



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LA MITOFAGIA INDUCIDA POR DENV-2
Y POR LAS VIROPORINAS NS2A Y NS2B EN UN MODELO DE
CELULAS ENDOTELIALES HMEC-1.**

T E S I S

Que Presenta

M.C. GIOVANI VISOSO CARVAJAL

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de tesis

Dra. LETICIA CEDILLO BARRÓN

CIUDAD DE MEXICO

FEBRERO 2022

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Leticia Cedillo Barrón
Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV

ASESORES

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda
Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV

Dr. Michael Schnoor
Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV

Dr. Porfirio Nava Domínguez
Investigador Titular del departamento de Fisiología y Neurociencias
CINVESTAV

Dr. Moisés León Juárez
Investigador en Ciencias Médicas D del Departamento de Inmunobioquímica
Instituto Nacional de Perinatología

AGRADECIMIENTO

La agradezco a CONACYT por otorgarme la beca con el no. 493846 que permitió realizar mis estudios de Doctorado en el departamento de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño, admiración y respeto:

A mi familia

Por el apoyo incondicional en cada momento, por su comprensión todos estos años. Les agradezco infinitamente todo lo bueno que me han aportado. Gracias por estar siempre presente. Dedicado a la excelente familia que tengo la fortuna de tener: mi papá, hermano, sobrinos, mis tías y primo(a)s.

A mi mamá: Rufina Carvajal Pastor. Quien con su ejemplo me ha enseñado a siempre luchar, a nunca darme por vencido, por muy gris que esté el día, gracias por el amor y dedicación que siempre me diste desde el primer día, nunca podré pagarte el esfuerzo y sacrificio brindado. Este logro es tuyo también.

A mi hermana: Nayeli. Por todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindado, por no dudar de mi y confiar siempre. Definitivamente este logro no habría sido posible sin tu ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón, por la gran oportunidad que me brindó para ser parte de su gran equipo de trabajo. Por su dedicación en la dirección y asesoría de este proyecto. Agradezco infinitamente toda su paciencia, sus consejos y confianza. El crecimiento que he tenido a lo largo de estos años es en gran parte a sus enseñanzas. Gracias por estar al pendiente de mi crecimiento, por siempre impulsarme a seguir adelante, valoro mucho su tenacidad y trabajo como doctora y como persona. Mil gracias.

A mi comité sinodal: los Doctores Nicolás Villegas Sepúlveda, Moisés León Juárez, Porfirio Nava Domínguez y Michael Schnoor, por su tiempo, amabilidad, consejos y sugerencias para mejorar el proyecto. Realmente su apoyo fue muy importante.

Al Dr. Julio García Cordero, el mejor auxiliar y colaborador que el laboratorio puede tener. Mil gracias por el apoyo brindado para la realización de este proyecto, por su increíble paciencia en todo momento, sus conocimientos, sin duda alguna, muchos de los experimentos realizados no hubieran sido posible sin su ayuda. Un gran ejemplo para mí de trabajo y esfuerzo.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio, el mejor equipo y ambiente de trabajo que pude encontrar. Agradezco el apoyo que me brindaron desde el primer día que llegué. A Sofi por su amistad y por ayudarme siempre que lo necesité. A Pao Valenzuela por su ayuda y amabilidad, Alfredo por su consejos y ayuda, a Froy por su apoyo en el laboratorio. Al nuevo gran equipo que se formó en los últimos años, Juve y la doctora Sandy, la mejor colaboradora y gran amiga.

A Maru Maqueda por su apoyo en todo momento, ejemplo de esfuerzo y amabilidad, muchas gracias por su tiempo y amistad. Siempre en deuda.

CONTENIDO	
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	1
VIRUS DENGUE: GENERALIDADES	2
PROTEÍNAS VIRALES	3
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES	4
CICLO DE REPLICACIÓN	7
AUTOFAGIA	10
ETAPAS DE LA AUTOFAGIA	11
TIPOS DE AUTOFAGIA	16
MITOFAGIA: UN TIPO SELECTIVO DE AUTOFAGIA	18
INDUCCIÓN DE MITOFAGIA	19
INFLAMASOMA	22
COMPONENTES DE INFLAMASOMA	23
ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA	23
ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA EN LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE	25
AUTOFAGIA E INFLAMASOMA	27
MITOFAGIA E INFLAMASOMA	29
ANTECEDENTES DIRECTOS	31
JUSTIFICACIÓN	37
HIPOTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
MATERIAL Y MÉTODOS	39
Purificación del virus.	39
Método de titulación del virus dengue por ensayo en placa.	39
SDS-PAGE y ensayo de western-blot.	40
Ensayos de inmunofluorescencia.	41
Fraccionamiento celular mitocondrial.	41
Microscopia Electrónica.	42

Ensayos de inhibición del inflammasoma.	43
Análisis de datos.	43
TABLA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS	44
RESULTADOS	45
Análisis de la activación de SREBP-1 en células HMEC-1 infectadas con DENV.2 y su relación con la inducción de mitofagia	45
Caracterización de la inducción de mitofagia en células endoteliales (HMEC-1) infectadas con DENV-2.	48
Análisis de la localización celular de proteínas de mitofagia en presencia de DENV-2.	51
Evaluar los cambios de proteínas de mitofagia en fracciones mitocondriales de células endoteliales infectadas con DENV-2.	53
Analizar los cambios morfológicos mitocondriales en células endoteliales infectadas con DENV-2	55
Evaluación la participación de las viroporinas de DENV en la inducción de mitofagia	59
Evaluación del papel de la proteína viral NS2A-GFP sobre la acumulación de PINK y NDP52.	61
Fraccionamiento mitocondrial en presencia de la proteína NS2A-GFP	64
Participación de las viroporinas de DENV-2 en la activación del inflammasoma.	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	78
PERSPECTIVAS	78
MODELO CELULAR	79
REFERENCIAS	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Composición de la poliproteína de DENV-2.	3
Figura 2.	Ciclo viral de DENV.	9
Figura 3.	Etapas de autofagia.	12
Figura 4.	Sistemas de conjugación para la formación de LC3-II.	15
Figura 5.	Principales tipos de autofagia.	17
Figura 6	Inducción de mitofagia.	20
Figura 7.	Estructura del inflammasoma NLRP3.	24
Figura 8.	Activación de SREBP.	27
Figura 9	La autofagia suprime la activación del inflammasoma NLRP3.	29
Figura 10.	Expresión de LC3 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2.	32
Figura 11.	Expresión de Beclina-1 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2.	33
Figura 12	Expresión de Beclina en presencia del inhibidor glibenclamida en células HMEC-1 infectadas con DENV-2.	34
Figura 13.	Análisis de la replicación viral de DENV-2 en presencia y ausencia del inhibidor glibenclamida.	36
Figura 14.	Activación de SREBP-1 y expresión de FAS en células HMEC-1 infectadas con DENV-2.	46
Figura 15.	Inhibición del inflammasoma NLRP3 y la expresión de SREBP, junto con FAS en presencia de DENV-2 a diferentes tiempos de infección.	47
Figura 16	Inducción de mitofagia en células HMEC-1 infectadas con DENV-2.	49
Figura 17	Expresión del factor de transcripción NFR2 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2	51
Figura 18	Localización celular de proteínas involucradas en mitofagia en presencia de DENV-	52
Figura 19	Fraccionamiento mitocondrial de células HMEC-1 infectadas con DENV-2.	53
Figura 20	Cambios mitocondriales en células HMEC-1 a diferentes tiempos de infección con DENV-2.	56
Figura 21	Análisis por microscopía electrónica de células HMEC-1 infectadas con DENV-2.	58
Figura 22	Cambios morfológicos mitocondriales inducidos por la vioporfina NS2A de DENV-2.	60
Figura 23	Análisis por microscopía electrónica de los cambios mitocondriales inducidos por vioporfinas de DENV-2.	61
Figura 24	Análisis de la localización de PINK en células HMEC-1 que expresan a las vioporfinas de DENV-2.	62
Figura 25	Análisis de la localización de NDP52 en células HMEC-1 que expresan a la vioporfina NS2A del DENV-2	63

Figura 26	Fraccionamiento celular de células HMEC-1 transfectadas con GFP y NS2A-GFP.	65
Figura 27	Análisis de la activación del inflammasoma NLRP3 en presencia de las viroporinas de DENV-2.	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados	44
---------------------------------	----

ABREVIATURAS

UTR	Untranslated region
ORF	Open Reading Frame
TIM	T cell immunoglobulin mucin domain 1
SQSTM1	Sequestosome-1
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
ATG	Autophagy-Related Genes
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa.
PI3K	PI3P kinase class III
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
mTor	Mammalian target of rapamycin
GβL	G <i>protein</i> beta subunit-like
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1
PI₃P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
Vps34	Vacuolar protein sorting 34
SNAP29	Synaptosome Associated Protein 29
RAB	Ras-related protein
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
IL-1β	Interleucina-1 beta
IκB	Inhibidor NF-κB
IKK	Kinasa de IκB
NF-κB	Factor nuclear κB
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cell
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
ASC	Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD
GFP	Green Fluorescent Protein
p62	Phosphotyrosine-independent ligand for the Lck SH2 domain of 62 kDa

RESUMEN

El virus Dengue es un miembro de la familia Flaviviridae, del género *Flavivirus*. DENV activa y altera diversos procesos esenciales en la célula blanco, como: tráfico vesicular, apoptosis, metabolismo celular y funciones relacionadas con el sistema inmune, como autofagia. Previamente, nuestro grupo de trabajo ha mostrado la inducción de autofagia en un modelo de células endoteliales infectadas con DENV-2, así como la activación del inflammasoma NLRP3, un complejo multiproteico de gran relevancia en la respuesta inmune innata. Adicionalmente, se ha demostrado la capacidad de DENV-2 para inducir importantes alteraciones mitocondriales, lo cual podría sugerir la inducción de mitofagia (tipo selectivo de autofagia) como ha sido reportado en otros flavivirus. El objeto de estudio de este trabajo es analizar una serie de eventos secuenciales como el daño mitocondrial ocasionado por la infección con DENV-2 y su capacidad para inducir mitofagia en un modelo de células endoteliales HMEC-1, así como evaluar la capacidad de las viroporinas (NS2A y NS2B) para activar mitofagia y eventualmente promover la activación del inflammasoma. Caracterizamos la inducción de mitofagia a través del análisis en la expresión y localización celular de proteínas relacionadas con mitofagia (PINK y PARKIN) en presencia de DENV-2. Observamos una acumulación de estas moléculas en fracciones mitocondriales, así como una redistribución en regiones perinucleares en presencia del virus. Se demostró también alargamiento mitocondrial y alteraciones en las redes mitocondriales en células infectadas. Con respecto a NS2A demostramos la acumulación de PINK en la mitocondria en presencia de esta viroporina, al igual que lo observado en la infección con DENV-2. Las proteínas NS2A y NS2B alteraron la morfología mitocondrial así mismo, co-localizan con la mitocondria y activan el inflammasoma NLRP3. Adicionalmente, encontramos un incremento de proteínas SREBP que se relacionan con la inducción de mitofagia. Todos estos resultados nos indican que DENV-2 y específicamente NS2A puede inducir mitofagia y el daño mitocondrial ocasionada por esta proteína viral probablemente activa el inflammasoma mediante la liberación de ROS.

ABSTRACT

Dengue virus is a member of the Flaviviridae family, of the genus Flavivirus. DENV modifies various important processes in the target cell, such as: vesicular trafficking, apoptosis, cell metabolism and immune processes such as autophagy. Previously, our work group has shown the induction of autophagy in a model of endothelial cells infected with DENV-2, and the activation of the NLRP3 inflammasome. Additionally, DENV-2 induces important mitochondrial alterations, which could suggest the induction of mitophagy (selective type of autophagy) as has been reported in other flaviviruses. Our work objective is to analyze various events such as mitochondrial damage caused by DENV-2 infection and its ability to induce mitophagy in a model of HMEC-1 endothelial cells, and to evaluate whether the viroporins NS2A and NS2B induce mitophagy to subsequently activate the inflammasome. We characterize the induction of mitophagy through the expression and cellular localization of the PINK and PARKIN proteins, related to the induction of mitophagy. We observed accumulation of these molecules in mitochondrial fractions, as well as a redistribution in perinuclear regions in the presence of the virus. Mitochondrial elongation and alterations in mitochondrial networks were also demonstrated in infected cells. With respect to NS2A, we demonstrated PINK accumulation in the mitochondria in the presence of this viroporin, as was observed in DENV-2 infection. The NS2A and NS2B proteins altered mitochondrial morphology, showing co-localization with the mitochondria and activating the NLRP3 inflammasome. Additionally, we found an increase in proteins related to lipid metabolism that are related to the induction of mitophagy (SREBP). All our results indicate that DENV-2 and specifically NS2A can induce mitophagy and the mitochondrial damage caused by this viral protein probably activates the inflammasome through the release of ROS.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del dengue es una de las infecciones virales transmitidas por mosquitos más frecuentes en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Se estima que cada año se reportan más de 100 millones de casos a nivel mundial, con una tasa de mortalidad del 5 hasta el 20%. (Uno-Ross, 2018). Actualmente, la enfermedad del dengue es endémica en más de 100 países, siendo las áreas más afectadas, las regiones tropicales de América del sur, Sureste Asiático y Pacífico Occidental (OMS, 2021).

El agente causal de esta enfermedad es el virus dengue (DENV), y el agente transmisor del virus es el mosquito del género *Aedes* y la especie *aegypti*, el cual se ha descrito como el principal vector de DENV. La transmisión del virus a los humanos ocurre a través de la picadura de un mosquito hembra infectado. Una vez ocurrido esto, los humanos se convierten en los principales portadores y transmisores del virus. Una persona infectada desarrolla diferentes síntomas dentro de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado (Mayer et al., 2017, OMS, 2021).

Clínicamente, la enfermedad se clasifica como dengue con o sin signos de alarma y como dengue severo. Existen criterios para establecer una probable enfermedad de dengue que incluyen vivir o haber viajado a una zona endémica, fiebre acompañada de alguno de las siguientes síntomas: náuseas, vómito, prurito, dolor generalizado, etc. Los signos de alarma pueden incluir una amplia gama de manifestaciones como dolor abdominal, vómito persistente, sangrado de mucosas, letargo, agrandamiento de hígado >2 cm e incremento en los niveles de hematocrito, junto con una disminución en la cuenta plaquetaria. Es importante destacar que incluso los pacientes sin signos de alarma pueden desarrollar dengue severo. Finalmente, los criterios que definen la forma grave de la enfermedad son los siguientes: fuga plasmática severa capaz de inducir síndrome de shock por dengue, hemorragia severa y una afectación grave a los órganos (OMS, 2021, Guzmán et al., 2016). Los factores que definen la forma severa de la enfermedad son múltiples, desde el fondo genético e inmunológico del paciente, así como una infección

secundaria con un serotipo heterólogo (uno los principales factores de riesgo para formas severas), hasta factores intrínsecos que dependen del vector, el aislado viral o el serotipo, entre otros (Wu et al, 2013).

VIRUS DENGUE: GENERALIDADES

El virus del dengue es un miembro de la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*, que incluyen también a los virus Zika, Fiebre amarilla, Encefalitis japonesa y West Nile entre otros. Se han descrito la existencia de 4 serotipos del virus dengue, que van del DENV-1 al DENV-4. DENV es un virus envuelto de morfología esférica, con un diámetro de aproximadamente 50 nm. La partícula viral está cubierta por una bicapa lipídica derivada de la célula huésped en la que se encuentra inmersa la proteína de envoltura (E) responsable de la entrada del virus. En el interior de la bicapa lipídica se localiza la nucleocápside, formada por la asociación del ARN viral y la proteína de cápside (C) (Junjhon et al., 2014, Lescar et al., 2018).

El genoma viral consta de una cadena sencilla de RNA polaridad positiva con un tamaño aproximado de 11 kb. Esta molécula de RNA contiene un solo marco de lectura abierto y posee dos regiones no traducidas en los extremos 5' y 3'. El extremo 5' está conformado por aproximadamente 95-101 nucleótidos, y posee un cap de tipo I (m⁷GpppAmp). En contraste, el extremo 3'UTR tiene 450 nucleótidos, este extremo 3' carece de cola poli A y se divide en tres dominios funcionales. Tanto el extremo 5' como 3' son elementos estructurales necesarios que regulan y permiten la traducción y replicación viral (Harapan, 2020).

El ORF del genoma viral codifica para una sola poliproteína de 3391 aminoácidos, la cual es procesada por proteasas celulares y por la proteasa viral NS2B-3 para dar lugar a tres proteínas estructurales: cápside (C), precursora de membrana (prM) y envoltura (E), las cuales conforman la estructura del virión. Asimismo, las proteínas no estructurales restantes son derivadas de la secuencia C-terminal de la poliproteína en el siguiente orden: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 que están implicadas en la replicación viral (Egloff et al., 2007, Norazharuddin-Lai, 2018)

Figura 1.

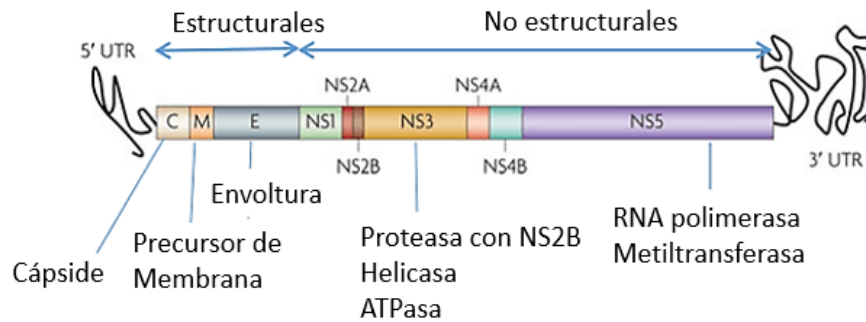


Figura 1. Poliproteína viral de aproximadamente 3391 aa, que da lugar a 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (modificado de Guzmán et al., 2016).

PROTEÍNAS VIRALES

Proteínas Estructurales

La proteína E es una glicoproteína de 50 kDa, aproximadamente de 400 aa y es la proteína viral responsable de la interacción entre el virus con la célula blanco. Participa en diversas etapas del ciclo de replicación viral, incluyendo su papel en la unión celular, fusión de membranas y ensamble viral. Par el huésped, el papel biológico más importante de la proteína E es su capacidad inmunogénica ya que promueve la inducción de anticuerpos neutralizante (Fahimi et al., 2018). La proteína E está conformada por tres dominios estructurales y funcionales (ED I–III). Los tres dominios incluyen un dominio central (EDI), un dominio de dimerización que contiene un péptido de fusión (EDII) y un dominio de unión a receptor (EDIII) (Screaton et al., 2015; Lin et al., 2017). Adicionalmente, está descrito que la glicosilaciones de los residuos Asn76 y Asn153 le permite a la proteína E un plegamiento apropiado (Shah et al., 2013, Screaton et al., 2015).

La proteína de cápside (C) es una proteína altamente básica con un peso de 13.5 kDa. Es la primera proteína viral en ser traducida y es capaz de formar heterodímeros. Tiene una alta afinidad por ácidos nucleicos lo que le permite interactuar con el RNA viral para formar la nucleocápside, además, puede también interactuar con membranas lipídicas (Byk-Gamarnik, 2016, Xia et al., 2020).

La proteína M (8 kDa) es sintetizada como una glicoproteína precursora (pM de un peso aproximado de 26 kDa). La función más importante de esta proteína es actuar de chaperona, ya que tiene la propiedad de interactuar y estabilizar al dominio II de la proteína E. La proteína M posee una estructura de barril- β que protege el loop de fusión evitando un cambio conformacional prematuro que puede promover la actividad fusogénica durante la vía secretora (Cruz-Oliveira et al., 2015). Durante el proceso de maduración, en la red trans-Golgi, la proteína prM es procesada proteolíticamente por la enzima furina liberando el polipéptido N-terminal “pr” (residuos 1-91), que se mantiene unido por las condiciones del pH en la célula y una vez que el virión es liberado el pr se disocia. Esta proteína tiene la propiedad de asociarse a la proteína viral E y es fundamental en la maduración de las partículas virales (Li et al., 2008, Zhang et al., 2013).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

La proteína NS1 es una glicoproteína de aproximadamente 45 kDa, implicada en el proceso de replicación. Una vez sintetizada se transloca al lumen del RE y posteriormente es secretada extracelularmente. NS1 se puede encontrar en forma de monómeros hidrofílicos inmaduros en el lumen del RE, o como un homodímero hidrofóbico estable capaz de interactuar con membranas u otras proteínas virales no estructurales, además se cree que esta forma puede estar involucrada en el ensamble del complejo de replicación. Asimismo, su forma hexamérica puede secretarse o también puede anclarse en la superficie de células infectadas y servir como blanco para la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Por otro lado, se ha descrito que la maduración de NS1 implica la glicosilación en dos sitios conservados para flavivirus (Meng et al., 2015). Se sugiere además que la proteína NS1 puede estar involucrada en las rutas metabólicas de lípidos, contribuyendo así a una característica clave de la enfermedad severa del dengue, que es la disfunción endotelial (Chen et al., 2018, Singh et al., 2018). Además, se ha reportado su participación en la inducción de fuga vascular en un modelo murino, mecanismo mediado por la ruptura de uniones mediada por autofagia (Chen et al., 2018).

La proteína NS2A es una proteína hidrofóbica transmembranal de ~22 kDa que forma parte del complejo de replicación. Cuenta con cinco segmentos integrales transmembranales (residuos 69–93, 100–118, 143–163, 165–186 y 189–209) que abarcan la bicapa lipídica de la membrana del retículo endoplásmico. Cuenta también con dos segmentos que se asocian a membranas (residuos 32–51 y 120–140), capaces de interactuar con la membrana del RE sin atravesar la bicapa lipídica (Nemésio-Villalaín, 2014). Recientemente, se le ha atribuido un papel muy importante durante la replicación viral, ya que se sugiere que esta proteína es capaz de reclutar el RNA viral, así como proteínas estructurales y proteasas al sitio del ensamble de las nuevas partículas virales (Xie et al., 2019). Adicionalmente, NS2A tiene un papel antagonista sobre la respuesta inmune, ya que bloquea la señalización de IFN- α/β (Dalrymple et al., 2015, Meng et al., 2015). Por otro lado, también se le ha atribuido un papel de posible viroporina a NS2A debido a diversos estudios, como la presencia de dominios hélice transmembranales con secuencias muy similares a otras viroporinas de flavivirus, así como su capacidad para inducir poros en un sistema procarionte y alterar la permeabilidad de membranas bacterianas, características clave en una viroporina (Shrivastava et al., 2017, Tomar et al., 2019).

La proteína NS2B al igual que NS2A es una proteína hidrofóbica con un peso de 14 kDa cuya función principal es actuar como cofactor de la proteasa viral NS3 formando el complejo NS2B-NS3. NS2B contiene 4 dominios hélice transmembranales entre ellos el dominio hidrofílico para actuar como cofactor y una región hidrofóbica que le permite anclarse a membranas celulares. Se ha demostrado su capacidad para oligomerizar y organizarse en estructuras tipo poros, alterando de esta manera la permeabilidad de membranas que pudiera conferirle un papel de viroporina. (León Juárez, 2015, Tomar et al., 2019). También se ha sugerido su participación en la replicación viral al asociarse con dsRNA (Nasar et al., 2019). Por otro lado, la proteína NS3 es una proteína multifuncional de 618 aa que actúa como una serin-proteasa, RNA helicasa y ATPasa/NTPasa, confiriéndole un papel primordial en la replicación viral. La proteína NS3 es la proteína viral más

conservada entre los serotipos de DENV. Se ha reportado que el residuo N-terminal de NS3 interacciona con un dominio central de 40 aminoácidos del cofactor NS2B, necesarios para ejercer su función como proteasa. El complejo NS2B-NS3 actúa rompiendo los enlaces peptídicos entre C-prM, NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4A-NS5, además de su actividad de helicasa durante la replicación viral (Wu et al., 2015, Nasar et al., 2019).

Por otra parte, las proteínas NS4A (16 kDa) y NS4B (27 kDa) son proteínas integrales de membrana. NS4A es la proteína menos caracterizada. Se ha sugerido que NS4A induce una remodelación importante de la membrana del RE para la replicación viral y que se encuentra en puntos discretos en el citoplasma de las células infectadas. Además, tiene dominios hélices que le permite oligomerizar. (Zou et al., 2015, Reddy et al., 2018). Mientras que NS4B está implicada en la interacción directa con la proteína NS3 y con un papel en la replicación viral mediante el reordenamiento de membranas para facilitar la formación del complejo viral (Chatel-Chaix et al., 2015). Se ha demostrado que la función de NS4B se conserva en los virus West Nile y de fiebre amarilla. Con respecto a DENV se sugiere que los primeros 1125 aminoácidos de NS4B son suficientes para la inhibición de la señalización de IFN alfa / beta (IFN- α / β) (Zmurko et al., 2015).

La proteína NS5 es la más grande del virus dengue, pesa aproximadamente 105 kDa y es la proteína más conservada entre los miembros del género flavivirus. Posee además un 67% de identidad entre las secuencias codificantes para la NS5 de los 4 serotipos de dengue (Lim et al., 2015). Esta proteína juega un papel importante en la replicación viral ya que contiene actividades enzimáticas requeridas para la formación del CAP y para la síntesis del RNA viral. Cuenta con dos dominios funcionales: El amino terminal con actividad de metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (residuos 1-265) y en el C-terminal un dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) con actividad de RdRp (residuos 266-900) (Zhao et al., 2015, Klema et al., 2016).

CICLO DE REPLICACIÓN

El ciclo de infección del virus dengue comienza con la inoculación de partículas virales en la piel del huésped a través de la picadura de un mosquito hembra infectado (Nasar et al., 2020). Se han descrito diferentes estirpes celulares permisivas a la infección por DENV, entre ellas macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos, células epiteliales, endoteliales, entre otras (Wu SJ 2000, Limón Flores-AY et al., 2005, Whitehead et al., 2007, Bustos Arriaga, 2011, Diamond et al., 2015, Bustos-Arriaga, 2016).

