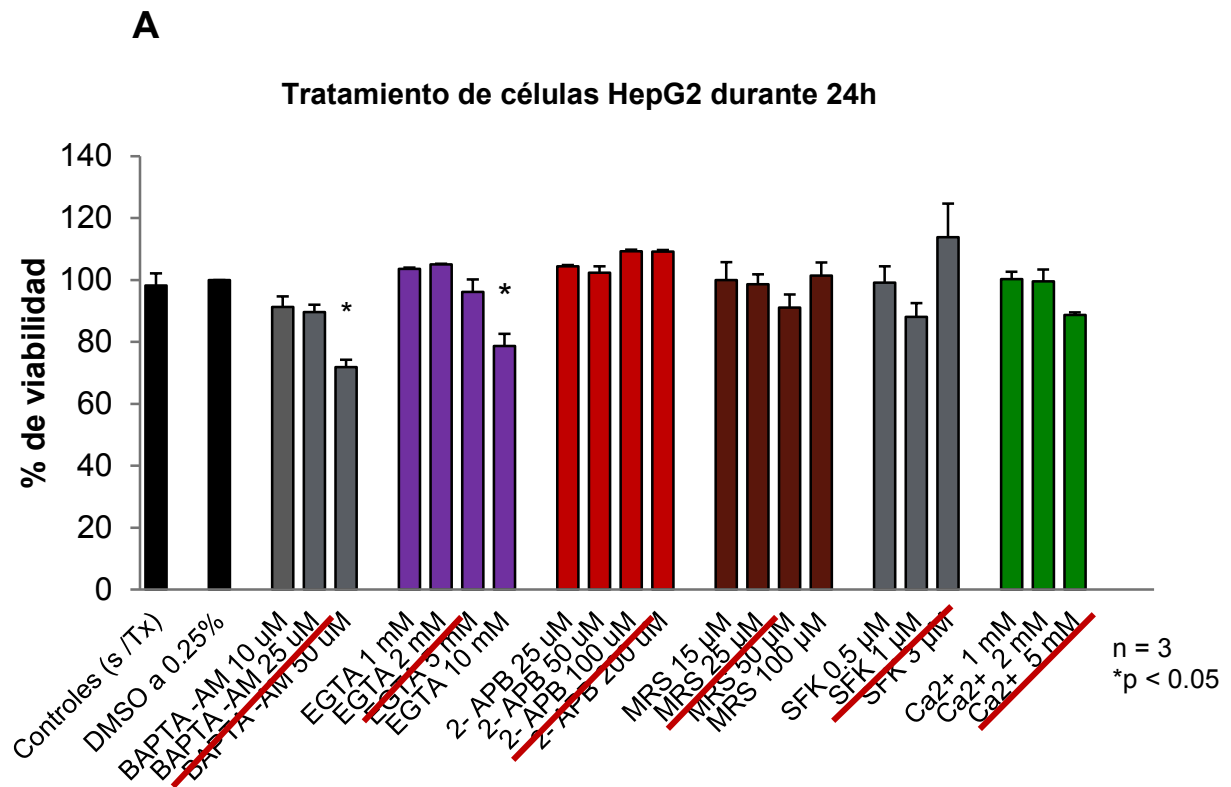


Figura 13.- Concentración de las diferentes drogas que no comprometían la viabilidad de las células hepáticas. Para determinar la concentración de trabajo de los compuestos a emplear en los tratamientos de las células infectadas, se realizó un ensayo de viabilidad por el método de MTT. Cultivo de células HepG2 (A) y Huh7 (B) se incubaron con diferentes concentraciones de los componentes, diluidos en medio de mantenimiento, durante 24 h y se evaluó la viabilidad a partir de la reducción del MTT en formazan, lo cual ocurre solamente en células metabólicamente activas. A partir de la absorbancia obtenida de las células control (células con DMSO 0.25%) se calculó el porcentaje de viabilidad de las células tratadas, tomando como 100% la viabilidad de las células control. Los resultados son la media \pm DE obtenidos de 3 experimentos independientes. (* $p < 0.05$)

La progenie viral se determinó en los sobrenadantes de las células hepáticas infectadas y tratadas con los diferentes componentes durante 24h. Como se muestra en las barras cuadradas de la **Figura 14 A y B**, todos los tratamientos resultaron en una disminución significativa de la progenie viral, aunque no todos ellos mostraron la misma eficiencia. Por ejemplo, los tratamientos con BAPTA - AM y EGTA indujeron una reducción de más del 80 % en la progenie viral en ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con 2 - APB redujo la progenie viral entre un 50 y 60 %. Inesperadamente el aumento de $[Ca^{2+}]$ extracelular en las células infectadas resultó en una disminución de aproximadamente el 50% de la progenie viral en lugar de favorecer la producción de partículas virales infecciosas (**Figura 14 A y B**). Finalmente, para evaluar el papel de los canales de Ca^{2+} operados por reserva (SOC) y de los canales operados por receptor (ROC), células HepG2 fueron tratadas con MRS 1845 y SKF 9636. Como se muestra en la **Figura 14 A**, ambos tratamientos mostraron aproximadamente un 70% de reducción sobre la progenie viral. Es de importancia notar que los resultados de la **Figura 14 A y B (barras grises)**, muestran que aun en células infectadas, los tratamientos empleados no inducen citotoxicidad, lo cual sugiere que las reducciones observadas en la progenie viral no se deben a un efecto inespecífico de los tratamientos sobre la viabilidad de las células hepáticas infectadas. Los resultados anteriores en conjunto sugieren que la infección por DENV se beneficia significativamente de las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} provocadas en las células infectadas.

