

Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Papel de calreticulina y del tratamiento con BAPTA-AM
en la infección por el virus dengue en células Huh-7”**

T E S I S

Que presenta

M. EN C. ARIANNA MAHELY HURTADO MONZÓN

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

Directores de la tesis:
Dra. Rosa María Del Ángel
Dr. Jorge Alberto Sánchez

México, Ciudad de México

Diciembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para la realización de este proyecto, el cual fue realizado en el laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y del Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez, así como la asesoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, el Dr. Juan Ernesto Ludert León, el Dr. Vianney Ortiz Navarrete y el Dr. Juan Santiago Salas Benito.

Agradezco al CINVESTAV-IPN, en particular al laboratorio de Virología por abrirme sus puertas durante todo este tiempo. Al apoyo técnico brindado por el auxiliar Fernando Medina y el técnico Jaime Zarco.

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio, Luis, Charly, Noé, Arely, Fidel, Manuel, Carla, Selvin; por el apoyo y consejos y por ser un excelente equipo de trabajo, gracias a Patricia Bautista por todo lo que me enseñó y por ser más que compañera de laboratorio, una excelente amiga.

Gracias a mis amigos y compañeros de generación desde la maestría, Alondra y Javier, que fortuna haber conocido a tan grandiosas amistades en este centro de investigación.

Por su puesto gracias a mi familia, Josefina, Ramón, Geo por el apoyo incondicional y su amor.

A mi compañero en nuestra pequeña familia, Rogelio, por siempre estar en las buenas y malas.

A mis abuelitos Baltazar, Lucía, Sara y a mi abuelito Inocencio, en paz descansen; y a la hermosa familia que han formado.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	27
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
METODOLOGÍA	32
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	54
PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CMV	Citomegalovirus
CRT	Calreticulina
DC	Células dendríticas
DCSA	Dengue con signos de alerta
DENV	Virus dengue
DG	Dengue grave
DNG	Dengue no grave
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HBV	Virus de la hepatitis B
HCV	Virus de la hepatitis C
IFITM	Proteínas transmembranales inducidas por interferon
IFN	Interferón
IFNAR	Receptor de IFN de tipo I
Ig	Inmunoglobulinas
IP3R	Receptor de inositol trifosfato
ISGF	Factor del gen estimulado por IFN
ISG	Gen estimulado por IFN
Jak1	Cinasa janus 1
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
kDa	Kilodaltones
MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral
MDA5	Gen asociado a diferenciación de melanoma 5
NCS	Sensores neuronales de calcio
NCX	Intercambiador sodio/calcio
NFAT	Factor activado en células T
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PMCA	ATPasa de calcio
PRR	Receptor de reconocimiento de patógenos
PTP	Poro de transición permeable
PUC	Proteína de unión a calcio
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA_v	Ácido ribonucleico viral
ROC	Canal operado por receptor
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
siRNA	Pequeños ARNs interferentes
SOC	Canal operado por reservorios

SPCA	ATPasa de calcio de la vía secretoria
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción
TLR	Receptor tipo Toll
TRIF	Inductor de IFN con dominio TIR
TRP	Canal iónico receptor de potencial transitorio
Tyk2	Tirosina cinasa 2
UTR	Región no traducida
VOC	Canales operados por voltaje
WNV	Virus del oeste del Nilo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Distribución global de dengue.	7
2	Clasificación de dengue.	9
3	Ciclo replicativo de DENV.	11
4	Producción de IFN de tipo I en células infectadas por DENV.	17
5	Respuesta a IFN de tipo I.	18
6	Esquema de la maquinaria de señalización de Ca^{2+} , el rango de afinidades de unión a Ca^{2+} y la escala de tiempo de actividades moduladas por Ca^{2+} .	22
7	Representación del motivo de mano EF.	23
8	Modelo de la estructura de calreticulina.	25
9	La infección por DENV2 en células Huh-7 incrementa la abundancia de CRT.	36
10	La infección con DENV2 no modifica la distribución subcelular de CRT.	37
11	El silenciamiento de CRT reduce la expresión de la proteína viral NS3 y la secreción de la proteína NS1.	38
12	El silenciamiento de CRT afecta la señalización de la respuesta inmune en células Huh-7 infectadas con DENV.	39
13	La disminución de Ca^{2+} intracelular impacta en la infección con DENV2 en células Huh-7.	41
14	La disminución de Ca^{2+} intracelular impacta en la producción de virus liberados por las células Huh-7 infectadas con DENV2, así como en las proteínas virales NS1 y NS3.	42
15	La disminución de Ca^{2+} intracelular incrementa los niveles de fosforilación de AKT en las células Huh-7 infectadas con DENV2.	43
16	Análisis In silico de las interacciones proteína-proteína de las proteínas alteradas durante el silenciamiento de CRT y el tratamiento con BAPTA-AM en células infectadas con DENV.	45

RESUMEN

El virus del dengue (DENV) es el agente causal de una de las enfermedades transmitidas por mosquito vector más comunes en el mundo. La replicación de este virus ocurre en el citoplasma, particularmente en asociación con el retículo endoplásmico (RE), sitio en el cual se llevan a cabo la replicación y traducción del genoma viral, así como el ensamblaje de los viriones inmaduros. Por estas razones, el RE es esencial para la replicación del DENV. Una proteína esencial del RE, es la calreticulina (CRT). Esta proteína tiene funciones de chaperona y además participa en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} . Estudios diversos han determinado que CRT se requiere durante la replicación de varios agentes virales. Notablemente, durante la infección por DENV, CRT es sobreexpresada en las formas graves de la enfermedad y promueve el ensamblaje correcto de las proteínas virales, así como la replicación eficiente del virus en el RE. Considerando los papeles cruciales de CRT en otras infecciones virales y que se encuentra sobreexpresada en células infectadas con DENV, evaluamos el papel de esta proteína en la replicación de DENV y en la modulación de la respuesta inmune innata. El silenciamiento de CRT redujo significativamente la síntesis de proteínas virales y aumentó la fosforilación de las proteínas de respuesta inmune TAK1 y STAT6, sugiriendo que DENV requiere de CRT para modular negativamente la respuesta inmune innata en células Huh-7. En concordancia, también se observó que el tratamiento de células infectadas con el quelante intracelular de calcio, BAPTA-AM, redujo los niveles de infección de DENV2, aumentando la fosforilación de AKT y afectando el ciclo de replicación viral al disminuir el calcio intracelular. De tal manera que se concluye que el virus DENV requiere a la CRT para replicarse y para evadir la respuesta inmune en las células Huh-7. Así mismo, la disminución del calcio intracelular, mediante el tratamiento con BAPTA-AM, reduce la infección por el DENV2 aumentando la fosforilación de AKT y afectando el ciclo de replicación viral.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is the causal agent of one of the most common arboviral diseases in the world. Viral replication occurs in the cytoplasm and particularly in the endoplasmic reticulum (ER), where the viral genome is replicated and translated. The assembly of immature virions also takes place in ER. For these reasons, the ER is essential for DENV virus replication. Calreticulin (CRT) is a crucial ER protein that performs two significant functions: as a chaperone and regulating Ca^{2+} homeostasis. Many studies have shown that CRT is required during different viral infections. Notably, in DENV infection, CRT is overexpressed in severe forms of the disease and promotes the correct folding of viral proteins and efficient replication of the virus in the ER. Considering the crucial roles of CRT, we evaluated in this study the role of CRT in DENV replication and immune response signaling. CRT silencing significantly reduced the synthesis of viral proteins and also increased phosphorylation levels of the innate immune response proteins TAK1 and STAT6, suggesting that DENV requires CRT for viral replication to avoid the innate immune response in Huh-7 cells. Additionally, the Ca^{2+} reduction through BAPTA-AM treatment, reduced DENV2 infection by increasing AKT phosphorylation levels and by diminishing intracellular Ca^{2+} levels.

INTRODUCCIÓN

Los Flavivirus son un género de virus de RNA pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, el cual incluye al menos 73 virus distintos, varios de ellos, patógenos de humanos transmitidos por artrópodos. Dentro de este género se encuentra el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Oeste del Nilo (WNV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del dengue (DENV), entre otros (Kuhn, J. R, 2011).

DENV es un arbovirus de gran importancia en la salud, principalmente en los países en desarrollo. Existen cuatro serotipos de DENV (DENV1-4), cualquiera de los cuales puede ser transmitido al hombre por la picadura de las hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente los de la especie *A. aegypti*, aunque también pueden servir como vector los mosquitos de la especie *A. albopictus* (WHO, 2020).

El dengue se considera la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo. Se estima que el dengue afecta a 128 países, produciéndose 390 millones de infecciones cada año, de las cuales 96 millones se manifiestan clínicamente, cualquiera que sea la gravedad de la enfermedad. Según la OMS el número de casos notificados pasó de 2,2 millones en 2010 a más de 3,4 millones en 2019 (Bhatt et al., 2013; Brady et al., 2012; WHO, 2020).

Hoy en día, la transmisión de dengue se presenta en los trópicos, siendo las zonas más afectadas los países de Asia y de América Latina, convirtiéndose en una de las principales causas de hospitalización y de muerte en niños y adultos de dichas regiones (Figura 1) (Bhatt et al., 2013; WHO, 2020). El año 2016 se caracterizó por grandes brotes de dengue en todo el mundo. La Región de las Américas notificó más de 2, 380, 000 casos ese año. De acuerdo con datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el número de casos reportados en 2019 es el mayor registrado en la historia del dengue en las Américas. Además, la proporción de casos de dengue grave fue de 0.9 % superando a lo observado en los cuatro años previos (OPS/OMS,

2020)

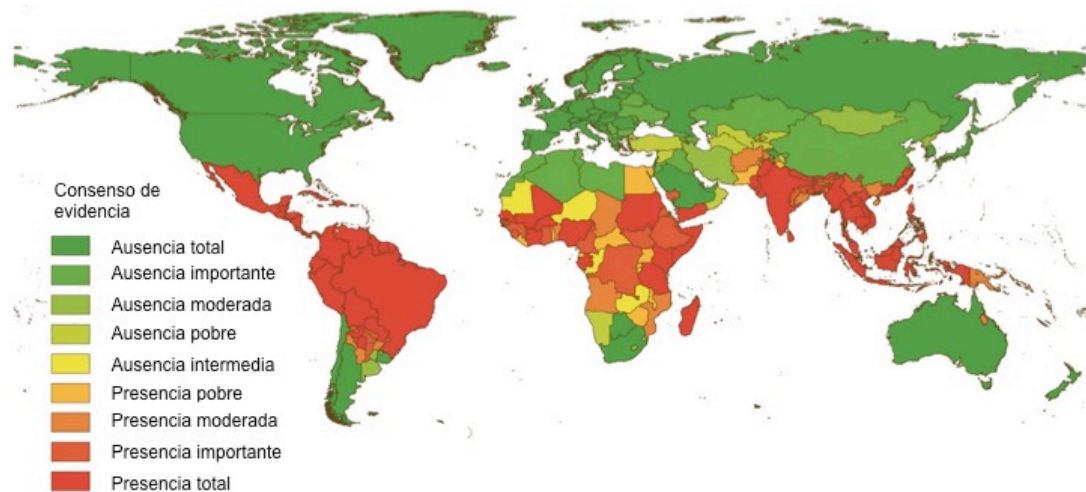


Figura 1. Distribución global de dengue modificado de Bhatt et al., 2013.

En los países en desarrollo ubicados en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, se combinan distintos factores que favorecen la transmisión viral a través del principal mosquito vector. Entre estos factores se encuentra el rápido crecimiento poblacional, la migración rural-urbana, la infraestructura urbana básica inadecuada (suministro de agua poco fiable que lleva al almacenamiento de agua en contenedores cercanos a las casas) y un aumento en el volumen de desperdicios sólidos, como contenedores plásticos desechados y otros artículos abandonados que acumulan agua de lluvia y, por lo tanto, pueden servir de *hábitats* para las larvas en zonas urbanas. El aumento en el tráfico aéreo y el fracaso en las medidas de control del vector, han contribuido al aumento global del dengue y del dengue grave (WHO, 2013).

Los registros de la transmisión del dengue en México datan de 1941, cuando se notificaron 6, 955 casos y una tasa de 34.4 por cada 100, 000 habitantes; cifras que fueron descendiendo a medida que avanzaba la erradicación del vector, certificada hasta 1963. Sin embargo, el dengue reapareció a finales de los años setenta, en Tapachula y se diseminó por el territorio en menos de 10 años (Narro & Gómez, 1995). Para 2019 se reportaron 268, 458 casos probables, de los cuales se confirmaron 41, 505 casos de dengue; de esos casos 27, 884 fueron de Dengue no grave (DNG), 10, 264 de dengue con

signos de alerta (DCSA), 3, 357 de dengue grave (DG) y 13, 621 de dengue con signos de alerta + dengue grave (DCSA+DG); todos estos casos se presentaron en la mayoría de los estados de la República Mexicana, excepto en la Ciudad de México y Tlaxcala; siendo Jalisco el estado con mayor incidencia, con 141.6 casos totales de dengue por 100 mil habitantes. En el país se encuentran en circulación los cuatro serotipos de DENV, siendo los más predominantes en 2019, los serotipos DENV1 y 2 (Secretaría de Salud, 2019).

PATOGENIA

La OMS, a partir del 2009, clasifica al dengue de acuerdo con su severidad, en dengue no grave (DNG) sin signos de alerta, dengue no grave con signos de alerta (DCSA) y en dengue grave (DG) (Figura 2) (WHO et al., 2009).

El dengue sin signos de alerta se define como una combinación de dos o más signos clínicos en una persona febril que haya viajado a un área endémica de dengue o vivía en ella. Los signos clínicos incluyen náuseas, vómitos, salpullido, dolores articulares, leucopenia y un resultado positivo de la prueba de torniquete. Los signos de alerta son dolor o sensibilidad en el estómago, vómitos persistentes, acumulación de líquido, hemorragia de mucosas, letargo, inquietud y hepatomegalia. Mientras que el DG se define por la presencia de extravasación grave del plasma que cause choque o acumulación de líquido con disnea, hemorragia grave; o deterioro grave de los órganos, como el presentar transaminasas elevadas de igual o más de 1000 IU/L, compromiso de conciencia o insuficiencia cardíaca.

El dengue se presenta en tres fases, la fase febril, la fase crítica y la fase de convalecencia. La fase febril se caracteriza por fiebre aguda por encima de 40°C y puede durar de 2 a 7 días. Los síntomas de esta fase son dolor en la parte frontal de la cabeza, dolor retroocular, dolor de músculos y de articulaciones, erupción macular o maculopapular; y manifestaciones hemorrágicas menores como petequia, hematoma, púrpura, epistaxis, sangrado de las encías, hematuria, o un resultado positivo de la prueba de

torniquete.(CDC, 2019; Gubler, 1998; Mangold & Reynolds, 2013; Rigau-Pérez et al., 1998).

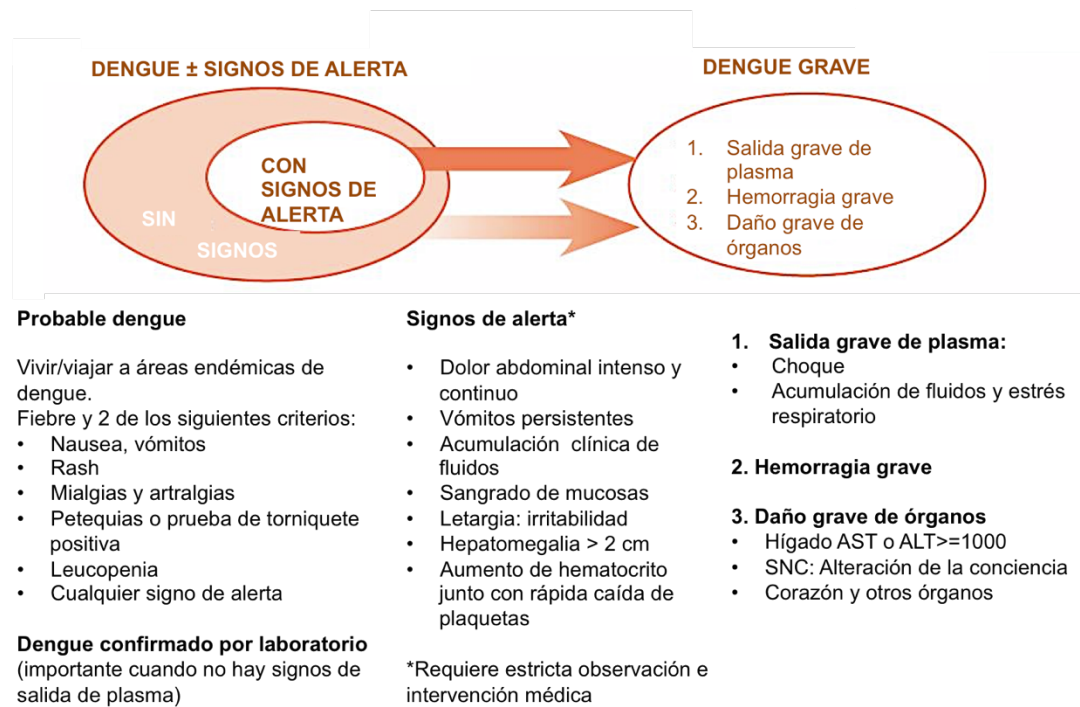


Figura 2. Clasificación de dengue modificado de Hadinegoro, 2012.