El ciclo viral de dengue está dividido en diversas etapas. El primer evento del ciclo viral consiste en la interacción entre el virus y la célula huésped, a través del dominio III de la proteína E con sus respectivos receptores celulares (Lo et al., 2016). Han sido reportadas diversas moléculas de la célula huésped que funcionan como receptores para el virus; entre ellas lectinas tipo C (DC-SIGN), algunos glicosaminoglicanos como heparán sulfato, el receptor de manosa CD206, proteínas de shock térmico (HSP70, HSP90), CD14 y proteínas inmunomoduladoras como los receptores TIM/TAM (Diamond et al., 2015). Algunas de estas moléculas reportadas como receptores para DENV han demostrado ser célula específica, el ejemplo más claro es DC-SIGN, una molécula presente en células dendríticas, descrita como el receptor para el virus dengue en esta estirpe celular. Sin embargo, aún se desconoce el receptor específico de muchas de las estirpes celulares permisivas a la infección por este virus. Con respecto a células endoteliales, se ha descrito que DENV-2 necesita la presencia de receptores proteoglicanos que contienen heparán sulfato para inducir una infección viral eficiente (Dalrymple-Mackow, 2014; Cruz-Oliveira et al., 2015).

Una vez que el virus interacciona con los receptores celulares en la célula huésped, la partícula viral ingresa a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptor (Screaton et al., 2015; Bhatt et al., 2021). Posteriormente, el ambiente ácido del endosoma promueve un cambio conformacional en la proteína E, exponiendo al péptido fusogénico que forma una asa localizado en el dominio II. Este loop fusogénico favorece la fusión de la membrana endosomal con la

membrana viral, promoviendo la disociación de la nucleocápside y la liberación del genoma viral al citoplasma de la célula. La cadena de RNA viral de polaridad positiva funciona como un mensajero y esto permite que se lleva a cabo la traducción inmediata en el RE a través de un mecanismo dependiente del cap 5'. El factor de iniciación de la célula huésped eIF4F reconoce esta región en el genoma viral y recluta al complejo ribosomal para iniciar la traducción de las proteínas virales (You S et al., 2001, Bäck-Lundkvist, 2013).

Una vez sintetizadas las proteínas virales, se forman los complejos de replicación viral que se alojan en estructuras de membrana provenientes del RE. La etapa de replicación inicia cuando la cadena de RNA de polaridad positiva es copiada en una cadena de RNA de polaridad negativa (dsRNA), la cual sirve como un molde para la síntesis de las cadenas de RNA de polaridad positiva (ssRNA), las cuales a su vez se asocian con la proteína de cápside y esto culmina en la formación de la nucleocápside (Brand et al., 2017). Enseguida, las proteínas prM y E forman heterodímeros que están orientados hacia el lumen del ER. Posteriormente, los heterodímeros prM/E se asocian en trímeros y se cree que estas interacciones oligoméricas inducen una superficie curva, que guía el brote del virión (Haparan et al., 2020).

Las nuevas partículas virales ensambladas en el RE migran a través de la red de trans-Golgi, donde la proteína preM es escindida por la proteasa celular furina, liberando al polipéptido N-terminal "pr" (residuos 1-91) permitiendo el reacomodo de las proteínas M y E en la superficie del virión. Posteriormente, los viriones se secretan por exocitosis y la proteína preM se disocia en el medio extracelular para producir el péptido libre y las partículas virales maduras que se caracterizan por presentar una estructura lisa (Whitehead et al 2007, Sreaton et al, 2015). El siguiente esquema resume el ciclo de replicación de DENV. Figura 2.

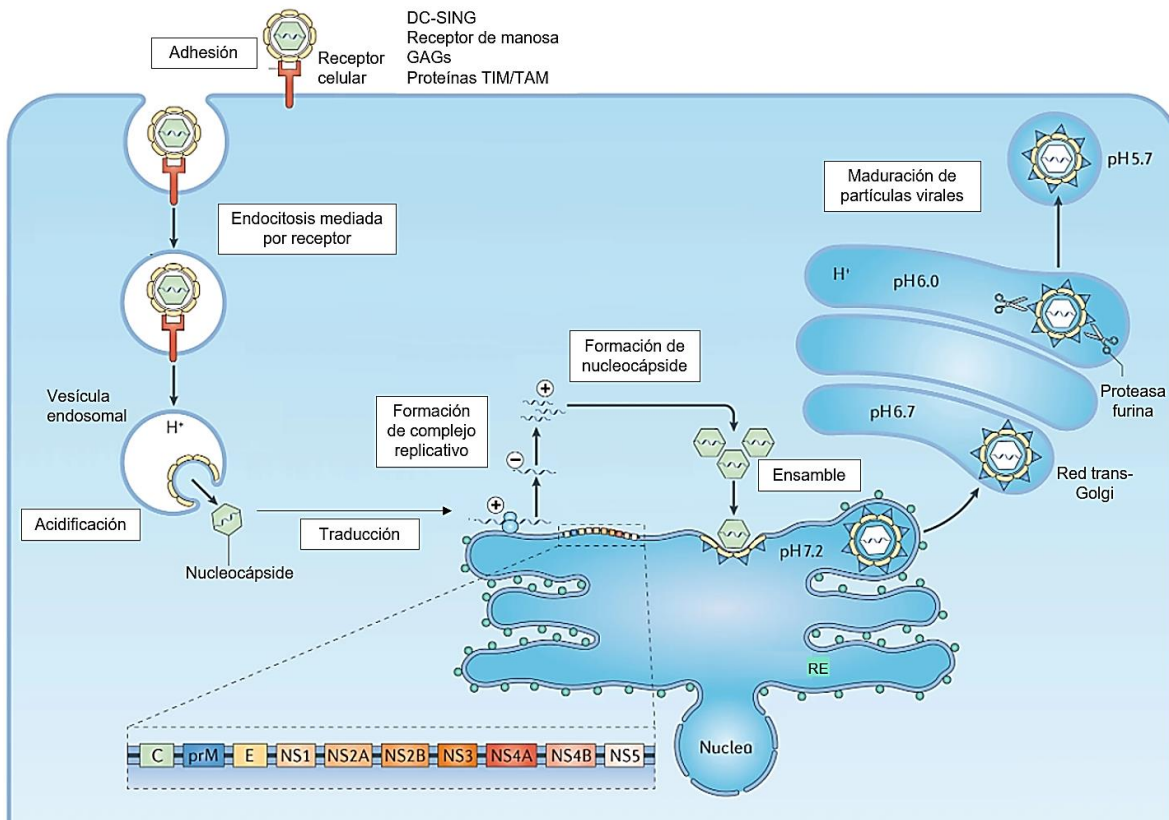


Figura 2. Ciclo viral de DENV. El proceso de replicación viral de DENV inicia con la unión de la partícula viral con receptores celulares específicos que median el ingreso a la célula blanco. Posteriormente la acidificación de la vesícula endosomal promueve la fusión de la membrana endosomal y la membrana viral, liberando la nucleocápside dentro del citoplasma. Enseguida ocurren los procesos de traducción y replicación viral en el RE. Finalmente ocurre el ensamblaje de las nuevas partículas virales, las cuales son transportadas por la red del aparato de Golgi (modificado de Screaton et al., 2015).

Durante el proceso de infección el virus dengue regula diferentes mecanismos que requieren específicamente de membranas de varios organelos celulares para orquestar los procesos de replicación viral. Algunos de los organelos más analizados en este contexto son el retículo endoplásmico y las mitocondrias, particularmente relacionados con la inducción de la autofagia, uno de los procesos celulares que muchos virus utilizan para promover el proceso de replicación.

Con respecto a los cambios producidos por DENV y otros flavivirus, la membrana que forma el retículo endoplasmático sufre una serie de redistribución y remodelación tanto para la formación de fábricas de replicación, como para la

traducción de proteínas virales y para promover el ensamblaje de nuevas partículas infecciosas (Brey-Bartenschlager, 2016, Schwarz y Blower, 2016). Dado que DENV puede inducir reordenamientos en las membranas del RE y este organelo ha sido propuesto como donante para la formación del fagóforo, existen muchas propuestas sobre la participación del RE en la inducción de la autofagia. Se ha demostrado que muchos flavivirus promueven la re-distribución de las membranas del RE, y es la interacción de las proteínas virales con el RE la responsable de estos cambios en su organización (Diwaker et al., 2015, Perera et al., 2017, Evans et al., 2020).

AUTOFAGIA

Está reportado que durante el ciclo viral de diversos flavivirus (virus dengue, virus Zika, virus de la encefalitis japonesa, etc.) varios procesos celulares son activados o alterados (Vicenzi et al., 2018). Se ha demostrado que DENV tiene la capacidad de manipular y controlar diferentes mecanismos celulares para beneficiar el proceso de infección viral, desde la activación de diversas vías de señalización como PI3K/AKT, hasta eventos como apoptosis, tráfico vesicular, procesos relacionados con el sistema inmune, e inclusive autofagia (Lee et al., 2005, Vázquez Ochoa et al., 2009, Miao et al., 2019).

La autofagia es un proceso catabólico normal, que se lleva a cabo en el citoplasma; encargado de mantener la homeóstasis celular, a través de la degradación y el reciclamiento de componentes celulares como agregados proteicos, proteínas plegadas erróneamente, e inclusive organelos celulares completos como mitocondrias (Yuk-Jo, 2013; Khandia et al., 2019). La autofagia se favorece por diversos estímulos asociados a estrés, como privación de nutrientes (principalmente por falta de aminoácidos), hipoxia, estrés oxidativo, así como por la invasión de agentes patógenos, frecuentemente intracelulares, etc. (Yuk-Jo, 2013, Deretic et al., 2013; Bento et al., 2016). Existen evidencias de que el fagóforo es capaz de interactuar con agregados proteicos u organelos. Esta interacción se da través de la molécula LC3-II que puede actuar como un receptor sobre el fagóforo y de esta

manera interaccionar con moléculas adaptadoras presentes en el blanco a degradar (ej. agregados proteicos o mitocondrias) favoreciendo así la captación y degradación selectiva. La molécula adaptadora mejor caracterizada es p62/SQSTM1, la cual es una proteína multifuncional que cuenta con un dominio N-terminal Phox-BM1 (PB1), un dominio de dedos de zinc tipo ZZ, una señal de localización nuclear (NSL), un motivo de exportación (NES), una región de interacción a LC3 (LIR), una región de interacción Keap1, y un dominio C-terminal asociado a ubiquitina (UBA). La proteína p62 interactúa de manera no covalente con cadenas de ubiquitinas o poliubiquitina a través del dominio UBA, y posteriormente libera las moléculas blanco ubiquitinadas a los autofagosomas a través del dominio LIR. La ubiquitinación en K63 es un marcador común en el proceso de autofagia (Liu et al., 2016).

La autofagia es un mecanismo que se encuentra finamente regulado por una gran variedad de proteínas denominadas proteínas ATG (Autophagy related gene) (Wesselborg et al., 2015). Hasta el momento, se han identificado ~40 proteínas ATG, muchas de las cuales están conservadas en células de mamífero (Jackson et al., 2015). Las proteínas ATG forman diversos complejos proteicos, los cuales participan en las diversas etapas a lo largo del proceso autofágico.

Los complejos ATG más descritos incluyen al complejo ULK1 conformado por la cinasa ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101 involucrado en la inducción. Otro complejo está conformado por la cinasa PI3K III, beclina-1 y ATG14 implicado en la formación del fagóforo, y finalmente los sistemas de conjugación de ATG12 y ATG8 importantes para el procesamiento de LC3-II y formación del autofagosoma (Mizushima et al., 2011; Zhang et al., 2021).

ETAPAS DE LA AUTOFAGIA

En un contexto general, la autofagia, también denominada macroautofagia, abarca una serie ordenada de etapas que se detallan a continuación: *i)* la formación *de novo* de una membrana asociada al RE/mitocondria denominada fagóforo, *ii)* el

secuestro de proteínas plegadas erróneamente, agregados proteicos, o componentes citoplasmáticos como organelos celulares. *iii*) formación de autofagosomas y la fusión con lisosomas. *iv*) degradación de moléculas blanco a través de la actividad de enzimas lisosomales presentes en el autofagolisosoma (Abdoli et al., 2018; Nishimura et al., 2020). Etapas son ilustradas en la figura 2.

La inducción de autofagia es un proceso que se encuentra finamente regulado por el complejo mTORC1 (conformado por la serina-treonina cinasa mTOR, y por las proteínas adaptadoras Raptor, GβL y Deptor). Además de estas funciones este complejo se encarga también de regular otros procesos importantes como ciclo celular, metabolismo, estrés celular, entro otros (Deretic et al., 2013; Abdoli et al., 2018).

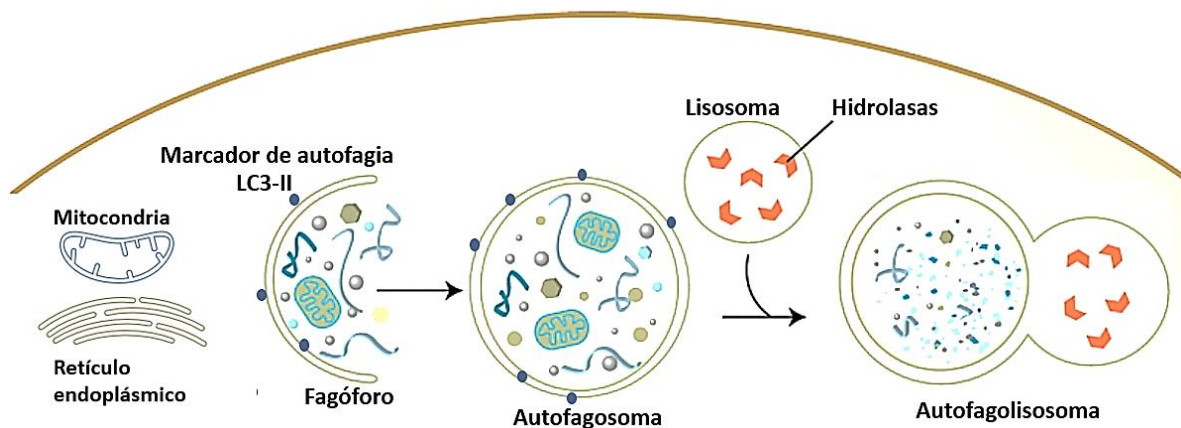


Figura 3. Etapas de autofagia. Las etapas que comprenden la autofagia inician con la (i) inducción del proceso, la cual está mediada por diversas señales y estímulos como privación de nutrientes o la presencia de agentes patógenos. (ii) La formación de la membrana inicial que tiene lugar en sitios de contacto entre el RE-mitocondria. (iii) La formación y elongación de la membrana que permite capturar moléculas y material citosólico, posteriormente se da la formación el autofagosoma, una estructura de doble membrana que se fusiona con lisosomas para formar el autofagolisosoma, (iv) resultando en la degradación de las moléculas cargo a través de enzimas lisosomales, principalmente proteínas de la familia de las catepsinas (modificado de Weidberg et al., 2011).

En condiciones basales, la cinasa mTOR es capaz de regular negativamente al complejo ULK1, fosforilando dos de sus componentes, ATG13 en el residuo S258 y ULK1 en el residuo S757, impidiendo de esta manera su agrupamiento e inhibiendo las señales río abajo que inducen autofagia. Por el contrario, en ausencia de mTOR, el complejo ULK1 es el primero en participar para la formación del autofagosoma (Randall-Denllo, et al., 2013). La cinasa ULK1 es capaz de iniciar una serie de fosforilaciones de las proteínas ATG13 y FIP200 (proteína de interacción con cinasas de adhesión focal) promoviendo su ensamble (Shi et al., 2012). El siguiente evento río abajo involucra al complejo PI3K III, (conformado por la cinasa PI3K III, beclina-1 y ATG14) el cual se forma inmediatamente ante la presencia del complejo ULK1.

La cinasa PI3K III pertenece a una familia de enzimas que catalizan la fosforilación de fosfatidilinositol (PI) en la posición 3 del anillo de inositol, generando fosfatidilinositol 3 fosfato (PI₃P). La acumulación de PI₃P genera una plataforma molecular para el reclutamiento de proteínas de unión a PI₃P (Hamasaki et al., 2013, Randall et al., 2013). Las cinasas PI3K se clasifican en tres clases, basado en su distribución subcelular, señales de activación y sustratos específicos. Estas cinasas están compuestas por una subunidad reguladora y una catalítica. Otra proteína importante que forma parte del complejo PI3K III, es Beclina-1. Esta proteína está involucrada de manera importante en el proceso de apoptosis ya que interactúa con la proteína Bcl-2, la cual tiene efectos anti apoptóticos (Sun et al., 2009). La interacción entre el complejo Bcl-2-Beclina-1 está mediada a través de un dominio BH3 (Bcl-2 homology 3) de ambas proteínas. Esta proteína juega un papel importante en la inducción de autofagia, ya que cuando se disocia de Bcl-2 es capaz de formar el complejo Beclina-1-PI3K III para continuar con el proceso de inducción de autofagia. Algunos reportes han indicado que esta proteína es capaz de inducir autofagia de una manera independiente de mTOR, ya que su disociación con la proteína Bcl-2 es suficiente para inducir la formación del autofagosoma (Russel et al., 2012). Una vez ensamblado, el complejo PI3K III se relocaliza en el RE a través de la proteína Atg14, la cual tiene la capacidad de asociarse a las membranas del

retículo debido a dominios hidrofóbicos, favoreciendo la acumulación de PI₃P, y formando las plataformas que reclutan a proteínas de la familia WIP (proteínas que interaccionan con PI₃P) las cuales son importantes para la formación del fagóforo, correspondientes a la segunda etapa de la autofagia. Esta estructura membranosa formada *de novo* permite la captura de componentes citosólicos y se ha sugerido que se forma en sitios de contacto entre el RE y la mitocondria (Hamasaki-Yoshimori, 2010).

La siguiente etapa consiste en la elongación de la membrana aislada (fagóforo) a través de la adición de vesículas que permite gradualmente la captura de porciones del citoplasma que contienen proteínas, organelos y moléculas blanco para ser degradadas, esta etapa culmina en la formación de una estructura de doble membrana denominada autofagosoma (Cao et al, 2007). Durante este proceso intervienen una serie de proteínas ATG que actúan como sistemas de conjugación tipo ubiquitinación que permiten el procesamiento eficiente de la proteína LC3 (proteína de la cadena ligera 3 asociada a microtúbulo). Se han descrito dos reacciones de conjugación necesarias para la formación de LC3-II. En la primera reacción se da la formación del complejo ATG5-ATG12. Para esto previamente el homodímero ATG7 forma un enlace tioéster entre un residuo de cisteína en el sitio activo de ATG7 y la glicina del extremo carboxilo terminal de ATG12, un proceso similar al mecanismo que efectúa una enzima activadora de tipo E1 ubiquitina. El enlace tioéster en el extremo carboxilo terminal de ATG12 se transfiere posteriormente de ATG7 a ATG10 (enzima similar a E2). Posteriormente, la proteína ATG10 cataliza la formación de un enlace isopeptídico que enlaza covalentemente a la proteína ATG5 y ATG12. El segundo sistema se forma para la conjugación de LC3, la cual se sintetiza como una proteína precursora, que inmediatamente es procesada por la serin-proteasa ATG4 eliminando su extremo carboxilo terminal provocando la exposición de una glicina C-terminal y liberando una forma soluble al citoplasma (LC3-I). Finalmente, la proteína ATG3 media la modificación lipídica de la proteína LC3-I con un grupo de fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a LC3-II (figura 4). Esta es la única proteína específica que permanece asociada a la membrana del autofagosoma por lo que ha sido aceptada y ampliamente utilizada

como marcador de autofagia (Lee-Iwasaki, 2008).

Las etapas finales de la autofagia comprenden la fusión de los autofagosomas con los endosomas tardíos y lisosomas para formar el autofagolisosoma. Esta etapa está mediada por la translocación de diferentes proteínas de la familia SNARE. Se sugiere que las proteínas syntaxina-17 y SNAP-29 localizadas en los autofagosomas y VAMP8 y VAMP7 presentes en los lisosomas son los factores clave implicados en este proceso (Wang et al., 2016, Tian et al., 2021). Así mismo proteínas RAB GTPasas como RAB7A, RAB33B y RAB2A han sido reportadas como reguladoras de la fusión autofagosoma-lisosoma. La fusión de las vesículas promueve la acidificación del medio, donde las moléculas que han sido capturadas son degradadas por hidrolasas lisosomales, principalmente proteínas de la familia de las catepsinas (Randall et al, 2013, Gallagher et al, 2016).

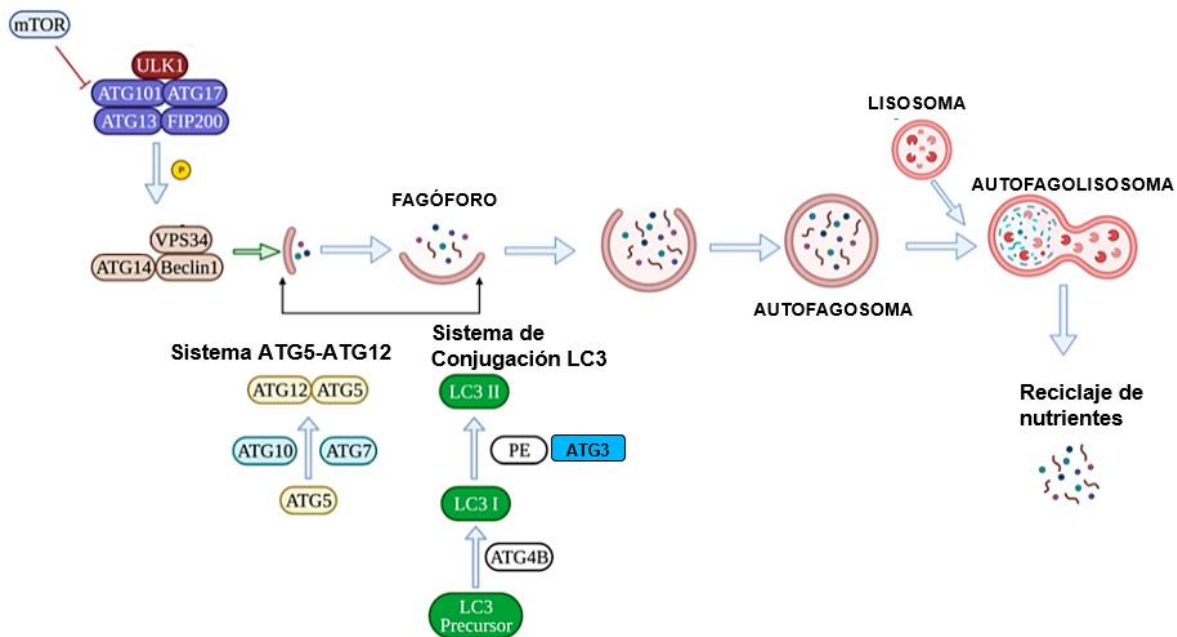


Figura 4. Sistemas de conjugación para la formación de LC3-II. Esquema que muestra las etapas de la autofagia donde se detalla la formación de LC3-II a través de los 2 principales sistemas de conjugación ATG. El primer sistema de conjugación es el sistema de conjugación ATG5-ATG12 formado por la proteína ATG5 conjugando a ATG12 con las enzimas tipo ubiquitina ATG7 y ATG10, que promueve el alargamiento de la membrana autofagosomal. El segundo sistema de conjugación implica a LC3. LC3 es escindida por la proteasa ATG4B, conjugándola con ayuda de ATG3 con fosfatidiletanolamina (PE) para formar la versión LC3-II (modificado de Jeon et al., 2021).

La autofagia también juega un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares y, no solo como sistema de degradación, por ejemplo, también participa en procesos de metabolismo e inmunidad. Por lo que, la alteración en este mecanismo ha sido asociado a múltiples desordenes y enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades inflamatorias o desordenes autoinmunes.

TIPOS DE AUTOFAGIA

Hasta el momento se han descrito diversos tipos de autofagia, el más estudiado ha sido la macroautofagia, detallado anteriormente como una vía de degradación lisosomal y de reciclamiento de componentes intracelulares. La principal característica de este tipo de autofagia es la presencia de una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma.

En contraste, la microautofagia, es el proceso donde los componentes citosólicos son atrapados directamente por el propio lisosoma a través de la invaginación de la membrana lisosómica. Tanto la macroautofagia como la microautofagia pueden englobar estructuras grandes a través de mecanismos selectivos y no selectivos como se mencionó previamente.

El otro tipo de autofagia es mediada por chaperonas (CMA); proceso en el cual las proteínas blanco se translocan a través de la membrana lisosomal en un complejo de proteínas chaperonas (como Hsc-70) que son reconocidas por la proteína de membrana asociada a lisosomas del receptor de membrana lisosomal 2A (LAMP-2A) resultando en su degradación. La figura a continuación resume los tres principales tipos de autofagia.