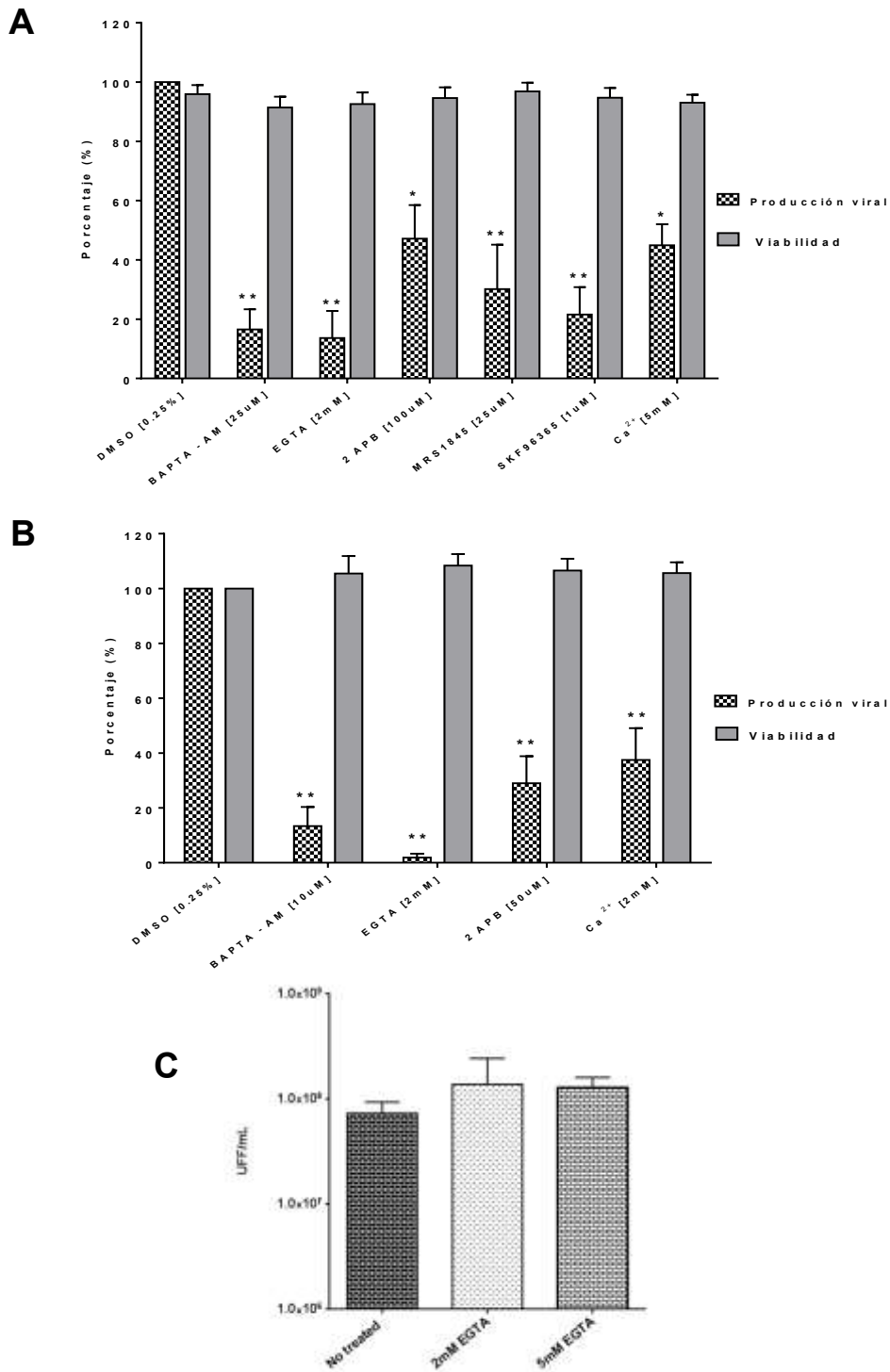


Figura 14.- La señalización de Ca²⁺ intracelular es importante para la eficiente replicación viral. Células HepG2 (A) y Huh7 (B) fueron infectadas con DENV4 a una MOI de 3y tratadas con diferentes componentes durante 24 h, a ese tiempo, los sobrenadantes se recolectaron y el título viral fue determinado por ensayo de focos para los sobrenadantes de HepG2 y por ensayo de plaqueo para los sobrenadantes de Huh7. Adicionalmente se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad de las células hepáticas infectadas y tratadas, corridos en paralelo. Las células crecidas con medio de cultivo y sin tratamiento se tomaron como el 100% de viabilidad, como control negativo se tomaron células incubadas con BAPTA – AM a 50μM. Los resultados correspondientes a la progenie viral son expresados como porcentaje, tomando como 100% la producción viral de los sobrenadantes de células infectadas y tratadas con el vehículo DMSO al 0.25%. (C) Muestra el efecto del tratamiento con 2 y 5 mM de EGTA sobre la infectividad de las partículas virales. Los resultados son el promedio ± DE de n ≥ 3 experimentos independientes. (* p < 0.05; ** p < 0.0001).

Finalmente, debido a que observamos un efecto negativo sobre la progenie viral en células infectadas y tratadas con EGTA, descartamos un posible efecto del quelante de Ca^{2+} extracelular, sobre la infectividad de las partículas virales secretadas al medio extracelular. Para esto, alícuotas de un stock viral obtenido de cerebros de ratones lactantes infectados fueron tratadas o no con 2 y 5 mM de EGTA por 30 minutos, ligeramente mezcladas en un vórtex cada 10 minutos y el título viral fue reevaluado por el ensayo de focos. La **Figura 14 C** muestra que el tratamiento directo con EGTA no modificó significativamente la cantidad de partículas virales infecciosas presentes en el medio extracelular, por lo tanto, el resultado sugiere que el quelante presenta un efecto directo sobre el ciclo replicativo viral y no sobre la estabilidad estructural de la partícula viral infecciosa.

Los resultados anteriores sugieren que la señalización por Ca^{2+} juega un papel relevante en el ciclo replicativo del DENV para producir partículas virales infecciosas en ambas líneas celulares hepáticas. A fin de corroborar los resultados obtenidos por los ensayos de focos y plaqueo, se procedió a la evaluación de la infección en la línea celular, Huh7, mediante un ensayo de ELISA destinado a la detección de la proteína viral no estructural NS1 intracelular y de la forma soluble presente en los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular Huh7 infectado y tratado con los diferentes componentes. Los resultados revelan que los diferentes tratamientos de las células infectadas disminuyen la síntesis y/o secreción de NS1 de manera significativa (**Figura 15**). Las reducciones en los niveles de producción de NS1 oscilan entre un 20 y 60 % tomando los niveles de NS1 en las células infectadas tratadas con el vehículo, DMSO, como el 100%. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de plaqueo de los sobrenadantes de Huh7, ya que ambos resultados sugieren que la manipulación de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} afecta significativamente el ciclo de replicación viral.