Los signos de advertencia de la evolución hacia el dengue grave ocurren en la última parte de la fase febril. La fase crítica, tiene lugar entre los días 3 a 7 después del inicio de los síntomas. En esta fase, algunos pacientes mejoran, mientras que otros comienzan a desarrollar aumento en la permeabilidad capilar que los lleva a desarrollar DG. Se puede presentar leucopenia durante el inicio de la fase febril, el hematocrito puede estar elevado y puede haber trombocitopenia durante la fase crítica (Mangold & Reynolds, 2013). Los pacientes que empeoran clínicamente después de que pasa la fase febril, deben ser monitoreados por los signos de alerta y por las manifestaciones hemorrágicas adicionales ya mencionadas. Durante esta fase crítica puede presentarse choque por extravasación de plasma, sangrado severo y compromiso importante de los órganos. Los pacientes también pueden presentar manifestaciones hemorrágicas severas como hematemesis, heces con sangre, o menorragia, especialmente si han estado en *shock* prolongado. Las manifestaciones poco frecuentes incluyen hepatitis, miocarditis, pancreatitis y encefalitis (CDC, 2019; OPS/OMS, 2020)

Finalmente, la fase de convalecencia o recuperación se presenta cuando la extravasación del plasma disminuye, al superar la fase crítica, que no es mayor a las 48-72 h. En esta fase el paciente comienza a reabsorber los líquidos intravenosos extravasados y los derrames pleurales y abdominales. Se estabiliza el estado homodinámico y ocurre la diuresis. El hematocrito se estabiliza, o podría bajar debido al efecto de dilución del líquido reabsorbido, y el recuento de glóbulos blancos comienza a aumentar, seguido de una recuperación del recuento de plaquetas (CDC, 2019; OPS/OMS, 2020)

La infección por DENV produce un amplio espectro de síntomas, muchos de los cuales no son específicos de esta enfermedad. Por lo tanto, un diagnóstico basado únicamente en síntomas clínicos no es confiable (Buchy, P. et al., 2009). Una prueba de laboratorio que puede ser útil en el diagnóstico de dengue es un conteo completo de células sanguíneas (que permita demostrar leucopenia, trombocitopenia y posibles anormalidades en el hematocrito). Existen pruebas más específicas como el cultivo celular, aunque este requiere hasta 2 semanas para obtener resultados, es de costo elevado y no es muy sensible, pero permite diagnosticar el serotipo de virus causante de la infección. El RT-PCR es rápido y sensible, aunque también es costoso. El ensayo de ELISA es la prueba más utilizada, detecta inmunoglobulinas (Ig) específicas anti-dengue, IgM o IgG; los IgM son el primer isotipo en aparecer tras la infección, estos son detectables en 50% de los pacientes en los días 3-5 de la enfermedad, aumentan a 80% para el día 5 y a 99% para el día 10. Mientras que los anticuerpos anti-dengue isotipo IgG en suero, en infecciones primarias son generalmente detectables a bajos títulos al final de la primera semana de la enfermedad, aumentando lentamente y siendo detectables después de varios meses (Buchy, P. et al., 2009; Mangold & Reynolds, 2013).

Hoy en día, la prueba más empleada para el diagnóstico de dengue es la detección de la proteína no estructural NS1 en suero. Esta prueba resulta positiva desde el día uno o dos después del inicio de la fiebre, además es altamente confiable y específica, aunque presenta una sensibilidad variable para los distintos serotipos. Se ha reportado que la concentración de NS1 circulante es mayor en individuos infectados con DENV1, que en infecciones

causadas por DENV2. Además, se sugiere que durante infecciones primarias, los niveles de NS1 circulante son mayores en pacientes con DG que en pacientes con DNG (de la Cruz-Hernández et al., 2013; Pan American Health Organization et al., 2016).

CICLO REPLICATIVO

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios, que requieren que la célula huésped provea las moléculas necesarias para su replicación. Para replicarse, los virus deben transportar su genoma dentro de la célula huésped, en donde el genoma dirige la síntesis de las proteínas virales, es replicado y empaquetado para formar los nuevos viriones (Figura 3) (Acheson N. H, 2011).

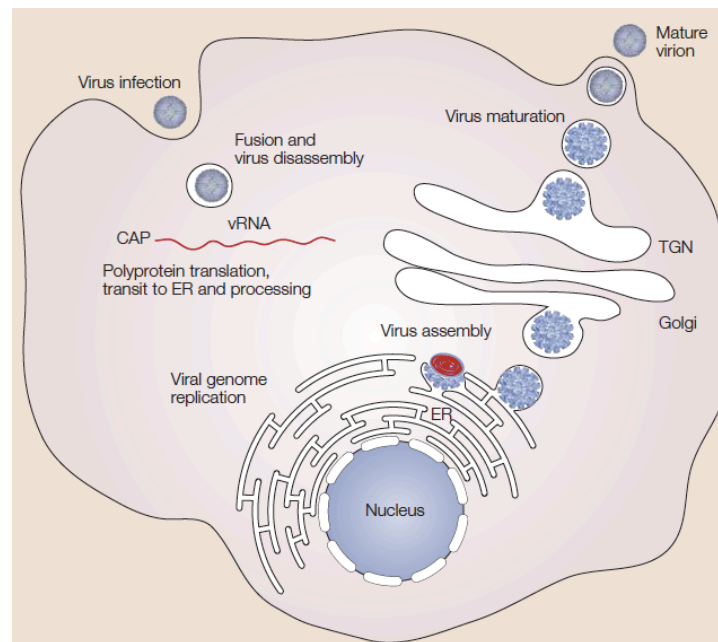


Figura 3. Ciclo replicativo de DENV. Los viriones se unen a la superficie de la célula huésped y entran por endocitosis mediada por receptor. En el endosoma acidificado se fusiona la membrana del virión a la membrana de esta vesícula y se libera el genoma al citoplasma, donde es traducido y replicado. El virus se ensambla en la superficie del RE, las partículas virales inmaduras se transportan por la red del trans-Golgi, donde maduran gracias a la acción de la furina y se liberan por exocitosis (Mukhopadhyay et al., 2005).

El genoma de DENV consiste en una cadena de RNA positivo de ~11kb. Este RNA codifica 3 proteínas estructurales (C, prM y E) que forman la partícula viral, y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) involucradas en la replicación del RNA viral (Figura 3). Las partículas del

DENV son icosaédricas con un tamaño de 50 nm de diámetro (Perera & Kuhn, 2008a).

Múltiples copias de la proteína C (11kDa) encapsidan el RNA para formar la nucleocápside viral. La nucleocápside está rodeada de una bicapa lipídica derivada de la célula huésped, en la cual se encuentran ancladas 180 copias de las proteínas M y E. La proteína M es un fragmento proteolítico pequeño (~ 8 kDa) de su forma precursora prM (~21 kDa). La proteína E (53 kDa) tiene tres dominios estructurales distintos. El dominio I está posicionado entre el dominio II, que es el dominio de homodimerización, y el dominio III, de tipo inmunoglobulina (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

El virus entra a una célula huésped permisiva vía endocitosis mediada por receptores. La glicoproteína E es la que interacciona con el complejo receptor a través de su dominio III. *In vitro*, DENV ha demostrado ser capaz de infectar diversas células humanas, incluyendo células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos, células cardíacas y células neuronales. El amplio rango de células permisivas a DENV indica que el virus debe unirse a una molécula de superficie celular ubicua o aprovechar múltiples receptores para entrar a la célula (Clyde et al., 2006; Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Algunos receptores que se han identificado en células de mamífero son el heparán sulfato, Hsp70 y 90, un receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa, así como lectinas de adhesión específica tipo DC (DC-SIGN) entre otras (Y. Chen et al., 1997; Reyes-Del Valle et al., 2005; Tassaneetrithep et al., 2003; Thepparit & Smith, 2004)

Para que la partícula viral entre a la célula, inicialmente es capturada por un receptor de baja afinidad ubicuo y posteriormente se une a un receptor de alta afinidad, que es menos común, lo que media la internalización del virión en endosomas de clatrina (Clyde et al., 2006; Rodenhuis-Zybert et al., 2010). El ambiente ácido de los endosomas tardíos induce la disociación de los homodímeros de E, esto lleva a que se proyecte el dominio II de E y se exponga el péptido hidrofóbico de fusión que se inserta en la membrana del endosoma y de esta manera se forman trímeros de E. Posteriormente, el

dominio III se dobla hacia el péptido de fusión en una conformación de tipo horquilla, lo que obliga a la membrana del endosoma y a la membrana viral a acercarse y, finalmente a fusionarse liberando la nucleocápside hacia el citoplasma celular (Fernandez-Garcia et al., 2009; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Una vez que el genoma viral es liberado al citoplasma, el RNA al ser de polaridad positiva, se traduce en el retículo endoplásmico (RE) a una poliproteína que es procesada co- y post-traduccionalmente por las proteasas virales y de la célula hospedera para producir las proteínas virales maduras, entre las que se encuentra la replicasa viral (NS5) (Mukhopadhyay et al., 2005). El genoma de este flavivirus funciona como un RNAm celular pues contiene una caperuza de tipo 1,7- metilguanosa en 5', una región no traducida (UTR) 5', un solo marco abierto de lectura y una 3' UTR; sin embargo, este RNAm no está poliadenilado y se ha propuesto que su circularización, necesaria para la replicación viral, ocurre a través de la interacción directa de los dominios de circularización (CS) 5' y 3' y las regiones terminales 5' y 3' UTR (Figura 3) (Clyde et al., 2006; Paranjape, S. M & Harris, E, 2010).

El mecanismo que usa DENV para competir por la maquinaria de traducción celular no es el de apagar la traducción de la célula huésped, sino el de llevar a cabo procesos virales en estructuras aisladas, derivadas de las membranas del RE, asegurando que la traducción, replicación y empaquetamiento del genoma sean orquestados eficientemente en compartimentos que protegen y dan andamiaje para que estos procesos virales ocurran eficientemente (Paranjape, S. M & Harris, E, 2010). Las vesículas derivadas del RE son sitios de replicación del RNAv y están conectadas con el citosol a través de un poro que, presumiblemente sirve como sitio de salida del RNA de la progenie viral. El RNA se asocia con la proteína de la cápside formando un complejo que gema hacia el lumen del RE, adquiriendo la membrana lipídica que tiene embebidos a los heterodímeros de E y a la proteína prM. Estas partículas inmaduras son transportadas a través de la vía de secreción celular y experimentan un paso de maduración, en el cuál, la furina corta a la proteína

prM en la red del trans-Golgi (Fischl & Bartenschlager, 2011; Welsch et al., 2009). El producto de la ruptura de la prM permanece asociado a la proteína E, evitando la fusión prematura de la partícula durante la secreción, pr es liberado solamente después de que la partícula viral ha salido de la célula (Fischl & Bartenschlager, 2011).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

De las proteínas virales no estructurales, las que se han caracterizado más extensivamente son la NS3, su cofactor NS2B y NS5. La NS3 es una proteína con un dominio proteasa en la región N-terminal y en una porción de la región C-terminal, además tiene las actividades de RNA trifosfatasa y RNA helicasa, involucradas en la adición del Cap al RNA viral (*capping*) y la síntesis de RNA viral, respectivamente. La actividad de proteasa de la NS3 depende de la presencia de su cofactor, NS2B que se encuentra conservado entre los flavivirus (Bollati et al., 2010; Clyde et al., 2006; Perera & Kuhn, 2008a).

La proteína NS5, es la más grande de los flavivirus y la más conservada del género. Es una enzima bifuncional con un dominio metiltransferasa N-terminal y un dominio C-terminal de polimerasa de RNA dependiente de RNA. La actividad de metiltransferasa de esta proteína es esencial para el *capping* del RNA viral (Bollati et al., 2010; Clyde et al., 2006).

Las proteínas menos caracterizadas son las proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A y NS4B. Estas están implicadas en la localización apropiada de proteínas virales y el RNA viral en los sitios de síntesis del RNA. La NS4A participa en la inducción de la formación de invaginaciones de la membrana del RE. Se ha demostrado que la NS4B y, en un menor grado, la NS2A y la NS4A son capaces de bloquear la transducción de señales mediada por interferón (IFN) (Clyde et al., 2006; Miller et al., 2007).

Finalmente, la proteína NS1, tiene un peso molecular de 46-55 kDa, dependiendo de su estado de glicosilación y puede presentar múltiples formas oligoméricas en distintas localizaciones celulares: asociada a la membrana

celular (mNS1), en compartimentos vesiculares dentro de la célula o en la superficie celular, y como una forma secretada de la célula (sNS1), siendo ésta una proteína rica en lípidos (Muller & Young, 2013). La NS1 está glicosilada en dos sitios, N130 y N207 y ambas glicosilaciones se requieren para la replicación viral en células de mosquito y para la neurovirulencia en ratones (Clyde et al., 2006).

La sNS1 es uno de los principales antígenos responsables de la formación del complejo inmune, que es capaz de desencadenar procesos inflamatorios; y es un importante activador del complemento. Se ha demostrado que NS1 se une a distintos componentes de la vía del complemento, así como a otras proteínas regulatorias de la célula huésped. Entre estas proteínas se encuentra el factor de regulación del complemento H (fH), las proteínas del complemento C4b, hnRNP C1/C2 y STAT3 β (Avirutnan et al., 2011; Chua et al., 2005; Muller & Young, 2013; Noisakran et al., 2008).

RESPUESTA INMUNE INNATA A LA INFECCIÓN POR DENV

Las células de mamíferos utilizan a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) para detectar patógenos invasores. Estas proteínas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) producidos durante el curso de la infección. Dos clases de PRRs, los receptores tipo toll (TLRs) y los receptores tipo RIG-I (RLRs), son esenciales para la respuesta a la infección viral. Los PRRs reconocen distintas estructuras virales y/o características estructurales; sin embargo, todos funcionan iniciando cascadas de señalización que resultan en la activación de factores de transcripción críticos para el comienzo de la respuesta del interferón de tipo 1 (IFN- α/β) (Muñoz-Jordán & Fredericksen, 2010).

En el citoplasma de las células infectadas el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) y el gen asociado a diferenciación de melanoma 5 (MDA5), reconocen al RNA viral de doble cadena ajeno a la célula. Estos interactúan con la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) e inducen la producción de IFN de tipo 1, citocinas proinflamatorias y la expresión de genes

estimulados por IFN (ISGs). Una vez que se une al RNA de doble cadena, RIG-I se oligomeriza de manera dependiente de ATP. Las proteínas RIG-I y MDA5 activan MAVS, para que ésta interaccione con la proteína estimuladora de genes de interferón del RE (STING). Una vez activado, MAVS se oligomeriza y atrae múltiples ubiquitina E3 ligasas como TRAF3 y TRAF6 para activar la cascada de señalización. La activación de TRAF3 resulta en la translocación del IRF3 y del IRF7 al núcleo para inducir la transcripción de IFN- α/β . Además, la activación de TRAF6 resulta en la translocación de NF κ B al núcleo y la producción de IFN- α/β (Figura 4) (Green et al., 2014; Suthar et al., 2013).

Otra forma en que las células reconocen a los PAMPS, es a través de los TLRs, en particular los TLR-3, TLR-7 y TLR-8 son sensores intracelulares y de las primeras líneas de defensa en el reconocimiento por parte del sistema inmune del RNA de doble cadena, del RNA de cadena sencilla y del RNA modificado. Estos TLRs se encuentran en compartimentos intracelulares de la vía endocítica en las células de origen inmune. El principal TLR involucrado en el reconocimiento de una infección por DENV, es el TLR-3, el cual reconoce el RNA del DENV después de la acidificación del endosoma y se ha demostrado que induce fuertes respuestas de IL-8 e IFN- α/β *in vitro*. El reconocimiento del RNA viral por parte de TLR-3 resulta en la fosforilación de TRIF (Inductor de IFN- β con dominio TIR). TRIF interacciona con los factores asociados a los receptores TNF, TRAF3 y TRAF6. TRAF3 interactúa con la cinasa de unión a TANK 1 y la cinasa I κ B (Ikk1), resultando en la fosforilación de IRF3. Las señales de TRAF6 a través de la asociación con TAK1, activan a Ap-1 e inician la vía de I κ B por Ikk1/ik2, llevando a la activación de NF κ B. La translocación al núcleo de IRF3, Ap-1 y NF κ B inducen la producción de IFN- α/β , ISGs y quimiocinas (Figura 4) (Green et al., 2014).

El IFN- α ha demostrado ser importante para el control de la infección en condiciones clínicas. En un estudio realizado con suero de pacientes con DNG o DG, se compararon los niveles del IFN- α , los cuales fueron más altos en los pacientes con DNG y en infecciones primarias, lo que sugiere que esta

respuesta temprana de IFN- α se correlaciona con una mejor condición clínica (De La Cruz Hernández et al., 2014).

Además de la producción de IFN- α/β , la inducción de la translocación de NF κ B al núcleo, resulta en la producción de pro-IL1 y la activación del inflammasoma, lo cual permite la producción de IL1 e IL18. Ambas citocinas son importantes para la respuesta antiviral y permiten el reclutamiento de células de respuesta inmune al sitio de la infección (Green et al., 2014).

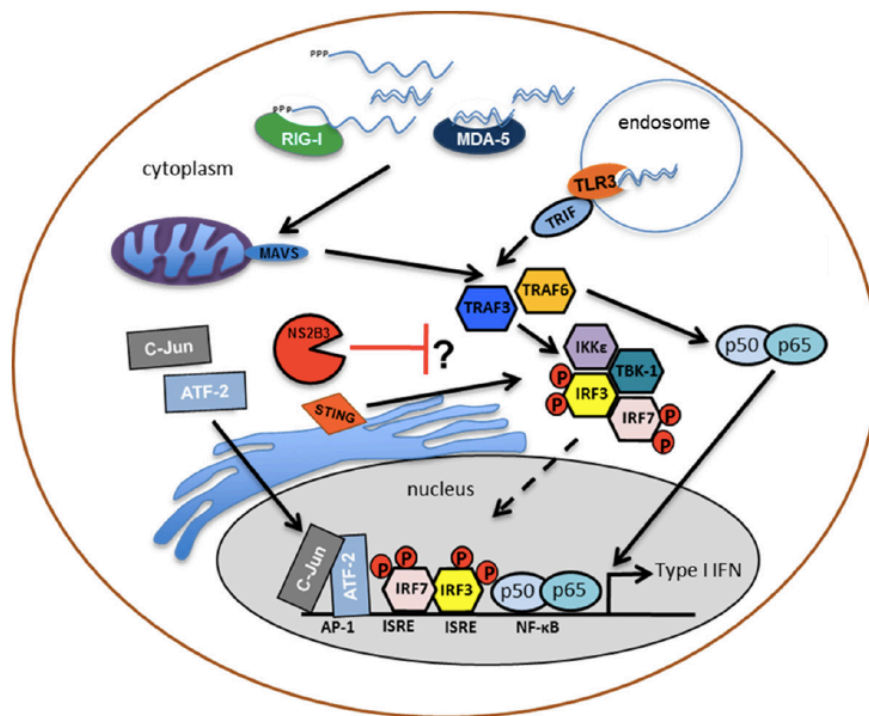


Figura 4. Inhibición de la producción del IFN de tipo I en las células infectadas por DENV. El complejo de proteasa del DENV inhibe la fosforilación de IRF3, dando como resultado una falta de producción de IFN tipo I en DC humanas (Morrison et al., 2012).