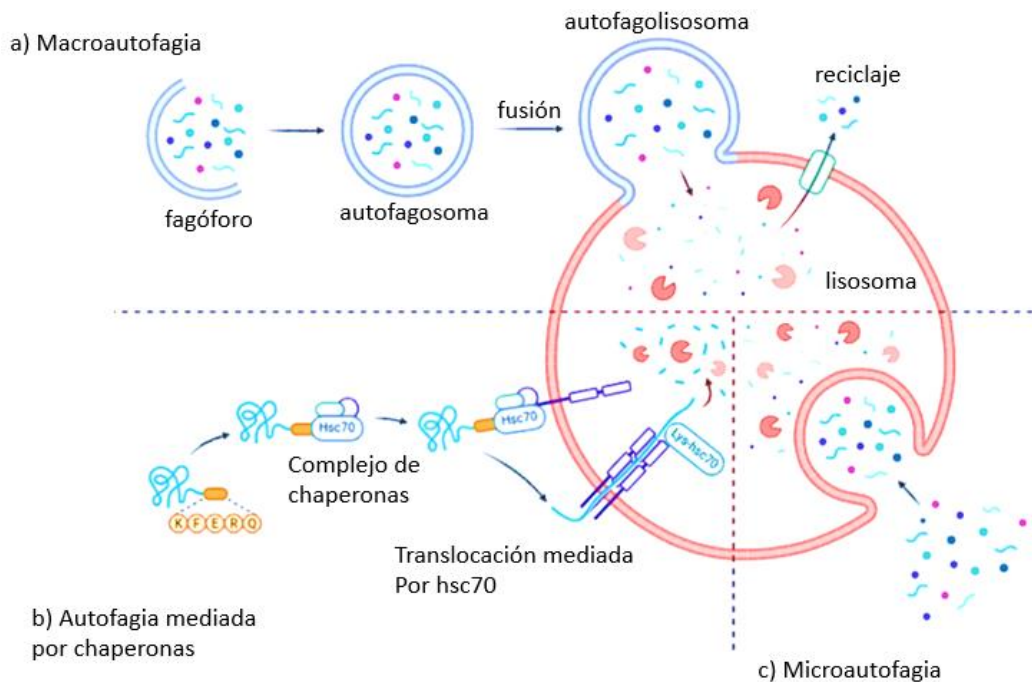


Figura.5. Principales tipos de autofagia. Esquema que resumen los tres tipos principales de autofagia. La macroautofagia es el proceso por el cual las vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas capturan proteínas blanco y organelos dañados, los cuales mediante la acción de lisosomas son degradados y posteriormente reciclados. La microautofagia también es capaz de liberar material al lisosoma mediante vesículas formadas por la invaginación de la membrana lisosómica. Con respecto a la autofagia mediada por chaperonas (CMA), este proceso no usa vesículas preformadas, sino que utiliza proteínas chaperonas para dirigir directamente proteínas específicas a la luz del lisosoma. Una de las diferencias más importantes es que la autofagia mediada por chaperonas está dirigida a proteínas muy específicas para su degradación, ya que solo aquellas con un motivo pentapéptido conservado en su secuencia de aminoácidos son eliminadas (Modificado de Frake et al., 2015).

La autofagia ha sido descrita como un proceso de degradación no específico debido a que algunos componentes celulares son capturados de manera aleatoria para generar nutrientes en condiciones de inanición celular. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado como un mecanismo altamente selectivo para la degradación de organelos y otras moléculas blanco (Seveau et al., 2018). Un tipo selectivo de autofagia muy descrito actualmente es la mitofagia; un proceso encargado de mantener la homeóstasis a través de la degradación de las mitocondrias dañadas.

MITOFAGIA: UN TIPO SELECTIVO DE AUTOFAGIA

La mitofagia comprende la eliminación específica de mitocondrias dañadas. Las mitocondrias son organelos de doble membrana presentes en células eucariontes, encargadas de generar y suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Las mitocondrias, además, son esenciales para regular diversos procesos, como la síntesis de ATP, metabolismo de lípidos a través de la oxidación de ácidos grasos, apoptosis, entre muchos otros fenómenos. La mitocondria tiene un tamaño aproximado entre 0.1 μ m y 0.5 μ m de diámetro y pueden alcanzar una longitud de hasta 7 μ m, dependiendo de la actividad de la célula. Las células poseen en promedio 2000 mitocondrias, pero las células que desarrollan mayor actividad metabólica, como las musculares, tienen un número mayor de mitocondrias en comparación con otras células con menor actividad (Suen et al., 2008).

La mitocondria posee un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales se caracterizan por tener una baja concentración de lípidos como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glicolípidos característicos de las membranas de las células eucariotas. (Grimm et al., 2007). Al igual que las membranas plasmáticas, las mitocondriales poseen una simetría en la distribución de los lípidos no sólo entre las membranas interna y externa, sino también entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica. De modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias en la función y en la integridad mitocondrial (Ding et al., 2012, Suen et al., 2008).

Se ha propuesto que la disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la alteración en la transición de la permeabilidad mitocondrial son responsables de la mitofagia debido principalmente a la despolarización que conlleva a un daño irreversible. La transición de la permeabilidad mitocondrial regula la apoptosis y la necrosis en células de mamíferos, y está mediada por el poro de transición de la permeabilidad (PT), que está compuesto por un canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa, el translocador de

nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna, y ciclofilina D (CypD) en el espacio de la matriz mitocondrial. Su reciclaje a través de la autofagia es un proceso muy importante para mantener la homeostasis dentro de la célula (Son et al., 2012, Zaffagnini, et al., 2016).

Se ha descrito que la inducción de mitofagia requiere de dos pasos principalmente: la inducción de la macroautofagia y la activación de la vía PINK1/PARKINA, la cual hasta el momento solo se ha relacionado con el daño mitocondrial. Desafortunadamente, se sabe poco acerca de estas dos proteínas primordiales para la mitofagia.

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) es una proteína cinasa que contiene una secuencia de orientación mitocondrial N-terminal (MTS), un segmento transmembrana (TM) y un dominio cinasa Ser / Thr. Se ha descrito que esta proteína puede funcionar como un sensor de daño mitocondrial (Ge et al., 2020).

Por otro lado, PARKINA es una proteína con función E3 ubiquitin ligasa, la cual consta de un dominio similar a la ubiquitina N-terminal (UBL), tres dominios RING: RING0, RING1 y RING2, y un dominio entre RING (IBR) que separa RING1 y RING2 (Eiyama et al., 2016). Sus funciones relacionadas al mantenimiento mitocondrial a través de ensayos de pérdida de función en *Drosophila melanogaster* (Jin-Youle, 2012).

INDUCCIÓN DE MITOFAGIA

Tras la despolarización mitocondrial, PINK1 se acumula en la membrana externa mitocondrial para posteriormente dimerizarse y activarse por autofosforilación. PINK1 tiene la capacidad de fosforilar tanto las moléculas de ubiquitina como a PARKINA en el residuo S65 de su dominio UBL. Estas modificaciones postraduccionales son indispensables para la activación de PARKINA. Hasta el momento solo se han descrito dos moléculas blanco de PARKINA, las mitofusinas 1 y 2 junto con proteínas VDAC.

El siguiente esquema explica de manera detallada la inducción de mitofagia mediado por PINK/PARKINA.

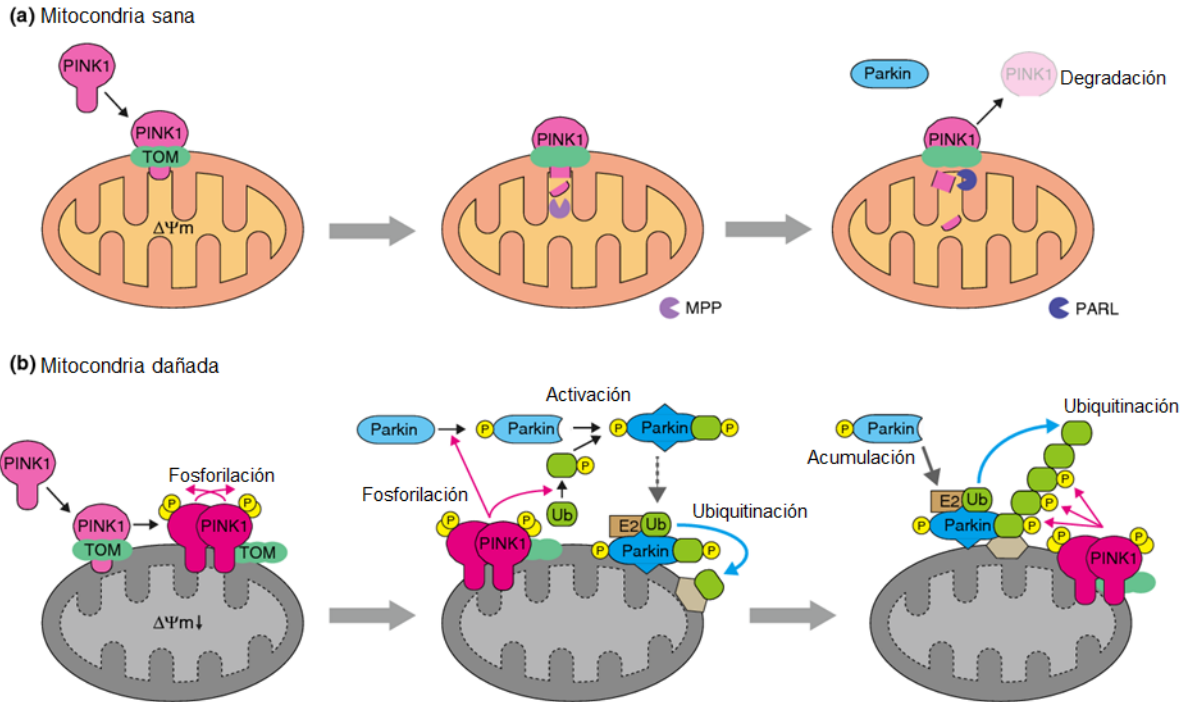


Figura 6. Modelo de mitofagia en mitocondrias íntegras y dañadas. (A) La cinasa PINK1 tiene la capacidad de translocarse a la membrana externa de la mitocondria a través del complejo proteico TOM (translocase of the outer membrane) exponiendo su dominio N- terminal de localización mitocondrial hacia la matriz, de una manera dependiente del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). Posteriormente su secuencia de localización mitocondrial se elimina a través de las proteasas MMP. Enseguida su dominio transmembranal se detiene en la membrana interna y es procesado por la proteasa PARL. Como resultado PARKINA se mantiene en un estado inactivo en el citosol. (B) La presencia de mitocondrias dañadas, ocasiona que PINK1 acumule en la membrana externa debido a la disminución del $\Delta\Psi_m$ interactuando con el complejo TOM. La acumulación de PINK1 permite su dimerización y autofosforilación. PARKINA y las moléculas de ubiquitinas son fosforiladas por PINK1 pasando a un estado completamente activo. PARKINA unida a moléculas de ubiquitinas puede asociarse de forma transitoria con mitocondrias e interactuar con sus proteínas sustratos (VDAC y mitofusinas). Los adaptadores autofágicos de unión a ubiquitina p62 o NDP52, reclutan autofagosomas a través de su dominio de unión a LC3, marcado de esta manera a las mitocondrias poliubiquitinadas para su degradación (Elyama et al., 2015).

Existen diversas evidencias acerca de la capacidad de DENV para alterar la morfología mitocondrial y disminuir el potencial de membrana, eventos que podrían desencadenar la inducción de mitofagia. Con respecto a esto, algunos estudios reportan el alargamiento mitocondrial inducido de manera particular por la proteína

NS4B de DENV. Se ha sugerido que los cambios morfológicos de la mitocondria alteran procesos relacionados con la inmunidad innata, los cuales perturban la señalización dependiente de RIG-1 y favorecen de esta manera la replicación viral (Chatel-Chaix et al., 2016). Otros efectos asociados con la infección por DENV es la escisión de las mitofusinas MFN1 y MFN2 (proteínas implicadas en la fusión mitocondrial) para alterar la respuesta antiviral innata y promover la muerte celular. Se demostró que MFN1 facilita la producción de IFN mediado por MAVS (Yu et al., 2015). Se ha reportado también la inducción de autofagia dependiente de la infección por DENV. Componentes del sistema inmune como el sensor de DNA mitocondrial cGAS es degradado a través de la autofagia, impidiendo el reconocimiento de DAMPs mitocondriales generados por las diversas alteraciones inducidas por el virus (Aguirre et al., 2017, Sun et al., 2017). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado por microscopia electrónica alteraciones morfológicas mitocondriales, así como cambios en los patrones de redes mitocondriales (Shrivastava et al., 2020). A pesar de toda esta evidencia, el fenómeno de mitofagia no está claramente descrito en el contexto de la infección por DENV.

Con respecto a otros flavivirus, como ZIKV, VHC se ha demostrado también la alteración mitocondrial a diferentes niveles por causa de la infección, así como la inducción de mitofagia (Veenman et al., 2008). Por otro lado, con respecto al reconocimiento viral y las vías de señalización desencadenadas por el virus, se sabe que cuando DENV ingresa a la célula blanco ocurren diversos mecanismos antivirales importantes. El primer evento celular a la llegada del virus es la detección del virus a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo TLRs, RIG-I-like receptors (RLRs) y receptores tipo NOD (NLRs), los cuales selectivamente se unen a moléculas de RNA provenientes del virus. Los TLRs y receptores de lectina tipo C (CLRs) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) extracelulares y endosomales, mientras que AIM2 (miembros de la familia IFI200 ausentes en melanoma 2), RLHs (helicasa tipo RIG-I) y los receptores tipo NOD (NLRs) son específicos para PAMPs intracelulares (Chen-Ichinohe, 2015, Latz et al., 2015). La vía de señalización que detonan los PRRs rio

abajo incluyen una serie de moléculas adaptadoras y proteínas como IFN de tipo I que establecen un estado antiviral para el control de la infección.

La presencia del genoma viral promueve la dimerización de TLRs, lo que a su vez induce el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88. El reclutamiento de MyD88 es seguido por el acoplamiento de la cinasa asociada a IL-1R y su proteína adaptadora, el factor 6 asociado a TNFR. La oligomerización de este factor puede activar el complejo cinasa I κ B (IKK), formado por dos subunidades catalíticas, IKK α y IKK β , y una subunidad reguladora, IKK. La activación del complejo IKK provoca la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I κ Bs, lo que resulta en la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B, y su translocación al núcleo, donde se une a sus secuencias consenso para activar la transcripción de genes como TNF α , IL-6, las formas inmaduras de IL-1 β , IL-18, así como NLRP3, una proteína de la familia de los receptores tipo NOD, implicada en la formación del inflamasoma (Kuo et al., 2006).

De manera particular, PRRs en los endosomas de las células infectadas se encargan de conducir a una de las respuestas antivirales mejor descritas. TLR3 y TLR7 detectan PAMPs virales y desencadenan señales que promueven la activación de NF- κ B que a su vez permite la expresión de genes inflamatorios como pro-IL-1 β y pro IL-18. Adicionalmente, el receptor RIG-1 es capaz de reconocer PAMPs virales a través de su dominio de helicasa, así como de interactuar con proteínas adaptadoras en la mitocondria, que culmina en la fosforilación y activación de los factores IRF3 e IRF7 (Shrivastava et al., 2016).

INFLAMASOMA

El inflamasoma es un complejo multiproteico que participa en la respuesta inmune innata, su activación está mediada por la invasión de agentes patógenos como agentes virales, fúngicos, protozoarios, agentes ambientales (aluminio presente en las vacunas como adyuvante, sílice, asbesto, cristales de colesterol, uratos, etc), y por componentes intracelulares de respuesta a daño, como especies reactivas de

oxígeno, cristales de ácido úrico, etc. (Chen-Ichinohe, 2015, Yuk-Jo, 2013). La activación del inflamasoma culmina en la maduración y secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 (Guo et al., 2015).

COMPONENTES DE INFLAMASOMA

De la familia de los inflamasomas, el que más se ha visto involucrado con infecciones virales es el NLRP3 (Shrivastava et al., 2016). Este complejo está formado por la proteína NLRP3, la cual es miembro de la familia NLR; esta molécula está formada por i) un dominio amino terminal efector y de unión (PYR), ii) un dominio central NOD, que es necesario para su oligomerización y unión a nucleótidos, iii), en el extremo carboxilo terminal se encuentra un dominio rico en leucinas que le permite detectar ligandos. Otras componentes que forman parte del complejo incluyen a la proteína adaptadora ASC y la procaspasa-1 (Jo et al., 2015, Abderrazak et al., 2015). El ensamble del complejo está mediado por la interacción entre los dominios PYR de NLRP3 y ASC, para reclutar a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD. La estructura del complejo se aprecia mejor en la figura 7. Una vez ensamblado el complejo multiproteico, ocurre el auto procesamiento de la procaspasa-1 para dar lugar a su forma activa, la cual se encarga de procesar a pro IL-1 β y pro IL-18 para su maduración. Las citocinas proinflamatorias secretadas participan en la activación de células del sistema inmune, y en la inducción de la infiltración de leucocitos como respuesta al daño generado (Thirumala-Kanneganti, 2010).

ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA

La activación del inflamasoma requiere de dos señales, una señal de pre-estimulación o *priming*, en donde, a través de tipo TLRs, NLRs, RLRs se desencadena la activación de factores de transcripción como NF-kB, que induce la transcripción de NLRP3, pro-IL-18 y pro-IL-1 β . La segunda señal de activación permite el ensamble del complejo multiproteico. Esta señal es generada por el daño

ocasionado por los diversos agentes patógenos o bien por moléculas de estrés celular.

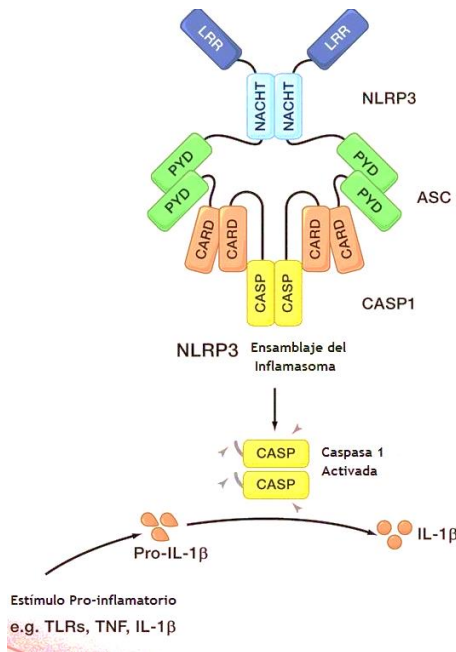


Figura 7. Estructura del inflamasoma NLRP3.

Componentes del inflamasoma: NLRP3, miembro de la familia NLR, presenta tres dominios, en el extremo amino posee un dominio efector y de unión (PYD), además, posee un dominio de oligomerización y de unión a nucleótidos (NATCH). En el extremo carboxilo terminal tiene un dominio rico en leucinas que le permite detectar ligandos (LRR). Los otros miembros del complejo incluyen a la proteína ASC (proteína de asociación a apoptosis) y la procaspasa-1. El ensamblaje del complejo está mediado por la interacción entre los dominios PYD de NLRP3 y ASC, para reclutar a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD (Modificado de Jaramillo et al., 2016).

Se han descrito 4 señales importantes para la activación del inflamasoma. La primera señal involucra, a) Las concentración altas de ATP extracelular que induce la salida de iones potasio a través de canales iónicos P2X7, lo cual permite que más PAMPs entren a la célula a través del receptor purinérgico pannexina-1. b) Debido a que PAMPs pueden ingresar a algunas células por fagocitosis, la ruptura de lisosomas y la subsecuente liberación de sus componentes especialmente catepsina B pueden participar en la activación del inflamasoma. c) PAMPs y DAMPs son capaces de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) derivadas del complejo I y III mitocondrial, las cuales estimulan la activación del complejo multiproteico que forman el inflamasoma. d) La entrada de calcio desde el espacio extracelular y su salida desde reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico permiten la activación del inflamasoma. Además, recientemente se

ha demostrado que diversas moléculas conocidas como vioporinas, presentes en diversos virus como DENV, influenza, VHC, etc, son capaces de inducir la movilización de iones almacenados en componentes intracelulares hacia el citosol para activar inflammasoma (Latz, et al., 2013, Lupfer-Kanneganti, 2014, León Juárez et al., 2016, Shrivastava et al., 2020).

ACTIVACIÓN DEL INFLAMMASOMA EN LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

Es ampliamente descrito que la infección por agentes patógenos es capaz de activar procesos relacionados con la respuesta inmune como medida para eliminar el agente invasor. Ha sido reportado que diversas infecciones virales ocasionadas por diferentes flavivirus son capaces de activar mecanismos como el inflammasoma.

Se ha demostrado *in vitro*, que la infección por DENV es capaz de inducir la activación del inflammasoma en diversas estirpes celulares como macrófagos y plaquetas (Wu et al, 2012; Hottz et al, 2013). Por otro lado, experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que DENV-2 es capaz de inducir la activación del inflammasoma en una línea celular endotelial microvasculatura humana (HMEC-1). Este modelo de células endoteliales infectadas con DENV-2 mostraron una expresión elevada de NLRP3 a las 36 y 48 horas post-infección en comparación con células sin infectar y aquellas células tratadas con el virus inactivo. Nuestro grupo también evaluó la activación del inflammasoma a través de la cuantificación de caspasa-1 e IL-1 β , mostrando una mayor concentración a las 24 horas y 36 horas post-infección (Shrivastava et al, 2020).

Diversos elementos celulares han sido reportados en la activación del inflammasoma. La infección por DENV y otros flavivirus es algo que se ha descrito ampliamente, aunque algunos mecanismos moleculares aún están poco estudiados. Uno de estos procesos es el metabolismo de lípidos en la activación del inflammasoma NLRP3. Se ha reportado que varias clases de lípidos son capaces de generar las señales de “*priming*” para activar el inflammasoma, como LDL oxidada y varios fosfolípidos oxidados. Diversos trabajos han identificado al estrés celular inducido en múltiples organelos, especialmente mitocondrias, lisosomas y retículo endoplásmico (RE),

como un detonante importante de la activación de NLRP3 en macrófagos humanos (Zhou et al., 2020, Liang et al., 2021).

Lípidos como ácidos grasos saturados inducen estrés en el RE, activando una de las vías de estrés mejor descritas con DENV, la vía UPR (Datan et al., 2016). Una alteración en los niveles de lípidos activa la vía UPR. Un aumento en la relación de fosfatidilcolina con fosfatidiletanolamina en el RE provoca una disminución en el transporte de Ca^{++} , aumentando los niveles libres en citoplasma, desencadenando la activación del inflamasoma. Aunado a esto, muchos trabajos reportan que se requieren de SREBP2 y SCAP proteínas que están involucrados en el tráfico de colesterol para una activación óptima del inflamasoma NLRP3 (De la Roche et al., 2018, Zhou et al., 2020).

Las proteínas SREBP son proteínas que actúan como reguladores transcripcionales del metabolismo de lípidos en la célula. Los mamíferos expresan tres isoformas de SREBP diferentes: SREBP-1a y SREBP-1c están codificadas por el gen *Srebf-1*. (Lee et al., 2018). Los genes blanco varían entre las isoformas, SREBP-1a activa todos los genes blanco de SREBP, mientras que SREBP-2 y SREBP-1c activan genes implicados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos, respectivamente. Estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos localizados en el retículo endoplásmico (RE) unidos a la proteína activadora de escisión de SREBP (SCAP). SCAP se encuentra localizada junto a las SREBP a través de vesículas COPII (vesículas del complejo de proteína de cubierta II) al aparato de Golgi. Posteriormente mediante escisión proteolítica mediada por la proteasa del Sitio-1 (S1P) y la proteasa del Sitio-2 (S2P) se liberan el extremo N de la proteína SREBP y permiten su entrada en el núcleo para activar los genes asociados al metabolismo de lípidos (Shao et al., 2014, Guo et al., 2018) Figura 8.

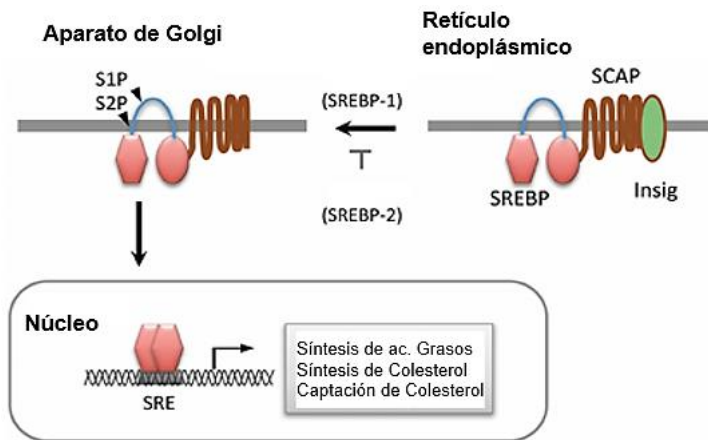


Figura 8. Activación de SREBP. De manera general, cuando se agotan los esteroides en la célula, la proteína activadora de escisión de SREBP (SCAP) "escorta" a las proteínas SREBP desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi, donde las SREBP se someten a una escisión proteolítica a través de S1P y S2P. Como resultado, el dominio del factor de transcripción N-terminal de las SREBP se transloca al núcleo y actúa sobre el elemento regulador de esteroides (SRE) que activa genes blanco como LDLR y 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) sintasa implicada en el metabolismo del colesterol, así como la sintasa de ácidos grasos (FAS) y acetil CoA carboxilasa implicadas en las vías lipogénicas (modificado de Xu et al., 2013).

AUTOFAGIA E INFLAMASOMA

La autofagia y el inflamasoma son dos fenómenos que la célula emplea para mantener la homeóstasis, tanto por la eliminación de agentes extraños y componentes celulares, así como por la regulación de la respuesta inflamatoria ante diversos estímulos como la invasión de agentes patógenos.

Recientemente, diversa evidencia ha descrito que la autofagia podría tener un papel regulador sobre la actividad del inflamasoma (Saitoh-Akira 2016). En los últimos años se han realizado diversos estudios y análisis de diferentes tipos para intentar comprender la asociación de estos dos fenómenos.