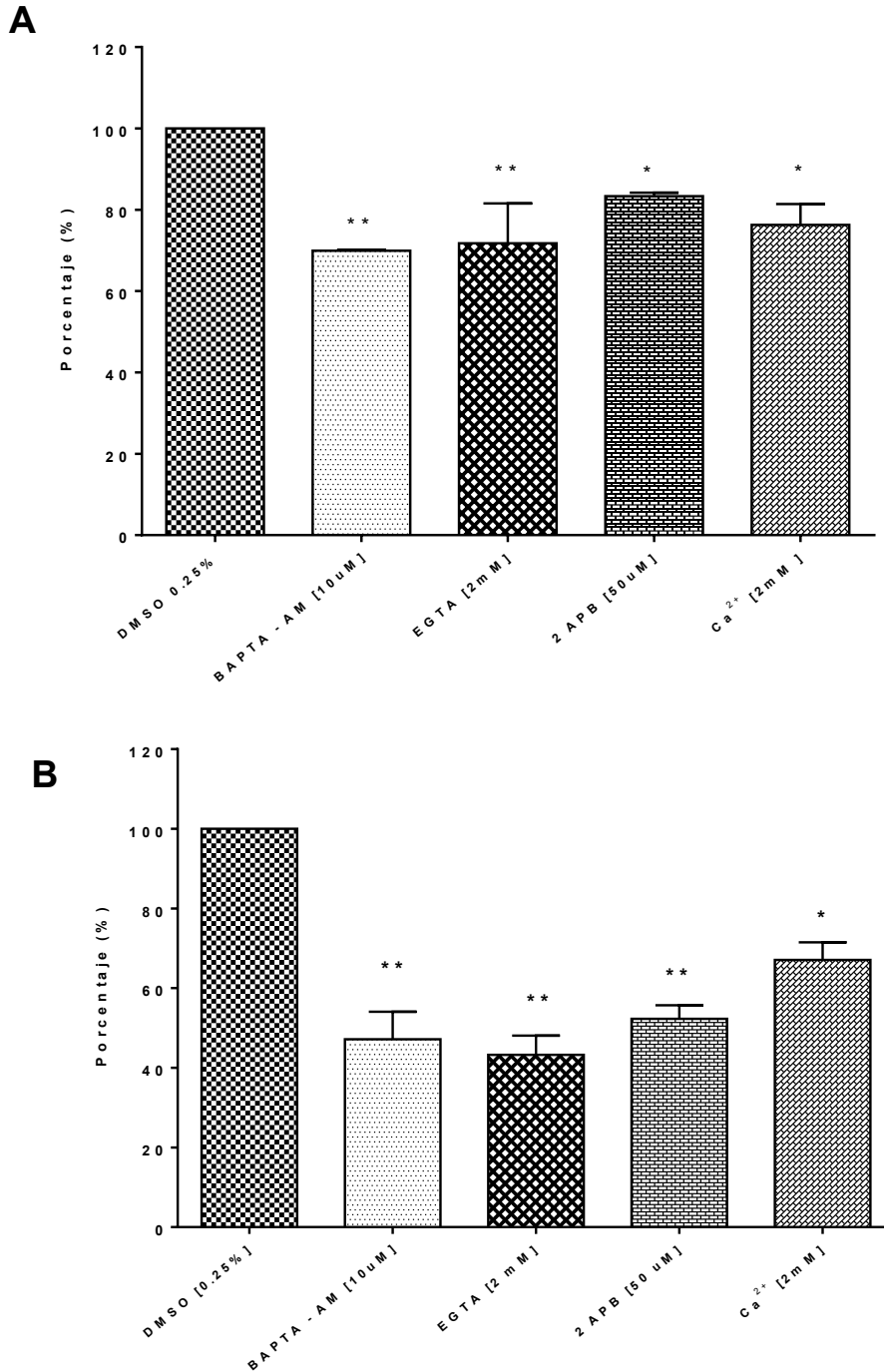


Figura 15.- La alteración de los niveles de Ca²⁺ repercute en la producción de NS1. Células Huh7 a crecidas y cultivadas en una placa de 24 pozos, infectadas a MOI 3 se les manipularon los niveles de Ca²⁺ intracelular y extracelular con quelantes de calcio, así como la adición de Ca²⁺ extracelular y el empleo del antagonista del IP₃R e inhibidor de SOCE (2 – APB). Los tratamientos se realizaron durante 24 h.p.i y al término de este tiempo se evaluó la infección mediante la determinación de los niveles de NS1 en lisados celulares (A) y sobrenadantes (B) cosechados, utilizando un estuche comercial de ELISA. Los resultados son la media \pm DE de 3 experimentos independientes(* p <0.05; ** p < 0.0001).

7) DISCUSIÓN.

El calcio es una de las moléculas más universales y versátiles de señalización y participa en la mayoría de los procesos celulares, desde la supervivencia hasta la muerte celular. Los virus han evolucionado capacidades para utilizar la amplia red de señalización de Ca^{2+} y crear ambientes celulares que favorezcan sus necesidades de replicación, por lo que perturban la homeóstasis de Ca^{2+} y utilizan las proteínas celulares de unión a Ca^{2+} para beneficio de su ciclo de replicación. En los diferentes sistemas virales se han identificado ejemplos donde el Ca^{2+} juega un papel importante en la formación de la estructura del virión, la entrada del virus, la expresión de genes virales, el procesamiento postraduccional de las proteínas virales, la maduración y la liberación de los viriones. En concordancia con la participación del Ca^{2+} en diferentes fases del ciclo replicativo para ciertos virus se ha reportado que durante una infección, se produce un incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplásmico inducida por el virus debido a un influjo del Ca^{2+} del medio extracelular o por su liberación a partir de las reservas internas, como RE y mitocondria, lo cual puede potenciar la replicación viral, por la activación o aceleración de procesos enzimáticos dependientes de Ca^{2+} en el citosol y /o por sobreexpresión de factores transcripcionales sensibles a Ca^{2+} (Zhou et al., 2009)

6.1) La infección por DENV activa mecanismos que alteran la homeostasis de Ca^{2+} .

En células no excitables, la depleción de las reservas de Ca^{2+} del RE a menudo dispara la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Esta vía de permeabilización de Ca^{2+} es conocida como entrada de Ca^{2+} operada por reserva (SOCE) y se caracteriza por una corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+} , con la finalidad de reponer dicha reserva

(Venkatachalam et al., 2002). Sólo unos pocos estudios han reportado la activación de SOCE inducida por virus, entre los cuales están el VHC, otro miembro del género *Flavivirus*, cuya proteínas de la cápside parece ser la responsable del fenómeno. Se ha reportado que la infección por VHC, induce la depleción de Ca^{2+} del RE y posteriormente dispara la apertura de los canales CRAC en células T y en células T Jurkat (Bergqvist et al., 2003). Por otro lado, un estudio realizado por Scherbik et al. (2010) demuestra que durante la infección por el virus West Nile, otro *Flavivirus* transmitido por artrópodos, conduce a un rápido y sostenido influjo de Ca^{2+} en la célula infectada a través de entrada durante la endocitosis del virión, así como canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática que contribuyen a dicho proceso. Más aún, la reducción en el influjo de Ca^{2+} durante los tiempos tempranos de la infección reduce la progenie viral, lo cual sugiere que el influjo de Ca^{2+} provocado por la infección es necesario para una eficiente producción de partículas virales infecciosas.

Con la finalidad de conocer si existe alguna relación entre mecanismos regulatorios de Ca^{2+} y la replicación por DENV, en el presente estudio se determinaron los niveles de Ca^{2+} por medio de un ensayo basado en fluorescencia en células control y en células infectadas. El estudio mostró que durante la infección con DENV, si bien los niveles basales de Ca^{2+} no se encuentran incrementados (**Figura 7**) se presenta un incremento sí la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática en células HepG2 y Huh7, a las 6, 12 y 18 h.p.i y a las 12 y 18 hpi, respectivamente (**Figura 8 y 10**) y una clara reducción de la cantidad de Ca^{2+} que se libera del RE (**Figura 9 y 10**).