El IFN- α/β secretado por las células infectadas, inicia señales de alerta en las células adyacentes, así como una inducción autócrina de respuesta antiviral. La vía de señalización del IFN tipo I es iniciada, cuando el IFN- α/β se une a un receptor del IFN tipo I (IFNAR), el cual está presente en la superficie de la mayoría de las células. Esto provoca la activación de las tirosina-quinasas asociadas al receptor, la cinasa Janus 1 (Jak1) y la tirosina cinasa 2 (Tyk2), las cuales subsecuentemente fosforilan al transductor de la señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) y al transductor de señal y activador de la transcripción 2 (STAT2). STAT1 y STAT2 fosforiladas, junto con el factor

regulador de IFN 9 (IRF9) forman un complejo heterotrimérico conocido como factor de gen estimulado por IFN 3 (ISGF3) que se transloca al núcleo y se une al elemento de respuesta estimulado por el IFN (ISRE) que se encuentra arriba de los genes estimulados por el IFN (ISGs) (Figura 5). Existen cientos de ISGs y muchos de sus productos han demostrado poseer actividades antivirales. Entre estos ISGs, se encuentran la proteína cinasa R (PKR), viperina, la familia 2',5'-oligoadenilato sintasa (OAS) y la familia de proteínas transmembranales inducidas por IFN (IFITM) (Green et al., 2014; Morrison et al., 2012)

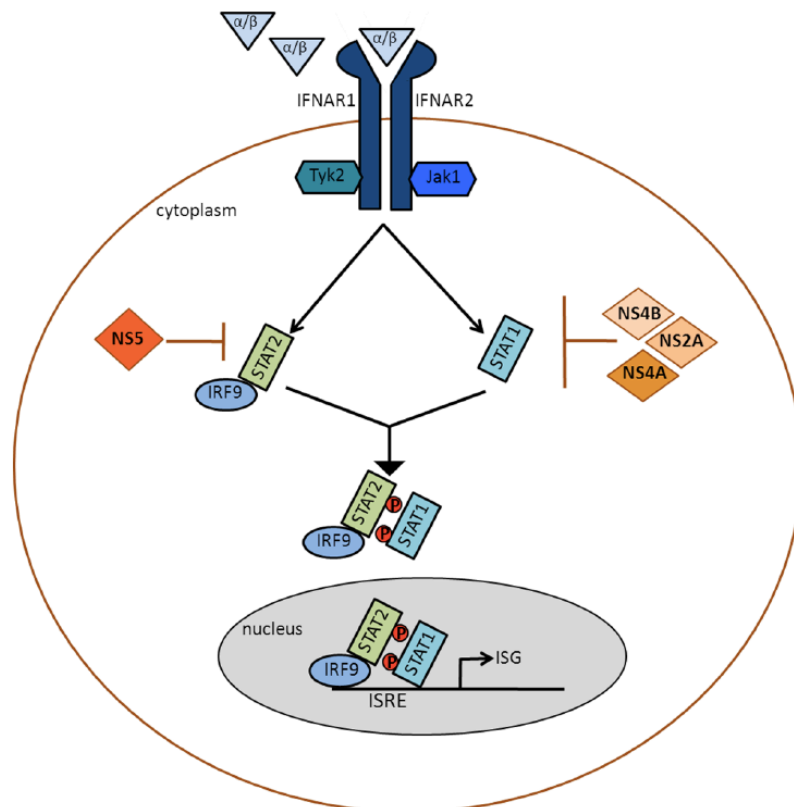


Figura 5. Bloqueo de la respuesta al IFN tipo I. DENV antagoniza esta vía de señalización utilizando NS5 para degradar al STAT2, y usando a NS2A, NS4A y NS4B para inhibir etapas anteriores a la activación del STAT1 (Morrison et al., 2012).

EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR EL DENV

Se ha demostrado que el DENV es un inductor débil de la producción del IFN de tipo I por DCs, lo que resulta en una incapacidad de estas DCs para activar a las células T hacia una inmunidad Th1. Aunque se ha visto que el DENV es capaz de activar la expresión de algunas citocinas proinflamatorias (IL6, IL8 y TNF α) a tiempos tempranos de la infección. Una explicación de esta

característica del DENV, es que el virus ha adquirido, durante la evolución, una estrategia para atraer células blanco al sitio de la infección permitiendo la expresión de algunos quimioatrayentes por las células infectadas. DENV ha evolucionado exitosamente, para sobreponerse a la respuesta inmune innata e infectar al huésped usando una combinación de dos estrategias fundamentales, una es pasiva, evadiendo la interacción de los PAMPS con los PRRs celulares, y la otra es activa, inhibiendo varios pasos de la respuesta inmune innata a través de la expresión de moléculas antagonistas que bloquean directamente las vías intracelulares que llevan a la producción y a la respuesta al IFN del tipo I (Muñoz-Jordán & Fredericksen, 2010).

En la estrategia pasiva, la infección por DENV induce la formación de estructuras membranales intracelulares en forma de vesículas y de membranas complejas en donde se concentran componentes virales y celulares requeridos para la replicación del virus. Este rearrreglo espacial crea un microambiente parcialmente aislado del citoplasma, lo que impide una interacción física con los PRRs del huésped, retrasando la interacción PAMP-PRR hasta que el proceso de replicación sintetice suficientes productos virales para la constitución de una nueva progenie (Morrison et al., 2012; Muñoz-Jordán & Fredericksen, 2010).

En la estrategia activa, las proteínas no estructurales de DENV, NS2A, NS4A, NS4B y NS5 se han visto implicadas en la inhibición de la señal de IFN- α/β por parte del DENV. La proteína NS2B rompe el complejo STING/MITA, interfiriendo con la señal que lleva a la inducción de IFN- α/β (Figura 4). NS5 se une a STAT2 y a través de la proteína UBR4, participa en su degradación, mientras que NS2A, NS4A y NS4B participan en la inhibición de la activación de STAT1, aunque no se ha demostrado el mecanismo por el cual realizan esta inhibición (Angleró-Rodríguez et al., 2014; Green et al., 2014; Morrison et al., 2012, 2013; Morrison & García-Sastre, 2014).

SEÑALIZACIÓN DE CALCIO

El ion calcio tiene un número de coordinación flexible de 4-8, una geometría irregular de coordinación y cinéticas de unión rápidas, lo cual maximiza su

potencial para interactuar con distintos ligandos. El Ca^{2+} tiende a precipitar aniones inorgánicos y orgánicos (a un rango del mM), por lo tanto, una alta concentración de Ca^{2+} es incompatible con la vida, de tal manera que las células ejercen control sobre este ión secuestrándolo, compartimentalizándolo o expulsándolo (Clapham, 2007; Zhou et al., 2009).

Las células invierten gran parte de su energía en efectuar cambios en la concentración de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]$). Existe un gradiente mantenido por las células con una diferencia de más de 10,000 veces entre las concentraciones intracelular ($\approx 100\text{nM}$ de calcio libre) y extracelular (mM). El control en los niveles de Ca^{2+} en los distintos compartimentos celulares u organelos es ejercido a través de la coreografía molecular de un repertorio de moléculas de señalización de Ca^{2+} , incluyendo canales de Ca^{2+} , transportadores de Ca^{2+} , receptores, amortiguadores de Ca^{2+} , proteínas de respuesta a Ca^{2+} (por ejemplo, enzimas sensibles a Ca^{2+} y factores de transcripción) que se distribuyen en el citoplasma, en el retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS), en el complejo de Golgi, en la mitocondria, en el núcleo o en la matriz extracelular (Clapham, 2007; Zhou et al., 2009).

Cientos de proteínas celulares se han adaptado para unirse a Ca^{2+} con distintas afinidades (nM a mM), en algunos casos simplemente para amortiguar o para disminuir los niveles de Ca^{2+} , y en otros para iniciar procesos celulares. Los amortiguadores, que se cargan con Ca^{2+} durante la reacción de entrada y se descargan durante la reacción de salida, funcionan para afinar las propiedades espaciales y temporales de las señales de Ca^{2+} . Pueden alterar la amplitud y el tiempo de recuperación del Ca^{2+} transitorio. Del Ca^{2+} que entra al citosol sólo una pequeña proporción termina siendo Ca^{2+} libre, porque la mayor parte se une rápidamente a los amortiguadores y una menor cantidad, a los efectores (Michael J. Berridge et al., 2003).

Tras un estímulo extracelular, el Ca^{2+} citosólico libre aumenta rápidamente por la entrada del Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática vía canales de Ca^{2+} , tales como los canales operados por voltaje (VOC), los

canales operados por receptor (ROC), canales iónicos receptor del potencial transitorio (TRP por sus siglas en inglés) y los canales operados por reservorios (SOC por sus siglas en inglés); o por la liberación de Ca^{2+} de reservorios internos (como el RE, el complejo de Golgi, y los lisosomas) a través de los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) y de los receptores de rianodina (RyR) debido a la activación de receptores de membrana (receptor acoplado a proteínas G o GPCR y el receptor de tirosina cinasa o RTK) y la subsecuente síntesis del IP3. En el estado basal, la concentración de Ca^{2+} citosólico se mantiene en el rango submicromolar, expulsando Ca^{2+} fuera de la membrana plasmática vía la ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), o bombeando Ca^{2+} de regreso a los reservorios internos a través de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA) o la ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretoria (SPCA). En la mitocondria, el Ca^{2+} puede pasar fácilmente a través de los poros de la membrana exterior mitocondrial y cruzar la membrana interior mitocondrial a través del *uniporter* de Ca^{2+} embebido en la membrana. El Ca^{2+} sale de la mitocondria por la apertura de un poro de transición permeable (PTP) en la membrana interior mitocondrial y por el intercambiador de $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Las señales de Ca^{2+} afectan la actividad de amortiguadores de Ca^{2+} (por ejemplo, la calreticulina), efectores de Ca^{2+} (como la calmodulina y S100A10) y las enzimas reguladas por Ca^{2+} . Las señales pueden tener efectos de “largo plazo” a través de la modulación de factores transcripcionales, incluyendo al factor activado en células T (NFAT) o cotransactivadores dependientes de Ca^{2+} (como p300) (Figura 6) (Michael J. Berridge et al., 2003; Zhou et al., 2009)

Virus y la señalización de calcio.

Habiendo evolucionado para utilizar la maquinaria celular, los virus se apropian o interrumpen las vías de señalización del calcio y otros procesos dependientes de este ión para lograr sus propios fines. El Ca^{2+} ha demostrado tener una función en prácticamente todos los pasos de los ciclos de replicación virales. La interacción entre los virus y el Ca^{2+} en las células infectadas se puede clasificar en tres categorías principales: (1) las proteínas virales directa o indirectamente, afectan la homeostasis del Ca^{2+} al alterar la

permeabilidad de la membrana y/o manipulando componentes clave del aparato de señalización de Ca^{2+} ; (2) las proteínas virales se unen directamente al Ca^{2+} para tener integridad estructural o funcionalidad; y (3) interacciones críticas entre el virus y la célula huésped dependen de las proteínas o las vías de señalización celulares reguladas por el Ca^{2+} (Zhou et al., 2009).

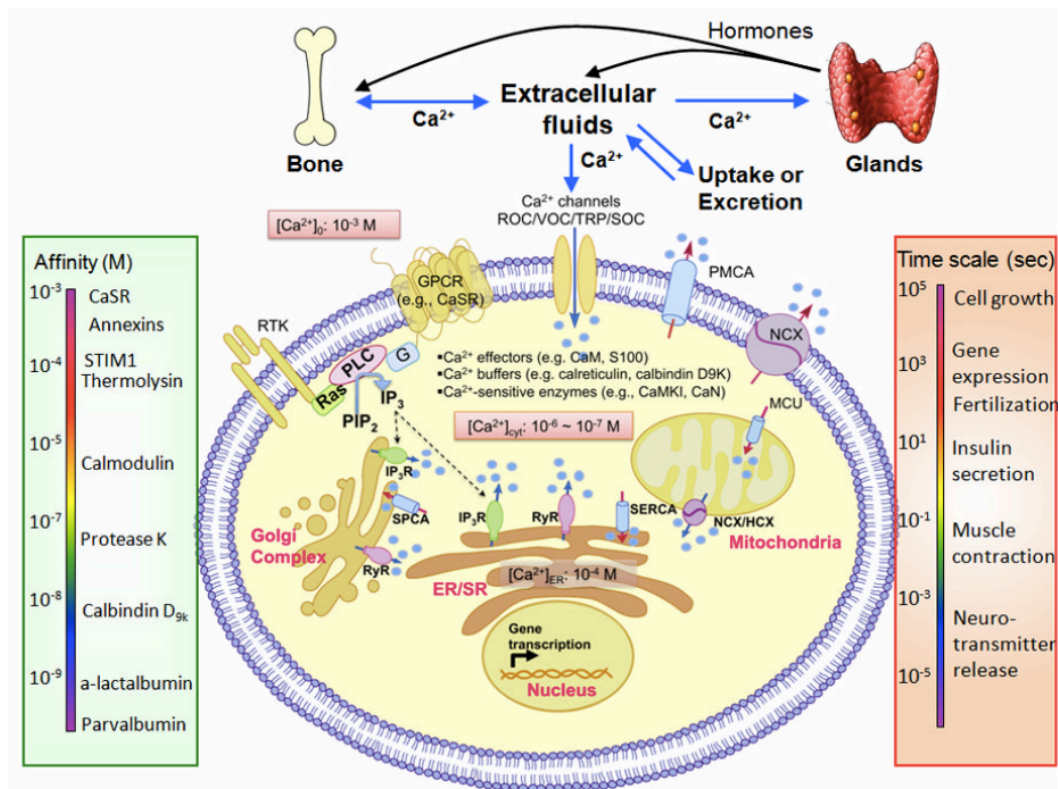


Figura 6. Esquema de la maquinaria de señalización del Ca^{2+} , el rango de afinidades de unión a Ca^{2+} y la escala de tiempo de actividades moduladas por Ca^{2+} . La homeostasis de Ca^{2+} extracelular es mantenida por la acción coordinada de hormonas, células del hueso y el balance entre la absorción y secreción de Ca^{2+} en el intestino y el riñón. La homeostasis intracelular de Ca^{2+} se logra a través de la exquisita coreografía de la caja de herramientas de señalización de Ca^{2+} . Las proteínas de unión al Ca^{2+} tienen afinidades que varían 10^6 veces o más, dependiendo de su localización y función (panel de la izquierda). El Ca^{2+} puede ejercer efectos a corto plazo activando la liberación de neurotransmisores en microsegundos. Las señales, también pueden iniciar efectos de “largo plazo” modulando la expresión de genes (panel de la derecha) (Zhou et al., 2013).

PROTEÍNAS DE UNIÓN A CALCIO

El papel de Ca^{2+} como segundo mensajero depende en gran medida de un amplio número de las llamadas proteínas de unión a calcio (PUC), estas son proteínas heterogéneas que pueden unirse a este ión a través de dominios específicos (Yáñez et al., 2012).

Las PUC pueden subdividirse en dos categorías: Las PUC intrínsecas de membrana, que modulan la concentración de Ca^{2+} al transportarlo a través de las membranas celulares, entre estas se incluyen los canales y transportadores de Ca^{2+} ; y las proteínas moduladas por Ca^{2+} , las cuales son proteínas que no sólo contribuyen a la concentración de este ión, sino también decodifican sus señales al actuar como sensores (Yáñez et al., 2012).

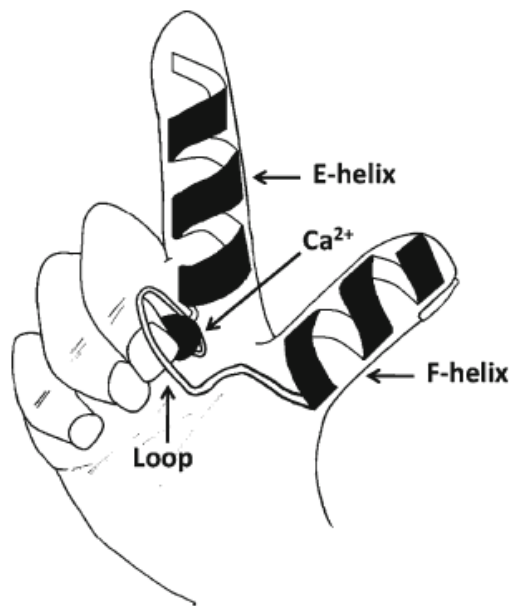


Figura 7. Representación del motivo mano EF.

Otra forma de clasificar a las PUC es por la presencia o ausencia de un dominio de unión a Ca^{2+} denominado dominio mano EF. El dominio mano EF clásico es un motivo hélice-giro-hélice caracterizado por una secuencia de 12 residuos flanqueados con dos alfa-hélices posicionadas perpendicularmente una con respecto a la otra en un arreglo espacial similar a los dedos pulgar e índice levantados en la mano humana. En el "loop" que se integra en esta secuencia se pueden acomodar los iones Ca^{2+} o Mg^{2+} y la afinidad del motivo por estos iones es un factor determinante de la función de la proteína (Figura 7). Dentro de las PUC que presentan el dominio mano EF se encuentran las familias de la parvalbumina, de la calmodulina, S100, la calcineurina y las NCS (sensores de calcio neuronales); mientras que dentro de las PUC sin el dominio mano EF se encuentran varias proteínas intracelulares de gran importancia como lo son la calsecuestrina, las anexinas y la calreticulina, entre otras (Yáñez et al., 2012).

CALRETICULINA

La calreticulina (CRT) se encuentra en el lumen del RE, es codificada por un único gen y no existe evidencia de que haya *splicing* alternativo del RNAm para la CRT. La proteína tiene un peso molecular de 46 kDa, está conformada por tres dominios: el N, el P y el C (M Michalak et al., 1999; Marek Michalak et al., 2009).

En el dominio N-terminal tiene una secuencia escindible que la dirige hacia el RE. Se predice que esta mitad de la proteína es globular, compuesta por ocho beta-helices antiparalelas; además este dominio incluye sitios de unión a polipéptidos y carbohidratos, un sitio de unión al Zn^{2+} y un sitio de enlace disulfuro (Figura 8). Así mismo este dominio de la CRT forma un núcleo estable que es resistente a la proteólisis en presencia del Ca^{2+} (Marek Michalak et al., 2009).

El dominio P se encuentra en la porción media de la proteína y es rico en prolina. En este dominio se encuentran un par de repetidos, el repetido A, IXDPXA/DXKPEDWDX, y el repetido B, GXWXPPXIXNPXYX (Figura 8). La CRT presenta tres sets de repetidos AB, los cuales pueden estar involucrados en la función de tipo lectina de CRT. La estructura del dominio P contiene una región extendida estabilizada por tres beta-plegadas antiparalelas que interaccionan con la proteína ERp57, lo cual es importante para la función de chaperona de CRT (Marek Michalak et al., 2009).

Finalmente, el dominio C-terminal tiene una secuencia KDEL, que la retiene en el RE. Además, este dominio es de especial interés, ya que contiene una gran cantidad de residuos cargados negativamente que son responsables por la función de buffer de Ca^{2+} de la proteína (Figura 8). La CRT se une a más del 50% del Ca^{2+} del lumen del RE con gran capacidad (25 mol de Ca^{2+} por mol de proteína) y baja afinidad ($K_d = 2mM$) (M Michalak et al., 1999; Marek Michalak et al., 2009).

