



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR

“Análisis de localización nuclear de la proteína NS3 durante  
la infección con DENV-2 en células Huh7”

TESIS

QUE PRESENTA:

PALACIOS RÁPALO SELVIN NOÉ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS

DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES  
DRA. ANA LORENA GUTIERREZ ESCOLANO

CIUDAD DE MEXICO

JULIO, 2020

## **Créditos a las instituciones**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel y cotutoría Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Este trabajo fue asesorado por la Dra. Patricia Talamás Rohana y el Dr. Bulmaro Cisneros profesores e investigadores del CINVESTAV unidad Zacatenco.

### **Tutores:**

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

### **Asesores:**

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dr. Bulmaro Cisneros (Departamento de Genética y Biología Molecular)

### **Numero de CVU:**

938058

## **Agradecimientos**

Primeramente, agradecer a Dios, por la sabiduría e inteligencia que solamente él puede dar, por la salud y las bendiciones que cada día nos muestra. A mis abuelos, Bertilia Velásquez y Jesús Palacios por su apoyo incondicional. A mi madre Jenny Rápalo, a mi padre Selvin Palacios, a mi hermana Josselyn Palacios, por su apoyo y por siempre creer en mí. A toda mi familia que gracias a su motivación pude lograr este gran paso en mi vida.

Agradezco a mi profesora y tutora, la Dra. Rosa María del Ángel por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme su confianza y por su invaluable contribución en el desarrollo de mi proyecto de investigación. También, no puedo dejar de mencionar a mi profesora y cotutora la Dra. Ana Lorena Gutiérrez por brindarme su apoyo y sus consejos, y a mis compañeros de laboratorio Luis Adrián De Jesús, José Manuel Reyes, Fidel Osuna, Noe Farfan, Carla Gallardo y Ariana Monzón por sus consejos y sobre todo su amistad y cariño sincero. Gracias a mis asesores, Dra. Patricia Talamás y Dr. Bulmaro Cisneros, por su tiempo y sus consejos.

A todos muchas gracias.

## Contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
1.1 Epidemiología.....	8
2.2 Sintomatología.....	8
2.3 Diagnóstico.....	9
3 Biología del virus.....	10
3.1 Generalidades.....	10
3.2 Características del virus.....	10
3.3 Proteínas estructurales.....	11
3.4 Proteínas no estructurales.....	12
3.5 Ciclo replicativo.....	13
4 Antecedentes.....	14
4.1 Complejo del Poro Nuclear (NPC).....	14
4.2 Vías clásicas del transporte núcleo-citoplasma.....	15
4.3 Alteración del transporte núcleo-citoplasma causado por virus RNA.....	16
4.4 Proteínas de virus de la familia <i>Flaviviridae</i> en núcleo.....	17
4.5 Proteínas virales de DENV y el transporte núcleo-citoplasma.....	18
5 Justificación.....	19
6 Hipótesis.....	20
7 Objetivos.....	20
7.1 Objetivo general.....	20
7.2 Objetivos específicos.....	20
8 Diseño experimental.....	21
9 Materiales y métodos.....	22
9.1 Análisis <i>in silico</i> de NS3.....	22
9.2 Cultivo e infección de células Huh7 con DENV.....	22
9.3 Inhibición de las vías clásicas del transporte nucleocitoplasma.....	23
9.4 Fraccionamiento celular.....	23
9.5 Western blot.....	23
9.6 Inmunofluorescencia.....	24
9.7 Imagen y análisis estadístico.....	24
9.8 Viabilidad celular.....	25
9.9 Declaración de ética.....	25
10 Resultados.....	26
10.1 Análisis <i>in silico</i> de NS3 de DENV2.....	26

10.1.1	Predicción de la estructura terciaria de NS3 de DENV2 .....	26
10.1.2	Predicción de NLS y NES en la proteína NS3 DENV2.....	28
10.2	Localización subcelular de la proteína NS3 DENV2.....	30
10.3	Inhibición de la vía importina $\alpha/\beta$ durante la infección con DENV 2.....	33
11	Discusión .....	36
12	Conclusiones.....	40
13	Perspectivas.....	40
14	Bibliografía.....	41

### Figuras y tablas

Figura 1.	Nivel de viremia y de anticuerpos durante la infección primaria y secundaria por DENV.....	7
Figura 2.	Estructura de DENV. Interpretación de la microscopía crioelectrónica usando la estructura conocida de la glicoproteína E.....	8
Figura 3:	Representación esquemática de la estructura de la poliproteína de DENV.....	9
Figura 4.	Estructura general de la proteína NS3 de DENV4.....	11
Figura 5.	Estructura del complejo del poro nuclear (NPC).....	13
Figura 6.	Estructura tridimensional del heterodímero Importina $\alpha/\beta$ .....	14
Figura 7.	Predicción de la estructura terciaria de la proteasa NS3 de DENV2 cepa Nueva Guinea.....	24
Figura 8.	Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína NS3 de diferentes virus de la familia <i>Flaviviridae</i> .....	25
Figura 9.	Comparación estructural de la proteína NS3 de DENV-4 y NS3 de DENV-2.....	26
Figura 10.	Localización estructural de las NLS y NES predichas en la proteína NS3 de DENV-2.....	28
Figura 11.	La proteína NS3 DENV-2 se localiza en el núcleo de las células Huh7 infectadas.....	29
Figura 12.	Análisis de Western blot de las fracciones nucleares y citoplásmicas de células infectadas con DENV-2.....	31
Figura 13.	Ensayo de viabilidad celular por MTT con diferentes concentraciones de ivermectina en células Huh7.....	32
Figura 14.	La vía importina $\alpha/\beta$ no media la translocación nuclear de la proteína NS3 de DENV2.....	33
Tabla 1.	Predicción de secuencias de localización nuclear y de exporte nuclear en la proteína NS3 DENV-2.. .....	27

## Resumen

El ciclo de replicación viral del virus dengue (DENV) tiene lugar en el citoplasma, sin embargo, el núcleo desempeña un papel esencial en este proceso. La proteína de la cápside (C) y la polimerasa RNA dependiente de RNA o la proteína no estructural 5 (NS5) de los *Flavivirus* se translocan al núcleo de las células infectadas, este hecho es necesario para la replicación viral. Además, también se ha reportado la localización nuclear de la proteína NS3 de diferentes *Flavivirus*. Nuestro grupo reportó la localización nuclear de la proteína NS3 durante la infección por DENV en las células C6/36; sin embargo, la localización nuclear de la proteína NS3 de DENV en las células de mamíferos no ha sido completamente estudiada.

Mediante análisis *in-silico* predijimos la presencia de secuencias de localización nuclear (NLS) y de exporte nuclear (NES) en el dominio de la helicasa de la proteína NS3; ambas secuencias se encontraron conservadas en diferentes miembros del género *Flavivirus*. El análisis de microscopia confocal mostró que la proteína NS3 está presente en el núcleo de las células Huh7 durante las primeras horas de la infección, y posteriormente se transloca al citoplasma, sugiriendo que podría utilizar proteínas de transporte nuclear para moverse entre en núcleo y el citoplasma. Sin embargo, la inhibición de la vía importina  $\alpha/\beta$  no modificó la localización de la proteína NS3 de DENV2, sugiriendo que no usa esta vía para su importe.

Un estudio más detallado de las vías de transporte nuclear en las células infectadas nos permitirá entender los mecanismos que usa la proteína NS3 para moverse entre ambos compartimentos, lo que permitirá entender como contribuye esto en el ciclo replicativo y en la patogénesis de la enfermedad.

## Abstract

The replicative cycle of the dengue virus (DENV) takes place in the cytoplasm; however, the nucleus plays an essential role during this process. The capsid protein (C) and the RNA-dependent RNA polymerase or the non-structural protein 5 (NS5) of the *Flavivirus* are translocated to the nucleus of the infected cells, this fact is necessary for viral replication. In addition, the nuclear location of the NS3 protein of different *Flaviviruses* has also been reported. Our group reported the nuclear location of NS3 protein during DENV infection in C6/36 cells; however, the nuclear localization of DENV NS3 protein in mammalian cells has not been completely studied.

The in-silico analysis predicted the presence of a nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) in the helicase domain of the NS3 protein; both sequences were conserved in different members of the genus *Flavivirus*. Confocal microscopy analysis showed that the NS3 protein is present in the nucleus of Huh7 cells during the first hours of infection, and then it is translocated into the cytoplasm, suggesting that it could use nuclear transport proteins to move between the nucleus and the cytoplasm. However, the inhibition of the  $\alpha/\beta$  importin pathway did not alter the nuclear location of the NS3 protein from DENV2, suggesting that this protein does not use this pathway to be imported.

Therefore, a more detailed study of the nuclear transport pathways in infected cells will allow us to understand the mechanisms that the NS3 protein uses to move between both compartments, which will allow us to understand how this contributes to the replicative cycle and the pathogenesis of the disease.

# 1. Introducción

## 1.1 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado al virus dengue (DENV) como un importante desafío mundial de salud pública en los países ubicados en zonas tropicales y subtropicales (1). Aunque en los últimos años, la infección por DENV ha surgido en nuevos territorios, se ha observado que su historia evolutiva se encuentra localizada, lo que sugiere que su dispersión está ligada principalmente por la movilidad de humanos a nuevos entornos geográficos que poseen el vector adecuado y una población susceptible (2).

DENV es transmitido por mosquitos hembras del género *Aedes* (*A. aegypti* y *A. albopictus*), su principal actividad es por las noches y se encuentra altamente distribuido en el trópico y subtrópico, en donde existen las condiciones ideales para la reproducción del vector; estas regiones se encuentran altamente pobladas, lo que ha permitido el establecimiento y transmisión eficiente de la infección a los humanos (3,4).

Antes de 1970 solo nueve países reportaban casos graves de dengue, para la década de 1980 la incidencia de casos había aumentado y países de las regiones del Pacífico y de las Américas pasaron a ser endémicos por uno o más serotipos del DENV (3). Debido al aumento de la actividad comercial entre el Caribe, América del Norte y del Sur los casos de dengue aumentaron, por lo que los principales brotes reportados en la región de América ocurrieron a partir del año 2000. Se estima que alrededor de 100 millones de personas se infectan por año, lo que implica que 1/3 de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad (4).

## 2.2 Sintomatología

La interacción entre el DENV y su hospedero humano promueve una serie de manifestaciones clínicas que pueden presentarse de leves a graves e incluso la muerte. El periodo de incubación del dengue es de 2-7 días acompañado generalmente por fiebre, cefalea, artralgias, mialgias y dolor retro ocular (3,5). La enfermedad del dengue según la gravedad de sus síntomas, como lo indica la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2009, a) dengue sin signos de alarma: manifestándose principalmente como un síndrome febril inespecífico, b)

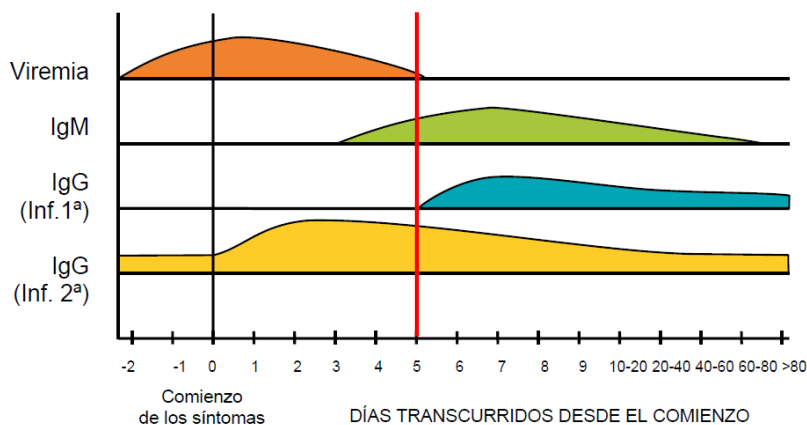


dengue con signos de alarma: en donde el paciente puede presentar dolor abdominal intenso y continuo, vómito persistente, acumulación de líquidos y sangrado de nariz, c) dengue grave: en las formas graves de dengue se puede presentar choque por extravasación de plasma, acumulación de líquidos con dificultad respiratoria, sangrado profuso, compromiso grave de órganos como el hígado, sistema nervioso central, corazón, entre otros (6).

### 2.3 Diagnóstico

Para el diagnóstico de infecciones virales se realizan métodos de detección directos que indiquen una infección activa y que radican en la identificación del RNA viral o indirectos, con los que se identifican anticuerpos específicos que indican que la infección ha progresado o se ha resuelto. El suero es la muestra de elección para el diagnóstico de DENV; la técnica que se utilizará dependerá de los días de evolución de la enfermedad, durante los primeros cinco días (viremia) se utilizan los métodos directos para la detección del RNA viral mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), así como la presencia de antígenos virales (proteínas no estructurales) mediante el uso de técnicas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Pasados los cinco días, los métodos indirectos son útiles para detectar anticuerpos del tipo IgM e IgG utilizando ensayos de ELISA o Inmunofluorescencia indirecta (5,6).

Las primoinfecciones por DENV producen respuestas más fuertes y específicas de IgM, en cambio las infecciones secundarias demuestran una respuesta débil de IgM y fuerte de IgG (6).



\*Modificado de "Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control" Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica N° 548.

Figura 1. Nivel de viremia y de anticuerpos durante la infección primaria y secundaria por DENV. (Carballal, G. & Oubiña, J., 2012).