Probablemente los primeros análisis que permitieron establecer esta relación fueron estudios de asociación a escala genómica. Con este tipo de análisis se sugirió que un defecto en la autofagia causada por mutaciones en el gen Atg16L (responsable de la conversión de LC3-II), podría alterar la actividad normal del inflamasoma, promoviendo un aumento de citocinas proinflamatorias, evento que podría favorecer

el daño tisular en algunas enfermedades de origen inflamatorio (Hampe et al, 2007). Los antecedentes han permitido sugerir un efecto importante de la autofagia sobre la actividad del inflamasoma, además se ha reportado que la inhibición de la autofagia provoca un incremento de actividad inflamatoria, principalmente por el aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β . Recientemente algunos grupos de trabajo han corroborado este hecho (Harris et al., 2010). Se ha sugerido que la autofagia es capaz de controlar la activación del inflamasoma, a través de la degradación de las formas inmaduras de IL-1 β , comprobando que la inhibición de la autofagia promueve el procesamiento de esta citocina (Shi et al., 2012).

El siguiente esquema muestra un posible papel regulador por parte de la autofagia sobre el inflamasoma. En este modelo se ha descrito que partículas ambientales como uratos, cristales de colesterol, así como agentes patógenos, son capaces de generar daño a nivel mitocondrial, provocando una excesiva generación de ROS, y a su vez actuar como una señal de activación del inflamasoma.

Por otra parte, se demostró que la proteína PARKINA, induce la ubiquitinación de un conjunto de proteínas expresadas en mitocondrias dañadas, las cuales son detectadas por proteínas adaptadoras como p62 o NDP52, que poseen un dominio de unión a LC3, promoviendo de esta manera el reclutamiento de la maquinaria autofágica y favoreciendo de esta manera la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas. Por lo tanto, la degradación de las mitocondrias (una fuente importante de ROS) por parte de la autofagia ha sido sugerida como una manera indirecta de suprimir la activación del inflamasoma (Saitoh-Akira, 2016).

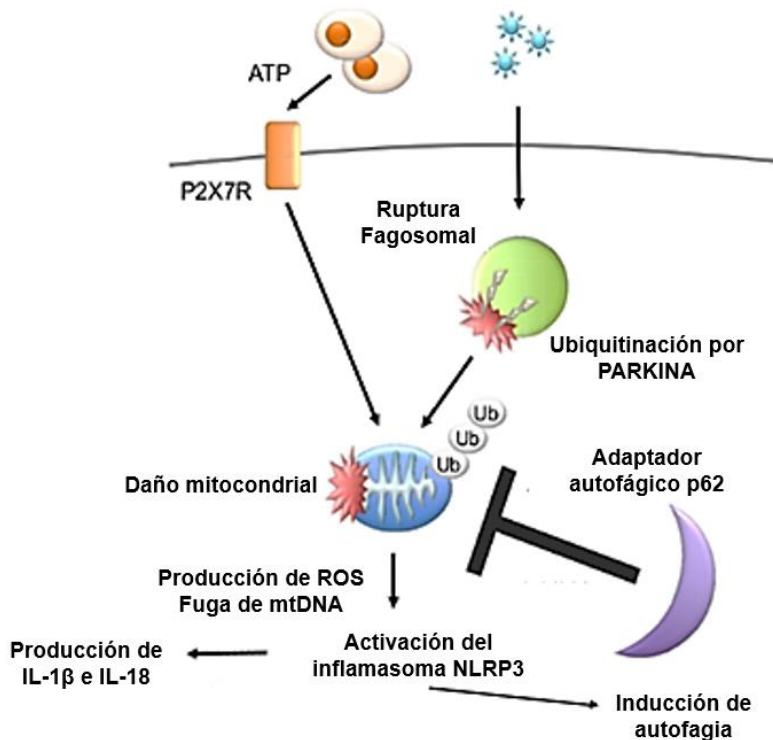


Figura 9. La autofagia suprime la activación del inflammasoma NLRP3. Diversas moléculas y agentes patógenos son capaces de inducir ruptura del fagosoma, provocando daño mitocondrial. La liberación de ATP proveniente de células dañadas estimula el canal iónico P2X7R y causa daño mitocondrial, provocando la liberación de EROS y DNA mitocondrial, causando activación del inflammasoma. PARKINA, una E3 ubiquitin ligasa induce ubiquitinación de proteínas expresadas en mitocondrias dañadas. La autofagia de manera selectiva elimina mitocondrias dañadas después de reconocer proteínas ubiquitinadas por el adaptador p62. La autofagia suprime la activación del inflammasoma a través de la eliminación de mitocondrias dañadas, lo cual previene exceso en la producción de EROS y mtDNA (Saitoh-Akira, 2016).

MITOFAGIA E INFLAMASOMA

La infección por DENV y otros flavivirus inducen cambios drásticos en diferentes organelos celulares, entre ellos la mitocondria. Un organelo esencial en la homeostasis celular. Compuesto de un sistema de doble membrana, la mitocondria ha mostrado tener importantes funciones en la regulación de la respuesta inmune innata, particularmente en la repuesta antiviral, como una plataforma de varias vías de señalización (Liu et al., 2018, Zhong et al., 2016).

La infección viral induce de igual manera diferentes fenómenos celulares, muchos de ellos relacionados estrechamente. La inducción de la mitofagia requiere previamente de un daño severo a las mitocondrias, ocasionado regularmente por proteínas virales (Gou et al., 2017, Jassey et al., 2019).

Se ha reportado que algunas viroporinas son capaces de alterar la dinámica estructural mitocondrial y de otros organelos a través de la formación de poros, provocando una desestabilización en la permeabilidad de estos organelos (Jalily et al., 2016). Nuestro grupo de trabajo recientemente reportó que las viroporinas NS2A y NS2B mostraban localización citoplasmática con una fuerte colocalización en organelos como retículo endoplásmico y mitocondrias. Además, se demostró que estas proteínas virales promueven una intensa salida de iones Ca^{++} así como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Shrivastava et al., 2020).

Se ha sugerido fuertemente que el daño mitocondrial (despolarización de la membrana externa) es capaz de inducir la mitofagia. Las diversas alteraciones mitocondriales pueden repercutir en diversos fenómenos, entre ellos la fuga y generación de EROS, moléculas primordiales y bien caracterizadas en la activación del inflammasoma. La mitofagia y el inflammasoma son un ejemplo claro de esta fenómeno por los antecedentes ya descritos por nuestro grupo y otros trabajos.

El objeto de estudio de este trabajo es analizar una serie de eventos secuenciales como el daño mitocondrial ocasionado por la infección con DENV-2 y su capacidad para inducir mitofagia en un modelo de células endoteliales, así como evaluar la capacidad de las viroporinas (NS2A y NS2B) para promover la mitofagia y eventualmente promover la activación del inflammasoma por las EROS.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Inducción de autofagia en células HMEC-1 infectadas con DENV-2

El fenómeno de mitofagia es un evento celular que es considerado un tipo específico de autofagia, el cual emplea la maquinaria autofágica para la eliminación selectiva de las mitocondrias. Un antecedente importante para este trabajo fue mostrar de manera inicial la inducción de autofagia en un modelo de células endoteliales infectadas con DENV-2.

Procesamiento de la molécula LC3- II en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2.

En primera instancia se evaluó la expresión de proteínas ATG relacionadas con la autofagia, como LC3 y Beclina. El análisis consistió en evaluar estas moléculas utilizando lisados totales de células HMEC-1, infectadas previamente con 5 MOIs de DENV-2 a diferentes tiempos y analizadas a través de un ensayo de WB. La figura 10 muestra la expresión de la proteína no estructural NS5, utilizado como control de infección, así como las formas de LC3-I y LC3-II. En la figura 10A se puede apreciar el incremento de NS5 en las etapas tardías de la infección (24 y 36 hpi). Con respecto a LC3, observamos dos fenómenos interesantes, primero, que la forma LC3-I (18 kDa) muestra un incremento en los primeros tiempos de infección (3, 6, 12 hpi) y una disminución en los tiempos siguientes (24 y 36 hpi), lo cual podría sugerir que el virus es capaz de regular la expresión de esta proteína en etapas tempranas de la infección, debido a que esta proteína solamente necesita procesarse y relocalizarse a los autofagosomas para llevar a cabo su función, por lo que el incremento de la forma basal (18 kDa) por la presencia de DENV-2 podría sugerirnos tal regulación. Sería importante evaluar el ARNm de LC3, así como analizar los factores de transcripción involucrados en la regulación de esta proteína.

Por otro lado, la forma LC3-II (16 kDa) muestra un comportamiento similar a la forma LC3-I, observándose un procesamiento de LC3 desde los primeros tiempos de

infección (3, 6 y 12 hpi) y sugiriendo también la inducción de autofagia. Los tiempos tardíos de la infección (24 y 36 hpi) muestran una disminución de LC3-II, lo cual podría explicarse como una disminución de autofagosomas por su degradación o por demanda menor en la inducción de autofagia.

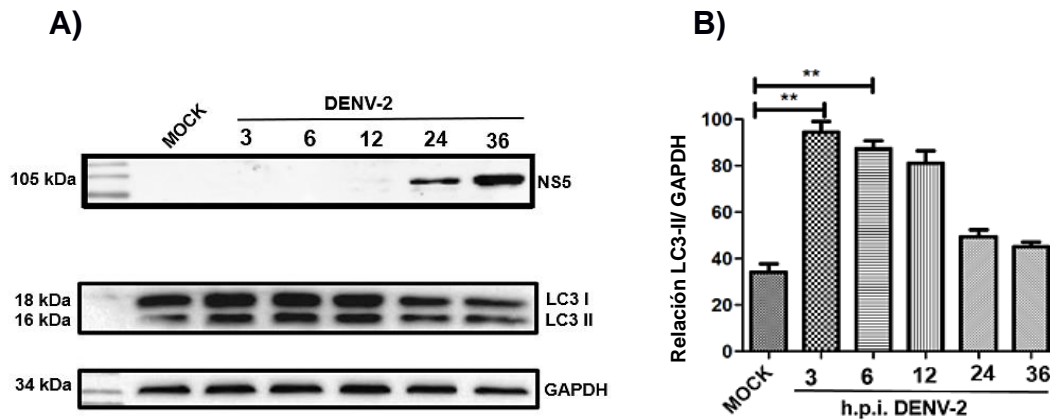


Figura 10. Expresión de LC3 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2. A) Células HMEC-1 fueron infectadas con 5 MOIs de DENV-2 a diferentes tiempos, se analizaron las proteínas NS5 (control de infección), LC3 y GAPDH (control de carga). B) Análisis densitométrico correspondiente a LC3-II durante la cinética de infección. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Expresión de beclina-1 en células HMEC-1 infectadas con DENV-2

La proteína Beclina participa en los primeros eventos de la inducción de autofagia, es esencial para la formación del fagóforo, y es la primera estructura necesaria para la formación del autofagosoma. Para este análisis se llevó a cabo la misma metodología de infección descrita en la sección anterior. La figura 11A muestra la presencia de NS5 en lisados totales de células HMEC-1 infectadas, la cual se ve incrementada en los tiempos tardíos de la infección al analizar a la proteína Beclina, pudimos observar un compartimiento similar al que mostró LC3-II, es decir, mayor expresión en los primeros tiempos de infección y una disminución en las etapas tardías. Estos resultados corroboran mayor inducción de autofagia en las etapas tempranas de la infección, y una disminución en las etapas tardías, sin embargo, es evidente la presencia de Beclina a lo largo de la cinética de infección.

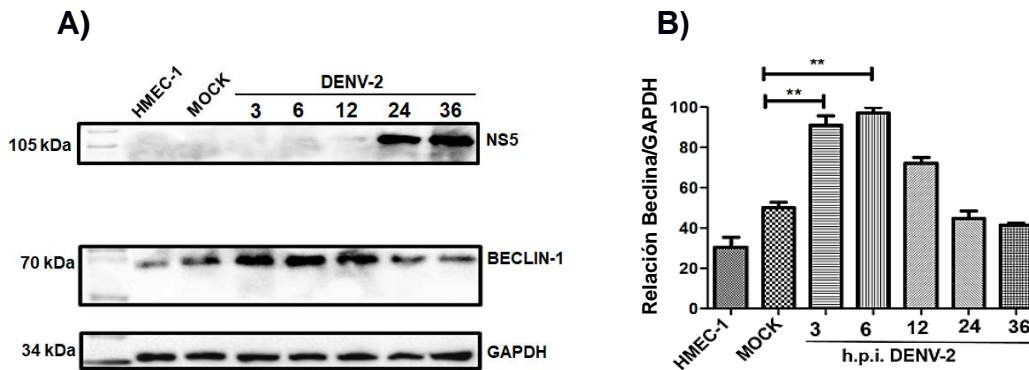


Figura 11. Expresión de Beclina-1 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2. A) Células HMEC-1 fueron infectadas con 5 MOIs de DENV-2 a diferentes tiempos, se analizaron las proteínas NS5 (control de infección), Beclina y GAPDH (control de carga). B) Análisis densitométrico correspondiente a Beclina durante la cinética de infección. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Análisis de la conexión entre la autofagia y el inflammasoma

Existen varios trabajos sobre un posible crosstalk entre la autofagia e inflammasoma, básicamente por el control de inflamación excesiva que la célula puede regular. Con respecto a eso, diversos trabajos han debatido a cerca del efecto que tiene la autofagia sobre otros procesos celulares, mostrando alguna evidencia sobre degradar algunas moléculas del inflammasoma. Sin embargo, no hay mucha información sobre el papel del inflammasoma sobre la autofagia. Se ha señalado que las vías de señalización del inflammasoma pueden regular la autofagia para establecer un equilibrio entre la respuesta inflamatoria contra patógenos inducida por el inflammasoma y la prevención de esta inflamación excesiva, que puede llegar a ser perjudicial.

Decidimos evaluar este efecto, para ello se utilizó el fármaco glibenclamida, el cual suprime la salida de K^+ a través del canal KATP para bloquear la activación de complejo NLRP3. La figura 10 muestra dos análisis por WB de la proteína Beclina, la cual es una de las moléculas clave en la activación de la autofagia. La expresión de Beclina en presencia y ausencia del inhibidor glibenclamida en células infectadas, así como el control de infección evidenciado por la presencia de la proteína no estructural NS5. La figura 10A corresponde a la expresión de esta

proteína en condiciones normales de infección con DENV-2, mostrando niveles más elevados en los primeros tiempos de infección y una disminución a las 24 y 36 hpi. La figura 10C muestra los niveles de Beclina en presencia del inhibidor, donde no pudimos observar cambios significativos de esta proteína con respecto a la cinética previa sin el inhibidor, lo que nos hizo sugerir que la inhibición del inflamasoma no afecta directamente al fenómeno de autofagia. Finalmente, las figuras 10B y D pertenecen a los análisis densitométricos correspondientes de los WB previamente descritos.

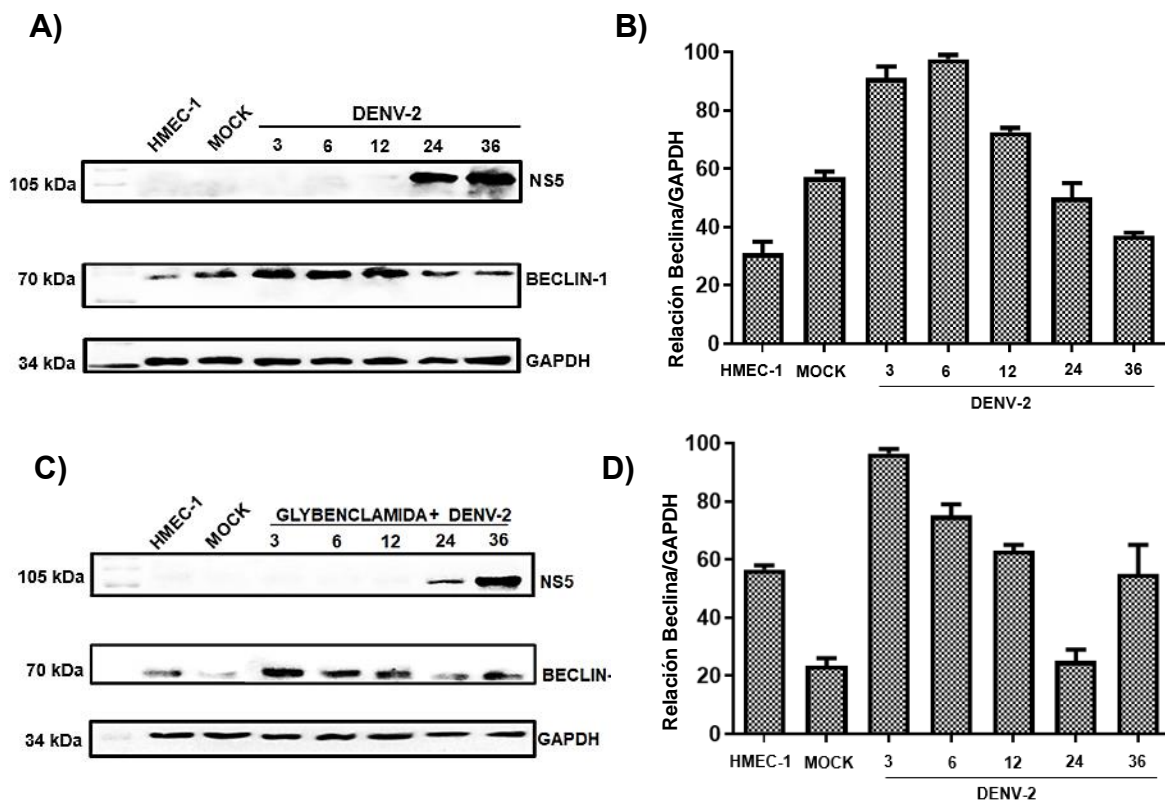
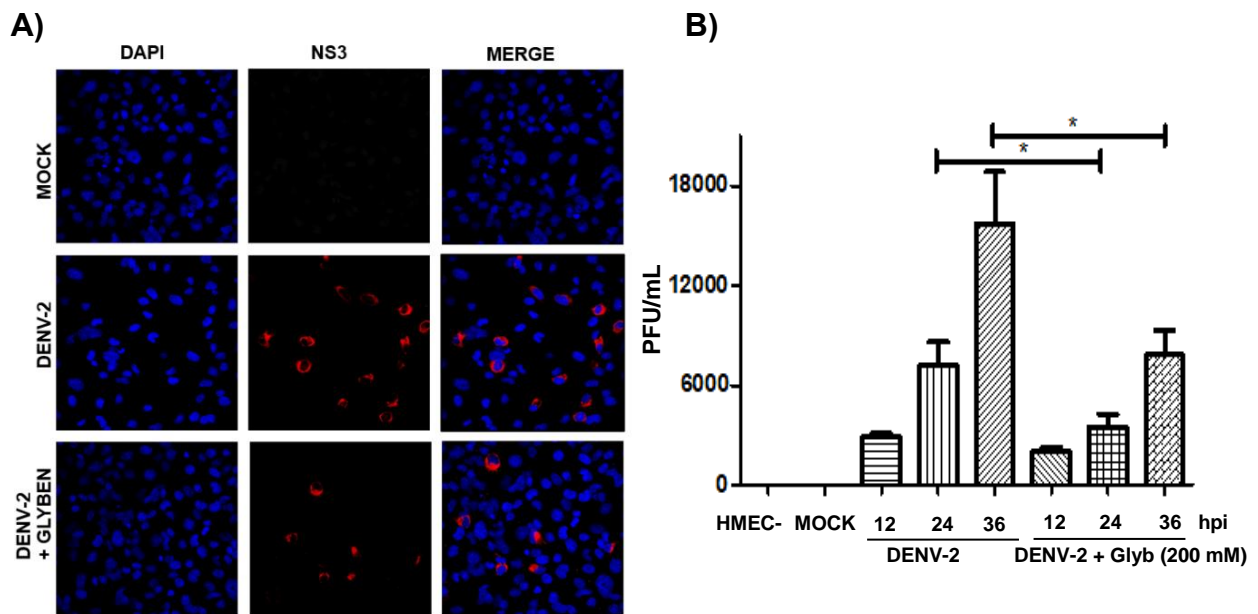


Figura 12. Expresión de Beclina en presencia del inhibidor glibenclamide en células HMEC-1 infectadas con DENV-2. A) Expresión de Beclina y NS5 en células HMEC-1 infectadas con DENV-2 a diferentes tiempos de infección. B) Expresión de Beclina y NS5 en células HMEC-1 infectadas con DENV-2 y en presencia de 200 mM de glibenclamide. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

De manera simultánea se analizó el efecto de la inhibición del inflamasoma sobre la replicación viral, a través de la detección de la proteína NS5 por western blot y por inmunofluorescencia. Pudimos encontrar de manera interesante una disminución de

la replicación viral. La figura 11A muestra un análisis por IF donde se evalúa la expresión de NS3 en presencia y ausencia del inhibidor. Se puede apreciar en el panel central en color rojo la señal correspondiente a NS3 en células infectadas con DENV-2. En el panel inferior cuando las células son tratadas con glibenclamida se observa una disminución de la señal de NS3. Adicionalmente, se analizó por WB el nivel de expresión de NS5 en las mismas condiciones previas al tratamiento con inhibidor del inflammasoma. La figura 11C muestra de manera simultánea el nivel de expresión de NS5 en las condiciones ya mencionadas, observándose en el panel izquierdo un enriquecimiento de la proteína dependiente de las horas de infección, en contraste en el panel derecho se observa el nivel de expresión de NS5 en presencia de glibenclamida, mostrando una clara disminución al compararse con la cinética de infección en ausencia del inhibidor. El análisis densitométrico correspondiente del WB se presenta en la figura 11D. Este efecto es el mismo en la IF al igual que el mostrado en la titulación viral de los sobrenadantes obtenidos de las cinéticas, presentado en la figura 11B. Estos resultados muestran que la inhibición del inflammasoma impacta sobre la replicación de DENV-2.



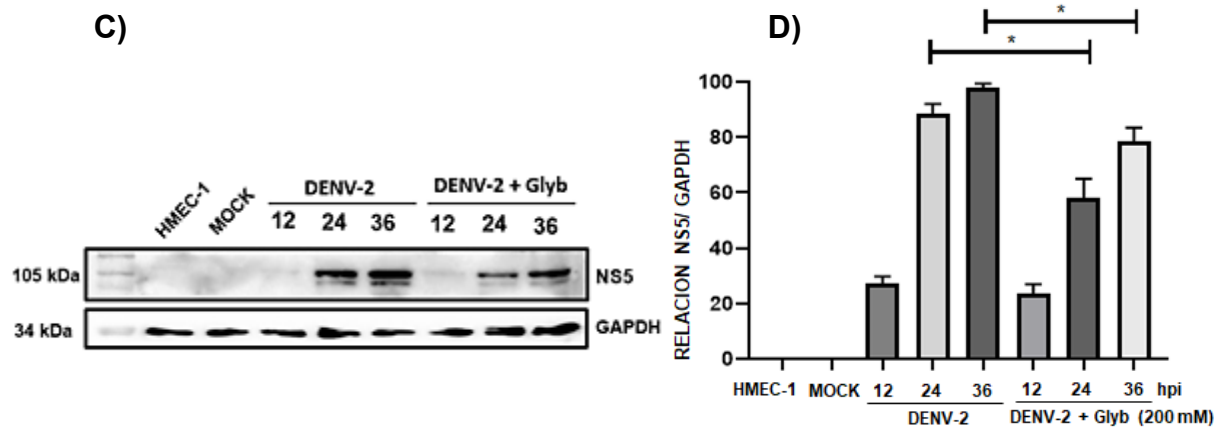


Figura 13. Análisis de la replicación viral de DENV-2 en presencia y ausencia del inhibidor glibenclamida. A) IF de la proteína NS3 en células HMEC-1 infectadas con DENV-2 a 36 hpi en presencia y ausencia del inhibidor glibenclamida (200 mM). Los núcleos fueron evidenciados utilizando el colorante DAPI. B) Titulación viral de sobrenadantes de células HMEC-1 infectadas a diferentes tiempos. C) Análisis por WB de NS5 de células infectadas con DENV-2 en ausencia y presencia de glibenclamida (200 mM). D) Análisis densitométrico de NS5 correspondiente al análisis por WB previo. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

JUSTIFICACIÓN

El virus dengue activa diferentes procesos celulares en la célula infectada, entre ellos la inducción de autofagia y la activación de inflamasoma. Así mismo, induce importantes alteraciones mitocondriales, lo cual podría sugerir la inducción de mitofagia, como ha sido reportado en otros flavivirus.

Aunado a esto, la disminución del potencial de membrana mitocondrial, así como alteraciones sobre la integridad de la membrana mitocondrial son señales de daño importantes que se han relacionado con la activación de mitofagia e inflamasoma respectivamente. En adición a lo anterior, nuestro grupo de trabajo ha caracterizada y demostrado la participación de las vioporinas NS2A y NS2B en la alteración de la membrana mitocondrial, así como la capacidad de estas proteínas virales para provocar la salida de especies reactivas de oxígeno, las cuales activan el inflamasoma NLRP3.

Por todo esto, consideramos importante analizar el mecanismo por el cual DENV induce la activación de la mitofagia y si este fenómeno a su vez está relacionado con la activación de inflamasoma.

HIPOTESIS

EL DENV induce la activación de mitofagia ocasionada por daño mitocondrial a diferentes niveles, evento que es capaz de regular la activación del inflamasoma a través de las proteínas virales NS2A y NS2B (like-vioporinas).

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el fenómeno de mitofagia en células HMEC-1 infectadas con DENV-2 y evaluar si su inducción está relacionada con la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la presencia de las proteínas virales NS2A y NS2B (like-viroporinas).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la activación de SREBP1 en células HMEC-1 infectadas con DENV.2 y analizar su relación con la inducción de mitofagia.
2. Caracterizar la inducción de mitofagia en células endoteliales (HMEC-1) infectadas con DENV-2.
 - 2.1. Caracterizar los cambios en la expresión de proteínas totales relacionadas con mitofagia de células HMEC-1 durante el curso de una cinética de infección con DENV-2.
 - 2.2. Evaluar la localización celular de proteínas de mitofagia en células HMEC-1, infectadas con DENV-2.
3. Evaluar los cambios en la expresión de proteínas de mitofagia en fracciones mitocondriales provenientes de células endoteliales infectadas con DENV-2.
4. Analizar los cambios morfológicos mitocondriales en células endoteliales infectadas con DENV-2.
5. Evaluar la participación de las viroporinas DENV en la inducción de mitofagia y su efecto sobre el inflammasoma en las células endoteliales HMEC-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación del virus.