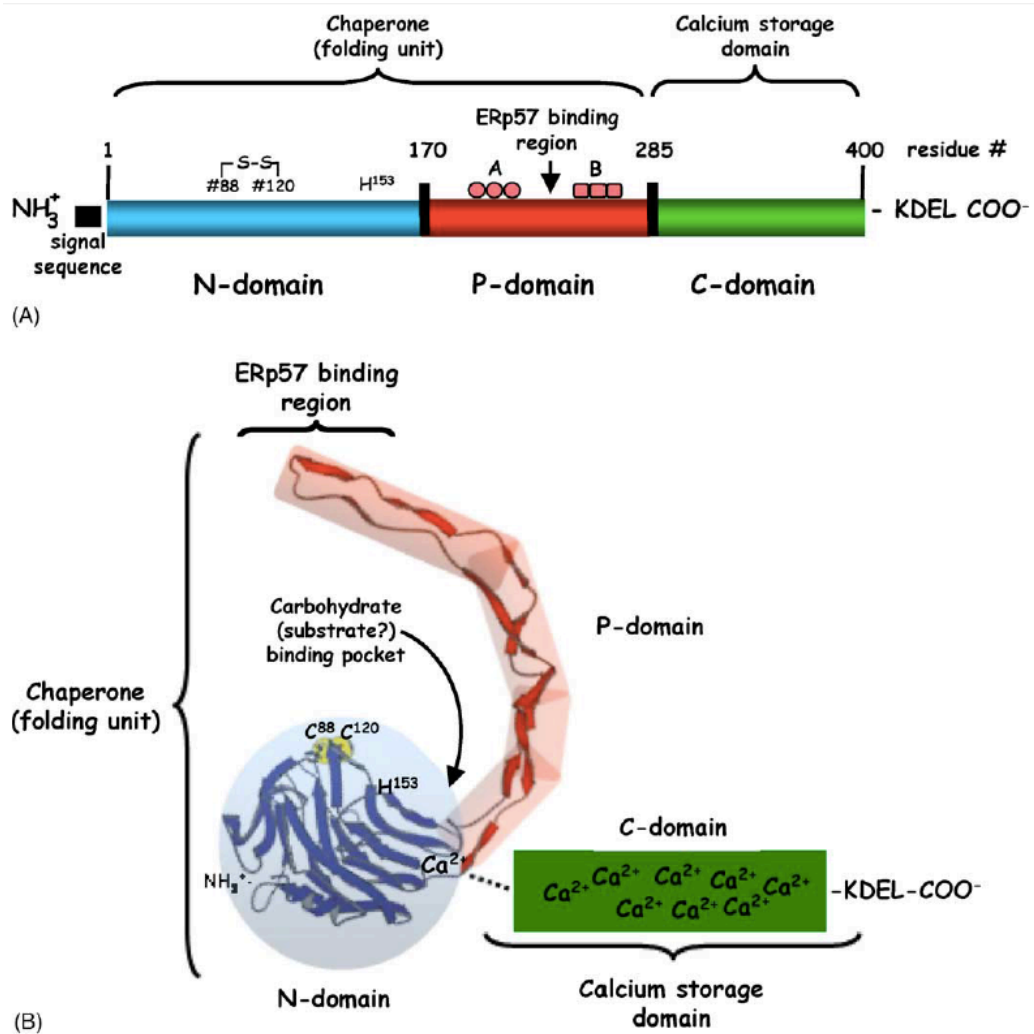


Figura 8. Modelo de la estructura de la calreticulina. La representación lineal de los dominios de calreticulina se muestra en (A). La proteína contiene una secuencia señal en N-terminal (caja negra) y una señal de recuperación hacia el RE KDEL C-terminal. Los repetidos A (secuencia de aminoácidos PxxIxDPDAXKPEDWDE) y B (secuencia de aminoácidos GxWxPPxIxNPxYx) están indicados por círculos y cuadrados, respectivamente. (B) Modelo 3D de los dominios N y P de calreticulina. La Calreticulina contiene un dominio globular N-terminal (en azul) y central, dominio P rico en prolina (en rojo) que forma un característico *loop*. Los dominios N + P de la calreticulina son responsables de su función de chaperona. El dominio C-terminal contiene una gran cantidad de aminoácidos cargados negativamente y está involucrado en la gran capacidad de almacenamiento del Ca^{2+} de la proteína. Los círculos amarillos representan la cisteína (Cys⁸⁸-Cys¹²⁰), que forman un puente C-C en la calreticulina. Se indican las localizaciones de la His¹⁵³ esencial y del sitio de unión a carbohidrato y el sitio de unión a ERp57. (Gelebart et al., 2005).

Las funciones principales de la CRT en el lumen del RE son la de chaperona y la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} . La CRT funciona como una chaperona molecular en el plegamiento de múltiples proteínas y glicoproteínas. Para llevar a cabo esta función, la CRT se une a la calnexina

y ambas reconocen carbohidratos en glicoproteínas recién sintetizadas. Las alteraciones en la concentración de iones como el Ca^{2+} en el RE pueden afectar la formación de estos complejos de chaperona y por lo tanto la capacidad de chaperona de la CRT (Gelebart et al., 2005; Marek Michalak et al., 2009). Así mismo, la CRT es capaz de unirse a Ca^{2+} y juega un papel crítico en la regulación de su homeostasis. Se ha observado que cuando hay niveles elevados de la CRT, aumenta la cantidad de Ca^{2+} en las reservas intracelulares como el RE y que las células deficientes en CRT tienen una reducción en la capacidad de almacenamiento del Ca^{2+} en el RE (Gelebart et al., 2005; Nakamura et al., 2001).

ANTECEDENTES

Los virus han evolucionado para secuestrar la maquinaria celular y son capaces de interactuar con múltiples proteínas. Tal es el caso de la CRT, que se ha encontrado que puede ser necesaria en distintas infecciones virales. Algunos virus inducen su expresión, como el citomegalovirus (CMV) (Zhu & Newkirk, 1994) y el virus del sarampión (Bolt, 2001) que aumentan la presencia de la CRT en la superficie de las células infectadas. Así mismo el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) (Ding et al., 2001; Gelebart et al., 2005) y el retrovirus de ratón FrCas aumentan los niveles de la CRT (Dimcheff et al., 2003). En algunos casos, la sobreexpresión de la CRT y otras proteínas del RE se relaciona con estrés del RE y la regulación de apoptosis por la infección de virus como la hepatitis C (HCV) y el enterovirus (Benali-Furet et al., 2005; Jheng et al., 2010). En el caso de la infección por DENV, se ha reportado que la CRT interactúa con la proteína E y que la CRT es importante para la producción de viriones, ya que al silenciarla se observó una reducción en la producción de viriones infecciosos en las células Vero (Limjindaporn et al., 2009). En un estudio posterior, al silenciar a la CRT se reportó una menor replicación del DENV en las células Huh-7.5 y se observó que la CRT co-localiza con las proteínas no estructurales NS3 y NS5, así como con el RNA de doble cadena, indicando que la CRT tiene un papel directo en la replicación de este virus (Khadka et al., 2011). Finalmente, en las células Vero se encontró que la infección con una cepa de DENV2 aumentó la expresión de la CRT (Martínez-Betancur et al., 2014). Es posible que, en estos casos, la sobreexpresión de CRT esté favoreciendo el plegamiento de las proteínas virales y la replicación del virus en el RE. Sin embargo, se ha encontrado que esta proteína también puede estar involucrada en la generación de la respuesta inmune. Esto debido a que la inducción de la expresión de la CRT por el virus de la hepatitis B (HBV) ha sido relacionada con la resistencia al IFN. Aparentemente, en células infectadas con HBV, CRT inhibe la producción de IFN- α a través del bloqueo de la traslocación del IRF7 al núcleo y la disminuye a los efectores de la respuesta al IFN- α , a través de la reducción de la fosforilación de STAT-1; favoreciendo la replicación del HBV en las células HepG2 (Yue et al., 2012).

Además de la función de chaperona de la CRT, ésta proteína es importante para la homeostasis de Ca^{2+} en el RE, que es el sitio en donde el RNA viral está siendo traducido y replicado (Ngo et al., 2019; Perera & Kuhn, 2008b; Reid et al., 2018). El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal en prácticamente todas las células eucarióticas, incluyendo las células del sistema inmune (Clapham, 2007; Feske, 2007; Zhou et al., 2013). Los virus se apropian o interrumpen las vías de señalización de Ca^{2+} y otros procesos dependientes de este ión para lograr sus propios fines. Tal es el caso del virus HCV, otro miembro de la familia *Flaviviridae*, cuya nucleocápside provoca la hiperexpresión de Grp78/BiP, Grp 94, CRT y la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico, induciendo estrés del RE (Benali-Furet et al., 2005). Otra proteína del virus de HCV que altera los niveles de Ca^{2+} intracelular es la NS5A, que activa la elevación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, llevando a la translocación de NF- κ B y STAT3 al núcleo (Gong et al., 2001). Otro flavivirus en el que el flujo de Ca^{2+} ha demostrado ser importante, es el WNV, en donde en las células infectadas se ha observado un rápido y sostenido aumento en el flujo de Ca^{2+} hacia el interior celular, el cual provoca la activación de cinasas como FAK, ERK1/2 y Akt. Si se reduce el flujo de Ca^{2+} a tiempos tempranos de la infección, hay una disminución en la producción de partículas virales y un retraso en la activación de las cinasas antes mencionadas. Estos resultados indican que el flujo de Ca^{2+} es requerido para una replicación viral eficiente y posiblemente, para el rearrreglo de la membrana del RE por parte del virus (Scherbik & Brinton, 2010).

En el caso del DENV existe evidencia limitada de la relación entre la infección causada por este virus y la homeostasis de calcio, aunque se ha reportado hipocalcemia en los pacientes con dengue. Esta hipocalcemia puede ser más pronunciada en las formas severas de la enfermedad, aunque los bajos niveles de calcio no han demostrado estar asociados con la mortalidad de los pacientes. En estudios *in vitro* el Ca^{2+} ha demostrado ser esencial para la actividad citotóxica de la citotoxina de macrófagos (CF2) inducida por DENV2 y para la producción y actividad de la citotoxina CF en las células de bazo (Dhawan et al., 1991; Khanna et al., 1991). El Ca^{2+} parece tener un papel en

la inducción de las células Th específicas para el DENV. El antígeno del dengue estimula la entrada de Ca^{2+} a las células Th, el cual es necesario para la proliferación de estas células, esto último fue demostrado al usar fármacos bloqueadores de canales de Ca^{2+} o al poner a las células Th en un medio sin Ca^{2+} y observar que estas células no proliferaron (Chaturvedi et al., 1995). Existe evidencia de que la producción de nitrato en respuesta a la infección por DENV también es dependiente de Ca^{2+} y puede ser inhibida por fármacos bloqueadores de los canales de Ca^{2+} (Misra et al., 1996; Mukerjee et al., 1996). Por lo tanto, el calcio parece tener un papel importante en la respuesta inmune a dengue, aunque las interacciones son complejas y las implicaciones clínicas precisas de estas interacciones no han sido definidas claramente (Shivanthan & Rajapakse, 2014).

Recientemente, se reportó que las células HepG2 infectadas con DENV mostraron un aumento significativo en la permeabilidad de la membrana celular al Ca^{2+} y que tanto en estas células como en las células Huh-7, la infección causó una reducción en los niveles de Ca^{2+} en el RE. Además, al tratar a las células con el quelante intracelular de calcio BAPTA-AM a una concentración de 10 y 25 μM , se redujo la producción de progenie viral en hasta un 80%, mostrando de esta manera que la infección por DENV altera la homeostasis de Ca^{2+} para favorecer la replicación viral (Dionicio et al., 2018).

JUSTIFICACIÓN

El RE es uno de los organelos celulares que con mayor frecuencia son secuestrados durante las infecciones virales. La replicación del genoma del DENV, su traducción, así como la formación de viriones inmaduros ocurren en asociación cercana con este organelo. Entre las funciones que cumple el RE en la célula, se encuentra la de ser un reservorio de calcio intracelular, así como estar involucrado en la homeostasis de esta molécula. El Ca^{2+} es una molécula de señalización muy versátil que puede regular diferentes funciones celulares, incluyendo el metabolismo, la transcripción, la movilidad celular e incluso la respuesta inmune.

La homeostasis del calcio es mantenida a través de diversas moléculas, entre las que se encuentran transportadores, amortiguadores y sensores de este ión. Una de las principales moléculas de unión a Ca^{2+} en el RE es la CRT. Esta molécula amortiguadora de Ca^{2+} también tiene la función de chaperona que ayuda al plegamiento correcto de otras proteínas.

Se ha demostrado que esta proteína es regulada durante la infección de múltiples virus, incluyendo DENV, el cual además interacciona con la CRT a través de las proteínas E, NS3 y NS5 y el RNA de doble cadena indicando que esta proteína está jugando un papel importante durante la replicación de DENV.

Sin embargo, la manera específica como CRT afecta la replicación del DENV se desconoce.

HIPÓTESIS

La proteína CRT es importante para la replicación de DENV, esto debido a su participación en la regulación de la respuesta inmune y de la homeostasis del calcio; por lo cual el tratamiento con el quelante intracelular de calcio, BAPTA-AM también resultará en la regulación de la respuesta inmune innata, afectando así la replicación de DENV.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de CRT y el efecto antiviral de BAPTA-AM durante la infección por DENV en Huh-7.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la importancia de la CRT durante la infección por el DENV2 en las células Huh-7
2. Determinar si la CRT participa en la respuesta innata contra el DENV.
3. Evaluar el efecto antiviral del BAPTA-AM
4. Evaluar el efecto del BAPTA-AM en la respuesta innata contra el DENV.

METODOLOGÍA

Propagación del virus

La propagación del DENV2 cepa Nueva Guinea se llevó a cabo en células de mosquito C6/36. Después de cinco días de infección con DENV2, el virus fue parcialmente purificado del sobrenadante de las células, por medio de centrifugación para eliminar los restos celulares; posteriormente, el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -70°C hasta su uso. La determinación del título viral se realizó por ensayos de focos en células Vero.

Cultivo celular y titulación viral

La línea celular de hepatoma humano, Huh-7 (amablemente donada por el Dra. Ana María Rivas de la Universidad Autónoma de Nuevo León) y las células Vero (células de riñón de mono verde) ATCC No. CCL-81 fueron cultivadas en medio DMEM advanced suplementado con glutamina 2mM, penicilina (5x10⁴U/ml)-estreptomicina (50 µg/ml), suero fetal bovino (SFB) al 5%, y anfotericina B (Fungizona) 1ml/l a 37°C en una atmosfera húmeda con CO₂ al 5%.

La línea celular de mosquito *Aedes albopictus* clona C6/36 (ATCC CRL-1660) fue cultivada en medio EMEM, suplementado con glutamina 2mM, penicilina (5x10⁴U/ml)-estreptomicina (50 µg/ml), suero fetal bovino (SFB) al 10%, y anfotericina B (Fungizona) 1ml/l a 37°C en una atmosfera húmeda con CO₂ al 5%.

Infección de células y tratamientos

Las células Huh-7 fueron cultivadas en multiplacas hasta una confluencia del 90%, posteriormente, se lavaron con medio Hanks y se infectaron con el DENV2 a una MOI de 3 en medio con 1% de SFB durante 2 horas a 37°C. Después de la infección, las células se lavaron tres veces con medio Hanks y se trataron con diferentes concentraciones del quelante intracelular de calcio BAPTA-AM (Abcam ab120503) en medio completo durante 48 horas a 37°C.

Silenciamiento de la calreticulina

El siRNA específico para la CRT fue sintetizado por Ambion (4390826). Las secuencias de siCRT fueron: 5'CAUCUUUCUUGAUCAACAUTT-3' (sentido) y 5'-AUGUUGAUCAAGAAAGAUGAG-3' (antisentido). Como control negativo se utilizó el siRNA no específico de Ambion (4390844).

Las células Huh-7 se cultivaron en placas hasta una confluencia del 100%, se despegaron y se transfirieron a la cubeta Gene Pulser (Biorad 165-2088). Posteriormente, 2000 ng de SiRNA se mezclaron con OptiMEM (Gibco 31985070) y se añadieron a las células y se llevó a cabo la electroporación a 170V por 30-40 ms en el Gene Pulser Xcell (Biorad). Finalmente, las células se transfirieron a una placa y se les añadió medio DMEM Advance con SFB al 15%.

La infección con el DENV2 se llevó a cabo a las 24 y 48 horas post-electroporación. La expresión de la CRT y la presencia de la proteína viral NS3 fue determinada por medio de Western Blot, así mismo, se evaluó la progenie viral y la secreción de NS1 en los sobrenadantes de células transfectadas e infectadas por medio de ensayos de focos y de ELISA respectivamente.

Progenie viral y secreción de NS1

Para cuantificar la progenie viral, se colectaron los sobrenadantes de células infectadas, tratadas y sin tratar, a las 24 o 48h post-infección y se llevaron a cabo ensayos de focos. Las células Huh-7 fueron cultivadas en placas de 96 pozos hasta una confluencia de 100%, en ese momento fueron inoculadas con diluciones seriadas en base 10 de los sobrenadantes previamente colectados (volumen final 50 μ l) durante 2 h a 37°C para permitir la adsorción viral. Posteriormente, se retiró el inoculo, se lavaron las células con medio Hanks y se agregaron 0.2 ml de medio completo. Posterior a las 48 h post-infección, se retiró el medio y las células se fijaron con formaldehído al 1%, se incubaron con solución permeabilizadora (PBS con saponina 0.2% y SFB 1%) durante 20 minutos, después se incubaron con el anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-prM (2H2) durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron

tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-ratón (Life technologies). Los focos se observaron en un microscopio de epifluorescencia y el resultado se expresó en Unidades Formadoras de Focos (UFF)/ml.

La secreción de NS1 fue medida en los sobrenadantes colectados usando un ELISA comercial (Platelia, Biorad), utilizado según las instrucciones del fabricante.

Western blot

Los extractos totales de proteínas celulares fueron cuantificados con el kit de ensayos de proteína BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas celulares (30µg) se separaron por SDS-PAGE y se llevó a cabo la inmunotransferencia.

Los anticuerpos que se usaron para la detección de proteínas de interés fueron: el anticuerpo monoclonal anti-CRT (Santa Cruz biotechnology) y el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (Cell Signaling). La infección fue monitoreada con el anticuerpo anti-NS3 DENV (GeneTex). La detección de estos anticuerpos se realizó con los anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados con HRP (Cell Signaling). La quimioluminiscencia fue detectada usando el sustrato quimioluminiscente Femto super Signal West (Thermo Fisher scientific) y el escáner LI-COR C-DiGit Blot Scanner 3600. Finalmente, el análisis densitométrico fue realizado usando el software myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific) y se ajustó con el control de carga (GAPDH).