Dado que en nuestro sistema observamos una reducción considerable de los niveles de Ca^{2+} que se liberan del RE durante la infección, esto da pie a sugerir que en la infección la disponibilidad a Ca^{2+} en el RE está modulada por proteínas chaperonas dependientes de Ca^{2+} como GRP78 y calreticulina, las cuales se han visto sobreexpresadas en células infectadas por DENV (Datan et al., 2016; Martinez-Betancur et al., 2014; Pena and Harris, 2011) y la unión de la calmodulina a Ca^{2+} podría parcialmente contribuir a la cantidad reducida de Ca^{2+} que se libera del RE bajo el estímulo con ATP. Por otro lado, la inserción de varias proteínas no estructurales del DENV en la membrana ER puede traer desestabilización suficiente como para permitir el aumento de la fuga de Ca^{2+} desde el lumen del ER al citoplasma (Mazzon and Mercer, 2014; Miller and Krijnse-Locker, 2008). Recientemente, se reportó que la proteína NS2B de DENV-2 recombinante tiene la capacidad de modificar la permeabilidad de membranas celulares y como tal se ha propuesto como una vioporina DENV. De hecho, NS2B presenta varias características atribuidas a las vioporinas, tales como la capacidad de formar oligómeros y formar estructuras de tipo poroso en diferentes ambientes lipídicos.(Leon-Juarez et al., 2016; Miller et al., 2007; Roosendaal et al., 2006; Stohlman et al., 1975). Una de las vioporinas mejor estudiada, es la proteína NSP4 de rotavirus, la cual también se inserta como un oligómero integral en la membrana de ER durante la replicación de este virus y es la única responsable de las importantes alteraciones en la homeostasis Ca^{2+} que tienen lugar en las células infectadas por rotavirus (Hyser et al., 2010; Zambrano et al., 2008). Por lo tanto, es probable que NS2B sea la proteína viral responsable por la salida de Ca^{2+} del RE; asunto que debe ser investigado en el futuro cercano.

Cabe resaltar que no observamos un incremento de los niveles de Ca^{2+} basal en las células infectadas, lo cual se puede deber a que los niveles de Ca^{2+} en citosol son resultado de un balance entre los mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y la salida de Ca^{2+}

de las reservas intracelulares, a través de canales, y los mecanismos que se encargan de removerlo del citosol hacia el medio extracelular o llevándolo a organelos que actúan como reserva a través de bombas ATP – asas o de intercambiadores. (Carafoli, 2002).

La replicación del genoma viral y el ensamblaje de miembros del género *Flavivirus* están estrechamente asociados con las membranas del RE de la célula huésped. El RE es el principal reservorio de Ca^{2+} en las células, entre otras funciones se encuentra la síntesis y el plegamiento adecuado de proteínas, la síntesis y distribución de lípidos (Bravo et al., 2013). Se ha descrito que alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} y la infección por flavivirus, son factores de estrés que producen un desbalance en las proteínas recién sintetizadas y la capacidad de plegamiento, resultando en la acumulación de proteínas no o mal plegadas en el lumen del RE, activando la respuesta de proteínas no plegadas (UPR). Esta respuesta se caracteriza por la activación de 3 proteínas principalmente, IRE1, PERK y ATF6, las cuales regulan la expresión de proteínas involucradas en aliviar el estrés del RE (Iranpour et al., 2016). Existen evidencias que han sugerido a la vía UPR como un proceso celular que los virus utilizan para beneficiar su ciclo de replicación y la persistencia de las células infectadas (Blazquez et al., 2014; Diwaker et al., 2015; Medigeshi et al., 2007; Pena and Harris, 2011; Su et al., 2002; Tardif et al., 2002; Umareddy et al., 2007; Yu et al., 2006).

Adicionalmente, varios reportes sugieren que se requiere la salida del catión al citosol para activar procesos celulares dependientes de la señalización por Ca^{2+} que favorezcan el ciclo replicativo del virus, como la autofagia, la cual se ha descrito puede ser activada por múltiples vías que involucran la activación de la proteína PERK, el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) o por cinasas como la proteína cinasa cinasa β dependiente de Ca^{2+} - calmodulina

(CaMKK – β) (Crawford et al., 2012; Datan et al., 2016; Lee et al., 2008; Mateo et al., 2013; Rashid et al., 2015).

6.2) La infección por DENV activa los componentes de la vía SOCE, Stim1 y Orai1 sin alterar los niveles proteicos de ambas proteínas.

La previa sugerencia de que se presenta un incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática en células hepáticas infectadas con DENV, da pie a hacer preguntas tales como, ¿cuáles son los mecanismos que se están activando u operando para llevar a cabo dicho proceso? y por otro lado, la importancia que tiene este proceso para la replicación del virus. Para responder a dichas preguntas, primeramente evaluamos posibles cambios en los niveles proteicos de dos de las proteínas principalmente involucradas en SOCE, Stim1 y Orai1, mediante ensayos de *Western blot* (**Figura 11**). El análisis densitométrico de los resultados obtenidos sugiere que durante la infección, no se ve afectado el nivel de expresión de ambas proteínas a las 12 hpi., como se ha descrito en la infección con otros miembros virales como el virus de Epstein Barr. Dellis et al. (2011) demostraron que la expresión de la proteína viral LMP-1 de Epstein Barr produce un incremento del influjo de Ca^{2+} en células B relacionado a un incremento de la expresión de la proteína Orai1 pero no de la proteína Stim1. Dado que en nuestro sistema, los niveles de proteína se mantienen sin cambios, decidimos evaluar la localización y/o distribución de algunos de los componentes de la vía SOCE. Los datos obtenidos mediante ensayos de microscopía confocal, nos muestran que durante la infección de células hepáticas con DENV, Stim1 y Orai1 presentan un patrón de colocalización a las 12 y 18 hpi (**Figura 12**). El patrón de colocalización de éstas dos proteínas ha sido ampliamente reportado como un indicador de la activación de la vía SOCE en células no excitables (Barritt et al., 2009;

Gwozdz et al., 2008; Luik et al., 2006; Parekh and Putney, 2005; Tojyo et al., 2014). Por tanto, los datos obtenidos en conjunto sugieren que la infección por DENV altera la homeóstasis de Ca^{2+} , provocando un incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática, proceso que puede estar relacionado al hecho de la reducción de los niveles de Ca^{2+} libres en el lumen del RE, lo cual conduce a la activación de la vía SOCE con la finalidad de mantener las reservas de Ca^{2+} .

6.3) Importancia de los niveles de Ca^{2+} intra – y extracelular en la producción viral.