## 3 Biología del virus

### 3.1 Generalidades

DENV perteneciente al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae*, comprende cuatro serotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (1), que son genéticamente diversos y comparten una limitada identidad de aminoácidos (60-75%). En los serotipos, los clados y variantes genéticas son determinantes importantes para diferenciar su “fitness” viral, virulencia y potencial epidémico, implicando diferencias en las manifestaciones clínicas y en la severidad de la enfermedad (7).

### 3.2 Características del virus

DENV es un virus envuelto, de simetría icosaédrica de aproximadamente 50 nm. En su envoltura lipídica se insertan las proteínas de membrana y de la envoltura (Figura 2). En el interior se localiza el complejo ribonucleoprotéico formado por proteína de la cápside y el genoma viral, el cual consiste de una hebra de RNA de sentido positivo que codifica a una poliproteína que se procesa en siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5) y tres estructurales (prM, C y E) (8) (Figura 3).

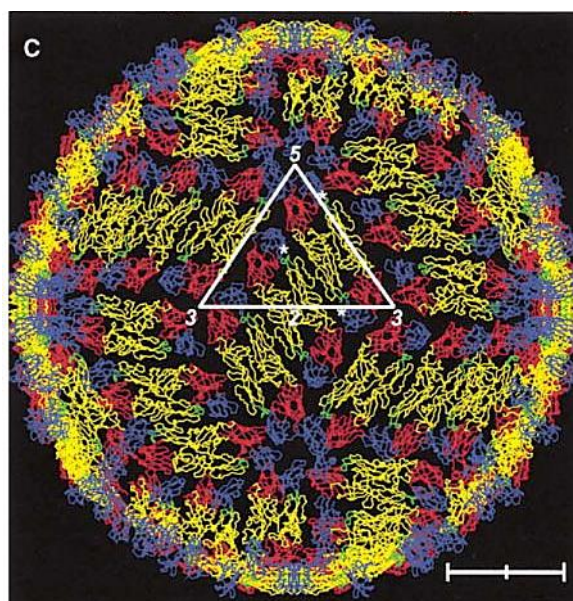


Figura 2. Estructura de DENV. Interpretación de la microscopía crioelectrónica usando la estructura conocida de la glicoproteína E. Tomado de: Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. (Kuhn, R. *et al.*, 2002) (9).

### 3.3 Proteínas estructurales

La proteína C es la proteína de la cápside que posee una estructura secundaria con cuatro hélices alfas con diferentes funciones. Se ancla a la membrana del retículo endoplásmico (RE) mediante dos de sus hélices que poseen características hidrofóbicas. Otra hélice con carácter básico localizada en la cara citoplásmica se ancla al RNA genómico recién sintetizado formando la nucleocápside. La última hélice que posee características también hidrofóbicas promueve la estabilización de la nucleocápside y el reclutamiento de gotas lipídicas del citoplasma, promoviendo la formación de la partícula viral.

La proteína precursora de membrana (prM) se encuentra presente en viriones inmaduros, la cual es procesada durante el transporte de los viriones vía trans-Golgi por la proteasa celular furina, generando el péptido pr y la proteína M, y con ello la maduración del virión.

La proteína E, es la proteína de envoltura que se encuentra en la superficie del virus formando complejos homodiméricos de típico cabeza-cola. Además, es la única proteína viral que interactúa con el receptor de membrana celular y es el principal inmunógeno del virus, ya que estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizantes (8).

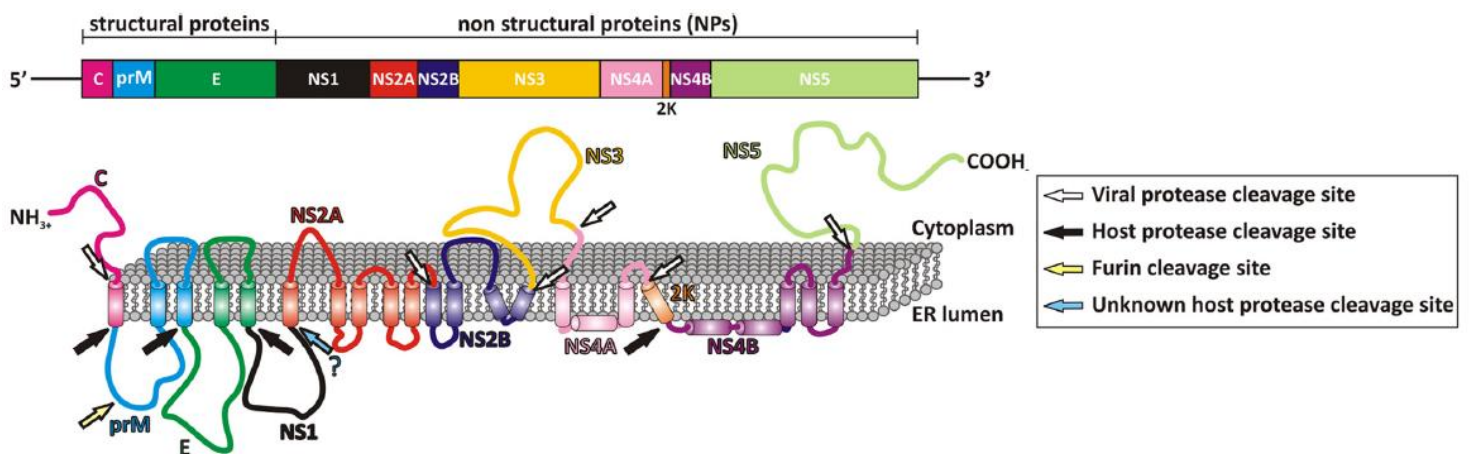


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de la poliproteína de DENV. Tomado de: Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. (Assenberg, R. *et al.*, 2009) (10)

### 3.4 Proteínas no estructurales

La proteína NS1 forma dímeros asociados a balsas lipídicas o hexámeros que se secretan, también se puede localizar en el citoplasma y en el espacio extracelular estimulando al sistema inmune, y participa en la apertura de las uniones intercelulares favoreciendo la fuga de plasma (11). La proteína NS2A promueve el ensamblaje y replicación viral, mientras que la proteína NS2B posee una porción hidrofóbica que se ancla a la membrana del RE que luego al ser liberada se une a la proteína NS3 en su dominio proteasa funcionando como un cofactor.

La proteína NS5 es la proteína más conservada entre los flavivirus, es una proteína multifuncional, ya que el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del capping y la metilación del extremo 5' del RNA viral, mientras que, en el extremo C-terminal se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRps). Por lo tanto, la proteína NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y la transcripción del RNA viral. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señal de localización nuclear (NLS) en la proteína NS5 que facilita su importación al núcleo (8,12), donde se ha reportado que modula la inducción de interleucinas y favorece la producción viral (13).

La proteína NS3 es una proteína multidominio, en el extremo N-terminal posee un dominio de proteasa similar a la tripsina donde se encuentra la triada catalítica, y en el extremo C-terminal posee un dominio de helicasa que pertenece a la superfamilia 2 (SF2) de helicasas, la cual posee motivos característicos de un sitio de unión a RNA (Figura 4) (10,14). Recientemente, se encontró que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje (8). Información generada por nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de NS3 en el núcleo de células de mosquito infectados con el virus (15), donde juega un papel importante en la integridad del complejo del poro nuclear (16).

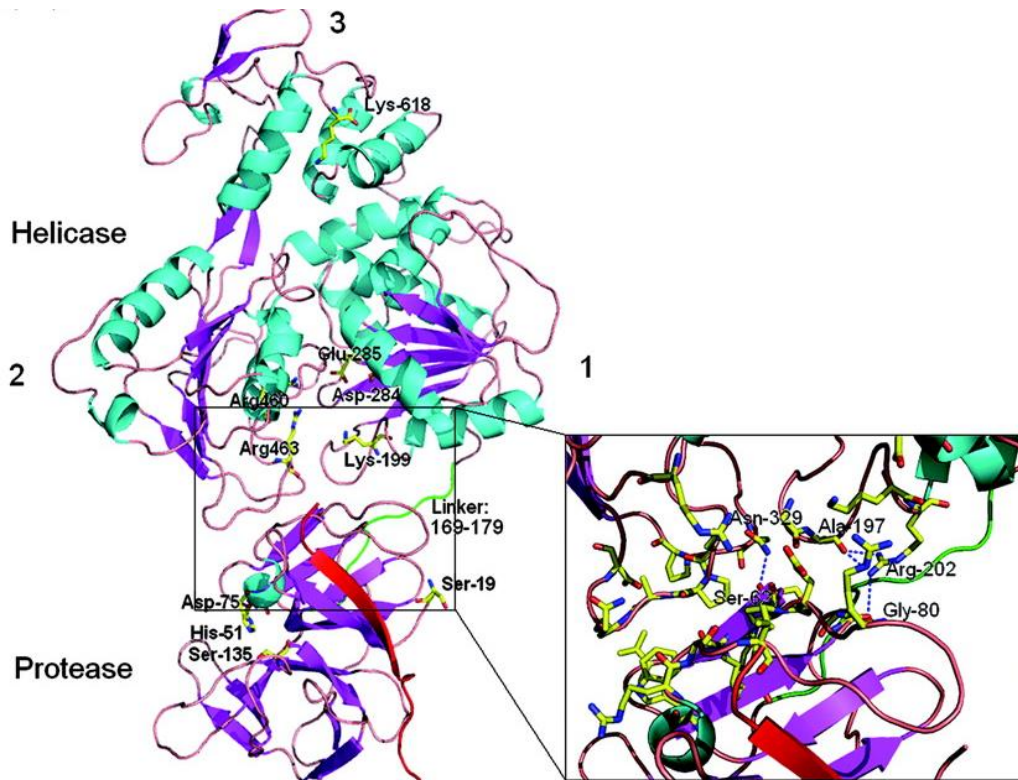


Figura 4. Estructura general de la proteína NS3 de DENV4. Tomado de: Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. (Luo, D. *et al.*, 2008) (14)

### 3.5 Ciclo replicativo

La entrada de DENV a la célula blanco inicia cuando la proteína E del virus interacciona con receptores celulares como el DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin o CD209) o proteoglicanos como el heparán sulfato, que promueven la endocitosis del virus mediado por la proteína clatrina. El endosoma temprano se convertirá en endosoma tardío, y a continuación se fusionará con el lisosoma acidificando el pH de la vesícula, lo que promueve un cambio conformacional de la proteína E permitiendo la fusión de la envoltura viral con el lisosoma, liberando la nucleocápside en el citoplasma.

Posteriormente, se libera el genoma viral y debido a que DENV posee un genoma de RNA de cadena sencilla en sentido positivo, éste es traducido directamente en una poliproteína en el retículo endoplásmico, la cual es procesada por proteasas celulares y por la proteasa viral NS3pro, liberando las tres proteínas estructurales (C, E y prM) y las siete proteínas no estructurales

(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) encargadas de la replicación del genoma en los complejos replicativos y del ensamblaje de la partícula viral en pequeñas gotas de lípidos.

Una vez ensamblado, el virión inmaduro pasa por el trans-Golgi donde la proteína E sufre cambios conformacionales y la proteína prM es escindida en el péptido “pr” y la proteína “M” por la proteasa celular furina. Finalmente el virión es liberado y el pH neutro extracitoplásmico promueve el desprendimiento del péptido “pr”, y la proteína E adquiere la conformación final que podrá ser reconocida por moléculas receptoras de las células (8).

## 4 Antecedentes

### 4.1 Complejo del Poro Nuclear (NPC)

Las células eucariotas se caracterizan por poseer separados los componentes citoplásmicos de los nucleares mediante una envoltura nuclear de doble membrana, la cual es atravesada por complejos de poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés “nuclear pore complex”) que permiten el intercambio de macromoléculas entre los dos compartimentos. El transporte núcleo-citoplásmico involucra a proteínas como los factores de transcripción que son fabricados en el citoplasma y realizan su función en el núcleo y material genético como mRNA, el cual se transcribe en el núcleo y debe ser transportado al citoplasma para su traducción (17).

Particularmente, la estructura del NPC está conformada por tres regiones, a) la cara citoplásmica que está compuesta por 8 microfilamentos, b) el anillo del poro interno que se encuentra transmembrana en la envoltura nuclear y c) la canastilla nuclear que se encuentra dentro del núcleo (Figura 5). El NPC está formado por múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas diferentes llamadas nucleoporinas (NUPs, por sus siglas en inglés “nucleoporins”) (17–19).

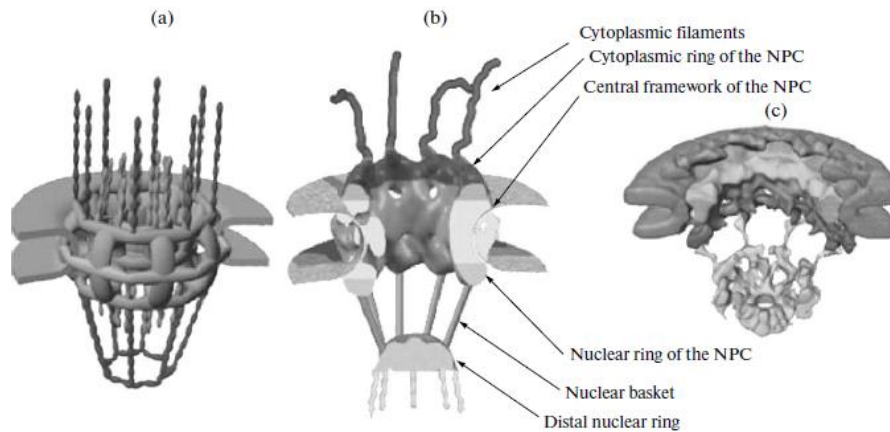


Figura 5. Estructura del complejo del poro nuclear (NPC). Tomado de: Organization and Regulation of Nucleocytoplasmic Transport. (Chumavov, S.P., 2010) (19).