Se prepararon abastos virales del serotipo 2 del virus dengue. El virus se propagó en la línea celular C6/36 proveniente de la larva de *Aedes albopictus*. Las células se crecieron a 36°C en ausencia de CO₂. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10%, vitaminas, antibiótico, aminoácidos, L-glutamina y piruvato 100 unidades/ml de cada uno y 10 unidades/ml de tylosina. Una vez evidenciado el efecto citopático mediante la formación de sincicios en un 70% de la monocapa, se recuperaron solamente los sobrenadantes y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C para eliminar los detritos celulares. Posteriormente el sobrenadante fue recuperado en tubos Falcon de 50 mL y se concentraron aproximadamente 10 veces con una columna de 100 kDa de cutoff Amicon Ultra 15 (UFC910024) Merck Millipore, posteriormente, se filtraron con membrana de 0.22 µm. Se adicionó 1/10 del volumen de SPG y finalmente se alicuotaron e inmediatamente se colocaron en hielo seco. Las alícuotas se almacenaron a -70°.

Método de titulación del virus dengue por ensayo en placa.

La titulación del DENV-2 se llevó a cabo en células Vero. Estas células fueron crecidas en medio RMPI suplementado con SFB al 10%, antibiótico, vitaminas, aminoácidos, L-glutamina y piruvato, 100 unidades/ml de cada uno a 37°C en un ambiente al 5% de CO₂. El proceso de titulación comienza con una dilución seriada (de 10⁻¹ a 10⁻⁶). Para esto se utilizan tubos eppendorf estériles a los cuales se les adiciona 225µL de medio Hanks (GIBCO) manteniendo los tubos en hielo. Enseguida se descongela el virus de -70°C a 4°C y se toma un inóculo de 25µL que es transferido al primer tubo de la dilución seriada y se mezcla con ayuda de un vortex. Posteriormente, con una punta nueva se añadieron 25 µl de esta dilución al siguiente tubo y así sucesivamente hasta completar 6 diluciones. El ensayo se realizó por triplicado. Previamente se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos, donde cada pozo fue inoculado con 100 µl de las diferentes diluciones del virus; como controles se utilizaron células no infectadas y células a las que se les adicionó el virus sin diluir. Se incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera de

humedad al 5% de CO₂ y enseguida se añadieron 500 µl/pozo de medio Overlay (medio MEM 2X (GIBCO) suplementado con L-glutamina a 2 nM, suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de antibiótico, carboximetilcelulosa (CMC de SIGMA) al 3% estéril. Finalmente, las células en presencia del virus a las diferentes diluciones fueron incubadas a 37°C durante 5 días.

Transcurrido el tiempo de la incubación se decantó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X hasta eliminar el medio overlay. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de metanol al 80% y se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas una vez más con PBS 1X y como método de bloqueo, se adicionó 1 ml de PBS-Leche (SIN Tween) al 5% y se dejó incubando 20 min a temperatura ambiente sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se decantó la solución bloqueadora y las células se lavaron con PBS 1X. Se adicionaron 200 µl de anticuerpo primario (anti-E 4G2 1:2000) diluido en PBS-Leche (SIN Tween) al 5% y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Después se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS-leche y adicionaron 200 µl por pozo de anticuerpo secundario y se incubó 1 hora en agitación a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se decantó la placa y dejó secando 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 180 µl de True Blue por pozo y se incubaron 10 min a TA sin agitación y se procedió a contar las placas. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$(\text{Log}) (\text{Promedio de placas} \times 10^{x+1})$$

SDS-PAGE y ensayo de western-blot.

Las células HMEC-1 con una confluencia del 80% se infectaron con DENV-2 a una MOI de 5. Se realizaron cinéticas de infección de 3, 6, 12, y 24 horas. Como controles se utilizaron células HMEC-1 sin infectar y HMEC-1 tratadas con virus inactivado por calor (mock). Después las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE al 12 o 15% dependiendo del peso molecular de

las proteínas analizadas durante 80 min a 100 V (Mini-Protean Cell; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se utilizaron 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína por cada condición. La transferencia a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) se llevó a cabo a 120 V durante 2 horas aproximadamente). Las membranas se bloquearon con PBS-Tween- leche al 5% durante una hora y después se lavaron cuatro veces con PBS- Tween. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante una toda la noche a 4°C. transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron de nuevo con PSX 1X y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (Invitrogen) durante una hora. Después de otra ronda de 4 lavados con PBS-Tween, las membranas se revelaron en presencia del reactivo de revelado (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a través del equipo ChemiDoc (BIO-RAD).

Ensayos de inmunofluorescencia.

Se sembraron 1×10^4 células HMEC-1 por pozo en placas de 24 pozos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO₂ y posteriormente se infectaron a una multiplicidad de 5 con virus purificado. Como controles se utilizaron células HMEC-1 sin infectar o HMEC-1 tratadas con virus inactivado por calor. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se permeabilizaron con PBS 1X+Tritón al 0.1% + gelatina al 0.02% durante 30 minutos. Las monocapas se bloquearon con solución PBS 1x + Tritón 0.1% + suero de cabra (10%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces con PBS 1X-Tritón 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando 3 μl Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP8).

Fraccionamiento celular mitocondrial.

Para este análisis se plaquearon 4×10^6 millones de células HMEC-1 por condición

y se incubaron durante toda la noche, posteriormente se infectaron a 10 MOIs por 24 hpi. El fraccionamiento mitocondrial se realizó a través del kit Thermo Scientific™ Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells. El primer paso consistió en tripsinizar las células para obtener el pellete de células, transfiriéndolo a tubos eppendorf para continuar con el procedimiento. Se agregaron 800µL de reactivo A a cada uno de los tubos de trabajo, enseguida se incubaron durante 2 minutos en hielo sin agitación. El paso dos consistió en añadir 10 µL de reactivo B y se incubó la mezcla durante 5 minutos en hielo, agitando l cada minuto. Posteriormente, se añadieron 800 µL de reactivo C y se centrifugó a 700× g durante 10 minutos a 4° C y se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 12.000× g durante 15 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado (mitocondrias) con 500 µl de Reactivo C. Finalmente se centrifugó a 12.000 × g durante 5 minutos a 4 ° C y se agregó el inhibidor de proteasas para su cuantificación y eventual análisis por WB.

Microscopia Electrónica.

Las células HMEC-1 se cultivaron aproximadamente 800 mil células durante la noche en placa de 6 pozos (Corning, Nueva York, EE. UU). Luego, las células se infectaron con DENV-2 a 5 MOI a diferentes tiempos. Posteriormente, las muestras se lavaron y se fijaron con 2 mL de una solución de 0.1 M Cacodilato de sodio, 4% formaldehído, 0.05% Glutaraldehído, 0.2% ácido pícrico durante 2 horas en ausencia de luz posteriormente de 24 a 48 horas a 4°C. Una vez pasado el proceso de fijación se quitó la solución fijadora y se agregaron 2 mL de 0.1 M Cacodilato de Sodio por pozo. Las muestras se deshidrataron a través de un gradiente de etanol y óxido de propileno, y luego se embebieron en resinas epoxi Polybed y se polimerizaron a 60 ° C durante 24 h. Finalmente, se tiñeron secciones delgadas de 70 nm con acetato de uranilo y citrato y luego se analizaron las preparaciones usando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Transfección de gfp-ns2a y gfp-ns2b e inmunofluorescencia.

Se sembraron 1×10^5 células/mL células HMEC-1 en cubreobjetos de vidrio. Después de 24 h, se retiró el medio de cultivo y las monocapas se lavaron con

PBS1x y se procedió a la transfección. Los complejos de transfección se mezclaron de la siguiente manera: 100 μ L de Opti-MEM libre de suero junto con 1 μ g de ADN y 1 μ L de reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies). Se incubaron durante 4.5 horas a 37°C y posteriormente se retiró la mezcla y se lavaron las células con PBX 1X para dejar con medio base MCDB más antibiótico durante 24 horas a 37°C. Posteriormente las células se fijaron con 4% paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, permeabilizado con una solución de PBS suplementado con Triton-X100 al 0,1% y bloqueado con Suero normal de cabra al 10% e incubando con anticuerpos primarios y secundarios de acuerdo con el análisis requerido. Las imágenes fueron capturadas con microscopio confocal (Leica SP2, Barcelona, España)

Ensayos de inhibición del inflamasoma.

Para este análisis se sembraron 700 mil células HMEC-1 se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, posteriormente las células fueron tratadas con LPS (1 μ g/mL) por 6 horas, pasado ese tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se trataron con 100 μ M del inhibidor glybenclamida por 1 hora, posteriormente las células fueron infectadas a 5 MOI con DENV-2 por dos horas en presencia del inhibidor, transcurrido el tiempo de incubación las monocapas se lavaron 2 veces con PBS 1X y se les adicionó medio nuevo. Finalmente, las células fueron tripsinizadas y se realizaron lisados totales a los tiempos de infección establecidos bajo la siguientes condiciones. Se llevó a cabo la lisis empleando buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen) y se realizó el análisis por Western Blot.

Análisis de datos.

Los datos fueron procesados y graficados en el programa Prism-GraphPad versión 8.1. El análisis estadístico fue analizado mediante el cálculo del valor de p , considerando los valores menos a 0.05 como estadísticamente significativos.

TABLA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS

HUESPED	BLANCO	MARCA	No. CATÁLOGO
Rat	α NS5	LCB	García-Carrillo, 2014
Mouse	α NS3	LCB	LCB
Mouse	α PARKIN	Cell signaling	4211
Rabbit	α PINK	Cell signaling	6946
Rabbit	α NDP52	Cell signaling	60732
Mouse	α SREBP-1	Abcam	Ab3259
Rabbit	α SREBP-2	Abcam	ab30682
Rabbit	α GAPDH	Genetex	GNT100118
Rabbit	α FAS	Cell Signaling	3189
Rabbit	α NRF2	Abcam	ab137550
Rabbit	α HSP60	Abcam	ab46798
Rabbit	α NS2B	LCB	LCB
Mouse	α TOM22	Abcam	Ab-57523
Rabbit	α GFP	Abcam	ab290
Goat	α Mouse-HRP	Invitrogen	626520
Goat	α Rabbit-HRP	Invitrogen	656120
Goat	α Mouse Cy3	Invitrogen	M30010
Goat	α Rat-FITC	Thermo Fisher	31629
Goat	Rat-HRP	Invitrogen	629520
	Mitotracker	Thermo Fisher	M22425

RESULTADOS

Análisis de la activación de SREBP-1 en células HMEC-1 infectadas con DENV.2 y su relación con la inducción de mitofagia

Basándonos en nuestros hallazgos sobre la inducción de autofagia y los resultados obtenidos al evaluar el papel de la inhibición del inflammasoma sobre la replicación viral, decidimos continuar con ese análisis sin perder de vista el objetivo principal sobre la inducción de mitofagia en la infección por DENV-2, encontrando datos muy importantes para el estudio.

El metabolismo de lípidos ha sido reportado como un proceso de gran relevancia en la replicación del DENV-2. Con respecto a la participación del inflammasoma en este evento celular, se ha demostrado que los ácidos grasos saturados son capaces de inducir estrés en el RE y a su vez activar vías implicadas en la activación del inflammasoma NLRP3.

Con base en los resultados previos decidimos analizar la expresión de SREBP en células endoteliales infectadas con DENV-2.

La figura 14 muestra la activación que sufre la proteína SREBP-1, la cual se encarga de regular tanto la síntesis de colesterol, como de ácidos grasos, también se muestra la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS) en presencia de la infección con DENV-2. En la figura 14A podemos observar la forma precursora de SREBP-1 con un peso aproximado de 130 kDa y su forma procesada de 70 kDa, que se transloca al núcleo para transcribir genes asociados a la lipogénesis, se puede apreciar un mayor enriquecimiento de esta forma a las 24 y 36 horas de infección. Con respecto a FAS, se observa un nivel de expresión consistente con la activación de SREBP-1, es decir, una mayor presencia a los tiempos de 24 y 36 hpi. Las figuras 14B y C corresponden al análisis densitométrico de estas dos moléculas, respectivamente.

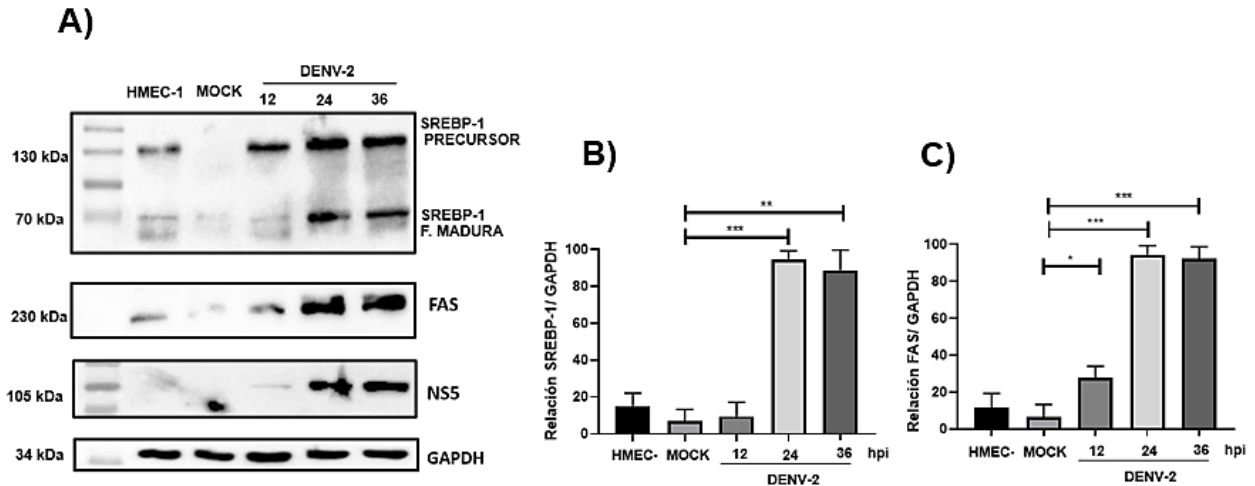


Figura 14. Activación de SREBP-1 y expresión de FAS en células HMEC-1 infectadas con DENV-2. A) Células HMEC-1 fueron infectadas a diferentes tiempos y analizadas con los anticuerpos para las proteínas SREBP, FAS, el control de infección NS5 y el control de carga GAPDH. B, C) Análisis densitométricos correspondientes a SREBP-1 y FAS. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Para el caso de SREBP-2, en la figura 15A se muestra de manera simultánea la expresión de este factor en ausencia y presencia de glibenclamida, observándose que, en las células infectadas en ausencia del inhibidor, existe incremento de la forma madura de esta proteína con comparación con los controles negativos, mostrando niveles más elevados a las 12 y 24 hpi. Una vez analizada la activación de los factores SREBP-1 y SREBP-2, se evaluó el comportamiento de su expresión ante la inhibición del inflammasoma, ya que se ha reportado la relación entre estos factores de transcripción y la activación del complejo NLRP3. Con respecto a SREBP-2 en la figura 15A (panel derecho) se puede apreciar que en presencia del inhibidor existe una disminución tanto de la forma precursora como de la forma madura, en comparación con las células infectadas que no fueron tratadas con este. La figura 15C corresponde a la expresión de SREBP-1 en células tratadas con glibenclamida, donde se observa de igual manera una disminución de la forma precursora en este caso. Con respecto a FAS de manera consistente se aprecia una menor expresión de esta proteína cuando se ve inhibido el inflammasoma con el fármaco. Finalmente, las figuras 15B y D corresponden a los análisis densitométricos de SREBP2 y FAS. Estos resultados nos indican el posible papel que SREBP está desempeñando sobre la lipogénesis y como este podría estar

alterando la replicación de DENV-2, de alguna manera el inflammasoma está impactando sobre estas vías metabólicas que finalmente disminuyen la replicación viral. De manera muy interesante, ha sido reportado que el silenciamiento de SREBP1 y otras moléculas implicadas en la lipogénesis disminuye la acumulación de PINK en la mitocondria, impidiendo la activación de mitofagia (Ivatt-Sanchez et al., 2014). Se demostró que SREBP1 bloquea la mitofagia al reducir la acumulación de PINK en la membrana externa mitocondrial, sugiriendo que una concentración de diversos lípidos es clave para estabilizar la presencia de la proteína en la mitocondria (Ivatt-Whitworth et al., 2014). Es importante mencionar que a pesar de que este análisis contribuye a nuestro estudio, este se realizó de manera previa por los hallazgos encontrados en un estudio previo sobre el inflammasoma, por lo que esta conexión entre SREBP y la mitofagia es un evento que no pudimos evaluar a profundidad, sin embargo, nos brinda información crucial sobre los mecanismos involucrados en la inducción de mitofagia.

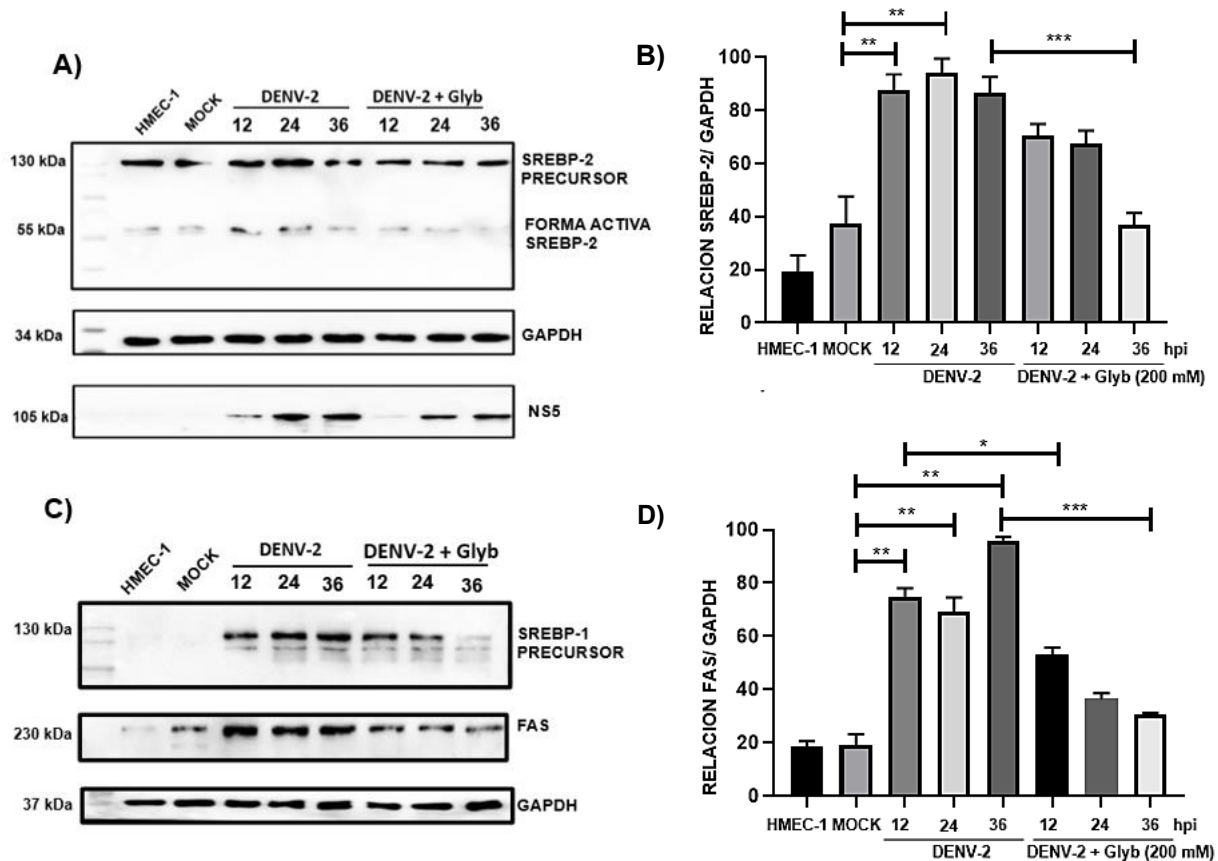


Figura 15. Inhibición del inflammasoma NLRP3 y la expresión de SREBP, junto con FAS en presencia de DENV-2 a diferentes tiempos de infección. Células HMEC-1 fueron infectadas a

5 MOI con DENV-2 en presencia y ausencia de glibenclamida (200 mM). A, C) Análisis de las proteínas SREBP-2, SREBP-1 y FAS, utilizando como control de infección NS5 y como control de carga GAPDH. B y D) Análisis densitométricos correspondientes a los niveles de expresión de las proteínas analizadas. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Caracterización de la inducción de mitofagia en células endoteliales (HMEC-1) infectadas con DENV-2.

Una vez evidenciada la inducción de autofagia en presencia de DENV-2, decidimos analizar la activación de mitofagia, un tipo de autofagia específico que consiste en la eliminación de mitocondrias dañadas. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que las proteínas virales NS2A y NS2B muestran una fuerte colocalización en organelos como retículo endoplásmico y mitocondrias. Además, se demostró que estas proteínas promueven una intensa salida de iones Ca^{++} así como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Shrivastava et al., 2020). Adicional a esto, se ha sugerido fuertemente que el daño mitocondrial (despolarización de la membrana externa) es capaz de inducir la mitofagia. Este fenómeno se evaluó en células endoteliales en una cinética de infección con DENV-2. Brevemente, se plaquearon células HMEC-1 a una confluencia del 80%, se infectaron con 5 MOI y se obtuvieron los lisados celulares totales a diferentes tiempos (3, 6, 12 y 24 hpi) para su respectivo análisis. Para poder evaluar la mitofagia inducida por el virus, primero se evaluó la infección de las células. En la figura 16A se demuestra la infección de las células HMEC-1 a través de un ensayo de tipo Western Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína no estructural NS5 (García-Cordero-Carrillo-Halfon, 2014). Donde se observa un incremento en la expresión de la proteína viral dependiente del tiempo de infección, mostrando un nivel más elevado a las 24 hpi. Una vez corroborada la infección se procedió a evaluar la expresión de las proteínas PINK y PARKINA, ambas relacionadas con la inducción de mitofagia. Es importante mencionar que la cinasa PINK favorece el reclutamiento de PARKINA a las mitocondrias dañadas a través de su fosforilación y PARKINA por su parte, favorece el marcaje de las proteínas mitocondriales a través de su actividad de ubiquitin ligasa (Eiyima et al., 2016). De

manera simultánea se analizó también a la proteína NDP52, la cual ha mostrado tener un papel como receptor de autofagia implicado en el reclutamiento del complejo autofágico a las moléculas blanco para su degradación (Padman et al., 2019). La figura 16A corresponde a ensayos representativos donde se analizaron los lisados de la cinética previamente descrita. Se muestra el nivel de expresión de las proteínas mencionadas junto con el respectivo análisis densitométrico. Se puede observar el aumento de la expresión de la proteína NS5 dependiente del tiempo de infección, lo cual concuerda con el tiempo del ciclo de replicación de DENV-2, donde a partir de las 12 horas inicia la síntesis de proteínas virales (Fig. 16A).

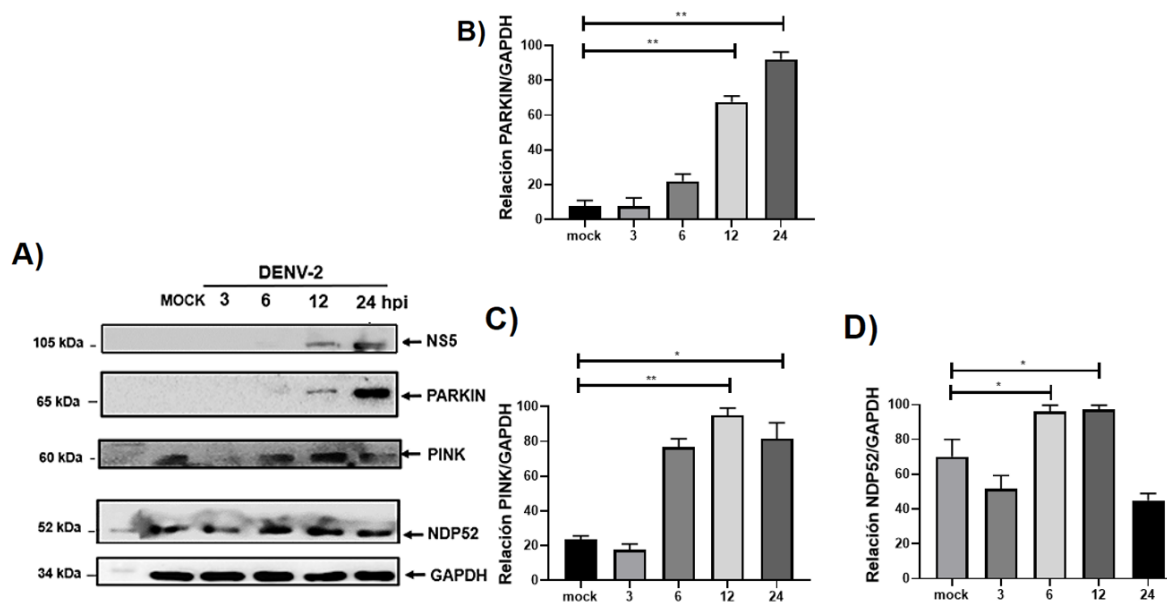


Figura 16. inducción de mitofagia en células HMEC-1 infectadas con DENV-2. Células endoteliales fueron infectadas a 5 MOI y analizadas a diferentes tiempos, como control negativo las células fueron tratadas con virus inactivado por calor (MOCK). A) Los lisados fueron analizados a través de Western Blot con anticuerpos anti NS5, PARKINA, PINK y NDP52. B, C y D) Análisis densitométrico correspondiente a cada proteína evaluada a diferentes tiempos post-infección, comparando con las células falsamente infectadas. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Con respecto a PARKINA (65 kDa) y PINK (60 kDa) se puede apreciar un patrón de expresión similar entre ellas, es decir, un enriquecimiento de ambas proteínas al tiempo final del análisis (24 hpi), lo cual sugiere la inducción de mitofagia a tiempos tardíos de la infección. De manera contrastante, el nivel de la proteína NDP52 no muestra cambios muy drásticos a lo largo de la infección, solo una disminución sutil a las 24 hpi, pudiendo deberse al fenómeno de mitofagia que probablemente está ocurriendo en los tiempos tardíos de la infección. Debido a que se analizaron lisados totales consideramos que el análisis de un fraccionamiento celular podría evidenciar cambios más importantes en el nivel de expresión, dado la localización mitocondrial que puede tener esta proteína para llevar a cabo su función de adaptador autofágico.