Finalmente evaluamos la relevancia que tiene la participación de Ca^{2+} en la replicación del DEV4. Para ello se realizaron tratamientos de las células hepáticas infectadas, que consistieron en la manipulación de los niveles de Ca^{2+} durante 24 h.p.i, mediante el uso de quelantes de Ca^{2+} extracelular, EGTA, quelante de Ca^{2+} intracelular, BAPTA – AM, un antagonista del IP_3R y un inhibidor de SOCE, 2 – APB, se utilizaron bloqueadores de canales de Ca^{2+} de membrana plasmática y provocamos un exceso de Ca^{2+} en el medio extracelular, a concentraciones que no comprometieran la viabilidad de las células no infectadas e infectadas con DENV4. Los tratamientos con los quelantes de Ca^{2+} redujeron de manera importante los niveles de la proteína viral NS1 y la producción viral, sugiriendo que la señalización por Ca^{2+} intracelular, es un proceso necesario para la eficiente producción de partículas virales infecciosas (**Figura 14 A, B y figura 15**). Éste resultado concuerda con lo observado en el estudio realizado con el virus West Nile, en el cual, el uso de inhibidores de Ca^{2+} no muestra ningún efecto sobre la producción viral cuando están presentes en el proceso de adsorción, indicando que la presencia de los inhibidores de Ca^{2+} no alteran la entrada del virus. Sin embargo, su presencia durante las primeras 2 horas de infección resulta en una reducción de la progenie viral, indicando que la señalización por Ca^{2+} es importante para eventos de replicación, posiblemente por rearrreglos en la membrana del RE y

otras modificaciones celulares requeridas para la replicación del WNV (Scherbik and Brinton, 2010). Otra explicación al proceso de reducción en la producción viral por el tratamiento con quelantes de Ca^{2+} puede ser que al disminuir los niveles de Ca^{2+} citosólicos, se produce una salida de este a partir de las reservas del RE, por lo que proteínas chaperonas dependientes de Ca^{2+} , como calreticulina presente en el lumen del RE se vean afectadas en cuanto a su actividad. Un estudio realizado por Yocupicio en 2003, revela la presencia de calreticulina en el complejo ribonucleoprotéico CI formado con 3'UTR (-) ARN, sugiriendo que esta proteína juega un papel en la replicación del DENV (Yocupicio-Monroy et al., 2003). Por otro lado, el tratamiento con 2 – APB, también reduce significativamente la producción de NS1 y la progenie viral, tal y como se reportó en un estudio realizado en virus herpes simplex (Cheshenko et al., 2003). Este resultado puede ser respaldado al hecho de que la liberación de Ca^{2+} de la reserva del RE sensible a IP_3 , es requerida para la activación de proteínas citosólicas dependientes de Ca^{2+} , como calmodulina, la cual tiene proteínas blanco necesarias para crear un ambiente favorable de replicación viral. Un estudio realizado por Teo en 2014, sugiere que la activación de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} - calmodulina ($\text{CaMKII}\gamma$), es requerida para la fosforilación y reorganización de los filamentos intermedios de vimentina, la cual mostró interacción directa con la proteína NS4A en los complejos replicativos. El estudio sugiere que la vimentina, es uno de los factores celulares que sirven como plataforma para el ensamblaje de los complejos replicativos a través de su interacción con NS4A (Teo and Chu, 2014). Por otro lado, un estudio reciente mostró que la infección de células hepáticas Huh7 por DENV, no altera los niveles de la proteína calmodulina y que además mostró que un antagonista de Ca^{2+} – calmodulina, W7, no presenta efecto sobre la reorganización de la vimentina pero sí un efecto considerable sobre el ciclo de replicación de DENV, reduciendo significativamente la síntesis de proteínas virales, la replicación del genoma viral y por consiguiente afectando la producción de partículas virales

infecciosas. El estudio sugiere que W7 afecta los procesos del ciclo replicativo viral, por un lado, afectando la actividad del complejo proteasa viral NS2B – NS3 al presentar W7 un dominio de interacción con la proteasa viral y por otro lado al ser W7 un antagonista de Ca^{2+} – calmodulina que no permite su interacción con NS2A, que es un componente esencial presente en los complejos replicativos; sugiriendo que calmodulina puede favorecer el ciclo replicativo del virus a través de su interacción con NS2A más que activar la reorganización de la vimentina y garantizar el andamiaje de los complejos replicativos (Bautista-Carbajal et al., 2017) , contrario a los hallazgos reportados por Teo et, al. En 2008. Sin embargo, hay que considerar el hecho de que CaMKII además de ser activada por Ca^{2+} – calmodulina, también puede ser activada por oxidación de metioninas clave, una activación independiente de Ca^{2+} (Erickson et al., 2008) y que vimentina no solo es fosforilada y activada por la CaMKII γ , si no que este filamento intermedio también es blanco de proteínas cinasas como PKC dependiente de fosfolípidos/ Ca^{2+} (Huang et al., 1988; Inagaki et al., 1987) y ROCK, como lo sugirió un estudio, realizado por Lei en 2013, en el cual se muestra que la fosforilación y reorganización de la vimentina es a través de la cinasa ROCK en células infectadas con DENV2 (Lei et al., 2013). Adicionalmente, un reporte reciente sugiere que en la infección de células Vero con DENV2, el citoesqueleto de actina y los microtúbulos están parcialmente involucrados en la replicación del virus, dado que la inhibición de la polimerización de dichos componentes del citoesqueleto, no reduce totalmente la infección (Orozco-García et al., 2015). En conjunto los datos sugieren que varios componentes del citoesqueleto participan en conjunto para estabilizar el ensamblaje de los complejos replicativos.

Por otro lado, los resultados indican que el bloqueo de canales de Ca^{2+} en membrana plasmática también afecta significativamente la producción de partículas virales infecciosas por parte de células hepáticas infectadas y tratadas, sugiriendo que el flujo de Ca^{2+} extracelular es

un elemento parcialmente requerido para mantener las reservas de Ca^{2+} o activar procesos celulares explotados por el virus y beneficiar su ciclo de replicación.

Cabe señalar, que si se disminuyen los niveles de Ca^{2+} citoplásmico por quelantes de Ca^{2+} , bloqueando el influjo del Ca^{2+} extracelular a través de canales de membrana plasmática, así como por inhibición de la salida de este catión del RE a través de IP3R, se podría disminuir la posibilidad de captura del Ca^{2+} por parte de la mitocondria y por tanto se vería comprometida la producción del ATP requerido para la replicación viral, esto a través de la piruvato deshidrogenasa, α – cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasa, enzimas del ciclo de Krebs sensibles a Ca^{2+} (Clapham, 2007; Li et al., 2007).

Por otro lado, hipotetizamos que si la infección por DENV es un proceso dependiente de la señalización de Ca^{2+} , al incrementar los niveles de este ión, el proceso de producción viral se vería altamente favorecido. Sin embargo, los resultados obtenidos, muestran todo lo contrario, ya que se observa una reducción importante en la producción de partículas virales infecciosas. Éstos últimos datos, dan pie a sugerir que el exceso de Ca^{2+} en las células infectadas, no favorece la replicación viral probablemente porque al incrementar los niveles de Ca^{2+} intracelulares, la célula invierte más energía en mantener los niveles basales, removiéndolo del citosol hacia el medio extracelular a través de la activación de bombas dependientes de ATP en la membrana plasmática (Brini and Carafoli, 2009), comprometiendo los requerimientos energéticos para la eficiente producción viral.