El paso de moléculas a través del NPC generalmente es mediado por una maquinaria de transporte que interactúa con el NPC, formada por proteínas receptoras que interactúan con sus proteínas blanco, y señales de localización nuclear (NLS) y de exporte nuclear (NES) en la proteína cargo para ser reconocidas y transportadas a través del NPC (12,17–19). Estos mecanismos de transporte son altamente selectivos, requieren de un gasto energético y son regulados por vías de señalización.

#### 4.2 Vías clásicas del transporte núcleo-citoplasma

El movimiento de moléculas a través del NPC es mediado por distintas vías de transporte nuclear, y algunas de ellas pueden acceder por más de una sola vía (20). Las proteínas con un peso molecular mayor de 45 kDa son transportadas al núcleo a través del NPC mediante receptores de transporte nuclear (“Nuclear Transport Receptor” (NTR) por sus siglas en inglés), que reconocen secuencias de aminoácidos conservados en las proteínas cargo (21).

Los miembros de la familia de las carioferinas son las proteínas NTR más estudiadas, donde se incluye a las importinas  $\alpha/\beta$ , las exportinas y las transportinas, las cuales reconocen un grupo único de proteínas cargo o RNAs. La familia de las carioferinas  $\beta$  (Importina  $\beta$  y CRM1) están formadas por repetidos HEAT en tándem de  $\alpha$  hélices antiparalelas que poseen un dominio N-terminal de unión a proteínas RanGTP/GDP, un dominio C-terminal de unión al cargo y un dominio intermedio de unión a las nucleoporinas (Figura 6) (19,21).

La carioferina  $\alpha$  (Importina  $\alpha$ ) es un adaptador que reconoce diferentes NLS en las proteínas cargo, la cual posee un dominio flexible N-terminal de unión a Importina  $\beta$  (Importin  $\beta$  Binding domain o IBB, por sus siglas en inglés), que se expone únicamente cuando es reconocida la proteína cargo, lo que permite la formación del heterodímero Importina  $\alpha/\beta$  y la subsecuente translocación de las proteínas al núcleo (22,23).

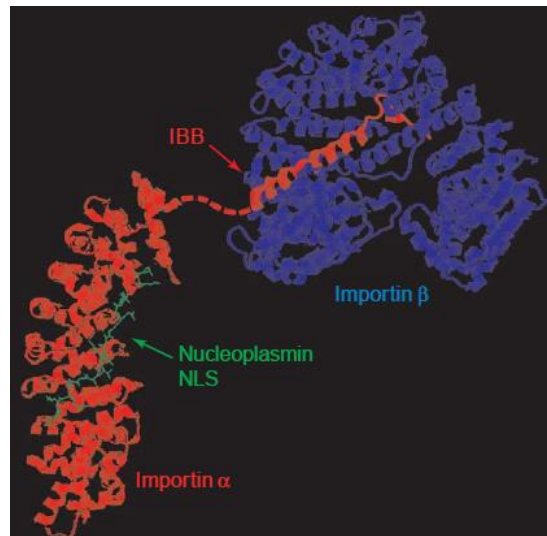


Figura 6. Estructura tridimensional del heterodímero Importina  $\alpha/\beta$ . Tomado de: Importin  $\alpha$ : a multipurpose nuclear-transport receptor. (Goldfarb, D. *et al.*, 2004).

CRM1 (Mantenimiento de la Región Cromosómica 1, también conocida como exportina 1 o XPO1) es una proteína que pertenece a la superfamilia de las importinas  $\beta$ , es la principal proteína de exporte nuclear que interactúa con NES formadas por secuencias ricas en leucinas (24) o aminoácidos hidrofóbicos tales como L, V, I, F o M (25), que se encuentran en motivos conservados en las proteínas cargo, tales como factores de transcripción, algunos factores de traducción y otras proteínas que deban ser exportadas del núcleo (24).

#### 4.3 Alteración del transporte núcleo-citoplasma causado por virus RNA.

Algunas de las infecciones virales alteran el transporte núcleo-citoplasma y esto lo hacen a través de distintas estrategias. Por ejemplo, Poliovirus (PV) y Rinovirus (HRV), modulan la localización de proteínas celulares que poseen NLS y a su vez evitan el transporte de otras a través de la degradación proteolítica de NUPs a través de las proteasas virales; al degradar algunos de los componentes del NPC mediante su degradación parcial suprime la relocalización de las



proteínas celulares. Este proceso le proporciona al virus un mecanismo de defensa contra el huésped y el establecimiento de la infección (20,26).

Se ha descrito que el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), regula el transporte núcleo-citoplasma mediante la interacción de una fracción de la proteína de la cápside con la envoltura nuclear, bloqueando las vías del transporte nucleocitoplasma. El virus del ébola (EBOV) mediante la interacción de la proteína VP24 con la proteína STAT1 fosforilada suprime la producción de IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$ , al impedir el importe de STAT1 al núcleo (26). El virus de la encefalitis japonesa (JEV) por otra parte, interrumpe la producción de interferón de tipo 1 mediante la competencia entre la proteína NS5 del virus y los factores reguladores del interferón 3 (IRF3) y NF $\kappa$ B por las proteínas de transporte importina  $\alpha$  3 y 4 evitando la translocación de estos factores al núcleo y por ende la activación de la respuesta inmune (27). El bloqueo del transporte núcleo-citoplasma ocurre tras la localización de las proteínas virales al núcleo o a la zona perinuclear. Por ejemplo, se ha reportado la localización en la membrana nuclear de la proteína M del virus sincitial respiratorio (VSR), donde puede translocarse entre el núcleo y el citoplasma a través de la vía importina  $\alpha$  y exportina CRM1 (28).

#### 4.4 Proteínas de virus de la familia *Flaviviridae* en núcleo

Aunque los diferentes virus de la familia *Flaviviridae* son considerados virus citoplásmicos, se ha descrito que proteínas virales son translocadas al núcleo durante la infección. La inhibición de las vías de importe y exporte nuclear ha permitido observar que la presencia de estas proteínas en el núcleo es indispensable en el ciclo replicativo viral. Las proteínas de algunos flavivirus que se han reportado que se translocan al núcleo son la proteína C de la cápside, la polimerasa NS5 y la proteasa NS3 (29).

Se ha descrito que a las pocas horas post-infección con el virus JEV, la polimerasa NS5 del virus se transloca al núcleo y colocaliza con la proteasa NS3, encontrándose localizada la proteína NS3 principalmente en la periferia del núcleo, y en el nucleoplasma colocalizando con la proteína nuclear Lamina A/C (30). En un estudio realizado con el virus del Zika (ZIKV) se reportaron NLS

putativas en la proteína NS3 y observaron que promueve un cambio en la distribución de la proteína lamina A (31). Por otro lado, mediante la inhibición de las vías de importe y exporte nuclear de la proteína NS5 de WNV se observó que su localización nuclear es indispensable para la replicación viral (32).

También se ha descrito que la proteína NS3 del virus Langat (LGTV) se localiza en el núcleo de las células, e interacciona con la caspasa 8 induciendo la apoptosis celular (33). En otro miembro de la familia *Flaviviridae*, el Virus de la Hepatitis C (HCV) se reportó que la proteína NS3 en ausencia de la proteína NS4A se localiza tanto en citoplasma como en núcleo de las células (34).

#### 4.5 Proteínas virales de DENV y el transporte núcleo-citoplasma

Se ha descrito que la proteína NS5 de DENV tiene dos secuencias de localización nuclear ( $\alpha$ NLS y  $\beta$ NLS) que promueven la translocación de la proteína a través del NPC hasta el nucleoplasma. La  $\alpha$ NLS de la NS5 posee dos grupos de aminoácidos básicos (**KKLMKITAKWLWKELGKKK**) que son importantes para su localización nuclear (35). Mediante estudios de mutagénesis se demostró que estos grupos de aminoácidos son indispensables para el transporte de la NS5 al núcleo, y que el heterodímero importina  $\alpha/\beta$  es la responsable del reconocimiento de la señal de importe de la proteína NS5 (12). Recientemente, se ha descrito mediante la construcción de plásmidos con diferentes dominios reportados para la NS5 (12) que los últimos 18 aminoácidos en el C-terminal también regulan su ubicación subcelular (36).

La ivermectina es un inhibidor de la vía importina  $\alpha/\beta$ , el cual ha sido utilizado para la inhibición del importe nuclear de proteínas de DENV, afectando la translocación de la NS5, provocando una disminución de la producción viral. Sugiriendo que el importe de la proteína NS5 al núcleo es esencial durante el ciclo replicativo (37, 38). Pryor et al, (2006) reportaron que la proteína NS5 de DENV es exportada del núcleo mediante la exportina CRM1 utilizando la leptomicina B (LMB) que es un inhibidor específico de esta vía, y su localización nuclear promueve una mayor producción viral (39,40). También, se demostró mediante mutagénesis que la proteína NS5 de DENV posee un NES, que es reconocida por la exportina CRM1 (13). Además, se observó que la acumulación

de la proteína NS5 en núcleo debido a la inhibición de la exportina CRM1 promueve una reducción en la producción de interleucina 8, sugiriendo que la proteína NS5 desde su localización nuclear participa en la inhibición de la activación de la respuesta inmune (41). La NS3 es otra proteína viral que participa en la replicación viral, por tener actividad de helicasa (14). Previamente, nuestro grupo ha descrito la localización parcial de la proteína NS3 en el núcleo de las células de mosquitos C6/36 infectadas con DENV (15). También Uchil-P et al. (2007) reportaron la localización nuclear de la proteína NS3 en células de riñón porcino infectadas con DENV mediante ensayos de Western blot de la fracción nuclear. Sin embargo, la localización nuclear de la proteína NS3 en células humanas infectadas con DENV no ha sido estudiada en su totalidad.

## 5 Justificación

La importancia epidemiológica que tiene DENV a nivel mundial y la falta de una vacuna y/o fármaco contra el virus, ha llevado a los investigadores a centrarse en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. En los últimos años se ha reportado la localización nuclear de la proteína NS3 en células infectadas con diferentes *Flavivirus*. Particularmente nuestro grupo, reportó que NS3 de DENV2 se localiza parcialmente en el núcleo de células de mosquito C6/36. Además, que NS3 de DENV2 y ZIKV procesan proteínas del complejo del poro nuclear de células Huh7. Este efecto sobre las NUPs y sobre el NPC traería como consecuencia cambios en la localización nuclear y citoplásmica de diversas proteínas y RNAs. A pesar de esto, la localización nuclear de NS3 en células de mamíferos no ha sido completamente estudiada.

Se ha predicho que la proteasa NS3 de Zika posee secuencias de localización nuclear (NLS) y de exporte nuclear (NES), encontrándose conservadas en diferentes *Flavivirus* incluyendo a DENV, sugiriendo la posibilidad de que NS3 interactúe con proteínas de las vías de importe y exporte nuclear para moverse entre el núcleo y el citoplasma, promoviendo cambios en los componentes del núcleo del hospedero. Por lo que, estudiar la localización nuclear de NS3 nos permitirá entender como contribuye esto en el ciclo replicativo, en la patogénesis de la enfermedad y de esta manera describir nuevas estrategias para el diseño de fármacos antivirales.

## 6 Hipótesis

La proteína NS3 de DENV-2 se transloca al núcleo y utiliza la vía de importe nuclear importina  $\alpha/\beta$ .