Con el fin de conocer si algunos de los principales factores de transcripción participan en la regulación de la expresión de los genes relacionados con mitofagia en la infección por DENV-2, decidimos evaluar la expresión de NRF2 en las células HMEC-1. La figura 17A muestra el comportamiento de este factor, mostrando niveles más elevados en los primeros tiempos de la infección e interesantemente una disminución a las 24 hpi, dado que este factor se ha implicado en la regulación de PINK Y NDP52, creímos que encontraríamos una relación directa entre su expresión y los niveles de estas proteínas de mitofagia. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la regulación de mitofagia en la infección por DENV-2, por lo que los datos encontrados no pueden indicar aún en este momento una relación acerca de la regulación de genes asociados a mitofagia, además de los diferentes factores de transcripción que se han visto implicados en regular estas proteínas mitofágicas. A pesar de estos resultados, la literatura reporta datos similares en otros modelos celulares infectados con DENV-2, incluso se demuestra que esta disminución de NRF2 es de hecho un evento que favorece la activación del inflammasoma, a través de un incremento de ROS, fenómeno que analizamos en este estudio. La figura 17B muestra el análisis densitométrico de esta proteína.

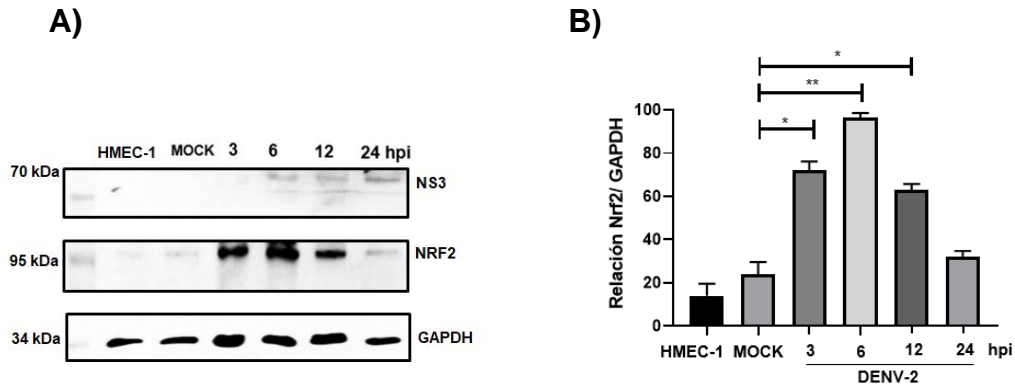


Figura 17. Expresión del factor de transcripción NRF2 en células HMEC-1 en una cinética de infección con DENV-2. A) Células endoteliales fueron infectadas con 5 MOIs de DENV-2 y se analizó el nivel de expresión de nrf2. B) Análisis densitométrico de Nrf2. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Análisis de la localización celular de proteínas de mitofagia en presencia de DENV-2.

Una vez analizado el nivel de expresión de PARKINA y mostrar que el virus es capaz de inducir un incremento en su expresión, procedimos a evaluar por inmunofluorescencia su distribución celular para analizar su translocación a la mitocondria como resultado de la inducción de mitofagia, de acuerdo con lo reportado con otros virus. Analizamos su redistribución celular a lo largo de la cinética de infección con DENV-2.

En la figura 18 se muestran imágenes de una IF representativas correspondientes a células HMEC-1, donde se utilizó un anticuerpo para inmunolocalizar a la proteína PARKINA, y otro para la proteínas NS5 (control de infección), así como DAPI para teñir a los núcleos. La presencia de la proteína NS5 con una localización nuclear nos permitió comprobar la infección de las células endoteliales. Se pudo observar agregación muy evidente de esta proteína a partir de las 6 horas post-infección con un efecto muy marcado a las 24 horas, un patrón que coincide con el incremento observado por WB conforme avanza la cinética de infección. La presencia y el incremento de PARKINA durante la infección contribuye a sugerir la inducción de mitofagia durante la infección del virus dengue.

De manera más descriptiva se puede apreciar que, en los primeros tiempos de infección, así como en el mock (panel 1), la proteína PARKINA presenta una señal heterogénea sobre el citoplasma de la células. Conforme avanza la infección, la

señal de la proteína se redistribuye hacia diversas regiones en la célula, un patrón que es muy evidente al final de las 24 horas de infección (panel 4).

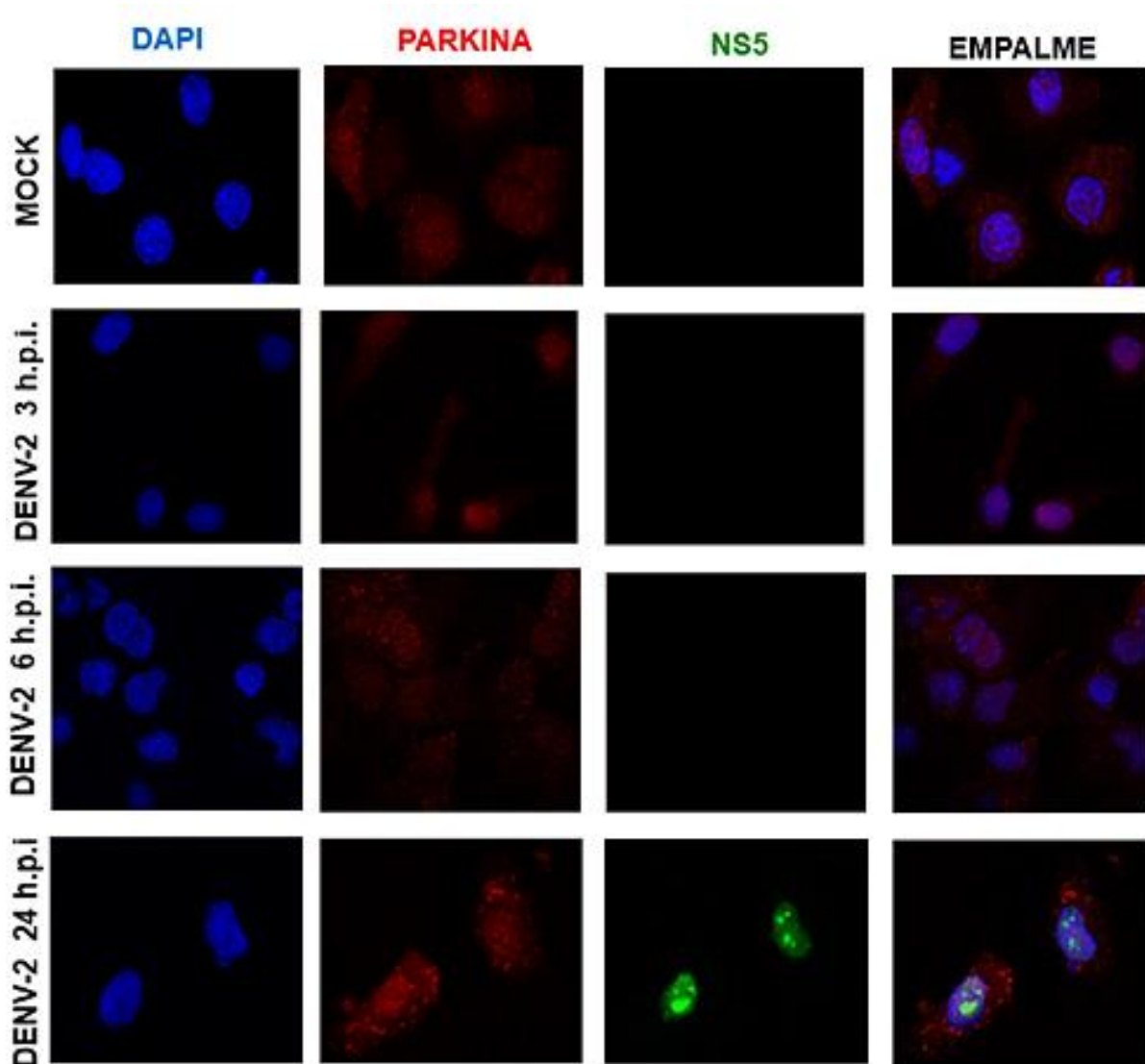


Figura 18. Localización celular de proteínas involucradas en mitofagia en presencia de DENV-2. Células endoteliales fueron infectadas con 5 MOI y fijadas para su análisis por IF utilizando los anticuerpos contra PARKINA y NS5. Se utilizó el colorante DAPI para marcar los núcleos. Cada fila corresponde al análisis con los anticuerpos descritos y finalmente el empalme que muestra la combinación de todas la señales celulares.

Evaluar los cambios de proteínas de mitofagia en fracciones mitocondriales de células endoteliales infectadas con DENV-2.

Uno de los primeros eventos celulares involucrados en la inducción de mitofagia es la acumulación de Pink y la translocación de PARKINA a la mitocondria. Decidimos comprobar la presencia e incremento de estas proteínas en lisados provenientes de fraccionamiento mitocondrial de células infectadas con DENV-2. Se realizaron fraccionamientos celulares a partir de 10×10^6 células HMEC-1 infectadas con 5 MOIs por 24 horas post-infección con DENV-2. En las fracciones mitocondriales se evaluó mediante WB la presencia de PARKINA, PINK y NDP52 (adaptador autofágico). En la figura 19A se muestra la expresión de la proteína PINK en la fracción mitocondrial de células infectadas con DENV-2. Se puede apreciar de manera muy clara un incremento de esta molécula en contraste con el control tratado con virus inactivo (MOCK). Este resultado, aunado al análisis previo de lisados totales e IF, confirma la acumulación de PINK en las mitocondrias debido a la infección con el virus dengue.

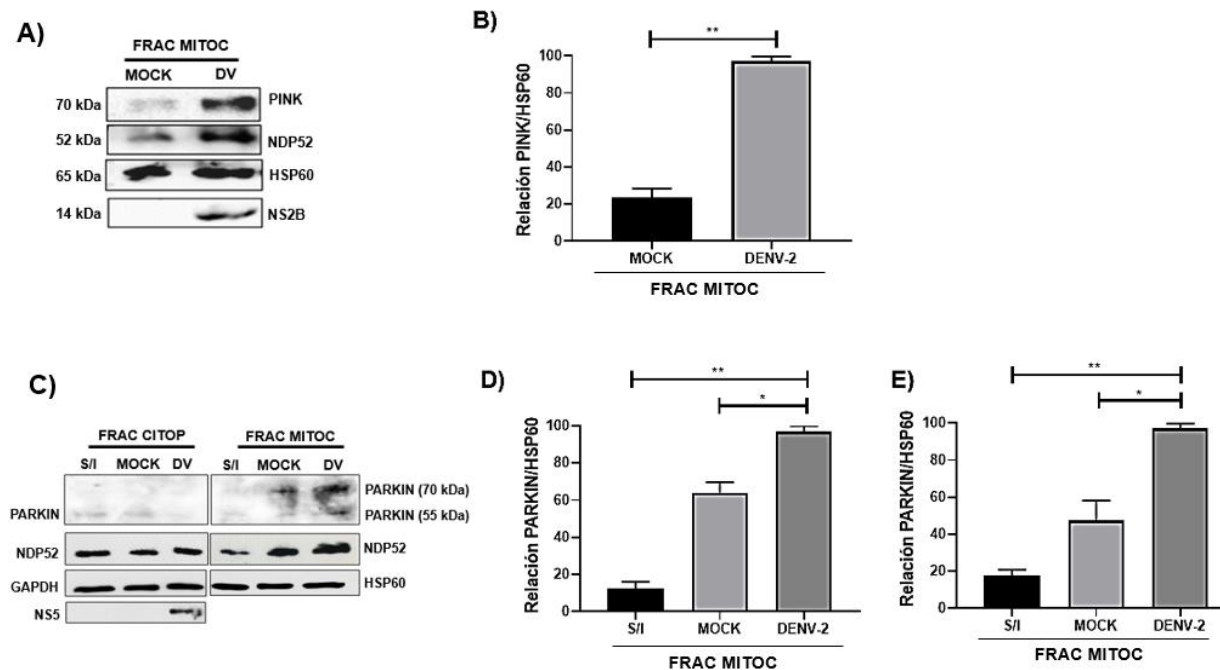


Figura 19. Fraccionamiento mitocondrial de células HMEC-1 infectadas con DENV-2. Células endoteliales fueron infectadas a 5 MOI durante 24 horas y sometidas a un fraccionamiento celular como se describió en materiales y métodos. A) Análisis de WB utilizando

los anticuerpos contra PINK, PARKINA, NDP52, HSP60 y NS2B. C) Fraccionamiento citoplasmático y mitocondrial analizando la expresión de PARKINA, forma basal y fosforilada, así como GAPDH, NDP52 y HSP60. B, D y E) Análisis densitométrico correspondiente a cada proteína analizada por WB. Cada experimento se realizó por triplicado. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Otro evento esencial en la mitofagia es la presencia de adaptadores autofágicos en la mitocondria que reclutan la maquinaria autofágica para promover la degradación mitocondrial. La figura 19A y B muestra la expresión de NDP52, cuyo comportamiento es semejante al observado con PINK, es decir, se observa una mayor concentración de la proteína cuando las células están infectadas. Es importante resaltar con respecto a este adaptador autofágico, que en los resultados obtenidos con los lisados totales no había diferencias notables entre el lisado de las células control (MOCK) y las células infectadas, en contraste con lo que observamos en el fraccionamiento mitocondrial, donde si es evidente el incremento de NDP52, este resultado sugiere que este adaptador autofágico podría ser uno de los responsables del reclutamiento de la maquinaria autofágica para degradar las mitocondrias dañadas generadas por el estrés celular ocasionado por la infección con DENV-2 y sus proteínas virales. En este análisis utilizamos como control de infección y de fracción mitocondrial a la proteína no estructural NS2B debido a que se ha reportado su interacción con la mitocondria. Como control de carga se utilizó a la chaperona mitocondrial HSP60 (Aguirre et al, 2017).

Para el análisis de PARKINA se muestran los fraccionamientos simultáneos de la mitocondria y el citoplasma, debido a que se ha reportado que en condiciones normales PARKINA tiene una localización citoplasmática y ante la presencia de daño mitocondrial esta se transloca a las mitocondrias para promover su eliminación a través del marcaje por ubiquitinación, como se mencionó previamente. PARKINA sufre una serie de fosforilaciones que permite su activación. En la figura 19 se muestra el análisis de WB, en donde se observan dos marcas correspondientes al peso aproximado de PARKINA, una banda con un peso de 55 kDa y otra banda de 70 kDa, se sugiere que esta última es la forma activa de la proteína que sufrió fosforilación dependiente de PINK. La banda más enriquecida en el western blot se muestra solo en el carril de células infectadas con DENV-2, a diferencia del control

tratado con el virus inactivo (falsamente infectado). Es importante resaltar el enriquecimiento de PARKINA en las fracciones mitocondriales en contraste con la fracción citoplasmática. Este dato sugiere que PARKINA sufre translocación del citoplasma a las mitocondrias ante una señal de daño para inducir mitofagia. Los resultados mostrados sugieren el papel que tiene DENV-2 para ocasionar el estrés celular necesario e inducir cambios en proteínas relacionadas con el fenómeno de mitofagia (Figura 19C). Debido a la presencia de PINK en altas concentraciones (Figura 16A) durante la infección y ahora una banda de mayor peso correspondiente a PARKINA (19C) consideramos que PINK puede estar activando a PARKINA a través de fosforilación. Finalmente, en las figuras 19B, D y E se muestra el análisis densitométrico de las proteínas mencionadas, corroborando de manera gráfica nuestras observaciones en WB.

Analizar los cambios morfológicos mitocondriales en células endoteliales infectadas con DENV-2

Un análisis complementario a la inducción de mitofagia es la evaluación de los cambios morfológicos de las mitocondrias de células infectadas con DENV-2. Para el análisis morfológico mitocondrial se realizaron ensayos de IF que nos permitieran evaluar las alteraciones y la relocalización de las redes mitocondriales a lo largo de la cinética de infección (3, 6, 12 y 24 hpi). Para evidenciar las redes mitocondriales utilizamos el colorante catiónico mitotracker. En la figura 20 se muestran las células falsamente infectadas (MOCK) donde se aprecia una distribución mitocondrial característica de células sanas en color rojo, con un patrón predominantemente heterogéneo en el citoplasma de la célula. En las células infectadas con DENV-2, a los primeros tiempos de infección, 3 y 6 hpi este patrón se mantiene, sin embargo, a las 12 y 24 hpi, se aprecia pérdida de la señal mitocondrial, acompañada de aglomeración con una localización perinuclear, además, este comportamiento coincide en aquellas células que se encuentran infectadas, señal corroborada por la presencia de la proteína viral NS5 en color verde. En la imagen correspondiente al empalme de las señales se pueden comprobar estos cambios. El cambio en el patrón de las redes mitocondriales y posible daño a las mitocondrias se debe a la presencia del virus dengue. Consideramos que los cambios más drásticos se

observaron a partir de las 12 hpi y son debido a la gran concentración de proteínas virales que provocan estrés en la célula, como ha sido reportado en la infección con DENV-2 en organelos como RE y mitocondria (Surasombatpattana et al., 2011, Veladao et al., 2016, Shrivastava et al., 2020).

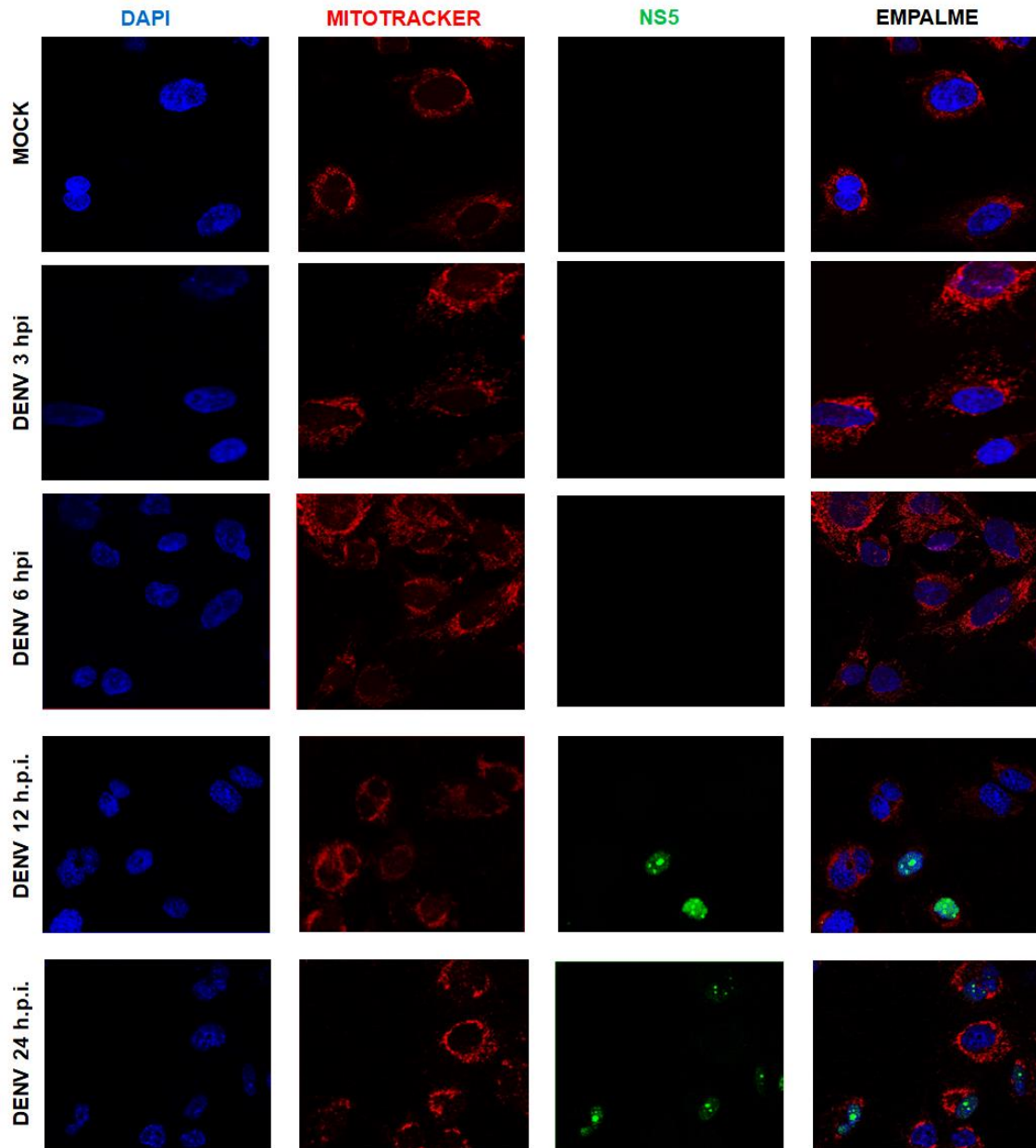
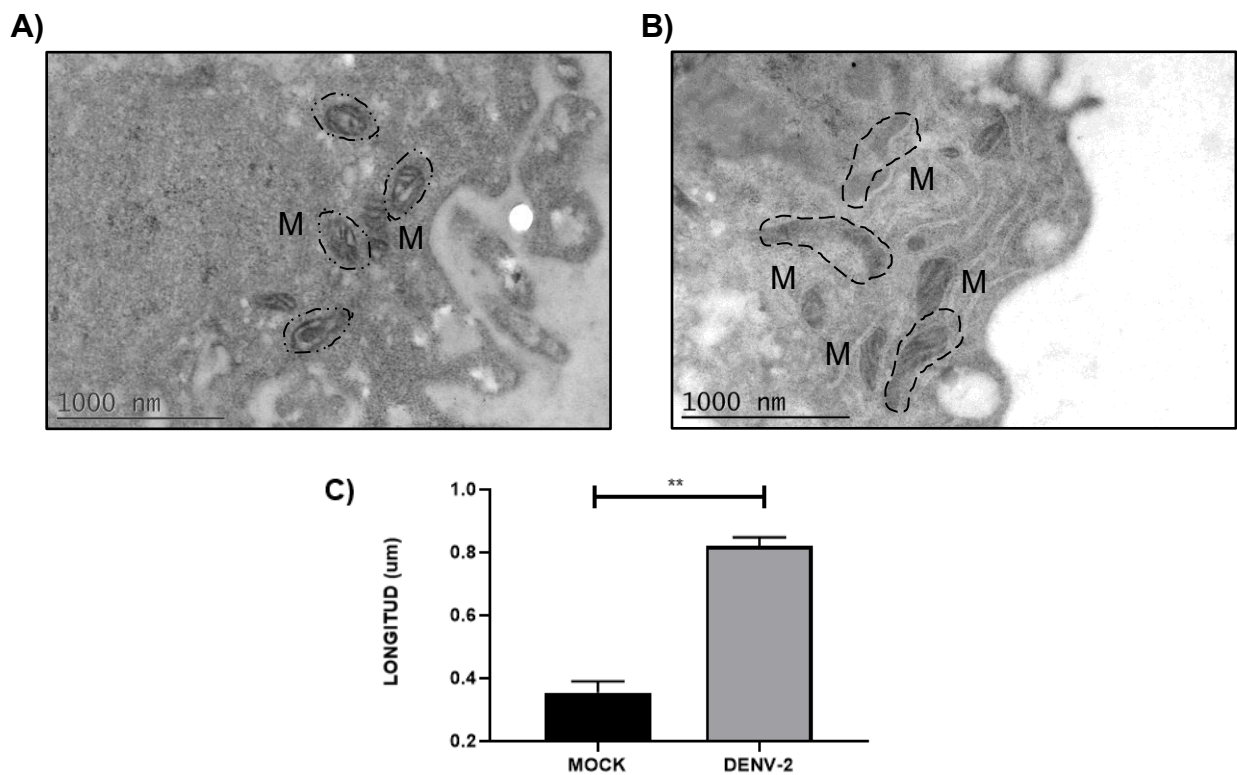


Figura 20. Cambios mitocondriales en células HMEC-1 a diferentes tiempos de infección con DENV-2. Células endoteliales fueron infectadas con 5 MOI a diferentes tiempos y posteriormente teñidas con mitotracker, DAPI y NS5 como control de infección. Un análisis adicional muy importante que corrobora los cambios celulares es la

microscopía electrónica, que permite evaluar de manera muy detallada las alteraciones morfológicas en una célula infectada. En la figura 21A y B se muestran dos micrografías representativas correspondientes a células falsamente infectadas e infectadas con DENV-2 por 24 hpi. Decidimos evaluar este tiempo debido a que los análisis previos mostraron una mayor alteración mitocondrial a las 24 horas de infección. La figura 21A muestra principalmente mitocondrias que se considerarían sanas o normales con un tamaño en promedio similar, además de la presencia característica de crestas mitocondriales. La figura 21B muestra a células infectadas con DENV-2, se observan mitocondrias de gran tamaño y presentando un claro fenómeno de alargamiento, así como ausencia de crestas mitocondriales a diferencia de las mitocondrias en células tratadas con el virus inactivo. Estos resultados nos permiten corroborar varias de las alteraciones mitocondriales que el virus dengue es capaz de provocar en la célula infectada.