Dado que existe evidencia de que proteínas virales son ensambladas y mantenidas estructuralmente por la unión a Ca^{2+} , tal es el caso de la proteína VP7 de rotavirus, que se ha

descrito una disociación de la proteína viral en presencia de agentes quelantes de Ca^{2+} y su reversible ensamblaje en la presencia de Ca^{2+} (Ruiz et al., 1996) y debido a que observamos un efecto negativo sobre la progenie viral en células infectadas y tratadas con EGTA, descartamos un posible efecto del quelante de Ca^{2+} extracelular, sobre la capacidad infecciosa de las partículas virales secretadas al medio extracelular (**Figura 14 C**). Los resultados obtenidos sugieren que el EGTA no modifica significativamente la cantidad de partículas virales infecciosas presentes en el medio extracelular, es decir, aparentemente presenta un efecto directo sobre el ciclo replicativo viral y no sobre la estabilidad estructural de la partícula viral infecciosa.

Otra posible explicación para la reducción en la producción de partículas virales infecciosas, es que la alteración los niveles de Ca^{2+} con los diferentes tratamientos, pueden estar afectando pasos de la vía de secreción celular, tal como ocurre con BAPTA – AM, el cual se ha reportado afecta pasos del transporte anterógrado que involucra el paso intermedio entre el RE y Golgi, así como la salida de moléculas cargo del aparato de Golgi (Chen et al., 2002). Dados estos antecedentes, es posible especular que la reducción de la disponibilidad de Ca^{2+} en citosol puede estar inhibiendo el tráfico y la salida de las partículas virales ensambladas. Por otro lado, es posible que la actividad de la furina, una proteasa dependiente de Ca^{2+} , residente en Golgi (Molloy et al., 1992); que se encarga de cortar el péptido prM para madurar las partículas virales (Yu et al., 2008), esté afectada, dando lugar a un incremento en la producción y secreción de partículas virales inmaduras, lo cual se ve reflejado en una reducción de viriones infecciosos en el medio extracelular.

Nuestros resultados indican que en células hepáticas infectadas con DENV ocurren alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} , especialmente un aumento en la permeabilidad a Ca^{2+} por

parte de la membrana plasmática a través de la vía SOCE posiblemente para mantener la reserva de Ca^{2+} en RE y que estos cambios parecen ser necesarios para llevar a cabo una eficiente replicación viral. Si bien en la literatura no existen reportes de cambios en la homeóstasis de Ca^{2+} por una infección con DENV, los resultados publicados con otros *Flavivirus*, como WNV y VHC (Bergqvist et al., 2003; Dionisio et al., 2009; Scherbik and Brinton, 2010) da pie a suponer que las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} es un fenómeno común para todos los *Flavivirus* en beneficio de su replicación.

Estudios epidemiológicos indican que las infecciones virales transmitidas por artrópodos a menudo forman parte de problemas de salud pública. Por lo tanto, el estudio de los aspectos moleculares activados durante una infección viral ayuda a entender los procesos relacionados con la patogénesis de enfermedades causadas por virus. En nuestro estudio, observamos que las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} en células hepáticas infectadas con DENV son aspectos claves que pueden estar activando procesos celulares dependientes de Ca^{2+} , creando un ambiente favorable para garantizar la viabilidad de la célula infectada y por tanto producir una infección persistente. Los reportes anteriores abren nuevas perspectivas para caracterizar y entender el papel funcional de vías celulares específicas activadas durante la infección por DENV e identificar los productos virales que activen estas vías, facilitando el desarrollo de nuevas estrategias para contrarrestar las infecciones virales.

8) CONCLUSIONES.

- La infección con DENV en líneas celulares hepáticas, produce una reducción considerable de los niveles de Ca^{2+} que se liberan del RE y un incremento en la permeabilidad a Ca^{2+} por parte de la membrana plasmática.
- La infección con DENV activa la respuesta SOCE sin modificar los niveles de expresión de Stim1 y Orai1.
- Alteraciones en las concentraciones intra y extracelulares de Ca^{2+} , afectan la replicación viral, lo cual sugiere que los cambios en los mecanismos regulatorios de Ca^{2+} inducidos por la infección son necesarios para que se lleve a cabo una eficiente producción de partículas virales.

9) PERSPECTIVAS

- Identificar las proteínas virales responsables de la salida de Ca^{2+} del RE y/ aumento de permeabilidad de la membrana plasmática.
- Determinar qué pasos de la infección viral se ven favorecidos por las alteraciones en la homeóstasis de Ca^{2+} inducidos por la infección.
- Identificar procesos celulares dependientes de Ca^{2+} o moléculas clave en la señalización que favorecen el ciclo replicativo viral como blancos terapéuticos.

10) REFERENCIAS

1. Albrecht, B., D'Souza, C.D., Ding, W., Tridandapani, S., Coggeshall, K.M., Lairmore, M.D., 2002. Activation of nuclear factor of activated T cells by human T-lymphotropic virus type 1 accessory protein p12(I). *Journal of virology* 76, 3493-3501.
2. Arnoult, D., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Poncet, D., Zamzami, N., Park, P.U., Sharpe, J., Youle, R.J., Goldmacher, V.S., 2004. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7988-7993.
3. Barritt, G.J., Litjens, T.L., Castro, J., Aromataris, E., Rychkov, G.Y., 2009. Store-operated Ca²⁺ channels and microdomains of Ca²⁺ in liver cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36, 77-83.
4. Bautista-Carbajal, P., Soto-Acosta, R., Angel-Ambrocio, A.H., Cervantes-Salazar, M., Loranca-Vega, C.I., Herrera-Martinez, M., Del Angel, R.M., 2017. The calmodulin antagonist W-7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) inhibits DENV infection in Huh-7 cells. *Virology* 501, 188-198.
5. Benali-Furet, N.L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R., Paterlini-Brechot, P., 2005. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 24, 4921-4933.
6. Bergqvist, A., Rice, C.M., 2001. Transcriptional activation of the interleukin-2 promoter by hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* 75, 772-781.
7. Bergqvist, A., Sundstrom, S., Dimberg, L.Y., Gylfe, E., Masucci, M.G., 2003. The hepatitis C virus core protein modulates T cell responses by inducing spontaneous and altering T-cell receptor-triggered Ca²⁺ oscillations. *The Journal of biological chemistry* 278, 18877-18883.
8. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 517-529.
9. Berridge, M.J., Irvine, R.F., 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
10. Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 1, 11-21.
11. Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504-507.
12. Blazquez, A.B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.C., Martin-Acebes, M.A., 2014. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. *Frontiers in microbiology* 5, 266.
13. Bootman, M.D., Lipp, P., 1999. Ringing changes to the 'bell-shaped curve'. *Current biology : CB* 9, R876-878.
14. Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., Farlow, A.W., Scott, T.W., Hay, S.I., 2012. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1760.
15. Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F., Lavandero, S., 2013. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *International review of cell and molecular biology* 301, 215-290.
16. Brini, M., Carafoli, E., 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews* 89, 1341-1378.
17. Campanella, M., de Jong, A.S., Lanke, K.W., Melchers, W.J., Willems, P.H., Pinton, P., Rizzuto, R., van Kuppeveld, F.J., 2004. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell

- responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 279, 18440-18450.
18. Carafoli, E., 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1115-1122.
 19. Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M., 2001. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 36, 107-260.
 20. Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
 21. Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E., 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology* 80, 11418-11431.
 22. Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., Estes, M.K., 2012. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase-beta signaling is required for rotavirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E3405-3413.
 23. Chami, M., Ferrari, D., Nicotera, P., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., 2003. Caspase-dependent alterations of Ca²⁺ signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein. *The Journal of biological chemistry* 278, 31745-31755.
 24. Chen, J.L., Ahluwalia, J.P., Stamnes, M., 2002. Selective effects of calcium chelators on anterograde and retrograde protein transport in the cell. *The Journal of biological chemistry* 277, 35682-35687.
 25. Cheshenko, N., Del Rosario, B., Woda, C., Marcellino, D., Satlin, L.M., Herold, B.C., 2003. Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *The Journal of cell biology* 163, 283-293.
 26. Datan, E., Roy, S.G., Germain, G., Zali, N., McLean, J.E., Golshan, G., Harbajan, S., Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2016. Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. *Cell death & disease* 7, e2127.
 27. Dellis, O., Arbabian, A., Papp, B., Rowe, M., Joab, I., Chomienne, C., 2011. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 increases calcium influx through store-operated channels in B lymphoid cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 18583-18592.
 28. Diamond, M.S., Edgil, D., Roberts, T.G., Lu, B., Harris, E., 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of virology* 74, 7814-7823.
 29. Ding, W., Albrecht, B., Kelley, R.E., Muthusamy, N., Kim, S.J., Altschuld, R.A., Lairmore, M.D., 2002. Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12(I) expression increases cytoplasmic calcium to enhance the activation of nuclear factor of activated T cells. *Journal of virology* 76, 10374-10382.
 30. Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Majano, P.L., Benedicto, I., Rosado, J.A., Salido, G.M., Gonzalez-Gallego, J., 2009. Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *Journal of hepatology* 50, 872-882.
 31. Diwaker, D., Mishra, K.P., Ganju, L., 2015. Effect of modulation of unfolded protein response pathway on dengue virus infection. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 960-968.
 32. Doedens, J.R., Kirkegaard, K., 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *The EMBO journal* 14, 894-907.
 33. Erickson, J.R., Joiner, M.L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M.C., Zimmerman, K., Ham, A.J., Weiss, R.M., Spitz, D.R., Shea, M.A., Colbran, R.J., Mohler, P.J., Anderson, M.E., 2008. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474.
 34. Gould, E., Clegg, J., 1991. Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. *Virology: a practical approach*, 43-78.
 35. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.

36. Gubler, D.J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology* 10, 100-103.
37. Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology* 8, S7-16.
38. Gwozdz, T., Dutko-Gwozdz, J., Zarayskiy, V., Peter, K., Bolotina, V.M., 2008. How strict is the correlation between STIM1 and Orai1 expression, puncta formation, and ICRCAC activation? *American journal of physiology. Cell physiology* 295, C1133-1140.
39. Hamilton, S.L., 2005. Ryanodine receptors. *Cell calcium* 38, 253-260.
40. Holden, C., Haughey, N., Nath, A., Geiger, J., 1999. Role of Na⁺/H⁺ exchangers, excitatory amino acid receptors and voltage-operated Ca²⁺ channels in human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated increases in intracellular Ca²⁺ in human neurons and astrocytes. *Neuroscience* 91, 1369-1378.
41. Huang, C.K., Devanney, J.F., Kennedy, S.P., 1988. Vimentin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications* 150, 1006-1011.
42. Hyser, J.M., Collinson-Pautz, M.R., Utama, B., Estes, M.K., 2010. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *mBio* 1.
43. Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M., Sato, C., 1987. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* 328, 649-652.
44. Iranpour, M., Moghadam, A.R., Yazdi, M., Ande, S.R., Alizadeh, J., Wiechec, E., Lindsay, R., Drebot, M., Coombs, K.M., Ghavami, S., 2016. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine* 18, e1.
45. Jaiswal, J., 2001. Calcium—how and why? *Journal of biosciences* 26, 357-363.
46. Jessie, K., Fong, M.Y., Devi, S., Lam, S.K., Wong, K.T., 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases* 189, 1411-1418.
47. Kinoshita, S., Su, L., Amano, M., Timmerman, L.A., Kaneshima, H., Nolan, G.P., 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* 6, 235-244.
48. Kruman, II, Nath, A., Mattson, M.P., 1998. HIV-1 protein Tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Experimental neurology* 154, 276-288.
49. Lee, Y.R., Lei, H.Y., Liu, M.T., Wang, J.R., Chen, S.H., Jiang-Shieh, Y.F., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, C.C., Liu, H.S., 2008. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 374, 240-248.
50. Lei, S., Tian, Y.P., Xiao, W.D., Li, S., Rao, X.C., Zhang, J.L., Yang, J., Hu, X.M., Chen, W., 2013. ROCK is involved in vimentin phosphorylation and rearrangement induced by dengue virus. *Cell biochemistry and biophysics* 67, 1333-1342.
51. Leon-Juarez, M., Martinez-Castillo, M., Shrivastava, G., Garcia-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragon-Castelan, M., Mondragon-Flores, R., Cedillo-Barron, L., 2016. Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology journal* 13, 1.
52. Lewis, R.S., 2007. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446, 284-287.
53. Li, Y., Boehning, D.F., Qian, T., Popov, V.L., Weinman, S.A., 2007. Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 2474-2485.

54. Lin, Y.L., Liu, C.C., Lei, H.Y., Yeh, T.M., Lin, Y.S., Chen, R.M., Liu, H.S., 2000. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *Journal of medical virology* 60, 425-431.
55. Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current biology : CB* 15, 1235-1241.
56. Ludert, J.E., Mosso, C., Ceballos-Olvera, I., del Angel, R.M., 2008. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virology journal* 5, 51.
57. Luik, R.M., Wu, M.M., Buchanan, J., Lewis, R.S., 2006. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology* 174, 815-825.
58. Mackenzie, J.M., Westaway, E.G., 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of virology* 75, 10787-10799.
59. Martinez-Betancur, V., Marin-Villa, M., Martinez-Gutierrez, M., 2014. Infection of epithelial cells with dengue virus promotes the expression of proteins favoring the replication of certain viral strains. *Journal of medical virology* 86, 1448-1458.
60. Mateo, R., Nagamine, C.M., Spagnolo, J., Mendez, E., Rahe, M., Gale, M., Jr., Yuan, J., Kirkegaard, K., 2013. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *Journal of virology* 87, 1312-1321.
61. Mazzon, M., Mercer, J., 2014. Lipid interactions during virus entry and infection. *Cellular microbiology* 16, 1493-1502.
62. Medigeschi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., Defilippis, V., Fruh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., Nelson, J.A., 2007. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *Journal of virology* 81, 10849-10860.
63. Mikoshiba, K., Hattori, M., 2000. IP₃ receptor-operated calcium entry. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2000, pe1.
64. Miller, J.L., de Wet, B.J., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Gordon, S., 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens* 4, e17.
65. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, 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. *The Journal of biological chemistry* 282, 8873-8882.
66. Miller, S., Krijnse-Locker, J., 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature reviews. Microbiology* 6, 363-374.
67. Molloy, S., Bresnahan, P., Leppla, S., Klimpel, K., Thomas, G., 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-XX-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *Journal of Biological Chemistry* 267, 16396-16402.
68. Mosso, C., Galvan-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193-199.
69. Noisakran, S., Onlamoon, N., Songprakhon, P., Hsiao, H.M., Choekphaibulkit, K., Perng, G.C., 2010. Cells in dengue virus infection in vivo. *Advances in virology* 2010, 164878.
70. Orozco-García, E., Trujillo-Correa, A., Gallego-Gómez, J., 2015. Cell biology of virus infection: The role of cytoskeletal dynamics integrity in the effectiveness of dengue virus infection. *Cell Biology*. 1st ed. InTech.
71. Parekh, A.B., Putney, J.W., Jr., 2005. Store-operated calcium channels. *Physiological reviews* 85, 757-810.
72. Pena, J., Harris, E., 2011. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 286, 14226-14236.