## 7 Objetivos

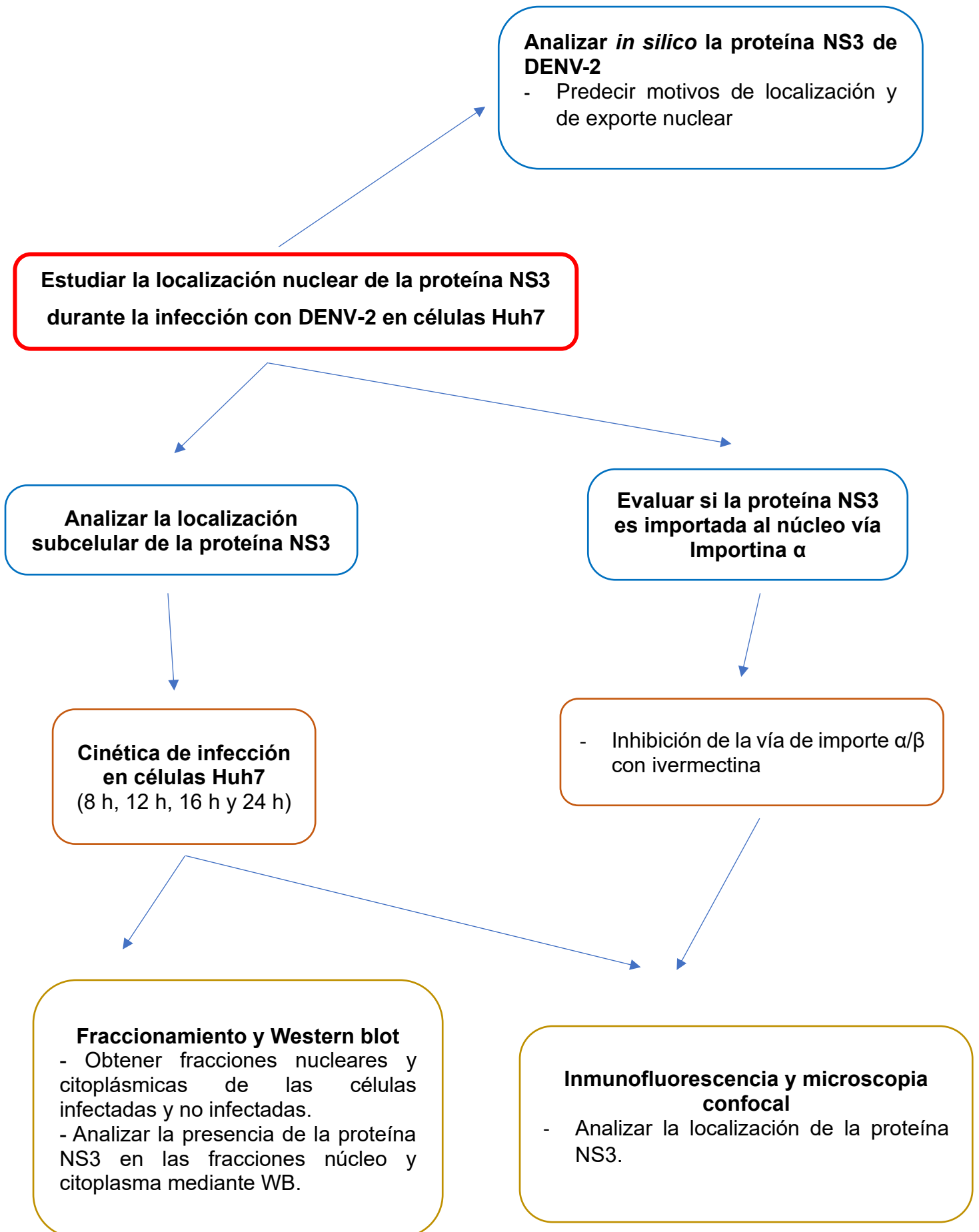
### 7.1 Objetivo general

1. Estudiar la localización nuclear de la proteína NS3 durante la infección con DENV-2 en células Huh7.

### 7.2 Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* la presencia de NLS y NES en la secuencia de la proteína NS3 de DENV-2.
2. Analizar la localización subcelular de la proteína NS3 durante la infección con DENV-2 en células Huh7.
3. Evaluar si la proteína NS3 es translocada al núcleo mediante la vía importina  $\alpha/\beta$ .

## 8 Diseño experimental



## 9 Materiales y métodos

### 9.1 Análisis *in silico* de NS3

Se utilizó la secuencia de la proteína NS3 de DENV-2 cepa *Thailand/NGS-C/1944* con número de acceso de UniProtKB: P14340 para el análisis de los sitios de localización nuclear; dicha proteína se encuentra en la posición 1476 – 2093 del genoma del DENV. Se compararon las secuencias de la proteína NS3 de diferentes flavivirus mediante un dendograma realizado en el software MEGA mediante la prueba phylogeny, utilizando el método bootstrap con 500 replicaciones; dichas secuencias se obtuvieron de la base de datos UniProtKB. Se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 en el software RaptorX, del cual se obtuvo un archivo en formato PDB que se analizó en el software UCSF CHIMERA, donde se comparó estructuralmente con el cristal de la proteína NS3 de DENV-4 con el código de acceso de PDB: 2vbc, mediante el comando Match. La predicción de secuencias de localización nuclear (NLS) de NS3 de DENV-2 se realizó en el programa cNLS Mapper con un punto de corte de 5 y en el sitio web WREGEX mediante la búsqueda del motivo TRG\_NLS\_MonoExtN\_4. Para la predicción de secuencias de exporte nuclear (NES) de NS3 de DENV-2 se utilizó la herramienta computacional LocNES y WREGEX para la búsqueda del motivo TRG\_NES\_CRM1\_1.

### 9.2 Cultivo e infección de células Huh7 con DENV

DENV-2 se propagó en cerebros de ratones CD1 neonatos. El título viral se calculó mediante ensayos de plaqueo en células de riñón de hámster (BHK). Brevemente, las células BHK se crecieron a 37 ° C con 5 % de CO<sub>2</sub> en medio Advanced DMEM con glutamina 2 mM, penicilina (5x10<sup>4</sup> U/ml), estreptomicina (50 µg/ml), 1 ml/L de fungizona y suero fetal bovino (SFB) al 7.5 % (medio completo). La infección de células Huh7 con DENV-2 se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 durante 2 h a 37 ° C con 5 % de CO<sub>2</sub> en medio Advanced DMEM sin suero. Posteriormente, se retiró el medio y se colocó medio nuevo completo y se permitió la infección durante una cinética de 8 h, 12 h, 16 h y 24 h.

### 9.3 Inhibición de las vías clásicas del transporte núcleocitoplasma

Las células Huh7 cultivadas con DMEM/7.5% SFB (v/v) se pre-trataron durante 4 h con 25  $\mu$ m de Ivermectina (IVM) SIGMA (18898-250MG) diluida en DMSO, la cual inhibe el importe de proteínas al núcleo vía importina  $\alpha/\beta$ 1 (38) Posteriormente, las células se infectaron con Mock o DENV2 a una MOI de 5 durante 2 h a 37 ° C con 5 % de CO2 en medio Advanced DMEM sin suero, después se retiró el medio y se colocó medio nuevo completo y se permitió la infección por 8 h.

### 9.4 Fraccionamiento celular

Las células Huh7 cultivadas en placas p100 al 80% se infectaron con Mock o DENV-2 durante 8 h, 12 h, 16 h o 24 h y se lavaron 3 veces usando PBS 1X. Las células se homogeneizaron en tampón hipotónico helado (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0,5% Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasa), se incubaron a 4 °C durante 10 min, se sometieron a agitación en un vórtex durante 1 min y se centrifugaron a 2.000 x g durante 1 min. Los sobrenadantes sirvieron como la fracción citoplasmática, y el botón se resuspendió suavemente en un tampón hipertónico (240 mM NaCl, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol, 1% Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de la proteasa), se sometieron a agitación en un vórtex de 1 h a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes sirvieron como la fracción nuclear.

### 9.5 Western blot

Las fracciones citoplasmáticas y nucleares de las células Huh-7 infectadas con Mock o DENV-2 fueron tratadas con tampón RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Tritón X-100, 0,1% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS y 140 mM NaCl) con un cóctel de inhibidores de la proteasa (ROCHE). Los extractos de proteína se cuantificaron utilizando el método Bradford. Treinta microgramos de proteína fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) y bloqueados con leche descremada al 10% en PBST (PBS/0,5% Tritón X-100) durante 1 h a temperatura ambiente. El ensayo de Western blot se realizó con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -NS3 de conejo

(1:5.000; GENETEX: GTX 124252), el anticuerpo monoclonal anti-histona de ratón (1:10.000; ABCAM: ab12179) como control de la fracción nuclear o el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -calreticulina de conejo (1:1.000; Santa Cruz: sc-6468) como control de la fracción citoplasmática. Como anticuerpos secundarios, se usaron anticuerpos IgG de cabra, conjugados con HRP,  $\alpha$ -ratón o  $\alpha$ -conejo (1:5.000). Las proteínas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Femto (Thermo Scientific) y el análisis densitométrico se realizó con el software myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific).

## 9.6 Inmunofluorescencia

Las células Huh7 se cultivaron en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos circulares hasta alcanzar una confluencia de 60-70% para ser infectadas con DENV2 durante una cinética de infección de 8 h, 12 h, 16 h y 24 h. Las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a 4 °C, a continuación, se permeabilizaron y se bloquearon con 0.2% de saponina, 1% de SFB, diluido en PBS 1X durante 20 min en agitación y se lavó con 0.2% de saponina, 1% SFB-PBS 1X. El anticuerpo primario  $\alpha$ -NS3 conejo (GTX 124252) 1:100 y  $\alpha$ -E ratón (4G2) 1:200, diluido en 0.2% de saponina, 1% SFB-PBS 1X, y se incubaron durante toda la noche a 4 °C.

Las células se lavaron 5 veces con 0.2% de saponina, 1% SFB-PBS 1X. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-ratón 1:1000 y Alexa 555 anti-conejo 1:300) por 2 h en 0.2% de saponina, 1% SFB-PBS 1X a TA y se lavaron 3 veces más. Después se incubaron con Hoescht en una dilución 1:1000 por 10 min y se lavaron 3 veces más con 0.2% de saponina, 1% SFB-PBS 1X y 1 vez con PBS 1X. Las preparaciones se montaron con VECTASHIELD Mounting Medium y se guardaron a 4 °C hasta su observación al microscopio confocal Leica TCS SP8. Las imágenes obtenidas bajo el microscopio se analizaron con el software Leica Application Suite X Core Offline version 3.3.0. for Windows 10.

## 9.7 Imagen y análisis estadístico

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron analizadas usando el software de análisis de imágenes Icy. Se importaron tres imágenes diferentes



por cada condición (8, 12, 16 y 24 h), y se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MFI) para los valores de los píxeles de cada región de interés (ROI) seleccionada para cuantificar la fluorescencia nuclear (Fn) en relación con la fluorescencia del citoplasma (Fc). La relación Fn/Fc se determinó de acuerdo con  $Fn/Fc = (Fn-Fb)/(Fc-Fb)$ , donde Fb era la fluorescencia de fondo (32).

El análisis estadístico se determinó utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Los datos de las variables continuas se expresaron con la media y el error estándar de la media (SEM), y el ANOVA unidireccional ordinario con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para determinar las diferencias significativas entre las medias. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p fueron  $< 0,05$ .

## 9.8 Viabilidad celular

Las células Huh7 se cultivaron en placas de 96 pozos hasta alcanzar una confluencia de 70-80%, se trataron con el vehículo (DMSO) y el fármaco ivermectina a diferentes concentraciones (12  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), después de 4 h se retiró el vehículo y el fármaco. El MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es un compuesto que pertenece a la familia de las sales de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillo. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células con actividad metabólica promueven la reducción del MTT en un formazano, insoluble en agua y de color violeta, por lo que se utiliza para evaluar la viabilidad celular. Se agregó 10  $\mu$ L de MTT en 100  $\mu$ L de medio de cultivo por pozo y se incubó por 3 h a 37°C según las indicaciones del proveedor. Se retiró el MTT y se agregó 100  $\mu$ L de DMSO por pozo. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Para quitar el fondo se leyó la placa a una longitud de onda de 630 nm y las absorbancias obtenidas se restaron a las absorbancias obtenidas con la longitud de onda de 562 nm.

## 9.9 Declaración de ética

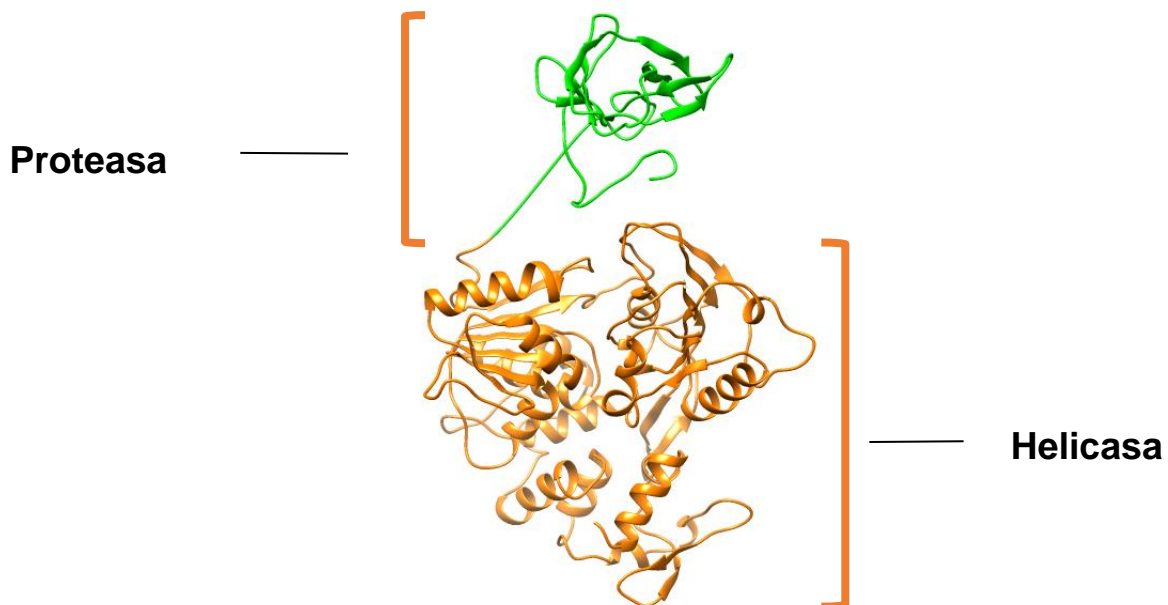
Este estudio se realizó de conformidad con la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el protocolo número 048-02, fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) en el CINVESTAV-IPN, México.