Detección de la respuesta inmune

Para detectar moléculas de señalización involucradas en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria se utilizó el *kit comercial PathScan Immune cell signaling antibody array kit* (13792 Cell Signal) que detecta 19 moléculas. Para ello se lisaron las células tratados o no, con BAPTA-AM, así como las células no transfectadas, no transfectadas e infectadas y las células transfectadas con SiRNA CRT, infectadas o no; los extractos totales se trataron siguiendo las instrucciones del *kit* y se detectó la quimioluminiscencia

con el escáner LI-COR C-DiGit Blot Scanner 3600. El análisis densitométrico fue realizado usando el software myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific).

Inmunofluorescencia y citometría de flujo

Las células Huh-7 se cultivaron en cubreobjetos en placas de 24 pozos para la microscopía confocal y en placas de 12 pozos para los ensayos de citometría de flujo. Posteriormente, las células fueron tratadas e infectadas como se indicó anteriormente. Las células cultivadas en los cubreobjetos fueron fijadas con formaldehído 2%, permeabilizadas por 20 min (PBS con saponina 0.1% y 1% SFB) e incubadas por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo 2H2, el anticuerpo monoclonal anti-CRT (Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo anti-NS3 (Genetex). Como anticuerpos secundarios se usaron el anti-ratón Alexa488 y el anti-conejo Alexa 555 (Life technologies); los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst 33342. Los cubreobjetos se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM700 y las imágenes se analizaron usando el software ZEL, v. 2010. La citometría de flujo fue realizada en el citómetro BD LSR Fortessa y los datos se analizaron con el software Cytobank.

Análisis estadístico

Los resultados representan al menos tres experimentos independientes. Los datos son expresados como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism versión 4.0. Para las comparaciones de dos grupos, se realizó una prueba de t no pareada, mientras que para las comparaciones múltiples, los datos con una distribución normal fueron analizados con ANOVA de una vía; finalmente la prueba de t múltiple se utilizó para analizar los datos del PathScan. Las diferencias estadísticamente significativas se indican de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

1. IMPORTANCIA DE LA CALRETICULINA EN LA INFECCIÓN POR DENV

Debido a la importancia de CRT en distintas infecciones virales, se analizó su papel en la infección por el DENV. Para ello primero se evaluó el efecto de la infección por el DENV2 en la abundancia de la CRT y en su localización subcelular. Para evaluar la abundancia de la CRT se realizaron ensayos de western blot. En la Figura 9A se muestra una imagen representativa de este ensayo, el análisis densitométrico de triplicados nos permitió observar un incremento modesto, aunque significativo en la abundancia de la CRT en las células infectadas con respecto a las no infectadas a las 48h post-infección (Figura 9B). Por otro lado, para evaluar la localización subcelular de la CRT se empleó la microscopía confocal, en estos ensayos se observó tanto en células infectadas como en no infectadas, una localización citoplásmica de la CRT (Fig. 10), sugiriendo que la localización de la CRT no se modifica a las 48h de infección con DENV. Además, y en concordancia con resultados anteriores (Limjindaporn et al., 2009), se observó una clara co-localización entre la CRT y la proteína viral E, utilizada para marcar a las células infectadas (Fig. 10).

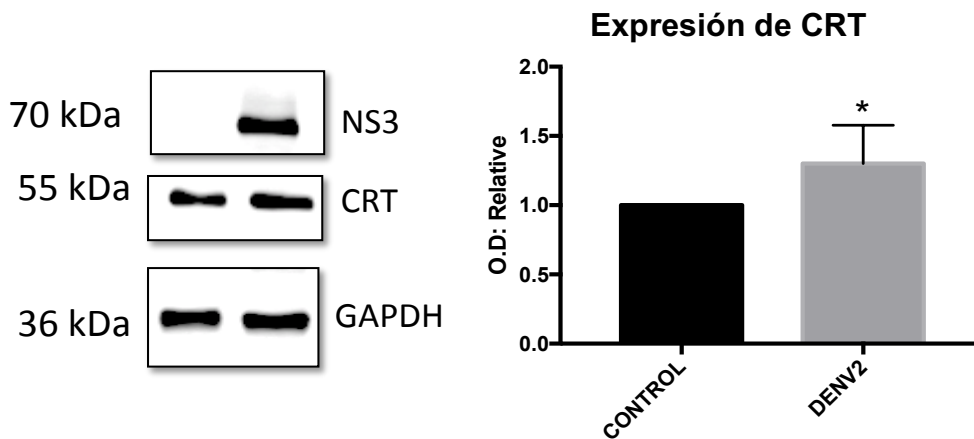


Figura 9. La infección por DENV2 en células Huh-7 incrementa la abundancia de CRT. (A) Extractos totales de células Huh-7 no infectadas (carriles de la izquierda) e infectadas (carriles de la derecha) con el DENV2 fueron colectados a las 48h post-infección, y se analizaron con ensayos de western blot usando el anticuerpo anti-CRT. GAPDH se usó como control de carga y NS3 como control de infección. Se muestra una imagen representativa de western blot. (B) la gráfica resume la abundancia relativa de la CRT bajo las condiciones experimentales de (A). La abundancia de la CRT se expresa como densidad óptica relativa (O.D. relative) \pm desviación estándar obtenida del análisis densitométrico de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$.

Una vez que se corroboró que la infección aumentaba la abundancia de la CRT, pero no modificaba su localización subcelular, se realizó el silenciamiento de la expresión de la CRT y así poder determinar su importancia durante la infección por DENV. Para ello, se transfectaron células Huh-7 por medio de electroporación con el siRNA específico para la CRT (siCRT) y como control se usó un siRNA no relacionado (UR siRNA). A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con DENV2 a MOI de 3, a las 24 h post-infección se evaluó la abundancia de la proteína NS3 por medio de Western blot y la cantidad de NS1 secretada el medio extracelular por medio de ELISA.

El silenciamiento de la expresión de CRT redujo significativamente (más de 50%) la cantidad de la CRT en las células Huh-7, como puede observarse por el ensayo de Western-blot (Fig. 11 A y B). El silenciamiento de CRT en células infectadas correlaciona con una reducción significativa de la abundancia de NS3 (Fig. 11C), el cual no fue observado en las células control tratadas con el UR siRNA. Así mismo se observó una menor secreción de NS1 en los sobrenadantes de estas células (Fig. 11D), sugiriendo la importancia de CRT en el ciclo replicativo de DENV.

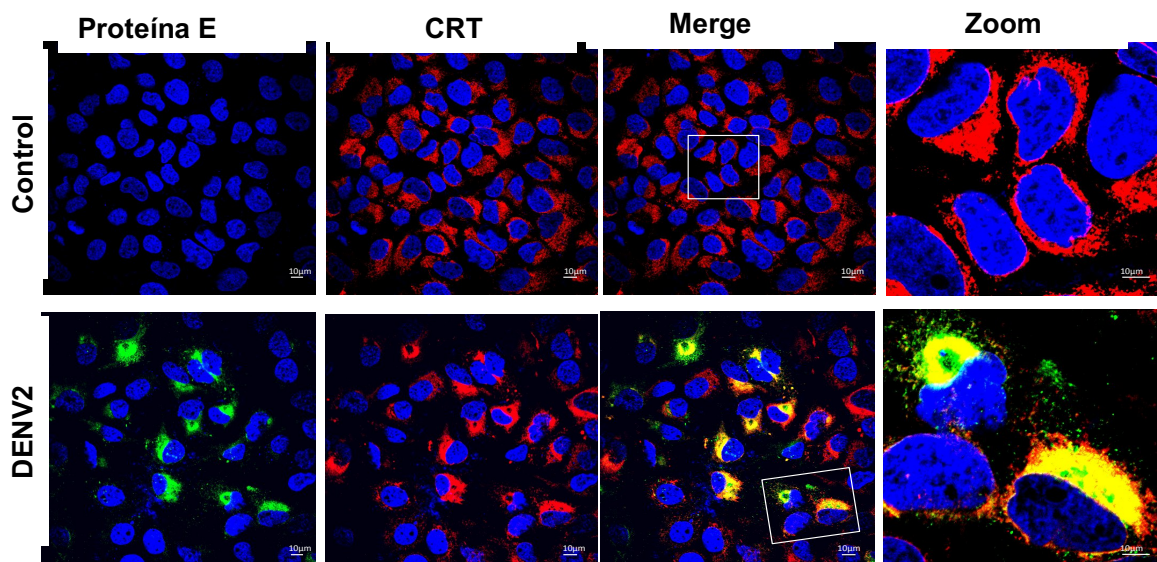


Figura 10. La infección con DENV2 no modifica la distribución subcelular de CRT. Las células Huh-7 no infectadas (control) e infectadas, fueron fijadas 48h post-infección e incubadas con anticuerpos anti-CRT (rojo) y anti-E (verde). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul).

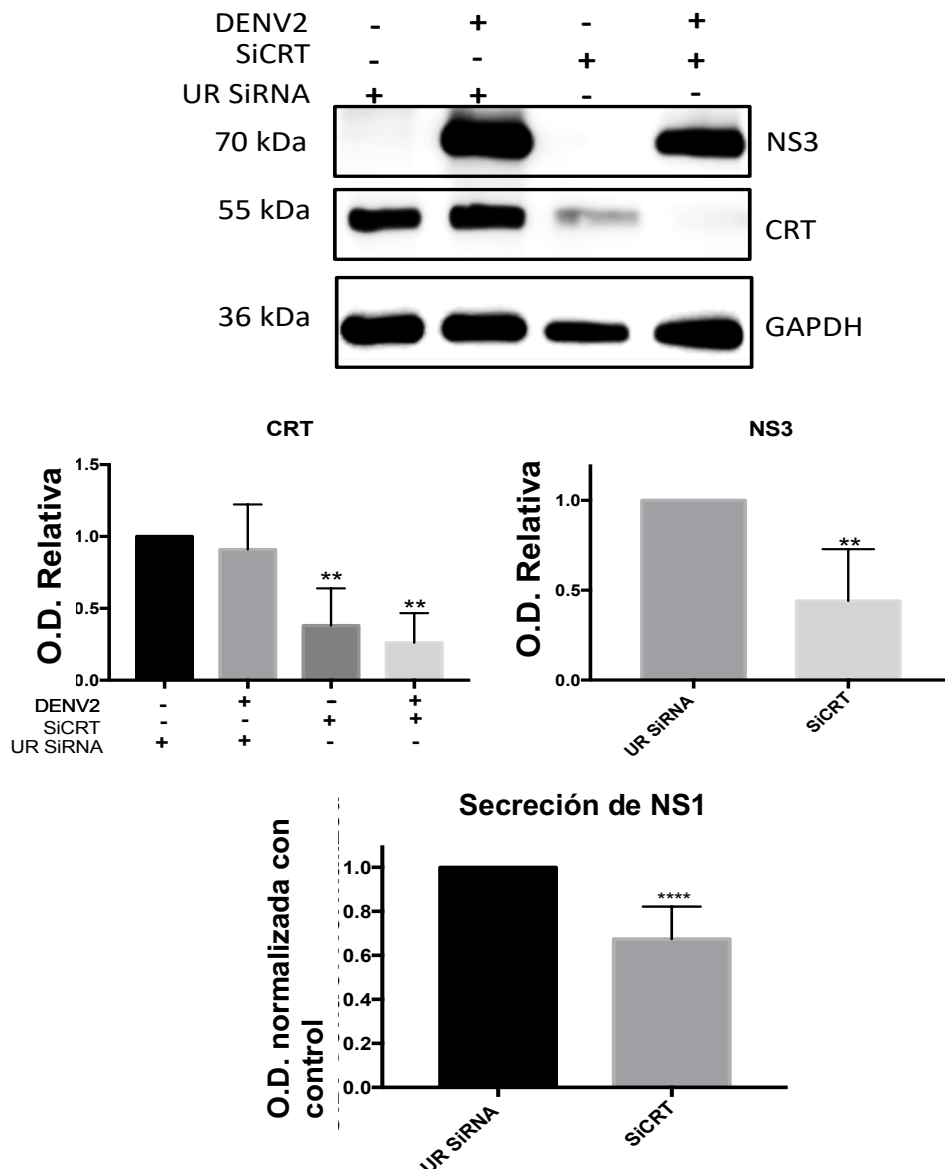


Figura 11. El silenciamiento de CRT reduce la expresión de la proteína viral NS3 y la secreción de la proteína NS1. (A) Extractos totales de células Huh-7 previamente transfectadas con siCRT o con siRNA no relacionado (UR siRNA), sin infectar o infectadas (MOI 3), fueron colectados a las 24h post-infección y se realizó un ensayo de Western blot usando anticuerpo anti-CRT. GAPDH fue usado como control de carga y NS3 como control de infección. Se muestra una imagen representativa de los ensayos de Western blot con los niveles de expresión de la CRT. La abundancia de la CRT (B) y de la NS3 (C) se expresan como densidad relativa \pm desviación estándar obtenida del análisis densitométrico de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$. (D) La cantidad de NS1 secretada por las células tratadas con UR siRNA o con siCRT fue evaluada por medio de ELISA. La secreción de NS1 se expresa como promedio de la absorbancia normalizada \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.00001$.

Para determinar si la CRT era capaz de afectar la respuesta inmune innata durante la infección con DENV, se evaluó la expresión de un total de 19 proteínas esenciales en la señalización de respuesta inmune, en células infectadas con DENV y

silenciadas o no para CRT, utilizando un kit comercial. Para esto, células previamente transfectadas con el siCRT o UR siRNA se infectaron con DENV, y posteriormente, usando el *kit* PathScan, se evaluaron los niveles de las 19 proteínas de señalización medibles por el kit. El silenciamiento de la CRT redujo la expresión de IRF-3 y aumentó los niveles de STAT6, así como los niveles de la proteína TAK1 fosforilada en las células infectadas (Fig. 12). Las tres proteínas modificadas están relacionadas con la respuesta a la infección viral (H. Chen et al., 2011; Doly et al., 1998; Murakami et al., 2010; Xia et al., 2017)

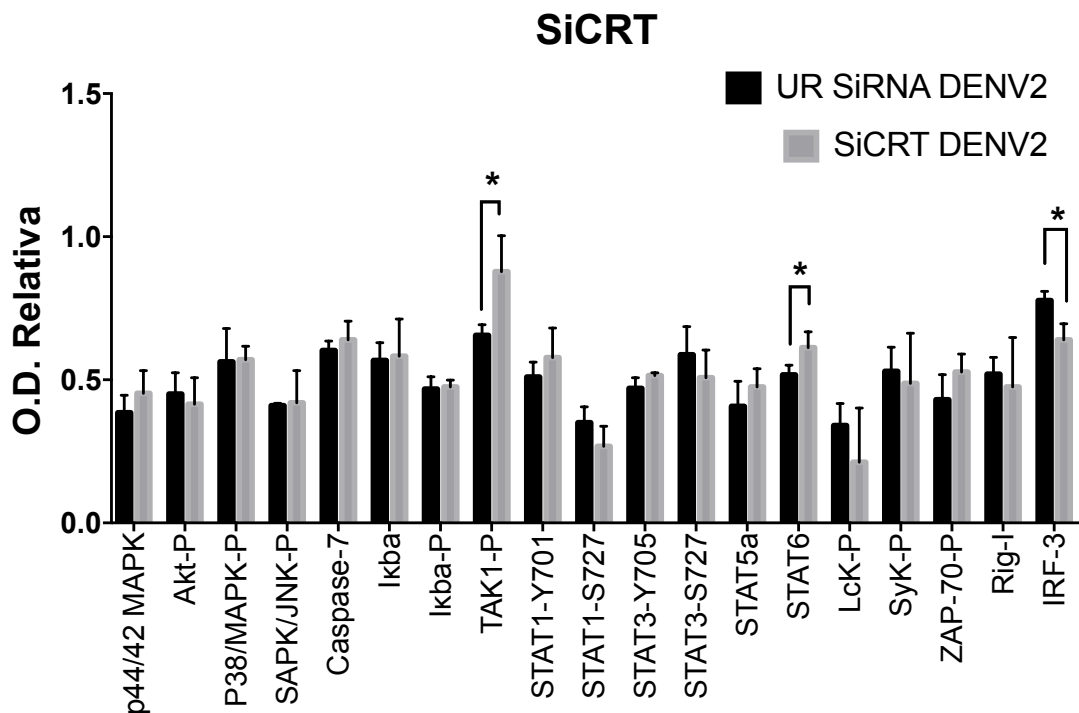


Figura 12. El silenciamiento de CRT afecta la señalización de la respuesta inmune en células Huh-7 infectadas con DENV. Se colectaron extractos totales de las células Huh-7 transfectadas con siCRT o con siRNA no relacionado (UR siRNA), infectadas con el DENV, se realizó el Pathscan, y se realizaron análisis densitométricos de los *blots*. Los niveles de fosforilación o la cantidad de las proteínas indicadas se expresan como la densidad óptica relativa (O.D. relativa) \pm desviación estándar, obtenida del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$.

2. TRATAMIENTO DE CELULAS INFECTADAS CON EL QUELANTE DE CALCIO, BAPTA-AM.

En el RE, CRT es un regulador esencial de la homeostasis de Ca^{2+} (Marek Michalak et al., 2009). Dado que se ha demostrado que durante la infección con el DENV se inducen cambios en la homeostasis de este ión (Dionicio et al., 2018), se usó el quelante intracelular de Ca^{2+} , BAPTA-AM, para estudiar la importancia del Ca^{2+} en la infección y la modulación de la respuesta inmune

primero se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de reducción de MTT de las células Huh-7 tratadas con concentraciones de 0 hasta 40 μM de BAPTA-AM. Se observó que a las concentraciones de 35 y 40 μM de BAPTA-AM, hubo una reducción significativa de la viabilidad (Fig. 13A), mientras que la viabilidad celular no se vio afectada de 0 a 20 μM , por ello las células fueron tratadas con 10, 15 y 20 μM de BAPTA-AM después de la infección con DENV, como control se empleó DMSO (vehículo donde se disolvió BAPTA-AM). El tratamiento con BAPTA-AM redujo el porcentaje de células infectadas de manera dependiente de la concentración del quelante de calcio, en comparación con las células tratadas con el vehículo, llegando a observarse más de un 50% de reducción en las células tratadas con la mayor concentración de BAPTA-AM utilizada (20 μM) (Fig. 13B). Resultados concordantes también fueron observados por medio de microscopía confocal, en dónde se observó una marcada reducción en la cantidad de células (aproximadamente una reducción del 90%) positivas a la proteína viral pr-M con el tratamiento con 20 μM de BAPTA-AM (Fig. 13C).