D)

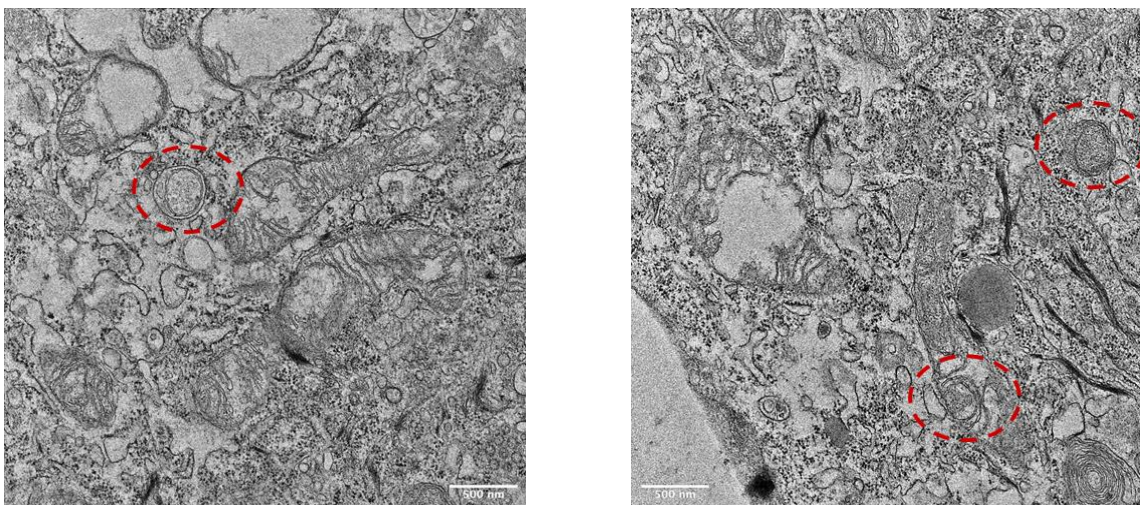


Figura 21. Análisis por microscopía electrónica de células HMEC-1 infectadas con DENV-2. A y B) Células HMEC-1 fueron infectadas a 5 MOI con DENV-2 y analizadas a las 24 hpi. Posteriormente, las muestras se lavaron y se fijaron con 2 mL de una solución de 0.1 M cacodilato de sodio, 4% formaldehído, 0.05% glutaraldehído, 0.2% ácido pícrico durante 2 horas en ausencia de luz por 24 horas a 4°C. Enseguida se retiró la solución fijadora y se agregaron 2 mL de 0.1 M Cacodilato de Sodio por pozo. Finalmente, se tiñeron secciones delgadas de 70 nm con acetato de uranilo y citrato. C) Cuantificación de la longitud de mitocondrias de células falsamente infectadas y células infectadas con 5 MOIs de DENV-2. D) En rojo se señalan vesículas de apariencia autofagosómica. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokio, Japón). Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

En la figura 21C se presenta los resultados del análisis y la cuantificación de diversas mitocondrias correspondientes de al menos 20 células. Los resultados de longitud y número de crestas mitocondriales fueron graficados, observándose que en general las células infectadas con DENV-2 presentan un alargamiento mitocondrial, así como una aparente disminución de crestas. Analizando de manera más detallada las micrografías, se examinaron mitocondrias a un mayor aumento y pudimos observar estructuras de apariencia autofagosómica cubriendo organelos de morfología mitocondrial, lo que apoya nuestra hipótesis sobre la mitofagia inducida por DENV-2 (Huang et al., 2009, Wu et al., 2017). Varias de estas estructuras son resaltadas en círculos de color rojo, principalmente a 24 hpi, tiempo en el cual hemos encontrado más evidencia de este fenómeno.

Evaluación la participación de las viroporinas de DENV en la inducción de mitofagia

Una vez que demostramos la presencia del fenómeno de mitofagia debido a la infección con el virus dengue, así como los diferentes cambios morfológicos en la mitocondria, procedimos a evaluar la participación de las viroporinas (NS2A y NS2B) en el fenómeno de mitofagia.

Se ha reportado que las alteraciones mitocondriales, tales como disminución del potencial de membrana son señales de daño que inducción la mitofagia. Varios flavivirus poseen proteínas con actividad de viroporina capaces de causar daño a nivel mitocondrial. Una vez evaluados los fenómenos de mitofagia y activación del inflammasoma en presencia de DENV-2, procedimos a analizar de manera individual el papel de las viroporinas (NS2A y NS2B) en ambos fenómenos, así como la conexión entre estos fenómenos celulares. De manera inicial se evaluaron las alteraciones mitocondriales que estas proteínas virales son capaces de inducir. Para ello se transfectaron células HMEC-1 con el plásmido que codifica para la proteína NS2A-GFP, posteriormente, se tiñeron con mitotracker para evidenciar los patrones mitocondriales inducidos por estas proteínas virales. La figura 22 muestra células sin transfectar y transfectadas respectivamente, en las primeras se observa en color rojo un patrón mitocondrial predominantemente homogéneo en todas las células, sin embargo, las células HMEC-1 transfectadas con NS2A-GFP claramente podemos observar una alteración de las redes mitocondriales, las cuales se relocalizan hacia regiones donde se observa una elevada expresión de NS2A-GFP, así como una pérdida del patrón heterogéneo observado en células sin transfectar. Adicionalmente, se analizó el coeficiente de correlación de Pearson, para evaluar colocación entre la señal de la viroporina y el mitotracker, el cual nos dio un valor de 0.8, que indica una fuerte cercanía entre ambas moléculas, lo cual nos permite sugerir que la proteína NS2A está induciendo estas alteraciones mitocondriales. Esta co-localización se puede apreciar de manera clara en el empalme de las imágenes donde se puede apreciar el color amarillo, combinación de las señales rojo y verde (Figura 22, papel inferior).

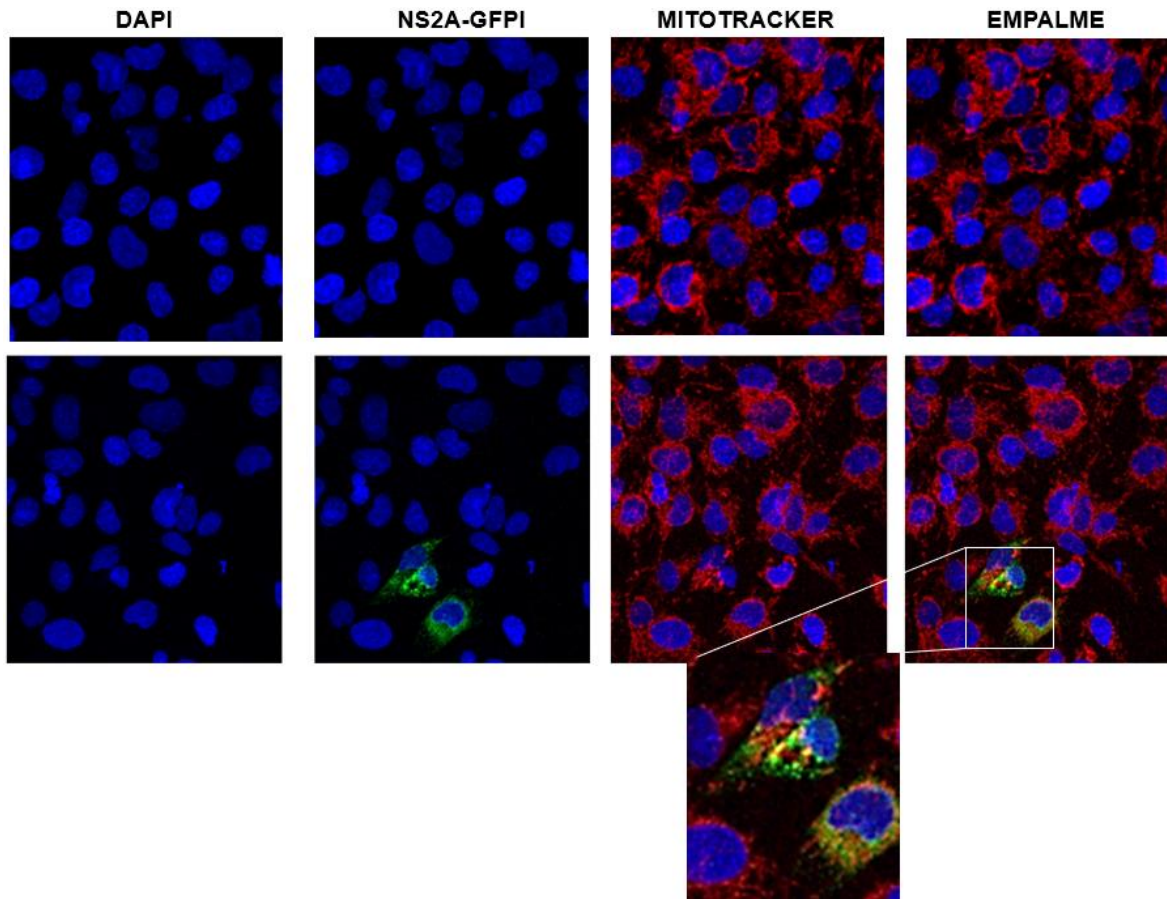
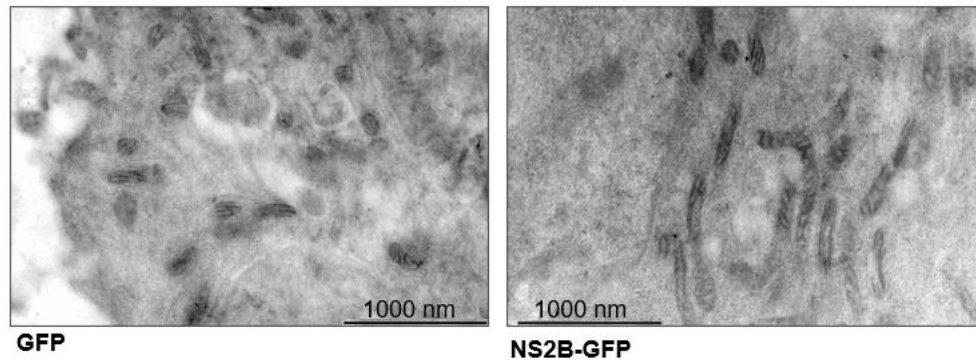


Figura 22. Cambios morfológicos mitocondriales inducidos por la viroporina NS2A de DENV-2. Células HMEC-1 fueron transfectadas con NS2A-GFP por 24 horas y luego teñidas con mitotracker. el análisis de correlación de Pearson fue realizado en el microscopio multifotónico LEICA TCS SP8 MP.

Para corroborar estos cambios mitocondriales se realizó un análisis por microscopía electrónica de células transfectadas con NS2B-GFP y evidenciar estas alteraciones. Desafortunadamente, no se pudieron procesar las células transfectadas con NS2A-GFP, por lo que solo se muestra NS2B. Como control de transfección se utilizaron células HMEC-1 transfectadas únicamente con el vector (GFP). En la figura 23A se muestran las células transfectadas con la construcción NS2B-GFP, donde se observan cambios similares a los inducidos por el virus completo, es decir, un alargamiento evidente de las mitocondrias, en contraste a las células control, así como una alteración en el número de las crestas mitocondriales. De manera general la proteína NS2B es capaz de inducir cambios similares a los inducidos por la infección completa, sugiriendo la posibilidad de que esta viroporina puede inducir

mitofagia. Estos análisis junto con los resultados previos por IF y WB sugieren fuertemente la existencia de mitofagia. Finalmente, en la figura 23B se cuantifican y grafican estos cambios

A)



B)

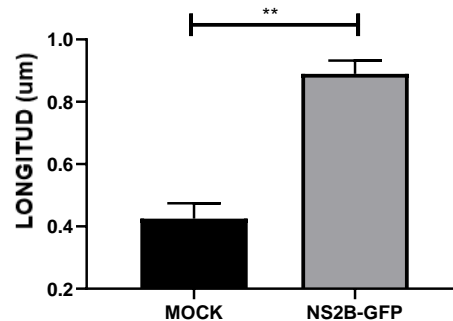


Figura 23. Análisis por microscopía electrónica de los cambios mitocondriales inducidos por viroporinas de DENV-2. A) Células HMEC-1 fueron transfectadas con NS2B-GFP por 24 horas y luego preparadas con cacodilato de sodio para microscopía electrónica. B) Cuantificación de longitud mitocondrial expresado en nm y la pérdida de crestas mitocondriales. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

Evaluación del papel de la proteína viral NS2A-GFP sobre la acumulación de PINK y NDP52.

Una vez demostrada de manera individual la capacidad de ambas viroporinas (NS2A y NS2B) para inducir cambios morfológicos mitocondriales, continuamos con la evaluación de la distribución celular que sufre PINK en presencia de la expresión de estas proteínas virales. Para ello, células HMEC-1 fueron transfectadas con el plásmido GFP-NS2A durante 24 horas y posteriormente se realizó una IF. En la figura 24 podemos apreciar una imagen representativa con la distribución de PINK

en células transfectadas con el plásmido control (GFP), donde se observa en general una señal homogénea en todas células, incluida la transfectada con GFP, resaltando de esta manera que la GFP no es capaz de inducir cambios en Pink ni en la viabilidad celular. Con respecto a la transfección con NS2A-GFP, podemos observar dos fenómenos que ocurren con Pink. Se aprecia que algunas células transfectadas con NS2A-GFP muestran una aparente acumulación de Pink, donde la síntesis de la proteína viral no está muy enriquecida. Por otro lado, podemos apreciar como algunas células con una gran señal correspondiente a NS2A (casi al centro de la imagen) pierden el patrón acumulativo de Pink, creemos y de acuerdo con lo ya reportado en otras infecciones virales, que la señal de la proteína se ve alterado por la mitofagia que se está llevando a cabo (Kim et al., 2013). Podemos comparar en la misma imagen como algunas células no transfectadas mantienen una señal de Pink en su citoplasma, que se disminuye en aquellas con gran acumulación de la proteína viral.

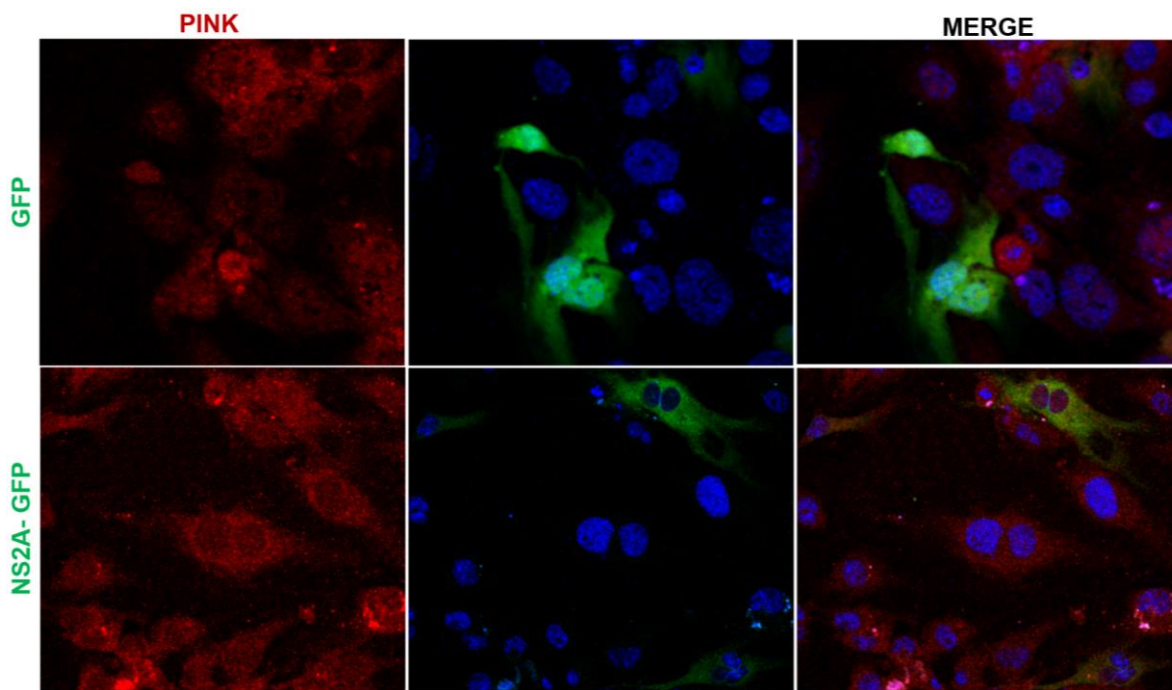


Figura 24. Análisis de la localización de PINK en células HMEC-1 que expresan a las viroporinas de DENV-2. Células HMEC-1 que fueron transfectadas con NS2A-GFP y GFP por 24 horas, teñidas con Pink en rojo y con DAPI en color azul.

Continuando con el análisis de la viroporina NS2A, proseguimos a evaluar al adaptador autofágico NDP52, otra molécula importante en la inducción de mitofagia. Realizamos al igual que con PINK, un análisis por IF en presencia del plásmido vacío, solo GFP y con NS2A-GFP para analizar su distribución en las células HMEC-1. La figura 25 muestra la presencia de la proteína adaptadora NS2A en rojo, de lado superior de muestra el patrón que tiene esta proteína en las células control, donde se observa una localización citoplasmática en todas las células. No pudimos observar cambios inducidos por la GFP. Con respecto a las células transfectadas con NS2A-GFP se muestra un cambio en la presencia de NDP52, es decir, en aquellas células enriquecidas con la proteína viral se observa menos señal de esta proteína autofágica en comparación con células que no están transfectadas. Creemos que 24 horas post transfección son suficientes para inducir cambios mitofágicos, como la disminución de este adaptador, debido a que estas proteínas son las primeras en degradarse ante la actividad autofágica de los autofagolisosomas.

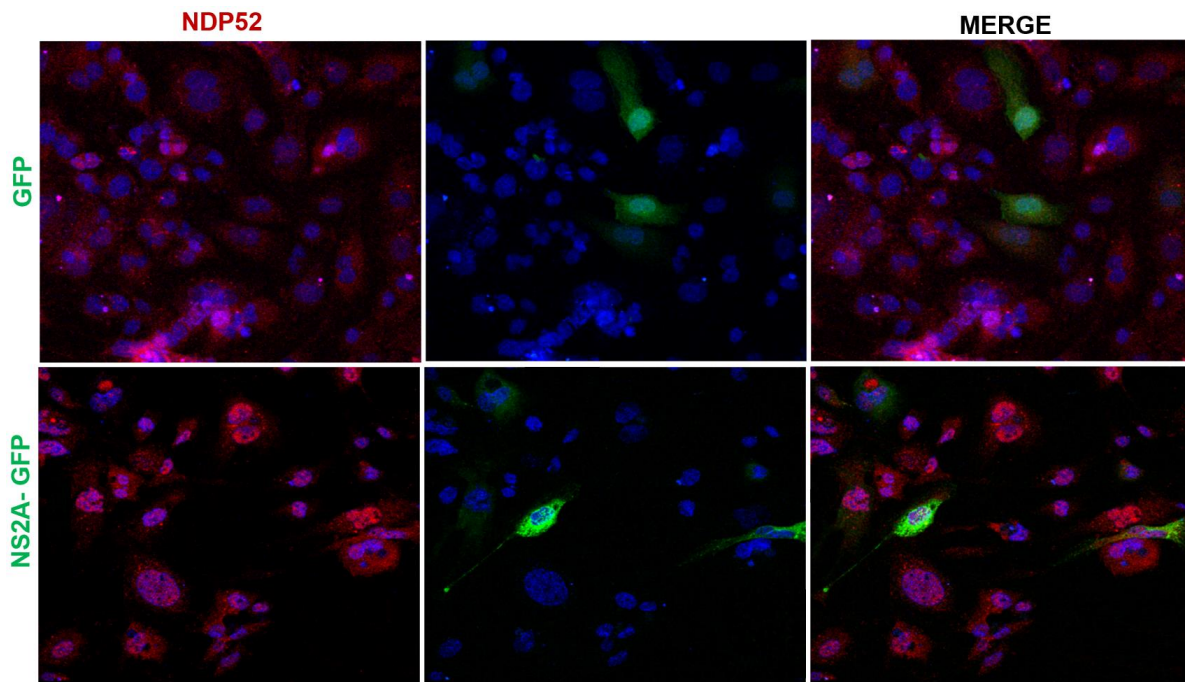


Figura 25. Análisis de la localización de NDP52 en células HMEC-1 que expresan a la viroporina NS2A del DENV-2. Células HMEC-1 fueron transfectadas con NS2A-GFP y GFP por 24 horas, teñidas con un anticuerpo específico para NDP52 en rojo y con DAPI en color azul.

Fraccionamiento mitocondrial en presencia de la proteína NS2A-GFP

Para corroborar el papel de las viroporinas sobre la inducción de mitofagia se realizó fraccionamiento mitocondrial a partir de 10×10^6 células HMEC-1 transfectadas con GFP y NS2A-GFP, por razones metodológicas no fue posible obtener el fraccionamiento con la proteína NS2B. El análisis con la proteína NS2A-GFP mostró resultados consistentes con la infección completa.

La figura 26 corresponde a un fraccionamiento mitocondrial y citoplasmático de células transfectadas con el plásmido parental GFP y con GFP-NS2A. Se muestra la expresión de PINK, junto con el control de transfección evidenciado por la proteína GFP (25 kDa) y una banda de mayor peso molecular correspondiente a la fusión de GFP con la NS2B (37 kDa). También se muestran el control de carga TOMM22 para corroborar el fraccionamiento mitocondrial, como control de carga se utilizó GAPDH para diferenciar el contenido citoplasmático.

Con respecto a la proteína PINK, observamos claramente en la fracción mitocondrial un incremento en las células que fueron transfectadas con NS2A-GFP, el cual es consistente con el hecho de que esta proteína se concentra en la mitocondria para inducir mitofagia, este incremento es evidentemente mayor que el observado en las células que fueron transfectadas únicamente con GFP, podemos también notar cierto incremento de PINK en la mitocondria con esta transfección, creemos que porque la proteína GFP ha sido reportado por inducir cierto estrés en las células, y probablemente esa sea la razón de un ligero incremento, aunque es claro el efecto que tiene la proteína NS2A-GFP sobre la acumulación de PINK en la mitocondria. esto último refuerza nuestra hipótesis sobre que esta viroporina es capaz de inducir mitofagia a través del daño mitocondrial que ya nuestro grupo de trabajo ha reportado previamente. Para el caso de NDP52, aunque la expresión no es muy marcada, observamos la diferencia que presenta la transfección de NS2A con respecto al parental, lo cual nos indica fuertemente que este adaptador autofágico, está teniendo un papel importante en el fenómeno de mitofagia, como ya observamos previamente en la infección completa.

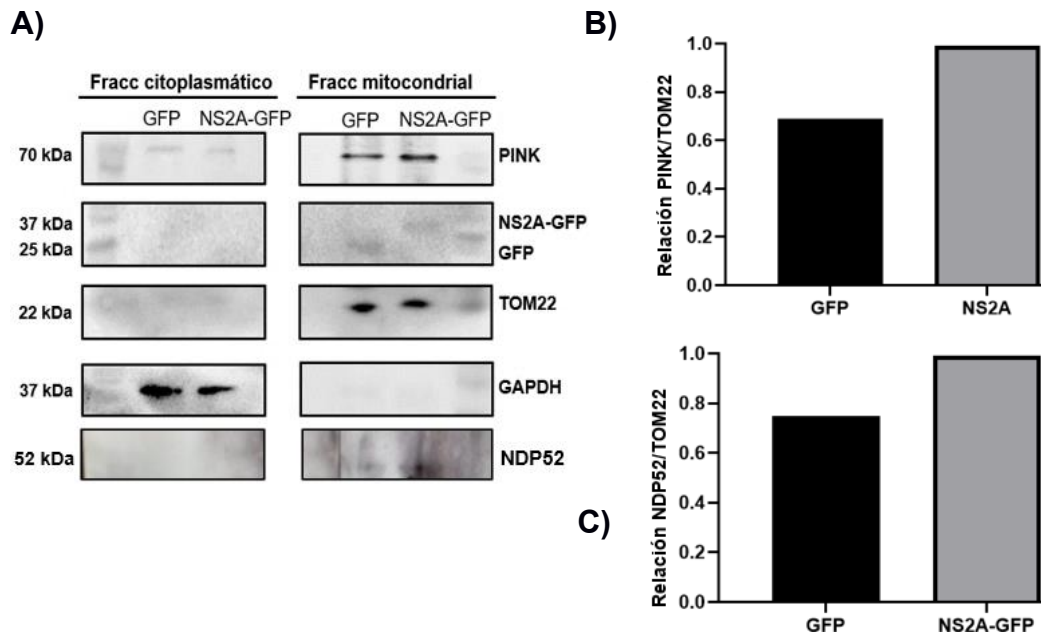


Figura 26. Fraccionamiento celular de células HMEC-1 transfectadas con GFP y NS2A-GFP. A) Células endoteliales fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para GFP y NS2A-GFP durante 24 horas y posteriormente sometidas a un fraccionamiento mitocondrial y citoplasmático, finalmente se analizaron por WB las proteínas PINK, TOMM22, NDP52, GFP y GAPDH. B) Análisis densitométrico de PINK y NDP52 del fraccionamiento mitocondrial en las condiciones de transfección mencionadas.

Participación de las viroporinas de DENV-2 en la activación del inflammasoma.

Finalmente, como ya se mostró en los resultados previos, el virus dengue es capaz de activar el inflammasoma NLRP3, mostrando activación del complejo desde las 12 horas post-infección. Estos eventos concuerdan perfectamente con los daños mitocondriales presentados, así como con la colocalización de viroporinas con mitocondrias, y con la disminución del potencial de membrana mitocondrial, que es la principal señal de daño para inducir mitofagia en la célula. Con todos los datos presentados, realizamos el siguiente ensayo para demostrar que solo en presencia de la viroporinas NS2A y NS2B se activa el inflammasoma, debido al daño mitocondrial y la generación de ROS que estas proteínas ocasionan en las células infectadas. Se transfectaron células HMEC-1 con diferentes plásmidos que codifican para estas proteínas virales no estructurales de DENV-2 y se evaluó

mediante WB el procesamiento de IL-1B para corroborar la activación del complejo multiproteico. En la figura 27 se muestra la presencia de la forma madura de IL-1B (18 kDa) en presencia únicamente de las dos viroporinas (NS2A y NS2B).