## 10 Resultados

### 10.1 Análisis *in silico* de NS3 de DENV2

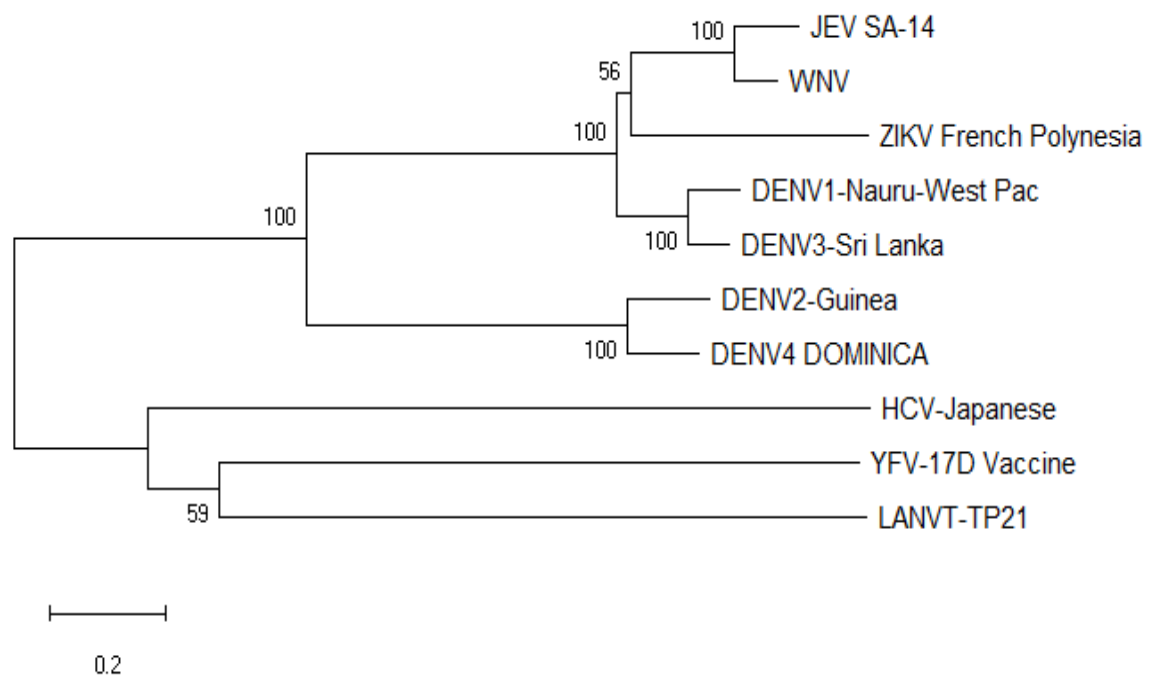
#### 10.1.1 Predicción de la estructura terciaria de NS3 de DENV2

Se realizó la búsqueda de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV2 en la base de datos de Protein Data Bank (PDB), sin embargo, no se ha reportado el cristal completo de dicha proteína, por lo que se predijo su estructura terciaria mediante el uso del software Raptor X. Para la predicción se utilizó la secuencia de aminoácidos de la cepa de DENV2 *Thailand/NewGuineaStrain-C/1944* con número de acceso de UniProtKB: P14340. El software predijo una estructura terciaria con un P-Value:  $1.89 \times 10^{-12}$  y un SeqID: 96%; donde aquellos valores con un P-Value  $< 10^{-03}$  indican una buena predicción y los modelos con un SeqID mayor al 30% predice un correcto plegamiento, según las especificaciones del software (Figura 5).



**Figura 7. Predicción de la estructura terciaria de la proteasa NS3 de DENV2 cepa Nueva Guinea.** Estructura predicha en el software Raptor X. Se observa el dominio de proteasa (color verde) y el dominio de helicasa (color anaranjado).

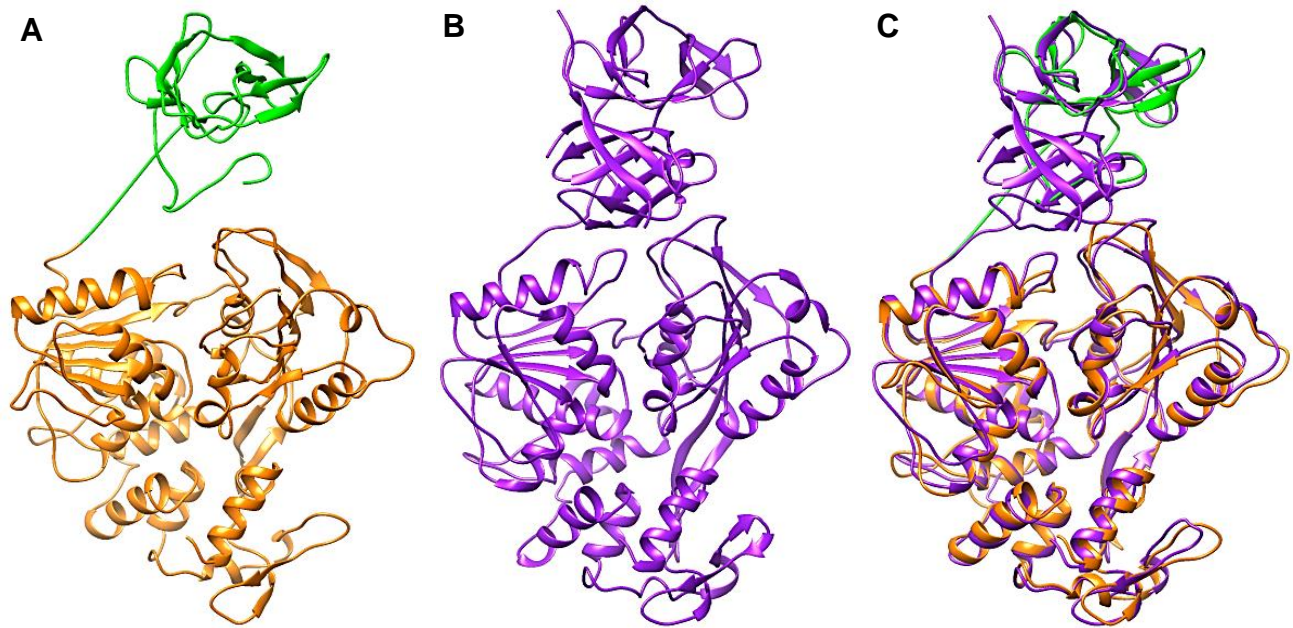
A continuación, se realizó la comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas NS3 de diferentes virus de la familia *Flaviviridae* incluyendo la cepa DENV2 Nueva Guinea con el fin de conocer la relación de identidad entre las secuencias de aminoácidos.



**Figura 8. Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína NS3 de diferentes virus de la familia *Flaviviridae*.** Dendograma construido por Máxima Verosimilitud. Los números en las bases de las ramas muestran el porcentaje de soporte Bootstrap para cada una.

La construcción se realizó con el software MEGA, por el método de máxima verosimilitud con 500 réplicas, obteniendo los siguientes resultados: Las secuencias de la proteína NS3 de los cuatro serotipos de DENV presentaron valores de soporte altos (100) agrupándose en dos clados. DENV2-NGS (cepa Nueva Guinea) y DENV4-Dominica se agruparon en mismo clado con un valor Bootstrap de 100 (Figura 6).

Con base en el dendograma anterior, obtuvimos la estructura terciaria del cristal de la proteína NS3 de DENV-4 de la base de datos de PDB con ID: 2VBC, y se comparó estructuralmente con la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV2 predicha en el software CHIMERA utilizando el comando MatchMaker. El solapamiento de las estructuras tridimensionales se hizo correctamente, lo que sugiere una buena predicción de la NS3 DENV2 (Figura 9). La identidad en secuencia corresponde al 76.34%.



**Figura 9. Comparación estructural de la proteína NS3 DENV4 y NS3 DENV2.**

A. Estructura predicha de la proteína NS3 DENV-2 cepa Nueva Guinea con el software Raptor X. B. Cristal de la proteína NS3 DENV4 obtenida de la base de datos de PDB (ID: 2VBC) C. Solapamiento de las proteínas NS3 DENV-2 (anaranjado y verde) y NS3 DENV-4 (morado) con el software CHIMERA.

#### 10.1.2 Predicción de NLS y NES en la proteína NS3 DENV2

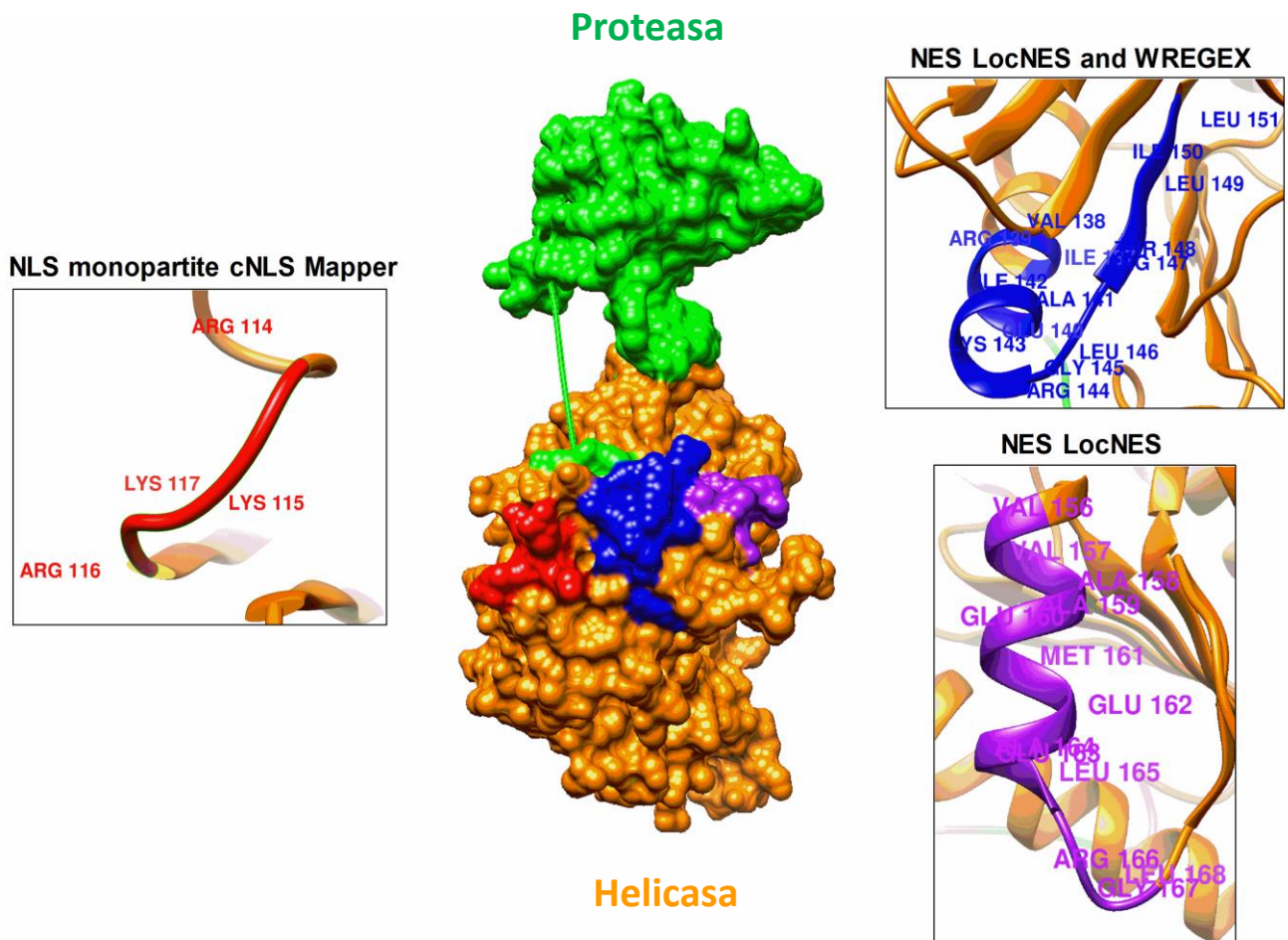
Para la predicción de señales de localización y de exporte nuclear se utilizaron los software bioinformáticos cNLS Mapper, WREGEX y LocNES. cNLS Mapper es un predictor de NLS específico de la ruta Importina  $\alpha/\beta$ . De la predicción de NLS se obtuvo una secuencia monopartita que se encuentra conformando un secuencia bipartita putativa, que comprenden residuos de aminoácidos básicos de lisina y arginina. La NLS monopartita se obtuvo con un score de 7.8, lo que significa que aquellas secuencias con score de 7 u 8 podrían encontrarse tanto en núcleo como en citoplasma según las especificaciones del software. Utilizando el motivo de búsqueda TRG\_NLS\_MonoExtN\_4 en el predictor WREGEX, se obtuvieron dos motivos NLS monopartitas del cual uno coincidió con el predicho por el software cNLS Mapper (Tabla 1).