Además de esto, se observó una reducción en la progenie viral de manera dependiente de la dosis del tratamiento con BAPTA-AM, alcanzando una reducción máxima de medio log de unidades formadoras de focos (FFU/ml) cuando las células fueron tratadas con una concentración de 20 μM de BAPTA-AM (Fig. 14A). Así mismo, se observó una disminución significativa (5 veces aproximadamente) en la cantidad de NS1 secretada en los sobrenadantes de células infectadas y tratadas con 20 μM de BAPTA-AM (Fig. 14B). Finalmente se observó una reducción en la abundancia de la NS3 en las células infectadas y tratadas con BAPTA-AM, siendo significativa esta reducción también a 20 μM (Fig. 14C y D). En conjunto, estos resultados, confirman el papel fundamental de Ca^{2+} durante la infección de las células Huh-7 con DENV2.

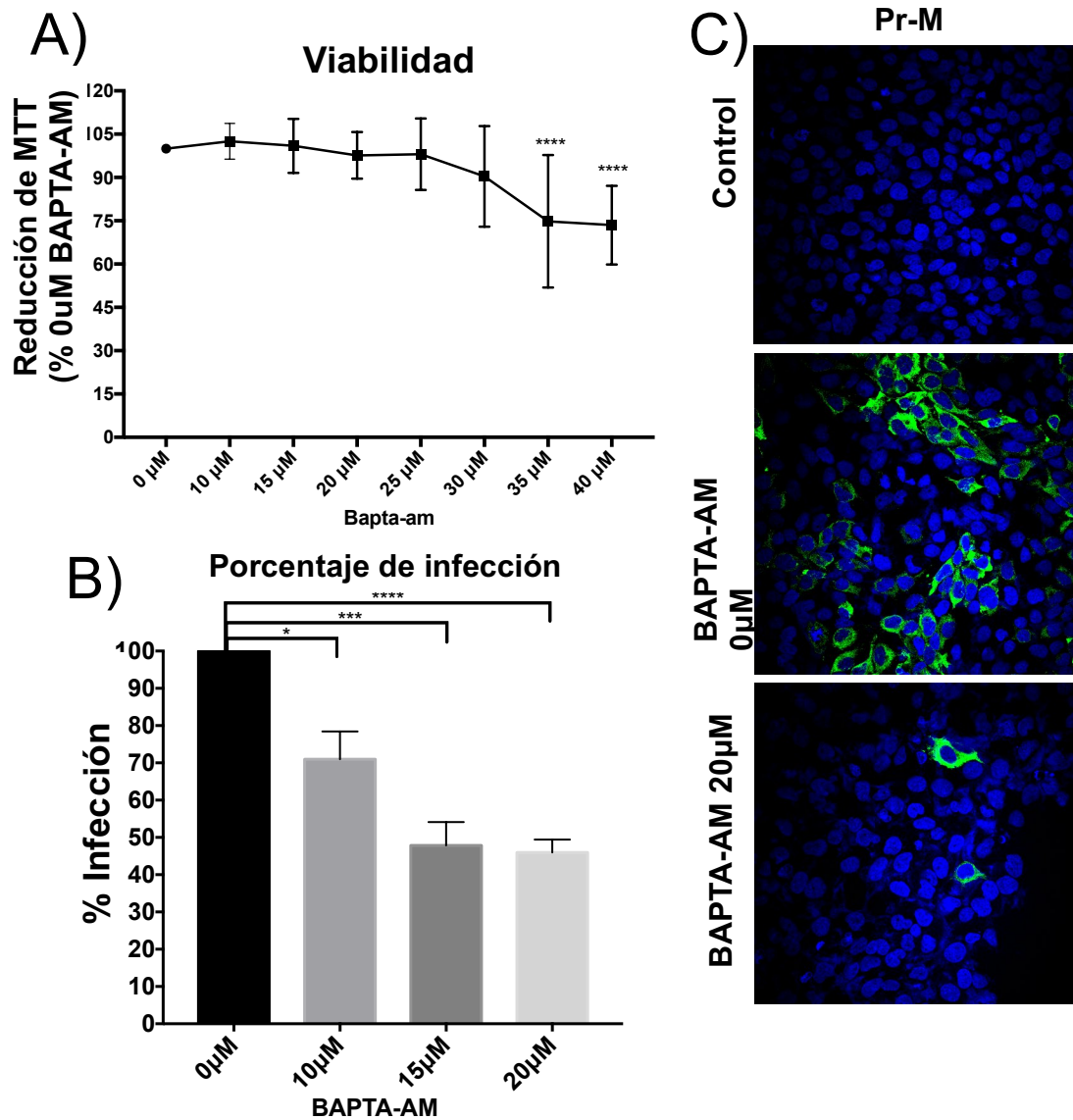


Figura 13. La disminución de Ca^{2+} intracelular impacta en la infección con DENV2 en células Huh-7. (A) Las células Huh-7 fueron tratadas con distintas concentraciones de BAPTA-AM, y a las 48 h post-tratamiento se analizó su viabilidad celular por medio del ensayo de reducción del MTT. La viabilidad celular se expresa como promedio de la absorbancia normalizada \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Las células Huh-7 infectadas con el DENV (MOI 3) fueron tratadas a las concentraciones indicadas de BAPTA-AM o con el vehículo (DMSO), indicado como la concentración de 0 μM . Después de 48h, se colectaron las células, se fijaron y se marcaron con el anticuerpo anti-prM, para finalmente cuantificar las células infectadas por medio de citometría de flujo. (C) Las células Huh-7 tratadas en las mismas condiciones indicadas en (B) fueron fijadas y se marcaron con anticuerpo anti-prM (verde). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul) y se analizaron mediante microscopía confocal. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$; **** $P < 0.00001$.

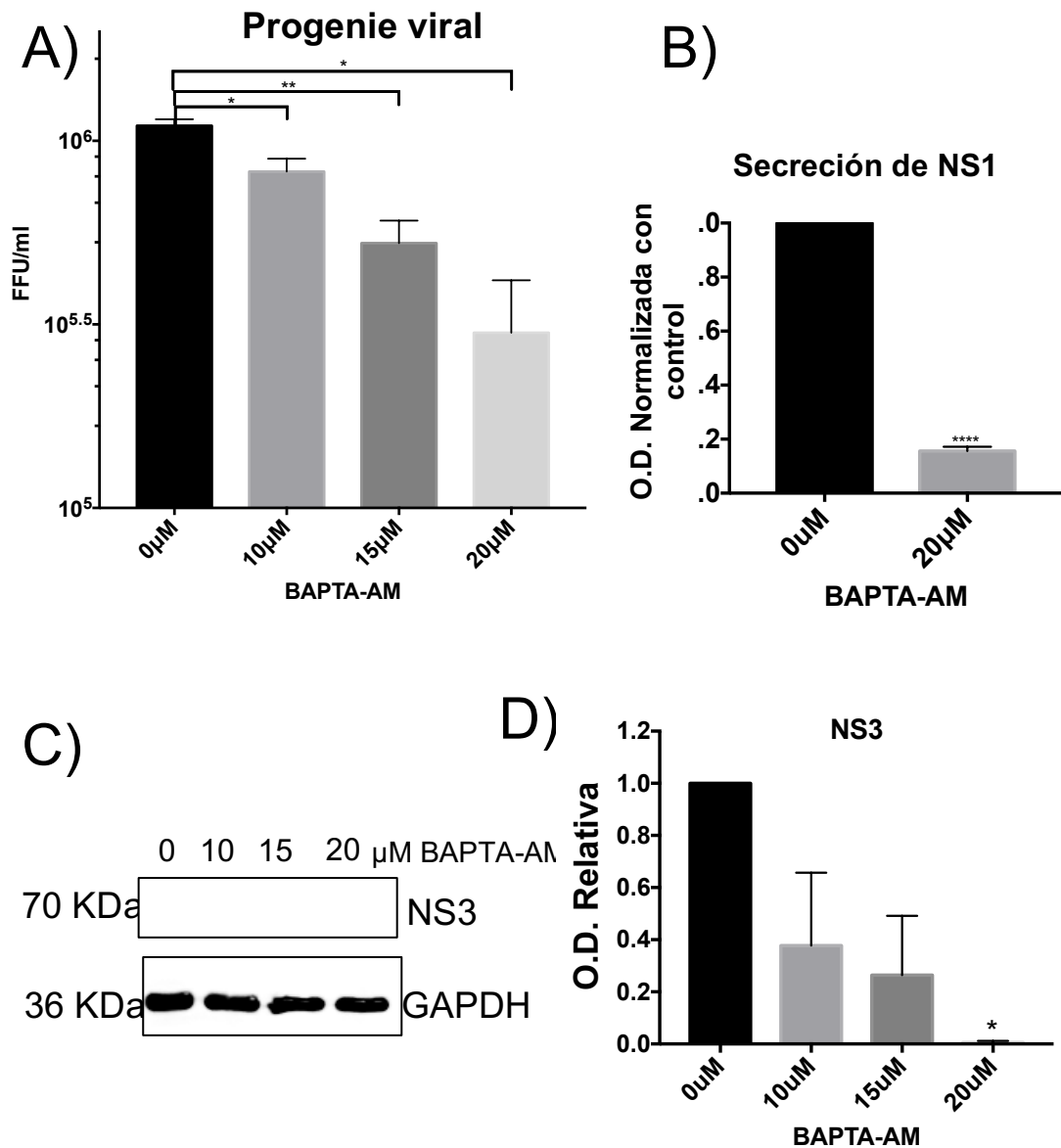


Figura 14. La disminución de Ca^{2+} intracelular impacta en la producción de virus liberados por las células Huh-7 infectadas con DENV2, así como en las proteínas virales NS1 y NS3. (A) Se colectaron sobrenadantes de células infectadas con DENV sin tratar y tratadas con BAPTA-AM, y se realizaron ensayos de focos identificados con la proteína prM. La progenie viral se expresa como el valor promedio \pm la desviación estándar de las unidades formadoras de focos (FFU)/ml de tres experimentos independientes. (B) Se evaluó la secreción de la proteína NS1 de células infectadas con el DENV, sin tratar o tratadas con BAPTA-AM; por medio de ELISA. La secreción de la NS1 se expresa como promedio de la absorbancia normalizada (O.D. *control normalized*) \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. (C) Se colectaron extractos totales de células tratadas bajo las mismas condiciones experimentales que en (A) y se realizó western blot usando anticuerpo anti-NS3. GAPDH se usa como control de carga. Se muestra un *western blot* representativo mostrando la abundancia de la NS3. (D) Se expresa la abundancia de la NS3 como densidad relativa \pm desviación estándar obtenida del análisis densitométrico de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; **** $P < 0.00001$.

Finalmente, para determinar si el tratamiento con el quelante intracelular de Ca^{2+} podría modificar la respuesta inmune inducida por la infección con el DENV, las células Huh-7 infectadas y tratadas con BAPTA-AM, se analizaron con el *kit* de ELISA PathScan. A pesar de que el tratamiento con BAPTA-AM fue capaz de inducir una reducción significativa en la abundancia de la proteína viral NS3, en la secreción de la proteína NS1 y en la progenie viral, sólo se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de AKT en células infectadas y tratadas con 20 μM de BAPTA-AM en comparación con las células tratadas sólo con el vehículo (Fig. 15).

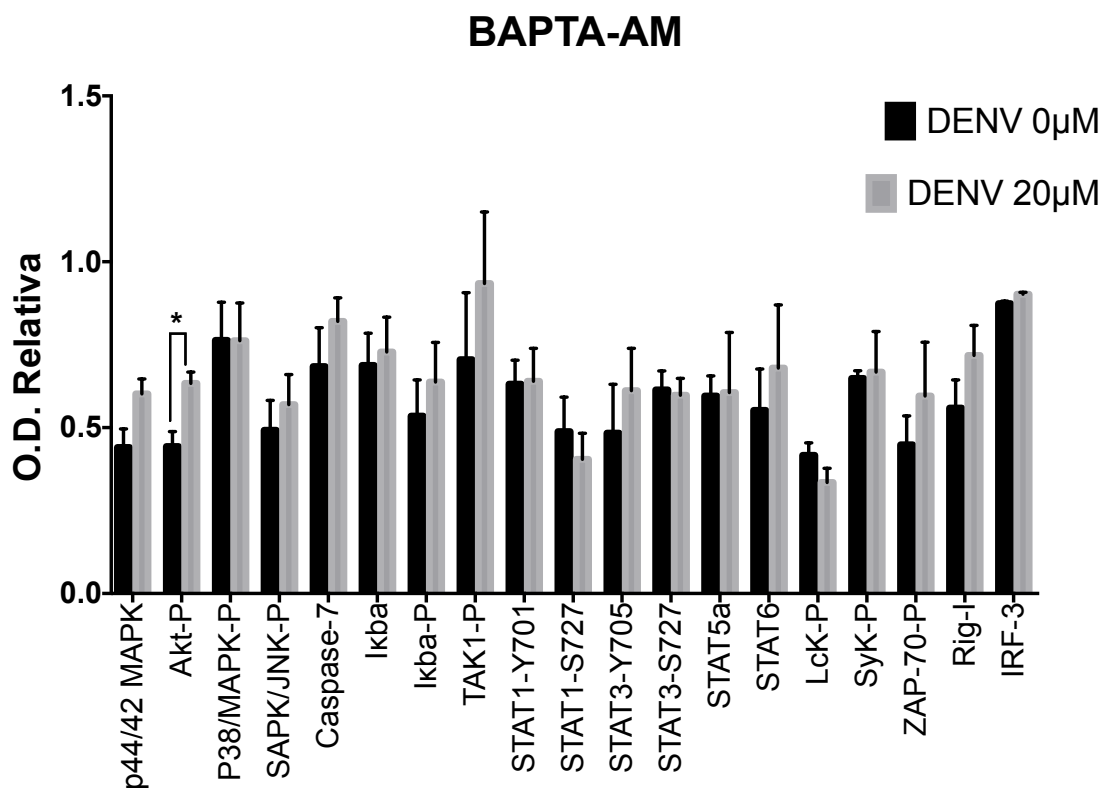


Figura 15. La disminución de Ca^{2+} intracelular incrementa los niveles de fosforilación de AKT en las células Huh-7 infectadas con DENV2. Se recolectaron extractos totales de las células Huh-7 infectadas con el DENV2, no tratadas o tratadas con BAPTA-AM 20 μM , los *blots* se analizaron por medio del sistema PathScan ELISA kit. Los niveles de fosforilación o la cantidad de las proteínas indicadas se expresan como densidad óptica relativa (*O.D. relative*) \pm desviación estándar, obtenida del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$.

3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS DE RESPUESTA INMUNE INNATA AFECTADAS POR LOS TRATAMIENTOS DE CÉLULAS INFECTADAS.

Para tratar de entender mejor los cambios en la infección con DENV, así como profundizar en la función de las proteínas involucradas en la señalización de la respuesta inmune innata que mostraron cambios en su expresión durante el tratamiento con el siCRT y BAPTA-AM de células infectadas, se realizó un análisis *in sillico* de la red de asociaciones funcionales de estas proteínas por medio de STRING, usando un nivel de confianza de 0.4.

Durante el silenciamiento de la CRT, se observaron cambios en la abundancia de IRF-3 y en la fosforilación de TAK1 y STAT-6. El análisis de redes con STRING mostró cinco proteínas funcionalmente relacionadas con IRF-3 y STAT-6 (Fig. 16A). Mientras que para TAK1 (NR2C2) no se encontró una asociación funcional con las proteínas antes mencionadas. Sin embargo, al analizar esta proteína de forma aislada, se encontraron diez proteínas relacionadas con la infección viral.

Por otro lado, en el caso del tratamiento con BAPTA-AM, se encontraron diez proteínas relacionadas con AKT que podrían explicar la reducción en la infección viral observada en las células tratadas.

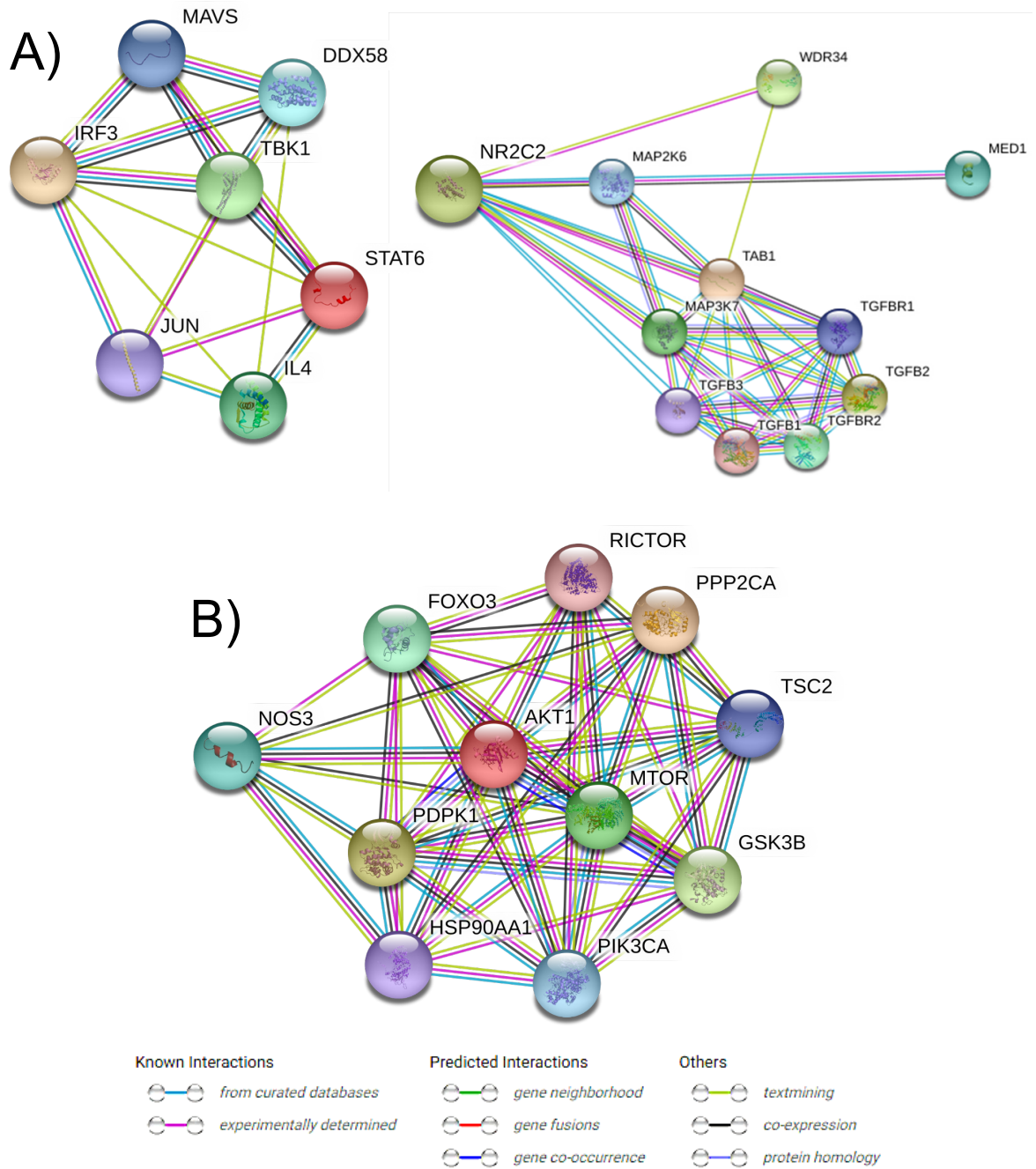


Figura 16. Análisis *in silico* de las interacciones proteína-proteína de las proteínas alteradas durante el silenciamiento de la CRT y el tratamiento con BAPTA-AM en las células infectadas con el DENV. La red de interacciones se realizó usando el software STRING v. 11. (A) Análisis de las proteínas afectadas durante el silenciamiento de la CRT en las células infectadas (TAK-1, IRF-3 y STAT-6). (B) Análisis de las proteínas afectadas durante el tratamiento con BAPTA-AM (AKT-1). El color de la línea indica el tipo de evidencia que soporta las interacciones mostradas.