73. Perez, J.F., Ruiz, M.C., Chemello, M.E., Michelangeli, F., 1999. Characterization of a membrane calcium pathway induced by rotavirus infection in cultured cells. *Journal of virology* 73, 2481-2490.
74. Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., Rizzuto, R., 2000. Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells. *The Journal of cell biology* 148, 857-862.
75. Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., Rizzuto, R., 2001. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *The EMBO journal* 20, 2690-2701.
76. Poncet, D., Larochette, N., Pauleau, A.L., Boya, P., Jalil, A.A., Cartron, P.F., Vallette, F., Schnebelen, C., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Boutolleau, D., Martinou, J.C., Goldmacher, V.S., Kroemer, G., Zamzami, N., 2004. An anti-apoptotic viral protein that recruits Bax to mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 279, 22605-22614.
77. Pova, T.F., Alves, A.M., Oliveira, C.A., Nuovo, G.J., Chagas, V.L., Paes, M.V., 2014. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS one* 9, e83386.
78. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J., 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews* 74, 595-636.
79. Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., Hogan, P.G., 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.
80. Puerta-Guardo, H., Medina, F., De la Cruz Hernandez, S.I., Rosales, V.H., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2012. The 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes. *Antiviral research* 94, 57-61.
81. Putney, J.W., Jr., Ribeiro, C.M., 2000. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 1272-1286.
82. Rashid, H.O., Yadav, R.K., Kim, H.R., Chae, H.J., 2015. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* 11, 1956-1977.
83. Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J., Smit, J.M., 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 2773-2786.
84. Roosendaal, J., Westaway, E.G., Khromykh, A., Mackenzie, J.M., 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *Journal of virology* 80, 4623-4632.
85. Ruiz, M.C., Charpilienne, A., Liprandi, F., Gajardo, R., Michelangeli, F., Cohen, J., 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of virology* 70, 4877-4883.
86. Samanta, J., Sharma, V., 2015. Dengue and its effects on liver. *World journal of clinical cases* 3, 125-131.
87. Sreaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., Roberts, C., 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature reviews. Immunology* 15, 745-759.
88. Scherbik, S.V., Brinton, M.A., 2010. Virus-induced Ca²⁺ influx extends survival of west nile virus-infected cells. *Journal of virology* 84, 8721-8731.
89. Sharon-Friling, R., Goodhouse, J., Colberg-Poley, A.M., Shenk, T., 2006. Human cytomegalovirus pUL37x1 induces the release of endoplasmic reticulum calcium stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19117-19122.
90. Simmons, C.P., Wolbers, M., Nguyen, M.N., Whitehorn, J., Shi, P.Y., Young, P., Petric, R., Nguyen, V.V., Farrar, J., Wills, B., 2012. Therapeutics for dengue: recommendations for design and conduct of early-phase clinical trials. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1752.

91. Soto-Acosta, R., Mosso, C., Cervantes-Salazar, M., Puerta-Guardo, H., Medina, F., Favari, L., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2013. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* 442, 132-147.
92. Stohlman, S.A., Wisseman, C.L., Jr., Eylar, O.R., Silverman, D.J., 1975. Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. *Journal of virology* 16, 1017-1026.
93. Su, H.L., Liao, C.L., Lin, Y.L., 2002. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *Journal of virology* 76, 4162-4171.
94. Suksanpaisan, L., Susantad, T., Smith, D.R., 2009. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *Journal of biomedical science* 16, 17.
95. Tardif, K.D., Mori, K., Siddiqui, A., 2002. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *Journal of virology* 76, 7453-7459.
96. Teo, C.S., Chu, J.J., 2014. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *Journal of virology* 88, 1897-1913.
97. Tojyo, Y., Morita, T., Nezu, A., Tanimura, A., 2014. Key components of store-operated Ca²⁺ entry in non-excitable cells. *Journal of pharmacological sciences* 125, 340-346.
98. Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q.Y., Vasudevan, S.G., Chevet, E., Gu, F., 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology journal* 4, 91.
99. van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens* 4, e1000244.
100. van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2007. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of virology* 81, 12019-12028.
101. van Kuppeveld, F.J., de Jong, A.S., Melchers, W.J., Willems, P.H., 2005. Enterovirus protein 2B po(u)res out the calcium: a viral strategy to survive? *Trends in microbiology* 13, 41-44.
102. van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *The EMBO journal* 16, 3519-3532.
103. Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Ma, H.T., Gill, D.L., 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature cell biology* 4, E263-272.
104. Verkhatsky, A., 2007. Calcium and cell death. *Sub-cellular biochemistry* 45, 465-480.
105. WHO, 2016a. Dengue and severe dengue.
106. WHO, 2016b. Dengue control. www.who.int/denguecontrol/en/.
107. Wu, S.J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J.R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M.K., Filgueira, L., Marovich, M.A., Wong, H.K., Blauvelt, A., Murphy, G.S., Robb, M.L., Innes, B.L., Bix, D.L., Hayes, C.G., Frankel, S.S., 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine* 6, 816-820.
108. Yocupicio-Monroy, R.M., Medina, F., Reyes-del Valle, J., del Angel, R.M., 2003. Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA. *Journal of virology* 77, 3067-3076.
109. Yu, C.Y., Hsu, Y.W., Liao, C.L., Lin, Y.L., 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *Journal of virology* 80, 11868-11880.
110. Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., Chen, J., 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834-1837.

111. Zambrano, J.L., Diaz, Y., Pena, F., Vizzi, E., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2008. Silencing of rotavirus NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca²⁺ homeostasis induced by infection of cultured cells. *Journal of virology* 82, 5815-5824.
112. Zeng, W., Mak, D.O., Li, Q., Shin, D.M., Foskett, J.K., Muallem, S., 2003. A new mode of Ca²⁺ signaling by G protein-coupled receptors: gating of IP3 receptor Ca²⁺ release channels by Gbetagamma. *Current biology : CB* 13, 872-876.
113. Zhou, Y., Frey, T.K., Yang, J.J., 2009. Viral calciomics: interplays between Ca²⁺ and virus. *Cell calcium* 46, 1-17.