**Tabla 1. Predicción de secuencias de localización nuclear y de exporte nuclear en la proteína NS3 DENV-2.**

Flavivirus	NLS predicted by cNLS Mapper	NES predicted by LocNES	NES predicted by LocNES and WREGEX
DENV2-Guinea	<b>F</b> RRKRLTIMDLHPGAG <b>KTKRYL</b>	<b>IV</b> REAIK <b>RGLR</b> TLIL	TR <b>VVA</b> EM <b>E</b> EAL <b>RGL</b>
LANVT-TP21	TAK <b>GQ</b> ITVLD <b>MHPGSGK</b> THRVL	<b>LIR</b> Q <b>CV</b> ERR <b>LRT</b> LVL	TR <b>VVL</b> RE <b>M</b> ER <b>A</b> LSGK
YFV-17D	L <b>KK</b> GMTTVLDF <b>HPGAGK</b> TRRFL	<b>ILA</b> ECARR <b>LRT</b> LVL	TR <b>VVL</b> SE <b>M</b> KEAFHGL
DENV4	<b>F</b> RRKRLTIMDLHPGAG <b>KTKRIL</b>	<b>IV</b> REAIK <b>RRLR</b> TLIL	TR <b>VVA</b> EM <b>E</b> EAL <b>RGL</b>
DENV1-Nauru-West	<b>F</b> RR <b>R</b> NLTIMDLHPG <b>S</b> G <b>KTR</b> RYL	<b>IV</b> REAI <b>R</b> RR <b>N</b> VRT <b>L</b> VL	TR <b>VVA</b> SE <b>M</b> AEAL <b>KGM</b>
DENV3-Sri	<b>F</b> KK <b>R</b> NLTIMDLHPG <b>S</b> G <b>KTR</b> KYL	<b>IV</b> REAIK <b>RRLR</b> TLIL	TR <b>VVA</b> EM <b>E</b> EAL <b>KGL</b>
ZIKV	L <b>KK</b> QLTVL <b>DLHPGAGK</b> TRRVL	<b>IV</b> REAI <b>K</b> TR <b>LRT</b> VIL	TR <b>VVA</b> EM <b>E</b> EAL <b>RGL</b>
WNV	L <b>R</b> KKQITVLD <b>LHPGAGK</b> TRKIL	<b>II</b> KEAI <b>N</b> K <b>R</b> LRTAVL	TR <b>VVA</b> EM <b>S</b> EAL <b>RGL</b>
JEV	L <b>R</b> KK <b>R</b> QMTVLD <b>LHPGSGK</b> TRKIL	<b>II</b> KDAI <b>Q</b> Q <b>R</b> LRTAVL	TR <b>VVA</b> EM <b>A</b> EAL <b>RGL</b>
	* * : : * : * * * : * * * : * *	:: : . . : * * : *	**** ** . * : *

Además, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína NS3 de diferentes virus del género *Flaviviridae*, y se observó que el motivo NLS monopartita/bipartita en la posición 180 se encuentra conservado en los diferentes virus, (Tabla 1). También, se analizó la localización del motivo NLS monopartita/bipartita en la estructura terciaria de la NS3 DENV2, y observó que el motivo NLS monopartita se podría encontrar expuesto en la porción N-terminal del dominio de helicasa (Figura 10)

Para la predicción de NES, se utilizó el software LocNES, el cual es un predictor de secuencias de exporte nuclear clásicas específicas para CRM1. Del análisis de la secuencia de NS3 DENV2 se obtuvieron dos motivos NES con el software LocNES en las posiciones 241 y 258, del cual el motivo en la posición 258 coincidió con la predicción hecha con el software Wregex mediante el motivo de búsqueda TRG\_NES\_CRM1\_1 (Tabla 1). Igualmente, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína NS3 de diferentes virus del género *Flaviviridae*, y se observó que los motivos NES predichos se encuentran conservados (Figura 10). También, se observó que su probable localización en la estructura terciaria de la proteína NS3 DENV-2 es en la porción C-terminal del dominio de helicasa (Figura 10) al igual que el motivo NLS monopartita descrito anteriormente.

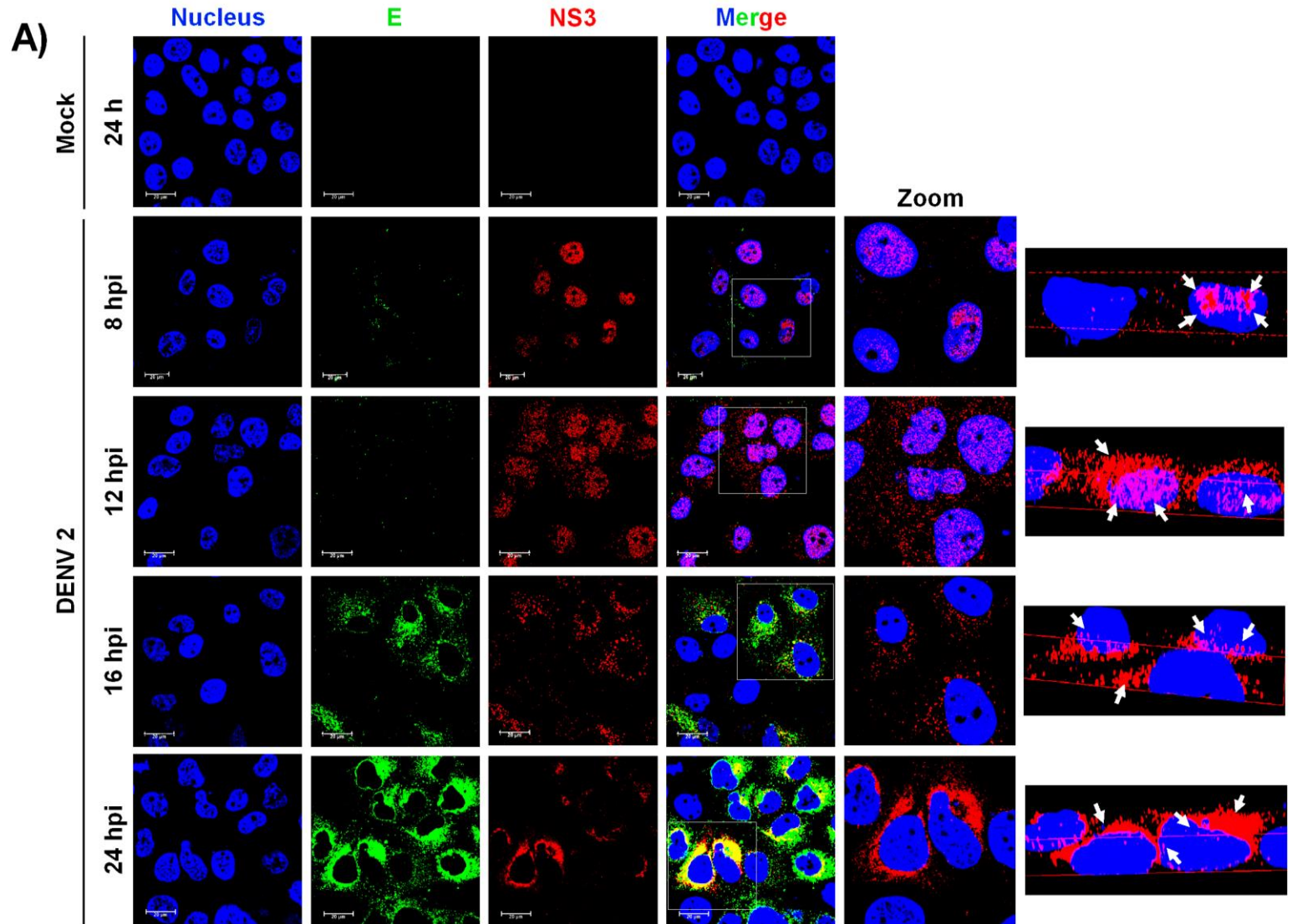


**Figura 10. Localización estructural de las NLS y NES predichas en la proteína NS3 de DENV-2.** Se observa la NLS monopartita (color rojo) y las NES (color azul y morado) expuestas y localizadas en la porción N-terminal del dominio de helicasa en la predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-2

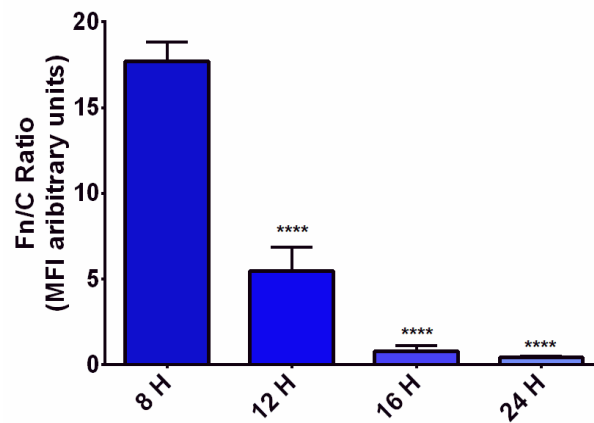
## 10.2 Localización subcelular de la proteína NS3 DENV2

La proteína NS3 se localiza en el núcleo de las células de mosquitos infectadas con DENV a las 48 hpi (15), sin embargo, se sabe poco sobre la localización de esta proteína durante la infección de células huésped humanas. Dado que la síntesis de las proteínas virales (a partir de 8 hpi), el inicio de la síntesis de *novo* del RNA, la morfogénesis de las partículas virales (entre 16 a 24 hpi) y su liberación (generada a partir de 18 hpi a 24 hpi) son procesos que ocurren en un ciclo de replicación del DENV (42, 43) el primer paso fue determinar la localización subcelular de la proteína NS3 a las 8, 12, 16 y 24 hpi.

Por lo que, las células infectadas con DENV-2 fueron analizadas por microscopía confocal utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -NS3 y un anticuerpo  $\alpha$ -E para marcar la proteína de la envoltura que se retiene en el RE durante la infección (44), como un control para la localización subcelular de las proteínas de DENV-2. La proteína NS3 de DENV-2 se localizó en el núcleo de las células infectadas a las 8 hpi (Figura 11A). También observamos que la proteína NS3 se localizaba en el núcleo y en el citoplasma de las células a partir de 12 hpi, siendo evidente la localización citoplasmática a las 16 y 24 hpi (Figura 11A).



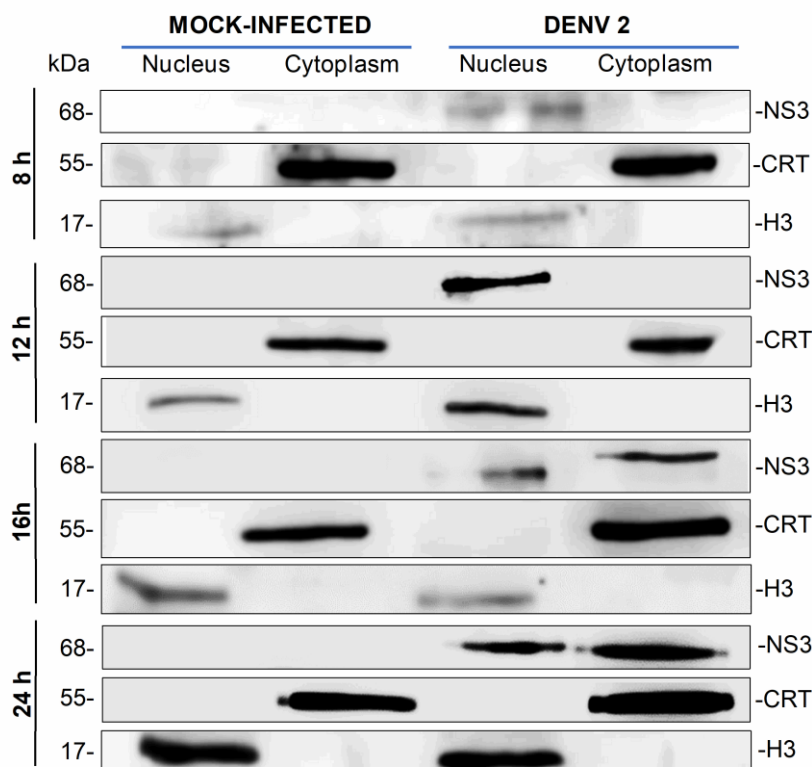
**B)**



**Figura 11. La proteína NS3 DENV-2 se localiza en el núcleo de las células Huh7 infectadas.** (A) La localización de las proteínas NS3 y E en las células Huh7 infectadas con DENV-2 a las 8, 12, 16 y 24 hpi, fue analizada por microscopía confocal usando anticuerpos  $\alpha$ -NS3 (rojo) y  $\alpha$ -E (verde). Los núcleos de las células fueron teñidos con Hoechst (azul). Los gráficos representan los resultados de los análisis de las imágenes como medias y SEM de 3 experimentos independientes por duplicado. (B) Se determinó la IMF para las ROI seleccionadas como núcleo y citoplasma ( $n = 30$  células, por condición de 8, 12, 16 y 24 horas) y se calculó la relación núcleo (Fn) / citoplasma (Fc) para estas ROI seleccionadas en cada imagen de fluorescencia obtenida por microscopía confocal. El valor de  $p$  fue el siguiente: \*\*\*\* $p = 0,0001$ .

Para confirmar este resultado, realizamos un análisis de western blot de la fracción nuclear y citoplasmática de las células Huh7 infectadas con DENV-2 (Figura 12). Con este ensayo logramos demostrar que la proteína NS3 está presente en la fracción nuclear entre las 8 y las 12 hpi, consistente con los datos observados en la Figura 11A. Sin embargo, a pesar de que NS3 se encontró principalmente en el citoplasma de las fracciones citoplásmicas de 16 y 24 hpi, las fracciones nucleares de 16 y 24 hpi también mostraron expresión de la proteína NS3, diferente a lo observado en los ensayos de inmunofluorescencia. Como controles de pureza de nuestro fraccionamiento, se muestran calreticulina para citoplasma (CTR) y la histona H3 para la fracción nuclear (H3) (Figura 12).