DISCUSIÓN

El RE es el organelo celular más grande y el que con más frecuencia es secuestrado durante las infecciones virales (Romero-Brey & Bartenschlager, 2016). Tal es el caso del DENV, donde la replicación y traducción del genoma viral, así como la formación de los viriones inmaduros, ocurren en asociación cercana con este organelo (Reid et al., 2018). Entre las funciones principales del RE están la síntesis de proteínas, su plegamiento y transporte, así mismo es el sitio de biosíntesis, procesamiento y transporte de múltiples lípidos. Además, este organelo sirve como almacén del calcio intracelular y está involucrado en la homeostasis de este catión (Schwarz & Blower, 2016). El ión Ca^{2+} es una molécula de señalización muy versátil, que puede regular diversas funciones celulares, entre las cuales se encuentran el metabolismo, la transcripción, la movilidad celular, así como la respuesta inmune (M. J. Berridge et al., 2000; Michael J. Berridge et al., 2003; Clapham, 2007).

La homeostasis del ión Ca^{2+} es mantenida a través de diversas moléculas transportadoras, amortiguadores y sensores de este ión (Krebs et al., 2015; Prins & Michalak, 2011). Una de las principales proteínas de unión al Ca^{2+} en el RE es la calreticulina (CRT). Debido a la importancia de esta proteína en distintas infecciones virales, así como a los reportes previos de su interacción con proteínas de DENV (Khadka et al., 2011; Limjindaporn et al., 2009), se analizó el papel de la CRT en la infección por el DENV. Para ello primero se midió la abundancia de la CRT en extractos totales de las células infectadas y se encontró un aumento significativo de la CRT a 48h post-infección de las células Huh-7 con DENV2. Este resultado coincide con los reportes previos en distintas líneas celulares (Datan et al., 2016; Martínez-Betancur et al., 2014).

De la misma manera, se ha descrito que durante la infección con el virus de la hepatitis B (HBV) aumenta la expresión de la CRT a nivel del RNAm de CRT en líneas celulares de hepatoma humano, incluyendo las células Huh-7. Interesantemente, se ha descrito un aumento en los niveles de la CRT en el suero de pacientes con hepatitis crónica por HBV, así como un aumento en la expresión de la CRT en las células mononucleares de sangre periférica (Yue

et al., 2012). Por el contrario, la infección por el virus de la encefalitis japonesa (JEV) en la línea celular de meduloblastoma TE671, causó una disminución en la cantidad de CRT. Además, esta disminución causó un antagonismo en la producción de IFN I (Yang et al., 2013).

La región 3' no traducida de la CRT es importante para la estabilidad del RNAm, su localización y traducción. HBV causa una sobreexpresión de la CRT, activando ésta región del RNAm de CRT (Yue et al., 2012). La expresión de la CRT también puede ser regulada directamente desde el promotor del gen, donde se encuentra un elemento adyacente a una caja TATA, que responde al estrés del RE (ERSE), el cual puede ser inducido precisamente, en respuesta al estrés en el RE causado por la disminución en la concentración de Ca^{2+} de este organelo, llevando a un aumento en la expresión del gen de la CRT (Waser et al., 1997). Debido a que se ha observado que la infección con el DENV causa una disminución en el Ca^{2+} que puede ser liberado del RE (Dionicio et al., 2018), la activación del sitio ERSE en el promotor de este gen podría estar siendo activada, explicando el aumento en la expresión de la CRT observada en las células infectadas con DENV.

Por otro lado, a pesar de que no se observó cambio en la distribución subcelular de la CRT, la proteína viral E se encontró distribuida en los mismos sitios que la CRT, lo cual sugiere que las proteínas podrían estar interactuando como ha sido sugerido por Limjindaporn et al. (2009). En ese estudio, el silenciamiento de la CRT y de otras chaperonas del RE causó disminución en la progenie viral del DENV en las células Vero, indicando que la CRT podría ser necesaria para el plegamiento de las proteínas virales y la correcta formación de las partículas virales (Limjindaporn et al., 2009).

Para continuar dilucidando el papel de la CRT durante la infección por el DENV, redujimos la abundancia de la CRT en las células Huh-7, observando una disminución significativa en la cantidad de la proteína viral NS3. Ya se ha reportado la co-localización de la CRT y la NS3 en el citoplasma de las células Huh-7, en donde se acumulan en agregaciones globulares. Además, en ese mismo estudio se reportó que el silenciamiento de CRT se inhibió la producción de luciferasa por parte de un replicón de DENV, sugiriendo que la

CRT tiene un papel directo en la replicación del genoma viral (Khadka et al., 2011). En concordancia con este resultado, la secreción de NS1 se redujo significativamente en los sobrenadantes de las células que fueron tratadas con el siCRT. En conjunto, estos resultados sugieren que la CRT es una proteína importante para la infección de las células Huh-7 con el DENV2, al menos a nivel de replicación y traducción del genoma viral.

Cabe mencionar que se ha reportado que la actividad de chaperona de la CRT es importante en el ciclo replicativo de numerosos virus. Esta proteína se asocia de manera transitoria con la glicoproteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Otteken & Moss, 1996), interactúa con las glicoproteínas E1 y E2 del virus de la hepatitis C (HCV) (Choukhi et al., 1998), con las proteínas de la envoltura F y Hn del virus Sendai (Tomita et al., 1999) y con la glicoproteína E2 del virus de la Rubeola (Nakhasi et al., 2001), entre otras. La CRT funciona como una chaperona al unirse principalmente a glicoproteínas, aunque también puede unirse a proteínas no glicosiladas. El dominio P de la CRT se une de manera dependiente de Ca^{2+} a las proteínas monoglicosiladas ricas en manosa, y esta unión implica la participación de otras chaperonas como la calnexina (M Michalak et al., 1999). Las proteínas del DENV prM/M, NS1 y E están glicosiladas (Yap et al., 2017), por lo tanto, la CRT podría ser necesaria para el plegamiento correcto de las mismas.

Además de su función de chaperona, la CRT también se ha involucrado en la respuesta inmune inducida después de la infección viral (Yang et al., 2013; Yue et al., 2012). Para dilucidar el papel de esta proteína durante la infección por DENV, se evaluó el efecto de la reducción de los niveles de expresión en la CRT sobre algunas de las moléculas de señalización relacionadas con la respuesta inmune innata.

El silenciamiento de la CRT causó un aumento en los niveles de fosforilación de TAK1 y STAT6; ambas proteínas que están relacionadas con la respuesta a la infección viral. En células dendríticas, la infección con el virus herpes humano 6, disminuyó los niveles de fosforilación de la TAK1, la cinasa I κ B (IKK) e I κ B α , después de ser estimuladas con lipopolisacáridos (Murakami et al., 2010). Otras infecciones virales impiden la fosforilación de TAK1, inhibiendo con ello el complejo IKK e I κ B α llevando a la supresión de la

translocación nuclear de NF- κ B (Xia et al., 2017). Sin embargo, a pesar del aumento en la fosforilación de la TAK1 inducido por el silenciamiento de la CRT en las células infectadas con el DENV, no se observó un cambio en la fosforilación de la proteína I κ B α , sugiriendo que no se está activando la translocación nuclear de NF- κ B. Aunque estos resultados podrían indicar que la CRT es inducida por el DENV para evadir la fosforilación de la TAK1, se requieren más estudios para corroborar esta posibilidad.

En este mismo orden de ideas, se requiere STAT6 para la señalización en la respuesta inmune innata durante diversas infecciones virales. Los virus activan a STING y STAT6 se recluta al RE y fosforilada en Ser407 y Tyr641. Esta activación de STAT6 inducida por las infecciones virales ha sido detectada de manera ubicua, implicando a este mecanismo como un requerimiento fundamental en la defensa contra las infecciones virales (H. Chen et al., 2011). Por el contrario, algunos virus, como el virus herpes de sarcoma de Kaposi (KSHV) inhiben la fosforilación de STAT6, sugiriendo que la vía de señalización de IL4/STAT6 es controlada de manera precisa por KSHV para la supervivencia, mantenimiento de la latencia celular, así como la supresión de la respuesta inmune de citocinas en las células infectadas (Cai et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la CRT podría ser necesaria para que DENV inhiba la activación de STAT6. Esto es apoyado por el hecho de que al reducir a la CRT, se elevaron los niveles de fosforilación de STAT6, activando la respuesta inmune y llevando a una reducción en la infección por DENV.

Por otro lado, el silenciamiento de la CRT redujo la abundancia de IRF-3 en las células infectadas con el DENV en comparación con las células infectadas tratadas con el UR siRNA. IRF-3 está relacionado con la expresión de IFN I, sugiriendo que la CRT podría ser necesaria para la expresión de esta proteína durante la infección con el DENV en las células Huh-7.

La fosforilación de IRF-3 está relacionada con la respuesta de IFN (Doly et al., 1998). En este caso, las células con menor expresión de la CRT que están infectadas, no son capaces de mantener los niveles basales de IRF-3. Sin embargo, la infección se redujo en comparación con las células tratadas con UR siRNA, indicando que la reducción en los niveles de IRF-3 podría deberse

a la falta de la CRT y la presencia del DENV2, aunque esta podría no ser la causa de que se redujera la infección viral, debido a que se requiere que IRF-3 esté siendo expresada para que se active por fosforilación y se transloque al núcleo para inducir la expresión del IFN y así controlar la infección viral (Levy & García-Sastre, 2001). Alternativamente, la bien conocida actividad de chaperona de la CRT podría ser la causa de la reducción en la cantidad de IRF-3.

Adicionalmente, el análisis *in silico* realizado con STRING, mostró cinco proteínas funcionalmente relacionadas con IRF-3 y STAT-6. DDX58, MAVS, TBK1, JUN, las cuales con parte de la vía de IFN I, e IL4, una citocina de la respuesta Th2 (Doly et al., 1998; Jadhav et al., 2018; Levy & García-Sastre, 2001). La vía RIG-I/MDA5/MAVS/TBK1 es un regulador clave de la replicación de DENV (Olagnier et al., 2014). Sin embargo, el DENV es capaz de evadir esta vía, NS4A interactúa con MAVS para evitar su unión con RIG-I. NS2A y NS4B pueden bloquear directamente el reclutamiento y la activación de los complejos TBK1 (Dalrymple et al., 2015; Z. He et al., 2016).

Para la TAK1(NR2C2), se encontraron diez proteínas que podrían estar relacionadas con su función durante la infección con DENV. Entre estas proteínas se encuentran TAB1, las MAP cinasas MAP2K6 y MAP3K7, TGFB1, 2 y 3 así como los receptores de TFFB 1 y 2. La activación de la TAK1 requiere de TAB1 y activa a p38, la cinasa JNK y NF- κ B, llevando a la producción de citocinas (Lei et al., 2014). La vía de TGFB puede activar a Erk, p38 y las cinasas JNK y MAP, proteínas tipo Rho GTPasas, y la vía PI3K-AKT-TOR, la cual regula la síntesis de proteínas (Kang et al., 2009). Todos estos resultados e interacciones sugieren que la CRT podría estar siendo usada por DENV como otra forma de evadir la respuesta inmune de la célula infectada.

Una de las múltiples funciones de la CRT es su papel como amortiguador de calcio; por lo tanto regula la homeostasis de este ión, principalmente en el RE, el cual es un sitio de almacenamiento crucial de Ca^{2+} (Krebs et al., 2015; M Michalak et al., 1999). La infección por el DENV en líneas celulares hepáticas causa un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática a Ca^{2+} y una disminución del Ca^{2+} que puede ser liberado del RE por medio de un agonista (Dionicio et al., 2018). Debido al aumento en la cantidad de la CRT

en las células infectadas con el DENV y a su importancia en la homeostasis de calcio en el RE, nos preguntamos si el quelante intracelular de calcio, BAPTA-AM afectaría la infección por DENV en células Huh-7. Este quelante intracelular de calcio redujo el porcentaje de células infectadas, la secreción de NS1 y la expresión de la NS3, lo cual concuerda con los resultados generados por Dionicio et al (2018), quienes observaron que el tratamiento con BAPTA-AM a una concentración de 10 μ M redujo la progenie viral de DENV pero no del virus de la estomatitis vesicular en las células HepG2 y Huh-7 (Dionicio et al., 2018).

Además, se analizó el efecto del tratamiento con BAPTA-AM durante la infección con DENV en células Huh-7 sobre las moléculas de señalización relacionadas con la respuesta inmune innata. Encontramos un aumento en los niveles de fosforilación de AKT. La infección con DENV activa a la vía de señalización de PI3K/AKT, afectando el proceso de remodelado del citoesqueleto de actina, lo cual podría ser necesario para la creación de los complejos de replicación del RE. Sin embargo, en este estudio, la activación de la vía PI3K/AKT se presenta solamente en los eventos tempranos y tardíos del ciclo de replicación viral (Cuartas-López et al., 2018). La activación de la vía PI3K/AKT se ha relacionado con la activación de la apoptosis en los eventos tardíos de la infección por DENV (Liu et al., 2014). Aunque la activación de esta vía puede tener el efecto opuesto y bloquear la apoptosis en las etapas tempranas de la infección viral (Lee et al., 2005). En nuestro estudio, el tratamiento con BAPTA-AM activó a AKT reduciendo la infección por el DENV. Esto podría explicarse por el hecho de que la vía PI3K/AKT también está involucrada en la regulación de la respuesta inmune. Una mayor actividad de de PI3K/AKT puede impedir la propagación viral debido a la activación de las defensas celulares (Ji & Liu, 2008).

Río abajo de la vía PI3K/AKT están las Rho GTPasas y se ha observado que la inhibición de la Rho GTPasa RAC1, aumenta los títulos del DENV2 en las células Huh-7 (Cuartas-López et al., 2018). Las Rho GTPAsas pueden, a través de NF κ B, regular varios aspectos de la inmunidad innata (Tong & Tergaonkar, 2014). La Rho GTPasa Rac1, está río arriba de IKK-e y TBK-1

en la vía de activación viral de IRF-3 y es esencial para la respuesta del IFN I (Cuartas-López et al., 2018; Ehrhardt et al., 2004). En concordancia con estos estudios, nuestros resultados indican que la activación de la vía AKT podría estar relacionada con la activación de la respuesta inmune contra el DENV2, llevando a la reducción en el porcentaje de infección, la progenie viral, la cantidad de NS3 y la secreción de NS1 observadas.

En el análisis *in silico* de la interacción funcional de AKT, se encontraron diez proteínas que podrían relacionarse con el efecto observado durante el tratamiento con BAPTA-AM en las células infectadas con DENV. Cuatro de estas proteínas están relacionadas con la vía de mTOR, las proteínas TSC2, PDK1, que pueden activar la vía AKT/mTOR, y RICTOR (J. He et al., 2019; Sarbassov et al., 2004). Se ha observado que DENV puede inducir autofagia a través de mTOR (Kong et al., 2020). El DENV altera el metabolismo de los lípidos de las células infectadas para promover la infección. Un mecanismo para alterar este metabolismo es la inducción de una autofagia selectiva que tiene como blanco las gotas de lípidos, llamada lipofagia. La infección con el DENV requiere suprimir la actividad de mTORC1 para inducir la lipofagia (Jordan & Randall, 2017). Así mismo, tres proteínas que se han relacionado con la apoptosis, también fueron encontradas, GSK3 β , la sintasa de óxido nítrico NOS3, y FOXO3, la cual también puede estar asociada con la inmunidad innata contra los virus (Cuartas-López & Gallego-Gómez, 2020; Fasano et al., 2019; Lin et al., 2002; Loebel et al., 2018). La inhibición farmacológica de GSK3 β en etapas tardías de la infección con DENV causa una disminución de los títulos virales, indicando que esta proteína, que está río abajo de la vía PI3K/AKT, es importante para el ciclo replicativo de DENV (Cuartas-López & Gallego-Gómez, 2020). También se encontró la proteína PP2A, cuya inhibición tiene un efecto antiviral de manera independiente de HMGCR (Soto-Acosta et al., 2017). Finalmente, la chaperona HSP90, cuya interacción con múltiples proteínas de DENV ha sido reportada, también fue encontrada en esta red de interacción funcional de proteínas (Khadka et al., 2011; Srisutthisamphan et al., 2018).

En resumen, nuestros resultados indican que la CRT es una chaperona que no sólo es importante en la síntesis de proteínas virales sino también en

modular la respuesta del IFN, favoreciendo la replicación viral. Por otro lado, aunque el Ca^{2+} intracelular es importante en el ciclo replicativo de DENV, aún es incierto el paso específico en el ciclo replicativo viral en que este mensajero celular participa.

CONCLUSIONES

El virus DENV requiere a la CRT para replicarse y para evadir la respuesta inmune en las células Huh-7.

La disminución del calcio intracelular, mediante el tratamiento con BAPTA-AM, reduce la infección por el DENV2 aumentando la fosforilación de AKT y afectando el ciclo de replicación viral.

PERSPECTIVAS

- Determinar si la CRT está funcionando como chaperona de las proteínas virales.
- Determinar si la CRT afecta la producción del IFN y la activación de los ISGs.
- Determinar qué vía o vías de señalización se están activando con la fosforilación de AKT, al tratar a las células infectadas con BAPTA-AM.