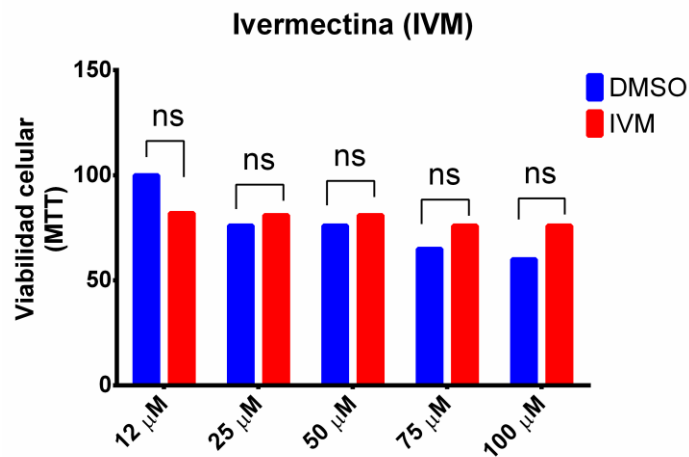


**Figura 12. Análisis de Western blot de las fracciones nucleares y citoplásmicas de células infectadas con DENV-2.** Las células Huh7 infectadas con DENV2 (8 h, 12 h, 16 h, y 24 h) fueron separadas en dos fracciones subcelulares, el núcleo (N) y el citoplasma (C). Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -NS3 de conejo (1:5.000; GENETEX: GTX 124252), el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -Histona 3 de ratón (1:10.000; ABCAM: ab12179) como control de la fracción nuclear y el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -Calreticulina de conejo (1:1.000; Santa Cruz: sc-6468) como control de la fracción citoplasmática.

### 10.3 Inhibición de la vía importina $\alpha/\beta$ durante la infección con DENV 2

En el análisis *in silico* observamos que la secuencia de la proteína NS3 posee una NLS monopartita expuesta en el dominio de helicasa, la cual podría ser reconocida por la proteína importina  $\alpha$  y ser translocada al núcleo del hospedero. Por lo que decidimos evaluar si la vía importina  $\alpha/\beta$  es la responsable del importe nuclear de la proteína NS3 de DENV2. Se ha reportado que el fármaco antiparasitario ivermectina es un inhibidor del importe nuclear específico de la vía importina  $\alpha/\beta$  (38).

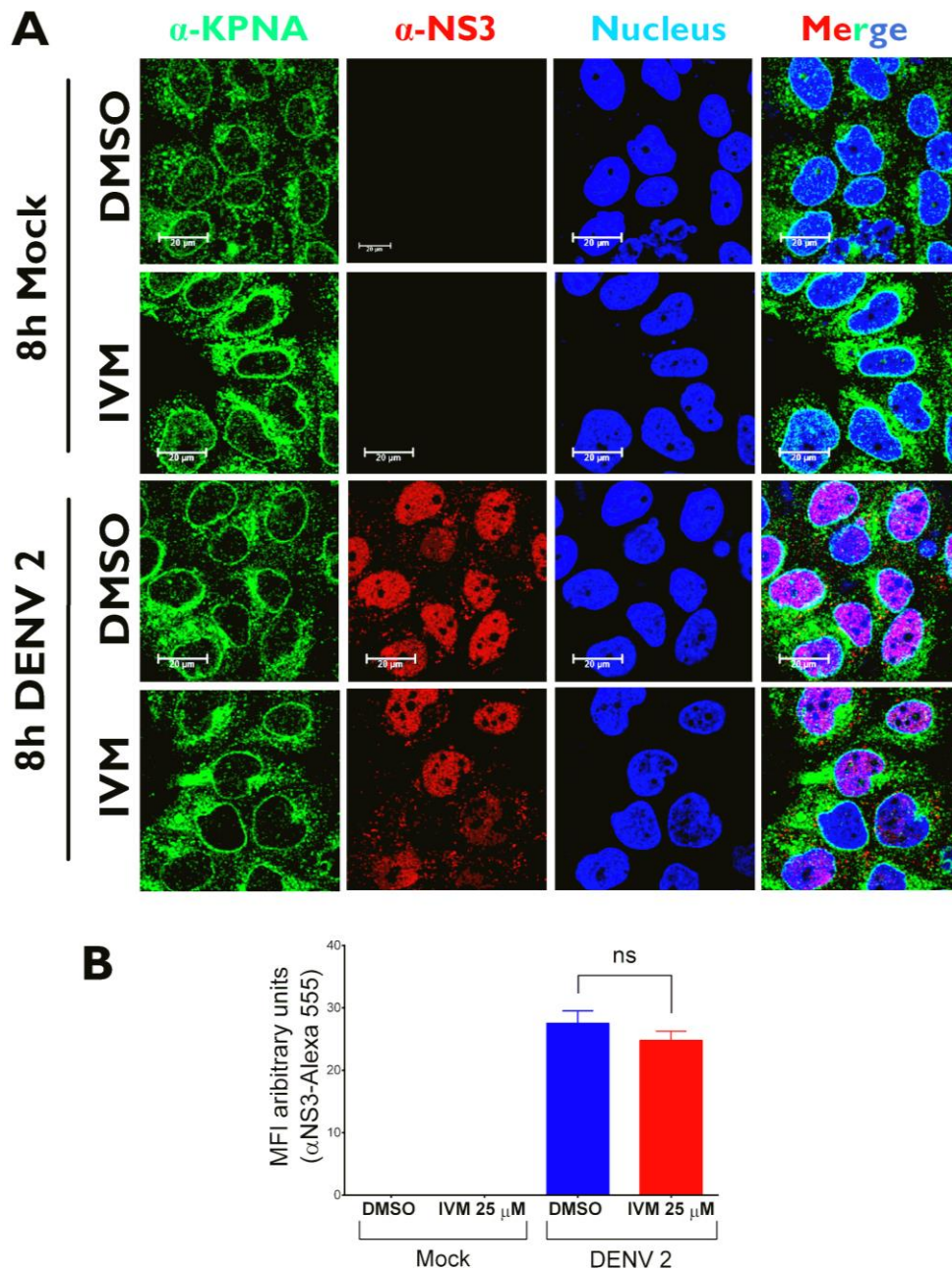
El primer paso fue realizar un ensayo de viabilidad celular donde las células Huh7 se trataron con DMSO (vehículo) y con diferentes concentraciones de ivermectina (12  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) (Figura 13). No se observó una diferencia significativa entre la viabilidad celular de las células tratadas con las diferentes concentraciones de ivermectina y las células tratadas con el vehículo.



**Figura 13. Ensayo de viabilidad celular por MTT con diferentes concentraciones de ivermectina en células Huh7.** El grafico representa los porcentajes de la viabilidad celular de células tratadas con ivermectina (IVM) y con el vehículo (DMSO). Los porcentajes se obtuvieron tomando como 100% la viabilidad celular del control de células sin fármaco y sin vehículo.

A continuación, utilizamos la concentración de 25  $\mu$ M de IVM para inhibir la vía importina  $\alpha/\beta$ . Se ha descrito que concentraciones más altas inhiben la replicación de DENV (38), ya que la proteína NS3 es un blanco para la ivermectina, inhibiendo su actividad de helicasa (45). Observamos que en las células tratadas con ivermectina la proteína KPNA2 (importina  $\alpha$  1) se acumuló principalmente en el citoplasma de las células, sugiriendo una probable inhibición del transporte nuclear, en comparación con las células no infectadas tratadas con el vehículo (DMSO) donde la proteína KPNA2 se distribuye tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 14A). Curiosamente, observamos que durante la infección con DENV2 en las células tratadas con el vehículo la proteína KPNA2 también se localizaba principalmente en el citoplasma celular. Cuando analizamos la localización nuclear de la proteína NS3, observamos que la inhibición de la vía importina  $\alpha/\beta$  parece no afectar la translocación nuclear de

la proteína NS3, no observándose diferencia significativa entre la condición con ivermectina y con vehículo (Figura 14A y B).



**Figura 14. Localización de la proteína NS3 de DENV2 durante la inhibición de la vía importina  $\alpha/\beta$ 1 (A).** Se analizó la localización de la proteína NS3 durante la inhibición de la vía importina  $\alpha/\beta$ 1 por microscopía confocal usando anticuerpos  $\alpha$ -NS3 (rojo) y  $\alpha$ -KPNA2 (verde). Los núcleos de las células fueron teñidos con Hoechst (azul). (B) El gráfico representa el resultado del análisis de las imágenes como medias. Se determinó la IMF para la ROI seleccionada como núcleo ( $n = 20$  células, por condición sin tratamiento y con tratamiento).

## 11 Discusión

Los virus de RNA como los miembros de la familia *Flaviviridae* tienen un ciclo de replicación citoplasmático, traduciendo y replicando su genoma en el ER. Algunas de las proteínas virales promueven la formación de complejos replicativos derivados del ER, donde se reclutan las proteínas implicadas en la replicación del genoma. Dadas las características de los complejos replicativos, impiden la activación de la respuesta inmune y promueven una replicación viral eficiente (46–48). Se ha descrito que algunas proteínas virales pueden interactuar con los componentes del núcleo, que tienen funciones esenciales durante el ciclo de replicación (26). Y no solo eso, sino que además, pueden secuestrar factores nucleares y competir por la maquinaria de transporte citoplasmático del núcleo con las proteínas celulares, o bien, alterar los componentes del NPC o inhibir la activación de la respuesta inmunitaria del huésped (13, 27, 49, 50). En este sentido, se sabe que el núcleo desempeña un papel esencial durante el ciclo de replicación de algunos virus de la familia *Flaviviridae*, ya que las proteínas estructurales como la proteína de la cápside (proteína C) y la proteína no estructural NS5 (polimerasa viral) se translocan al núcleo siendo necesario para la replicación viral (29).

La proteína NS3 de DENV, ha sido previamente reportada por nuestro grupo como localizada parcialmente en los núcleos de las células de mosquitos C6/36 (15). Además, Uchil-P et al. (2007) describieron la localización nuclear de la proteína NS3 de DENV en células de riñón porcino infectadas. Sin embargo, la localización nuclear de la proteína NS3 de DENV en células humanas infectadas no ha sido estudiada completamente. En este trabajo, proporcionamos evidencia de la localización nuclear de la proteína NS3 en células humanas durante la infección DENV-2. Nuestros resultados mostraron que la proteína NS3 de DENV-2 se localiza en el núcleo de las células del hígado humano Huh7 al principio de la infección. Utilizando análisis de microscopía confocal, mostramos que la proteína NS3 se localiza principalmente en el núcleo a las 8 y 12 horas post infección (Figura 11A). Donde observamos una disminución significativa en la relación de fluorescencia núcleo/citoplásmica (Figura 11B).

Además, estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados de Western Blot de las 8 h y 12 h que muestran que la proteína NS3 está presente principalmente en las fracciones nucleares (Figura 12). Por otro lado, la localización citoplasmática de la proteína NS3 fue más evidente en el citoplasma a las 16 y 24 horas post infección. Sin embargo, la proteína NS3 se localizó en el núcleo, pero en menor proporción, como se observó en los ensayos Western blot (Figura 12). Curiosamente, cuando se analizó la intensidad media de fluorescencia de la proteína NS3 en el núcleo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre las 16 h y las 24 h de las condiciones de la infección DENV-2 en comparación con la condición de 8 h (Figura 11B).

Se ha descrito anteriormente que la proteína NS3 de JEV se encuentra en la periferia dentro del núcleo a las 16 h (30) y mediante proteómica de células epiteliales humanas se reportó la presencia de péptidos de la proteína NS3 de DENV-2 en las fracciones citoplásmicas y nucleares a las 28 h post infección (51). Esto es consistente con los resultados observados a las 16 h y 24 h en células Huh7 (Figura 12), sugiriendo una localización perinuclear de la proteína NS3 de DENV-2, donde podría interactuar con componentes de la envoltura nuclear como el NPC, promoviendo la degradación de las nucleoporinas, como se ha descrito anteriormente (52). Además, se ha informado de la presencia nuclear de la proteína NS3 para otros miembros de la familia *Flaviviridae*, como el LGTV (33) y el virus de la hepatitis C (HCV) (53). En conjunto, estos datos confirman que durante el ciclo de replicación del DENV-2 y otros virus de la familia *Flaviviridae*, la proteína NS3 es traslocada al núcleo del huésped, sugiriendo que su ubicación nuclear desempeña una función durante la patogénesis de la enfermedad.

A través del análisis *in-silico*, tratamos de explicar un posible mecanismo de importe y exporte de la proteína NS3 del DENV-2. Está ampliamente descrito que las proteínas mayores de 45 kDa requieren de un transporte activo al núcleo (21), sugiriendo que la proteína NS3 (68 kDa) puede interactuar con las proteínas NTR, como se ha demostrado para otros virus (54). Mediante el análisis *in-silico*, encontramos la presencia de residuos de aminoácidos básicos (RKRK) que forman una NLS putativa monopartita expuesta en el dominio de la helicasa de la proteína NS3, que se conserva en diferentes miembros de la familia

*Flaviviridae* (Tabla 1, Figura 10), que podría interactuar con proteínas NTR como Importina  $\alpha$  (55).

También mediante el análisis *in-silico*, encontramos NES putativas en la NS3 (Tabla 1), que comprenden aminoácidos hidrofóbicos que forman dos NES expuestos y conservadas en el dominio de la helicasa (Figura 10) que podrían ser reconocidas por la exportina CRM1. Se ha descrito que la proteína NS5 de DENV tiene una región de residuos de aminoácidos ricos en leucina que forman una NES que media su exporte desde el núcleo CRM1-dependiente (13, 40). Por lo que, cabe la posibilidad de que la proteína NS3 de DENV-2 sea exportada del núcleo dependiente de la vía CRM1. Curiosamente, se ha reportado que la proteasa de otros virus RNA como los picornavirus, se encuentran dentro del núcleo (56–58); sugiriendo que los virus RNA de cadena positiva podrían utilizar estrategias comunes como la localización nuclear de las proteasas virales donde realizan modificaciones celulares que favorezcan su replicación.