REFERENCIAS

- Acheson N. H. (2011). Introduction to virology. En Acheson N. H (Ed.), *Fundamentals of Molecular Virology* (2nd ed., pp. 2–17). John Wiley & Sons.
- Angleró-Rodríguez, Y. I., Pantoja, P., & Sariol, C. A. (2014). Dengue virus subverts the interferon induction pathway via NS2B/3 protease-IkB kinase epsilon interaction. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 21(1), 29–38. <https://doi.org/10.1128/CVI.00500-13>
- Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Blom, A. M., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2011). Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(1), 424–433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100750>
- Benali-Furet, N. L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R., & Paterlini-Bréchet, P. (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene*, 24(31), 4921–4933. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208673>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Berridge, Michael J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- 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. W., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Bolt, G. (2001). The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperone expression. *Archives of Virology*, 146(11), 2055–2068. <https://doi.org/10.1007/s007050170020>
- 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(8), e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Buchy, P., Peeling, R., Artsob, H., Cardoso, J., Dayal-Drager, R., Gubler, D., Guzman, M., Hunsperger, E., Lum, L., Martinez, E., Pelegriño, J., & Vazquez, S. (2009). Laboratory diagnosis and diagnostic tests. En *Guidelines for*

diagnosis, treatment, prevention and control (pp. 91–106). World Health Organization.

- Cai, Q., Verma, S. C., Choi, J.-Y., Ma, M., & Robertson, E. S. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits interleukin-4-mediated STAT6 phosphorylation to regulate apoptosis and maintain latency. *Journal of Virology*, *84*(21), 11134–11144. <https://doi.org/10.1128/JVI.01293-10>
- CDC. (2019, septiembre 5). *Cuadro clínico | Dengue | CDC*. <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/clinical-presentation.html>
- Chaturvedi, P., Saxena, V., Dhawan, R., & Chaturvedi, U. C. (1995). Role of calcium in induction of dengue virus-specific helper T cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, *33*(11), 809–815.
- Chen, H., Sun, H., You, F., Sun, W., Zhou, X., Chen, L., Yang, J., Wang, Y., Tang, H., Guan, Y., Xia, W., Gu, J., Ishikawa, H., Gutman, D., Barber, G., Qin, Z., & Jiang, Z. (2011). Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell*, *147*(2), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.022>
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, *3*(8), 866–871.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., & Dubuisson, J. (1998). Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins. *Journal of Virology*, *72*(5).
- Chua, J. J.-E., Bhuvanakantham, R., Chow, V. T.-K., & Ng, M.-L. (2005). Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. *Virus Research*, *112*(1–2), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.025>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- 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*(23), 11418–11431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>
- Cuartas-López, A. M., & Gallego-Gómez, J. C. (2020). Glycogen synthase kinase 3β participates in late stages of Dengue virus-2 infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *115*, e190357. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190357>
- Cuartas-López, A. M., Hernández-Cuellar, C. E., & Gallego-Gómez, J. C. (2018). Disentangling the role of PI3K/Akt, Rho GTPase and the actin cytoskeleton on dengue virus infection. *Virus Research*, *256*, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.08.013>
- Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio*, *6*(3), e00553-00515. <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>
- 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(3), e2127–e2127. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.409>

- De La Cruz Hernández, S. I., Puerta-Guardo, H., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Ortiz-Navarrete, V., Ludert, J. E., & Del Angel, R. M. (2014). A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 60(3), 196–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.002>
- de la Cruz-Hernández, S. I., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Alpuche-Aranda, C., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2013). Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), 446–454. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0023>
- Dhawan, R., Chaturvedi, U. C., Khanna, M., Mathur, A., Tekwani, B. L., Pandey, V. C., & Rai, R. N. (1991). Obligatory role of Ca²⁺ in the cytotoxic activity of dengue virus-induced cytotoxin. *International Journal of Experimental Pathology*, 72(1), 31–39.
- Dimcheff, D. E., Askovic, S., Baker, A. H., Johnson-Fowler, C., & Portis, J. L. (2003). Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration. *Journal of Virology*, 77(23), 12617–12629. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.23.12617-12629.2003>
- Ding, W., Albrecht, B., Luo, R., Zhang, W., Stanley, J. R., Newbound, G. C., & Lairmore, M. D. (2001). Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12(I): Association with calreticulin and calnexin. *Journal of Virology*, 75(16), 7672–7682. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7672-7682.2001>
- Dionicio, C. L., Peña, F., Constantino-Jonapa, L. A., Vazquez, C., Yocupicio-Monroy, M., Rosales, R., Zambrano, J. L., Ruiz, M. C., Del Angel, R. M., & Ludert, J. E. (2018). Dengue virus induced changes in Ca²⁺ homeostasis in human hepatic cells that favor the viral replicative cycle. *Virus Research*, 245, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.11.029>
- Doly, J., Civas, A., Navarro, S., & Uze, G. (1998). Type I interferons: Expression and signalization. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 54(10), 1109–1121. <https://doi.org/10.1007/s000180050240>
- Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W. J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O., & Ludwig, S. (2004). Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Letters*, 567(2–3), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.069>
- Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore Signorile, M., & Simone, C. (2019). FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/cells8091110>
- Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of flavivirus infections: Using and abusing the host cell. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>

- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 7(9), 690–702. <https://doi.org/10.1038/nri2152>
- Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2011). Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.012>
- Gelebart, P., Opas, M., & Michalak, M. (2005). Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.030>
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., & Siddiqui, A. (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9599–9604. <https://doi.org/10.1073/pnas.171311298>
- Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A., & Harris, E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *Journal of Molecular Biology*, 426(6), 1148–1160. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.023>
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496.
- Hadinegoro, S. R. S. (2012). The revised WHO dengue case classification: Does the system need to be modified? *Paediatrics and International Child Health*, 32(s1), 33–38. <https://doi.org/10.1179/2046904712Z.00000000052>
- He, J., Yu, S., Guo, C., Tan, L., Song, X., Wang, M., Wu, J., Long, Y., Gong, D., Zhang, R., Cao, Z., Li, Y., & Peng, C. (2019). Polyphyllin I induces autophagy and cell cycle arrest via inhibiting PDK1/Akt/mTOR signal and downregulating cyclin B1 in human gastric carcinoma HGC-27 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 117, 109189. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109189>
- He, Z., Zhu, X., Wen, W., Yuan, J., Hu, Y., Chen, J., An, S., Dong, X., Lin, C., Yu, J., Wu, J., Yang, Y., Cai, J., Li, J., & Li, M. (2016). Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. *Journal of Virology*, 90(16), 7219–7230. <https://doi.org/10.1128/JVI.00221-16>
- Jadhav, N. J., Gokhale, S., Seervi, M., Patil, P. S., & Alagarasu, K. (2018). Immunomodulatory effect of 1, 25 dihydroxy vitamin D3 on the expression of RNA sensing pattern recognition receptor genes and cytokine response in dengue virus infected U937-DC-SIGN cells and THP-1 macrophages. *International Immunopharmacology*, 62, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.019>
- Jheng, J.-R., Lau, K. S., Tang, W.-F., Wu, M., & Horng, J.-T. (2010). Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. *Cellular Microbiology*, 12(6), 796–813. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01434.x>
- Ji, W.-T., & Liu, H. J. (2008). PI3K-Akt Signaling and Viral Infection. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(3), 218–226. <https://doi.org/10.2174/187220808786241042>
- Jordan, T. X., & Randall, G. (2017). Dengue Virus Activates the AMP Kinase-

mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy. *Journal of Virology*, 91(11).
<https://doi.org/10.1128/JVI.02020-16>

- Kang, J. S., Liu, C., & Derynck, R. (2009). New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends in Cell Biology*, 19(8), 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.008>
- Khadka, S., Vangeloff, A. D., Zhang, C., Siddavatam, P., Heaton, N. S., Wang, L., Sengupta, R., Sahasrabudhe, S., Randall, G., Gribbskov, M., Kuhn, R. J., Perera, R., & LaCount, D. J. (2011). A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 10(12), M111.012187. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012187>
- Khanna, M., Chaturvedi, U. C., Dhawan, R., Tekwani, B. L., & Pandey, V. C. (1991). Presence of Ca²⁺ is obligatory for the cytotoxic activity of dengue virus-induced cytotoxic factor. *Immunology*, 72(1), 73–78.
- Kong, W., Mao, J., Yang, Y., Yuan, J., Chen, J., Luo, Y., Lai, T., & Zuo, L. (2020). Mechanisms of mTOR and Autophagy in Human Endothelial Cell Infected with Dengue Virus-2. *Viral Immunology*, 33(1), 61–70. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0009>
- Krebs, J., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2015, abril 24). *Ca(2+) Homeostasis and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress: An Integrated View of Calcium Signaling*. Biochemical and Biophysical Research Communications; Biochem Biophys Res Commun. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004>
- Kuhn, J. R. (2011). The Flaviviruses. En N. H. Acheson (Ed.), *Fundamentals of Molecular Virology* (2nd ed., pp. 137–147). John Wiley & Sons.
- Lee, C.-J., Liao, C.-L., & Lin, Y.-L. (2005). Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *Journal of Virology*, 79(13), 8388–8399. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8388-8399.2005>
- Lei, X., Han, N., Xiao, X., Jin, Q., He, B., & Wang, J. (2014). Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *Journal of Virology*, 88(17), 9830–9841. <https://doi.org/10.1128/JVI.01425-14>
- Levy, D. E., & García-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(2–3), 143–156. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(00\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(00)00027-7)
- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., Sittisombut, N., Malasit, P., & Yenichitsomanus, P. (2009). Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.070>
- Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Shiau, A.-L., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., Liu, C.-C., Chiu, S.-C., & Lin, Y.-S. (2002). Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(2), 657–664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.657>
- Liu, Y., Liu, H., Zou, J., Zhang, B., & Yuan, Z. (2014). Dengue virus

subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology*, 448, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.016>

- Loebel, M., Holzhauser, L., Hartwig, J. A., Shukla, P. C., Savvatis, K., Jenke, A., Gast, M., Escher, F., Becker, S. C., Bauer, S., Stroux, A., Beling, A., Kespohl, M., Pinkert, S., Fechner, H., Kuehl, U., Lassner, D., Poller, W., Schultheiss, H.-P., ... Skurk, C. (2018). The forkhead transcription factor Foxo3 negatively regulates natural killer cell function and viral clearance in myocarditis. *European Heart Journal*, 39(10), 876–887. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx624>
- Mangold, K. A., & Reynolds, S. L. (2013). A review of dengue fever: A resurging tropical disease. *Pediatric Emergency Care*, 29(5), 665–669; quiz 670–671. <https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828ed30e>
- Martínez-Betancur, V., Marín-Villa, M., & Martínez-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(8), 1448–1458. <https://doi.org/10.1002/jmv.23857>
- Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K., & Opas, M. (1999). Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal*, 344(Pt 2), 281–292.
- Michalak, Marek, Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I., & Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 417(3), 651–666. <https://doi.org/10.1042/BJ20081847>
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8873–8882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200>
- Misra, A., Mukerjee, R., & Chaturvedi, U. C. (1996). Production of nitrite by dengue virus-induced cytotoxic factor. *Clinical and Experimental Immunology*, 104(3), 406–411.
- Morrison, J., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2012). Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses*, 4(3), 397–413. <https://doi.org/10.3390/v4030397>
- Morrison, J., & García-Sastre, A. (2014). STAT2 signaling and dengue virus infection. *JAK-STAT*, 3(1), e27715. <https://doi.org/10.4161/jkst.27715>
- Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Maestre, A. M., Rajsbaum, R., Pisanelli, G., Simon, V., Mulder, L. C. F., Fernandez-Sesma, A., & García-Sastre, A. (2013). Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003265. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003265>
- Mukerjee, R., Misra, A., & Chaturvedi, U. C. (1996). Dengue virus-induced cytotoxin releases nitrite by spleen cells. *International Journal of Experimental Pathology*, 77(2), 45–51.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(1), 13–

22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>

- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Muñoz-Jordán, J. L., & Fredericksen, B. L. (2010). How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses*, 2(2), 676–691. <https://doi.org/10.3390/v2020676>
- Murakami, Y., Tanimoto, K., Fujiwara, H., An, J., Suemori, K., Ochi, T., Hasegawa, H., & Yasukawa, M. (2010). Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virology Journal*, 7, 91. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-91>
- Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J. B., Müller-Esterl, W., Lew, D. P., Krause, K.-H., Demaurex, N., Opas, M., & Michalak, M. (2001). Functional specialization of calreticulin domains. *The Journal of Cell Biology*, 154(5), 961–972. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102073>
- Nakhasi, H. L., Ramanujam, M., Atreya, C. D., Hobman, T. C., Lee, N., Esmaili, A., & Duncan, R. C. (2001). Rubella virus glycoprotein interaction with the endoplasmic reticulum calreticulin and calnexin. *Archives of Virology*, 146(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s007050170186>
- Narro, J., & Gómez, H. (1995). El dengue en México: Un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública de México*, 37(Su1), 12–20.
- Ngo, A. M., Shurtleff, M. J., Popova, K. D., Kulsuptrakul, J., Weissman, J. S., & Puschnik, A. S. (2019). The ER membrane protein complex is required to ensure correct topology and stable expression of flavivirus polyproteins. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48469>
- Noisakran, S., Sengsai, S., Thongboonkerd, V., Kanlaya, R., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Malasit, P., & Yenchitsomanus, P. (2008). Identification of human hnRNP C1/C2 as a dengue virus NS1-interacting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.165>
- Olgarnier, D., Scholte, F. E. M., Chiang, C., Albulescu, I. C., Nichols, C., He, Z., Lin, R., Snijder, E. J., van Hemert, M. J., & Hiscott, J. (2014). Inhibition of dengue and chikungunya virus infections by RIG-I-mediated type I interferon-independent stimulation of the innate antiviral response. *Journal of Virology*, 88(8), 4180–4194. <https://doi.org/10.1128/JVI.03114-13>
- OPS/OMS. (2020). *Actualización Epidemiológica: Dengue*. OPS/OMS. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=51692-7-de-febrero-de-2020-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es
- Otteken, A., & Moss, B. (1996). Calreticulin Interacts with Newly Synthesized Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein, Suggesting a Chaperone Function Similar to That of Calnexin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 97–103. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.97>
- Pan American Health Organization, Espinal, M. A., & World Health

Organization. (2016). *Dengue: Guías para la atención de enfermos en la región de las Américas* (Segunda edición). OPS.

- Paranjape, S. M., & Harris, E. (2010). Control of dengue virus translation and replication. En Rothman, A.L (Ed.), *Dengue virus* (pp. 16–31). Springer.
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008a). Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008b). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Prins, D., & Michalak, M. (2011, enero 3). *Organellar Calcium Buffers*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology; Cold Spring Harb Perspect Biol. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004069>
- Reid, D. W., Campos, R. K., Child, J. R., Zheng, T., Chan, K. W. K., Bradrick, S. S., Vasudevan, S. G., Garcia-Blanco, M. A., & Nicchitta, C. V. (2018). Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. *Journal of Virology*, 92(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.01766-17>
- Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., & Del Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of Virology*, 79(8), 4557–4567. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005>
- Rigau-Pérez, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J., Reiter, P., Sanders, E. J., & Vorndam, A. V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 352(9132), 971–977.
- 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(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2016). Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses*, 8(6), 160. <https://doi.org/10.3390/v8060160>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D.-H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology: CB*, 14(14), 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- Scherbik, S. V., & Brinton, M. A. (2010). Virus-induced Ca²⁺ influx extends survival of west nile virus-infected cells. *Journal of Virology*, 84(17), 8721–8731. <https://doi.org/10.1128/JVI.00144-10>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Secretaría de Salud. (2019). *Panorama Epidemiológico de Dengue*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/524262/Pano_dengue_52_2019.pdf
- Shivanthan, M. C., & Rajapakse, S. (2014). Dengue and calcium. *International*

Journal of Critical Illness and Injury Science, 4(4), 314–316.
<https://doi.org/10.4103/2229-5151.147538>

- Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & Del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257>
- Srisutthisamphan, K., Jirakanwisal, K., Ramphan, S., Tongluan, N., Kuadkitkan, A., & Smith, D. R. (2018). Hsp90 interacts with multiple dengue virus 2 proteins. *Scientific Reports*, 8(1), 4308. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22639-5>
- Suthar, M. S., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2013). Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003541. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003541>
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Bix, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., & Marovich, M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 823–829. <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>
- Thepparit, C., & Smith, D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: Identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of Virology*, 78(22), 12647–12656. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12647-12656.2004>
- Tomita, Y., Yamashita, T., Sato, H., & Taira, H. (1999). Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin. *Journal of Biochemistry*, 126(6), 1090–1100. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022554>
- Tong, L., & Tergaonkar, V. (2014). Rho protein GTPases and their interactions with NFκB: Crossroads of inflammation and matrix biology. *Bioscience Reports*, 34(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20140021>
- Waser, M., Mesaeli, N., Spencer, C., & Michalak, M. (1997). Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *The Journal of Cell Biology*, 138(3), 547–557. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.547>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- WHO. (2013). *Impact of Dengue*. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>
- WHO, TDR/WHO, & NTD/WHO. (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. World Health Organization.
- WHO, W. H. O. (2020, marzo 2). *WHO Dengue and severe dengue*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

- Xia, Z., Xu, G., Yang, X., Peng, N., Zuo, Q., Zhu, S., Hao, H., Liu, S., & Zhu, Y. (2017). Inducible TAP1 Negatively Regulates the Antiviral Innate Immune Response by Targeting the TAK1 Complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 198(9), 3690–3704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601588>
- Yang, T.-C., Li, S.-W., Lai, C.-C., Lu, K.-Z., Chiu, M.-T., Hsieh, T.-H., Wan, L., & Lin, C.-W. (2013). Proteomic analysis for Type I interferon antagonism of Japanese encephalitis virus NS5 protein. *Proteomics*, 13(23–24), 3442–3456. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300001>
- Yáñez, M., Gil-Longo, J., & Campos-Toimil, M. (2012). Calcium Binding Proteins. En Md. S. Islam (Ed.), *Calcium Signaling* (pp. 461–482). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_19
- Yap, S. S. L., Nguyen-Khuong, T., Rudd, P. M., & Alonso, S. (2017). Dengue Virus Glycosylation: What Do We Know? *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01415>
- Yue, X., Wang, H., Zhao, F., Liu, S., Wu, J., Ren, W., & Zhu, Y. (2012). Hepatitis B virus-induced calreticulin protein is involved in IFN resistance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(1), 279–286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103405>
- Zhou, Y., Frey, T. K., & Yang, J. J. (2009). Viral calciomics: Interplays between Ca²⁺ and virus. *Cell Calcium*, 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.05.005>
- Zhou, Y., Xue, S., & Yang, J. J. (2013). Calciomics: Integrative studies of Ca²⁺-binding proteins and their interactomes in biological systems. *Metalomics: Integrated Biometal Science*, 5(1), 29–42. <https://doi.org/10.1039/c2mt20009k>
- Zhu, J., & Newkirk, M. M. (1994). Viral induction of the human autoantigen calreticulin. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*, 17(3), 196–205.