Actualmente existen fármacos que inhiben el transporte nuclear por la vía de la importina  $\alpha$ , como es la ivermectina; un antiparasitario que se ha observado que tiene un efecto antiviral (45). Finalmente, evaluamos si la proteína NS3 de DENV-2 era importada al núcleo de las células mediante la vía importina  $\alpha/\beta$ 1. Nuestros resultados sugieren que la inhibición del importe nuclear mediado por la vía importina  $\alpha/\beta$ 1 parece no afectar la localización nuclear de la proteína NS3, sugiriendo la posibilidad de que su importe nuclear sea independiente de la vía importina  $\alpha$  (Figura 14A).

En la predicción de NLS en la secuencia de la proteína NS3 de DENV-2 se encontró una NLS monopartita expuesta en el dominio de helicasa, la cual, también podría ser reconocida por la importina  $\beta$ . Anteriormente se reportó que la proteína NS5 de DENV posee dos NLS en la región intermedia de la proteína, formando una  $\alpha$ NLS bipartita (NLS reconocida por la importina  $\alpha/\beta$ 1) y una  $\beta$ NLS monopartita (NLS reconocida por la importina  $\beta$ 1) ambas funcionales; sin embargo, su transporte es mediado principalmente por la  $\alpha$ NLS (12). Por lo que, con estos resultados obtenidos, podríamos sugerir que la vía de importe de la proteína NS3 podría estar mediada por la vía importina  $\beta$ 1. Sin embargo, aún se requieren más experimentos siguiendo el marcaje de proteínas celulares que

usan la vía de importina  $\alpha$  o la vía importina  $\beta$ 1 para poder concluir el mecanismo de importe. Previamente se reportó que la importina  $\alpha$  7 (KPNA6) es requerida para la replicación de ZIKV. Curiosamente, observamos que la proteína KPNA2 se acumuló en el citoplasma de las células infectadas con DENV-2. Por lo que, sugerimos que la proteína KPNA2 podría jugar un papel durante la replicación viral de DENV-2 (59).

En los últimos años se ha propuesto a la proteína NS3 como diana para el diseño de fármacos, debido a su multifuncionalidad y a su participación en varias etapas del ciclo de replicación (60). Es claro que las funciones de helicasa y proteasa de NS3 son indispensables en el ciclo replicativo viral, pero a esto hay que sumarle algunas otras funciones como el hecho de que NS3 de ZIKV promueve cambios en la distribución de la proteína Lamin A, un componente de la envoltura nuclear (31). También NS3 de DENV y ZIKV induce la degradación de NUPs del NPC de las células infectadas, además de su participación en la degradación de proteínas nucleares que son translocadas al citoplasma, facilitando la replicación viral al inhibir la inmunidad innata (59,13).

Es evidente que NS3 juega un papel central en la replicación y patogenicidad de los *Flavivirus*, por lo que determinar los mecanismos a través de los cuales es transportada entre el núcleo y el citoplasma es de vital importancia para entender el rol en la patogénesis de la enfermedad inducida por estos virus.

## 12 Conclusiones

1. Mediante el análisis *in silico* identificamos NLS y NES putativas en la secuencia de la proteína NS3 DENV-2, ambas conservadas en diferentes virus de la familia *Flaviviridae*.
2. Los motivos predichos podrían encontrarse expuestos en la porción N-terminal del dominio de helicasa, por lo tanto, las proteínas de transporte nuclear podrían acceder a ellas.
3. La proteína NS3 DENV2 se localizó en el núcleo de las células Huh7 principalmente a las 8 h y 12 h post infección.
4. La localización citoplásmica de la proteína NS3 fue evidente a partir de las de las 12 h, observándose una diferencia significativa a las 24 h post infección.
5. La inhibición de la vía importina  $\alpha/\beta$  con el fármaco ivermectina parece no tener un efecto en la localización nuclear de la proteína NS3; sin embargo, aún se requieren los controles adecuados para concluir con este experimento.

## 13 Perspectivas

1. Evaluar si la proteína NS3 es exportada del núcleo por la vía CRM1.
2. Analizar si la vía importina  $\beta$  promueve la translocación nuclear de NS3 de DENV-2.
3. Evaluar mediante mutagénesis si las NLS y NES predichas son las responsables del importe y exporte nuclear de la proteína NS3 de DENV-2.
4. Analizar si la proteína importina  $\alpha$  juega un papel durante replicación de DENV-2.
5. Analizar la posibilidad de que durante la infección con DENV exista replicación viral en el núcleo.



## 14 Bibliografía

1. Hasan S, Jamdar SF, Alalowi M, Al Ageel Al Beaiji SM. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(1):1-6.
2. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 12 de abril de 2012;366(15):1423-32.
3. Wilder-Smith A, Murray, Quam M. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* agosto de 2013;299.
4. Higuera A, Ramirez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses. *Acta Tropica.* 2019. 99-111.
5. Carballal G, Oubiña JR. *Virología médica.* 4.<sup>a</sup> ed. Corpus Libros Médicos y Científicos; 2014. 800 p.
6. Sanchez JD. OPS/OMS. Pan American Health Organization / World Health Organization.
7. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet.* 31 de enero de 2015;385(9966):453-65.
8. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio.* marzo de 2011;15(1):33-43.
9. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell.* 8 de marzo de 2002;108(5):717-25.
10. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *J Virol.* diciembre de 2009;83(24):12895-906.
11. Suwanto S, Sasmono RT, Sinto R, Ibrahim E, Suryamin M. Association of Endothelial Glycocalyx and Tight and Adherens Junctions With Severity of

Plasma Leakage in Dengue Infection. *J Infect Dis.* 15 de marzo de 2017;215(6):992-9.

12. Pryor MJ, Rawlinson SM, Butcher RE, Barton CL, Waterhouse TA, Vasudevan SG, et al. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic Cph Den.* julio de 2007;8(7):795-807.
13. Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem.* 5 de junio de 2009;284(23):15589-97.
14. Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. *J Virol.* 1 de enero de 2008;82(1):173-83.
15. Reyes-Ruiz JM, Osuna-Ramos JF, Cervantes-Salazar M, Lagunes Guillen AE, Chávez-Munguía B, Salas-Benito JS, et al. Strand-like structures and the nonstructural proteins 5, 3 and 1 are present in the nucleus of mosquito cells infected with dengue virus. *Virology.* 2018;515:74-80.
16. Cervantes-Salazar M, Gutiérrez-Escolano AL, Reyes-Ruiz JM, Angel RM del. The Nonstructural Proteins 3 and 5 from Flavivirus Modulate Nuclear-Cytoplasmic Transport and Innate Immune Response Targeting Nuclear Proteins. *bioRxiv.* 24 de julio de 2018;375899.
17. Görlich D, Kutay U. Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15(1):607-60.
18. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):73-89.
19. Chumakov SP, Prassolov VS. Organization and regulation of nucleocytoplasmic transport. *Mol Biol.* 1 de abril de 2010;44(2):186-201.

20. Fontoura BM, Faria PA, Nussenzveig DR. Viral interactions with the nuclear transport machinery: discovering and disrupting pathways. *IUBMB Life*. febrero de 2005;57(2):65-72.
21. Cautain B, Hill R, Pedro N de, Link W. Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J*. 2015;282(3):445-62.
22. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*. septiembre de 2004;14(9):505-14.
23. Lott K, Cingolani G. The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta*. septiembre de 2011;1813(9):1578-92.
24. Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol*. abril de 2007;17(4):193-201.
25. Xu D, Farmer A, Chook YM. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- $\beta$  proteins. *Curr Opin Struct Biol*. diciembre de 2010;20(6):782-90.
26. Yarbrough ML, Mata MA, Sakthivel R, Fontoura BMA. Viral Subversion of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Traffic Cph Den*. febrero de 2014;15(2):127-40.
27. Ye J, Chen Z, Li Y, Zhao Z, He W, Zohaib A, et al. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- $\kappa$ B. *J Virol*. 15 de 2017;91(8).
28. Ghildyal R, Ho A, Dias M, Soegiyono L, Bardin PG, Tran KC, et al. The Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Possesses a Crm1-Mediated Nuclear Export Mechanism. *J Virol*. 1 de junio de 2009;83(11):5353-62.
29. Lopez-Denman AJ, Mackenzie JM. The IMPORTance of the Nucleus during Flavivirus Replication. *Viruses* [Internet]. 19 de enero de 2017 [citado 18 de

septiembre de 2019];9(1). Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294983/>

30. Uchil PD, Kumar AVA, Satchidanandam V. Nuclear Localization of Flavivirus RNA Synthesis in Infected Cells. *J Virol.* junio de 2006;80(11):5451-64.
31. Hou W, Cruz-Cosme R, Armstrong N, Obwolo LA, Wen F, Hu W, et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene.* 10 de septiembre de 2017;628:117-28.
32. Lopez-Denman AJ, Russo A, Wagstaff KM, White PA, Jans DA, Mackenzie JM. Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection. *Cell Microbiol.* 2018;20(8):e12848.
33. Prikhod'ko GG, Prikhod'ko EA, Pletnev AG, Cohen JI. Langat Flavivirus Protease NS3 Binds Caspase-8 and Induces Apoptosis. *J Virol.* junio de 2002;76(11):5701-10.
34. Wölk B, Sansonno D, Kräusslich H-G, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, et al. Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *J Virol.* marzo de 2000;74(5):2293-304.
35. Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. The Interdomain Region of Dengue NS5 Protein That Binds to the Viral Helicase NS3 Contains Independently Functional Importin  $\beta$ 1 and Importin  $\alpha/\beta$ -Recognized Nuclear Localization Signals. *J Biol Chem.* 27 de septiembre de 2002;277(39):36399-407.
36. Tay MYF, Smith K, Ng IHW, Chan KWK, Zhao Y, Ooi EE, et al. The C-terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production. *PLoS Pathog* [Internet]. 13 de septiembre de 2016 [citado 27 de septiembre de 2019];12(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5021334/>
37. Tay MYF, Fraser JE, Chan WKK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, et al. Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5;

protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res.* 1 de septiembre de 2013;99(3):301-6.

38. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin  $\alpha/\beta$ -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 1 de mayo de 2012;443(Pt 3):851-6.
39. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, et al. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res.* 1 de agosto de 1998;242(2):540-7.
40. Pryor MJ, Rawlinson SM, Wright PJ, Jans DA. CRM1-dependent nuclear export of dengue virus type 2 NS5. *Novartis Found Symp.* 2006;277:149-61; discussion 161-163, 251-3.
41. Bulich R, Aaskov JG. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* noviembre de 1992;73 ( Pt 11):2999-3003.
42. Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ. Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. *J Virol.* 1 de mayo de 2014;88(9):4687-97.
43. Byk LA, Gamarnik AV. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu Rev Virol.* 29 de septiembre de 2016;3(1):263-81.
44. Hsieh S-C, Tsai W-Y, Wang W-K. The length of and nonhydrophobic residues in the transmembrane domain of dengue virus envelope protein are critical for its retention and assembly in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* mayo de 2010;84(9):4782-97.
45. Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, Kaptein S, Pastorino B, Dallmeier K, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 2012;67(8):1884-94.

46. Brand C, Bisailon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA Replicase Complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA* [Internet]. noviembre de 2017 [citado 19 de julio de 2019];8(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5675032/>
47. Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic Cph Den*. noviembre de 2005;6(11):967-77.
48. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. enero de 2005;3(1):13-22.
49. Gustin KE. Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J*. 15 de enero de 2001;20(1):240-9.
50. Hiscox JA. The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res*. 1 de septiembre de 2003;95(1):13-22.
51. Chiu H-C, Hannemann H, Heesom KJ, Matthews DA, Davidson AD. High-Throughput Quantitative Proteomic Analysis of Dengue Virus Type 2 Infected A549 Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 26 de marzo de 2014 [citado 20 de abril de 2020];9(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3966871/>
52. De Jesús-González LA, Cervantes-Salazar M, Reyes-Ruiz JM, Osuna-Ramos JF, Farfán-Morales CN, Palacios-Rápalo SN, et al. The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses. *Viruses*. junio de 2020;12(6):583.
53. Muramatsu S, Ishido S, Fujita T, Itoh M, Hotta H. Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization. *J Virol*. julio de 1997;71(7):4954-61.
54. Atasheva S, Fish A, Fornerod M, Frolova EI. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Forms a Tetrameric Complex with CRM1 and Importin  $\alpha/\beta$  That Obstructs Nuclear Pore Complex Function. *J Virol*. mayo de 2010;84(9):4158.

55. Segura-Cabrera A, García-Pérez CA, Guo X, Rodríguez-Pérez MA. A viral-human interactome based on structural motif-domain interactions captures the human infectome. *PloS One*. 2013;8(8):e71526.
56. Amineva SP, Aminev AG, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J Gen Virol*. 2004;85(10):2969-79.
57. Peränen J, Rikkonen M, Liljeström P, Kääriäinen L. Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J Virol*. mayo de 1990;64(5):1888-96.
58. Tian W, Cui Z, Zhang Z, Wei H, Zhang X. Poliovirus 2Apro induces the nucleic translocation of poliovirus 3CD and 3C' proteins. *Acta Biochim Biophys Sin*. 1 de enero de 2011;43(1):38-44.
59. Yang L, Wang R, Yang S, Ma Z, Lin S, Nan Y, et al. Karyopherin Alpha 6 Is Required for Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Zika Virus. *J Virol*. 01 de 2018;92(9).
60. Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res*. noviembre de 2008;80(2):94-101.
61. Y D, W Y, J Y, P H, Y W, C Y, et al. DDX21 translocates from nucleus to cytoplasm and stimulates the innate immune response due to dengue virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 28 de marzo de 2016;473(2):648-53.