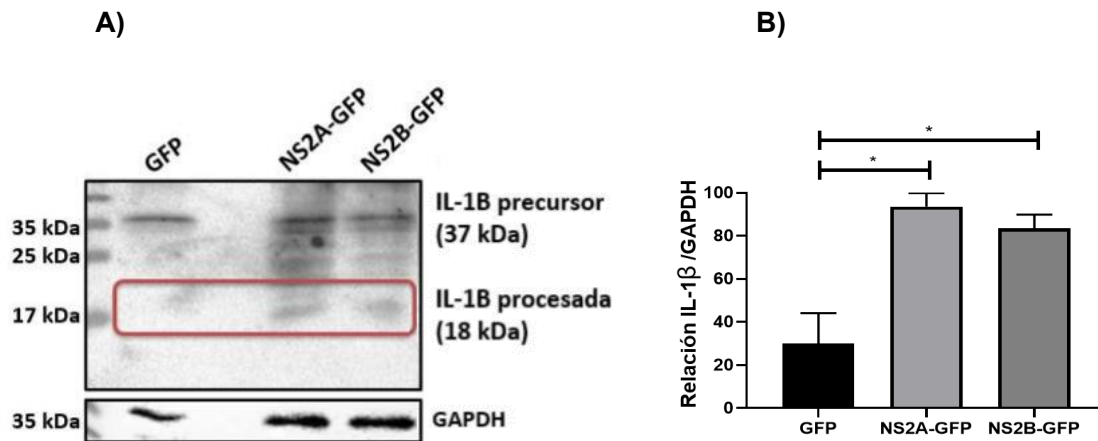


Figura 27. Análisis de la activación del inflamasoma NLRP3 en presencia de las viroporinas de DENV-2. A) Células HMEC-1 transfectadas con los plásmidos para proteínas virales NS2A-GFP y NS2B-GFP por 36 horas, así como con GFP, analizadas por WB para la proteína IL-1B procesada. B) análisis densitométrico de la expresión de IL-1β procesada. Los asteriscos representan datos significativos con valores de $p < 0.05$. ns, diferencia significativa.

DISCUSIÓN

El virus dengue es un virus que activa y altera diversos procesos biológicos en la célula blanco, teniendo como objetivos principales bloquear o inhibir la respuesta inmune, así como favorecer replicación viral, ambos estrechamente relacionados (Kao et al, 2018, Ferrari et al., 2020). Algunos de los mecanismos que se ven alterados ante la infección por DENV-2 incluyen: ciclo celular, tráfico vesicular, apoptosis, metabolismo celular y funciones relacionadas con el sistema inmune, etc (Lee et al., 2005, Vázquez Ochoa et al., 2009, Randall, 2018, Miao et al.,2019).

La autofagia es un proceso con múltiples funciones dentro de la célula, entre ellas el actuar como un elemento de la respuesta inmune, al participar en la eliminación de agentes patógenos, aunque, diversos virus entre ellos DENV-2, son capaces de manipular este mecanismo para favorecer el proceso de replicación, así como evadir el sistema inmune (Khandia et al., 2019, Zhang et al., 2021). La autofagia como proceso de degradación ha adoptado diversos sistemas de eliminación para degradar organelos o componentes de estos en una manera específica (Beese et al., 2020). Algunos de los tipos de autofagia más evaluados son la reticulofagia, peroxifagia, núcleofagia y mitofagia. (Gatica et al., 2018). Este último proceso es de gran relevancia para este estudio debido a antecedentes importantes de nuestro grupo de trabajo sobre la mitocondria y los fenómenos que puede desencadenar (Shrivastava et al., 2020). Previamente, hemos mostrado la inducción de autofagia en un modelo de células endoteliales infectadas con DENV-2 así como la activación del inflammasoma NLRP3, un complejo multiproteico de gran relevancia en la respuesta inmune innata.

Con respecto a la inducción de autofagia, observamos un incremento de los niveles de LC3-II y Beclina, las dos principales proteínas relacionadas a este fenómeno. Se ha reportado que DENV-2 utiliza la autofagia para promover su replicación viral, los mecanismos aún son poco claros, sin embargo, se propone que la degradación de lípidos y triglicéridos incrementa la B-oxidación, proceso que genera alta concentración de ATP, necesario para la replicación viral (Heaton, Randall 2010, Jordan et al., 2016, Nagy et al., 2020). A partir de nuestros resultados podemos

sugerir que los primeros tiempos de infección son clave para generar un microambiente idóneo que permita a DENV-2 replicar eficientemente.

La inducción de autofagia en células endoteliales ha mostrado un papel de gran importancia en el control de la inflamación, principalmente a través de la degradación de moléculas clave de este fenómeno (Netea-Maier et al., 2016). Se ha reportado que una alteración en este mecanismo está relacionada con una excesiva respuesta inflamatoria, desde un incremento en citocinas proinflamatorias hasta un aumento de infiltrado leucocitario, evidenciado por un alto nivel de migración de neutrófilos (Reglero-Real et al., 2012). En infecciones virales, la inducción de autofagia puede ser manipulada para evadir la respuesta inmune, favorecer la patogénesis de la enfermedad y el proceso de replicación (Choi et al. 2018, Mao et al., 2019).

Como parte del análisis de la autofagia en la infección por DENV-2, evaluamos el efecto de la inhibición del inflamasoma sobre la inducción de autofagia. De acuerdo con varios reportes, esperábamos detectar una alteración en la activación de autofagia, dado que se ha sugerido una regulación entre ambos fenómenos (Biasizzo-Kopitar, 2020). No logramos observar tal efecto, lo cual sugiere que el inflamasoma no parece tener un papel en la inducción de autofagia, al menos en la primera etapa de este proceso de degradación. Debido a la complejidad de este crosstalk, no se ha reportado si el inflamasoma pueda degradar algunas proteínas ATG (Chung et al., 2020). Adicional a este análisis, se evaluó el efecto de la inhibición del inflamasoma sobre la replicación viral, encontrando resultados interesantes, como la disminución de la replicación productiva de DENV-2. Este resultado fue contrastante debido a que la activación del inflamasoma por ser un elemento importante de la inmunidad innata sugiere un papel en el control de la infección. Está reportado que el RNA viral desencadena diversas respuestas antivirales e inflamatorias, incluida la activación del inflamasoma en células infectadas. Sin embargo, existen diversos reportes sobre la correlación entre la activación excesiva de inflamasoma AIM2 y NLRP3, con la inmunopatología de la infección por HBV, CHIKV y recientemente SARS-CoV2 (Du et al., 2013, Chen et al., 2019). De manera contraria, se ha reportado que la activación de NLRP3 por

WNV y HCV es importante para el control de la infección (Kumar et al., 2013). En resumen, la activación del inflamasoma ha mostrado brindar cierta protección inmunológica para algunos virus en particular, pero también favorecer la inmunopatología en algunos otros. Con respecto a esto, creemos que es importante considerar el tiempo de infección como un factor clave sobre el papel que juega el inflamasoma en la infección viral. Dado que observamos una mayor activación en tiempos tardíos de la infección, sugerimos que esto se debe al estrés celular acumulado, y a una estrategia viral que favorece al proceso infeccioso. Naturalmente los primeros tiempos de infección son muy importantes para establecer la infección, donde el virus intenta generar un microambiente que le permita replicar de la manera más eficientemente posible. Sabemos que a las 24 y 36 hpi existe una activación incrementada de NLRP3 donde el virus ya realizó diversas rondas exitosas de replicación (Chambers et al., 1990). De acuerdo con esto, creemos que el virus mantiene la activación de NLRP3 disminuida en las primeras horas de infección para poder replicar adecuadamente.

En la inhibición del inflamasoma mostramos que este evento repercute de manera importante en la activación de SREBPs, proteínas clave en la lipogénesis, así como en sus genes blanco como FAS (Shao et al, 2014). Existe evidencia sobre la relación entre estos dos elementos, aunque el mecanismo exacto no está bien descrito. Se ha reportado una activación elevada de SREBP-1 junto con la presencia de marcadores de inflamasoma como IL-1 β , así como NF-KB (Li et al., 2013). Así como una disminución de SREBP-1 cuando se inhibe el inflamasoma mediante RNA de interferencia (Varghese et al., 2019). Se ha sugerido que IL-1 β y caspasa-1 podrían tener un papel en esta regulación (Molla et al., 2020). Está reportado que caspasa-1 podría regular el metabolismo de lípidos de alguna manera, debido a que se ha observado una disminución de triglicéridos en ratones deficientes de caspasa-1 (Kotas et al., 2013). Consideramos que la activación del inflamasoma por DENV-2 en etapas tardías de la infección permite activar estas vías metabólicas que el virus aprovecha para mantener un estado eficiente de infección.

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la capacidad del virus dengue para activar el inflammasoma, como consecuencia de la presencia de ROS y alteraciones en la mitocondria, todo esto probablemente por la actividad de las viroporinas NS2A y NS2B de DENV-2. Partiendo de estos hallazgos, decidimos evaluar el papel del virus dengue en la inducción de mitofagia y subsecuentemente en la activación del inflammasoma, para finalmente analizar el papel de las viroporinas sobre estos eventos. De manera inicial, analizamos lisados totales de células HMEC-1 infectadas con DENV-2 para caracterizar la inducción de mitofagia a través de la expresión de proteínas involucradas en este fenómeno de autofagia específico. Logramos observar un incremento tanto de PARKINA y PINK a las 12 y 24 hpi y un ligero aumento del adaptador NDP52. La regulación transcripcional por parte de DENV-2 es un evento que se ha analizado ampliamente. Existen reportes sobre algunos factores de transcripción que se ven activados ante la infección por dengue y que podrían estar involucrados en los cambios de expresión observados en la cinética de infección. ATF4 es un factor de transcripción (FT) importante en la regulación de PARKINA, se une a un sitio CREB/ATF dentro del promotor de este gen para su activación (Bouman et al, 2011). Este FT asociado con el estrés a proteínas mal plegadas (UPR) se ha visto incrementado desde las 16 horas hasta las 48 hpi en la infección por dengue (Lee et al., 2018). Por lo que consideramos consistente el aumento de los niveles de PARKINA en nuestro modelo de infección. Con respecto a PINK, dos de los principales FTs que regulan su expresión es NRF2 y NFκB, el primero involucrado en coordinar el sistema antioxidante y el segundo ampliamente conocido por su papel en funciones como supervivencia celular y en la respuesta inmune. Ambos FTs se han visto alterados en la infección con DENV-2. Por lo que al igual que con PARKINA consideramos que el incremento de PINK por DENV-2 es un fenómeno estrechamente relacionado. Por su parte, la proteína NDP52 ha sugerido ser regulada por los FTs XBP1, NRF2 y por DDIT3, los cuales, excepto DDIT3 se han evaluado por separado en la infección con dengue, aunque observamos cambios sutiles no descartamos la posibilidad que NDP52 no sea blanco principal de la regulación por DENV-2. Con el fin de conocer si algunos de estos FTs participan en la regulación de la

expresión de los genes relacionados con mitofagia, decidimos evaluar la expresión de NRF2 en las células HMEC-1. Los resultados obtenidos mostraron mayores niveles de expresión al inicio de la infección y menor a las 24 hpi. Debido a que este FTs se ha relacionado con la regulación de PINK y NDP52, creímos que la expresión de NRF2 coincidiría con el comportamiento de PINK y NDP52. Este efecto contrario puede sugerir que la expresión de estas proteínas no está relacionada con la actividad de este factor de transcripción, por lo que tendríamos que analizar otros factores que puedan explicar el incremento de las proteínas relacionadas a mitofagia en presencia de DENV-2. Este resultado, sin embargo, brinda información importante sobre la presencia tan marcada que tienen las ROS en la infección por DENV-2. Se ha demostrado que la disminución de NRF2 promueve un incremento en las ROS a las 24 y 48 hpi con DENV-2, debido a la desregulación que sufre el sistema antioxidante mediado por NRF2 (Ferrari et al., 2020). Este resultado nos provee información importante acerca del porque en la infección con DENV-2 existe un alto nivel de ROS en los tiempos tardíos de la infección, algo que podría ayudar a explicar la activación de fenómenos como el inflammasoma NLRP3.

Continuando con el análisis de las proteínas de mitofagia, proseguimos a evaluar la concentración que sufre PARKINA en las células HMEC-1 infectadas. Los ensayos de IF mostraron que a medida que avanzaba la infección, PARKINA sufría cambios en la localización celular, mostrando una concentración bastante evidente a las 24 hpi, mientras que el control negativo y los primeros tiempos de infección denotaban un patrón generalmente heterogéneo dentro de la célula. Este evento es reportado en aquellas células que sufren mitofagia, debido a la función sobre la mitocondria que desempeña esta proteína, el cual es ubiquitinar moléculas presentes en la membrana externa mitocondrial como una señal de daño para dirigir la eliminación mitocondrial a través de la autofagia (Kim et al., 2013, Jaseey et al., 2019).

Con respecto al primer análisis de WB con PINK, PARKINA y NDP52, es importante resaltar que estos se realizaron en lisados totales y la función específica de estas proteínas ocurren en la mitocondria, por lo que el fraccionamiento mitocondrial nos brinda información más certera acerca de la inducción de este fenómeno. En el fraccionamiento celular pudimos observar niveles mayores de PINK y NDP52 en las

células infectadas con DENV-2 con respecto a las células falsamente infectadas. Dado la función que desempeñan en la mitocondria, consideramos que esta acumulación nos indica de forma más sugerente la inducción del fenómeno. El análisis de PARKINA mostró resultados que coinciden con los observados por IF. Se muestra un mayor enriquecimiento en las fracciones mitocondriales cuando se compara con la fracción citoplasmática, esto en presencia de DENV-2. Diversos estudios han reportado que, ante la inducción de PARKINA, esta proteína se relocaliza desde el citoplasma hacia las zonas mitocondrias para ejercer su actividad, algo que pudimos denotar en los WB de la figura 10C. También se logra apreciar una segunda banda de mayor peso molecular, que según la literatura corresponde a PARKINA en su estado fosforilado mediante la cinasa PINK para activar a la ubiquin ligasa.

El análisis de las diversas alteraciones mitocondriales por DENV-2 es crucial en el estudio de la mitofagia. Comenzamos evaluando la distribución de las redes mitocondriales en células infectadas, observando en el control negativo y en los primeros tiempos de infección un patrón en general homogéneo, visualizando las redes mitocondriales alrededor del núcleo. Sin embargo, conforme avanza la infección es evidente como las redes comienzan a deformarse y a mostrar cierta concentración en alguna región de la célula. Estas alteraciones nos indican acerca del daño mitocondrial que el virus está ocasionando. Algunos de estos cambios han sido también reportados por otros grupos, mostrando un alargamiento en las mitocondrias e inhibiendo la fisión mitocondrial en presencia de DENV-2 (Barbier et al., 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que estos cambios mitocondriales pueden ayudar a favorecer la replicación viral debido a que se alteran plataformas moleculares relacionadas con la respuesta innata dependiente de RIG-1 principalmente (Chatel-Chaix et al., 2016). Fuimos capaces de observar estas alteraciones en tiempos tardíos de la infección, lo cual es consistente con el ciclo viral de DENV-2. Está demostrado que el virus dengue ocasiona un gran estrés celular en diversos organelos como RE y mitocondria, principalmente por la alta tasa de traducción del genoma viral, el cual se lleva a cabo en el RE y sitios cercanos a la mitocondria (Perera et al., 2017, Lee et al., 2018). Además, se ha sugerido que el

daño en la mitocondria inducido por DENV-2 es tal, que afecta las funciones metabólicas (El-Bacha et al., 2007). Finalmente se ha sugerido que varias proteínas virales pueden alterar la integridad membranal de estos organelos, así como disminuir el potencial de membrana, el cual es una señal de daño mitocondrial (Yoshizumi et al., 2016, Shrivastava et al., 2020).

Consideramos también importante el análisis de los tiempos en que ocurren estos eventos en las células infectadas. Es decir, creemos que estas alteraciones mitocondriales ocurren como eventos finales en la infección con DENV.2. Para estos tiempos de infección el virus ya replicó de manera eficiente y existe una concentración muy alta de proteínas virales que pueden alterar este organelo en particular. Para corroborar estos cambios, analizamos por microscopia electrónica células falsamente infectadas e infectadas con DENV-2. Observamos como las mitocondrias en presencia de DENV-2 sufren el alargamiento reportado en otros trabajos, así como una pérdida de crestas mitocondriales. Se ha mostrado la presencia de cambios morfológicos en la mitocondria al llevarse a cabo procesos como la beta-oxidación, provocando un aumento del espacio intermembranal y de la matriz mitocondrial condensada (Toleikis et al., 2020), sin embargo, algunos otros grupos indican que la función mitocondrial puede verse afectada si el organelo sufre cambios muy drásticos en su estructura, como la presencia de poros en la membrana ocasionados por viroporinas (Chatel-Chaix et al., 2016, Barbier et al., 2017). La función mitocondrial es un evento complejo en la infección por DENV-2, dado los reportes que indican un incremento en mecanismos como beta-oxidación para generar energía, así como una alteraciones funcionales de este organelo (Toleikis et al., 2020). Basado en los antecedentes y en nuestros resultados, sugerimos que estos eventos pueden estar ocurriendo de manera secuencial. Consideramos que, en tiempos tardíos de la infección, el estrés ocasionado por altos niveles de proteínas virales provoca un daño severo a la mitocondria, a través de la generación de poros, que eventualmente dañan la función mitocondrial y que podrían estar relacionados con la inducción de mitofagia.

De acuerdo con esto, también pudimos observar la presencia de unas estructuras de apariencia autofagosómicas cercanas a la mitocondria (Eid et al., 2012, De Falco

et al., 2020). Estos hallazgos en conjunto, así como los resultados encontrados sobre SREBP1 nos permite sugerir no solo el daño mitocondrial, si no la posible inducción de mitofagia de acuerdo con datos mostrados con otros grupos de trabajo, donde se sugiere un papel por parte de los lípidos en la acumulación de PINK, lo cual hasta cierto punto tiene sentido, dado que el daño a la membrana mitocondrial podría desestabilizar las plataformas moleculares necesarias para el establecimiento de la maquinaria autofágica (Ivatt- Whitworth et al., 2014).

También sugerimos que los reportes que demuestran otros eventos mitocondriales son la suma de múltiples efectos observados en este organelo, por ello consideramos que la mitocondria es capaz de sufrir diferentes alteraciones que induzcan fusión o mitofagia dependiendo del tiempo de infección, inclusive de manera simultánea en menor o mayor medida, ya que es muy improbable que un solo evento esté ocurriendo debido a la infección por DENV-2, teniendo en cuenta la capacidad de los virus para alterar las células infectadas y múltiples mecanismos a su paso.

Una vez evaluada la inducción de mitofagia ante la infección completa con DENV-2, procedimos a analizar el papel de las dos proteínas virales que nuestro grupo de trabajo ha sugerido como posibles viroporinas. NS2A y NS2B han mostrado tener la capacidad de activar el inflammasoma de una manera dependiente de ROS, también se ha demostrado su capacidad de disminuir el potencial de membrana mitocondria, el cual es una señal de daño que induce mitofagia.

Se evaluó la distribución de las redes mitocondriales en presencia de la proteína NS2A-GFP por IF y por microscopia electrónica diversas alteraciones morfológicas mitocondriales ocasionadas por NS2B-GFP. Observamos que NS2A, al igual que la infección completa induce cierta agregación de la señal mitocondrial en diferentes regiones de la célula, acompañado de una aparente disminución de redes mitocondriales con una pérdida del patrón que las redes generalmente muestran en las células sin transfectar, así como la colocalización de NS2A con mitotracker. La transfección de NS2B por su parte mostró alargamiento y pérdida de crestas mitocondriales. Sugiriendo la evidente capacidad de estas proteínas virales para provocar estas alteraciones en la mitocondria. Existen pocos reportes sobre el

análisis individual de proteínas virales de DENV-2 y su relación con la mitocondria. Se ha mostrado que la proteína NS4A se transloca a la mitocondria para interactuar con la proteína MAVs, molécula esencial en la respuesta antiviral dependiente de RIG-1. NS4A bloquea la señalización mediada por MAVs, inhibiendo de esta manera un importante mecanismo de la respuesta innata (He et al., 2016). Por otro lado, se demostró que la proteína NS4B es capaz de inducir elongación mitocondrial a través de la inhibición de la fisión mitocondrial. NS4B disminuye la expresión de la cinasa CDK1, implicada en fosforilar a la proteína responsable de inducir fisión mitocondrial (Drp1) (Chatel-Chaix et al., 2016). Con respecto a la proteína NS2B, solamente se ha observado su colocalización con TOM20, proteína presente en la membrana externa mitocondrial, y que se ha visto disminuida en presencia de NS2A, lo cual podría indicar también una disminución mitocondrial.

Nuestros resultados obtenidos del análisis mitocondrial por NS2A y NS2B, muestran alteraciones similares inducidas por otras proteínas virales de DENV-2. Esto claramente nos indica su capacidad de inducir daño mitocondrial. Pero además de ello, estas proteínas cuentan con una característica propia de vioporinas, que es la presencia de dominios transmembranales, una propiedad que les permitiría anclarse a diversas membranas e inducir múltiples alteraciones en la célula, como las ya mencionadas (Murray et al., 2008, Zou et al., 2015, León-Juárez et al., 2016, Shrivastava et al., 2017).

Además de esto, se evaluó la participación de la proteína NS2A en la acumulación de PINK y NDP52, observando varios eventos, el primero es la colocalización de la señal correspondiente a NS2A y a la señal de PINK, lo cual concuerda con resultados previos en el sentido de que esta proteína es capaz de localizarse en la mitocondria, muy posiblemente a través de sus dominios transmembranales reportados en vioporinas (Griffin et al. 2015). Con respecto a su distribución, pudimos observar cierta disminución de la señal y unos dots que podrían indicar acumulación de la proteína. Estos dos eventos son muy importantes debido a que la mitofagia comprende de dos fenómenos (Wu et al., 2015). Este evento no ha sido reportado por en la infección con otros flavivirus, debido a que se analiza de manera más profunda la acumulación de PARKINA, pero ambas proteínas son de vital

importancia en la mitofagia (Kim et al., 2013, Huang et al., 2018).

Para la participación de NDP52 en presencia de NS2A, notamos que algunas células transfectadas con una elevada expresión de la proteína viral mostraban disminución muy notoria del adaptador autofágico, esto podría sugerir de acuerdo con otros reportes que los autofagosomas que NDP52 está reconociendo a través de su dominio de unión a LC3 están siendo degradados (Padman et al., 2019).

Para terminar de corroborar la inducción de mitofagia por NS2A, realizamos un fraccionamiento mitocondrial que nos permitió observar efectos similares a la infección completa con DENV-2. La acumulación de PINK en la mitocondria fue un evento consistente en nuestro análisis. Por ello, a pesar de que la mitofagia es un fenómeno poco explorado por viroporinas, consideramos que de acuerdo con sus características fisicoquímicas y a las alteraciones en la mitocondria que este tipo de proteínas son capaces de provocar, particularmente NS2A puede inducir mitofagia en las células HMEC-1.

Finalmente, con respecto a la activación del inflammasoma a través de NS2A y NS2B, a pesar de las limitaciones con la evaluación de ambas proteínas en todos los análisis, pudimos observar la activación del inflammasoma en una manera dependiente de estas viroporinas. Para la activación del inflammasoma se han reportado diversos estímulos y señales que son capaces de ensamblar el complejo, como algunas viroporinas o la presencia de ROS (Germain et al., 2014, Chen et al., 2019). Interesantemente las viroporinas son capaces de inducir una gran concentración de estas moléculas reactivas a través de la generación de poros en membranas de organelos como mitocondria y RE (León-Juárez et al., 2016, Shrivastava et al., 2020). La mitocondria, además de estar muy implicada en la activación del inflammasoma, también es un organelo clave en la generación de ROS (Dunn et al., 2015, Kaypa et al., 2016). El daño a la membrana mitocondrial y la presencia de proteínas de mitofagia son fenómenos que sugieren fuertemente la inducción de mitofagia (Gomes et al., 2013, Rimessi et al., 2013, Nguyen et al., 2016). Analizando todos estos eventos mencionados, consideramos de manera reiterativa la relación entre estos fenómenos. Las viroporinas son capaces de alterar la estabilidad de la membrana mitocondrial, favoreciendo con ello la salida de ROS,

necesarias para la activación del inflamasoma, adicional a esto, si el daño ocasionado es tan grande, estos organelos serían incapaces de reparar las alteraciones, ya sea a través de fusión mitocondrial u otros eventos, por lo que la inducción de mitofagia tendría lugar en aquellas células con un alto nivel de estrés celular provocado por el DENV-2 o de manera específica por las viroporinas NS2A y NS2B.

CONCLUSIONES

El virus dengue es capaz de ocasionar un severo daño a la mitocondria, activando vías lipídicas (dependiente de SREBP) que podrían promover un evento de mitofagia, algo que evidenciamos por la presencia de proteínas mitofágicas en la mitocondria (PINK, PARKINA y NDP52) y por mitocondrias dañadas acompañadas de estructuras de apariencia autofagosómicas. De igual manera nuestro grupo de trabajo evidenció la participación de ROS en la activación del inflammasoma en presencia de las vioporinas NS2A y NS2B.

Con base en estos hechos, sugerimos que todos estos eventos son factores importantes que activan el inflammasoma NLRP3 en una manera dependiente de las proteínas virales NS2A y NS2B de DENV-2.

PERSPECTIVAS

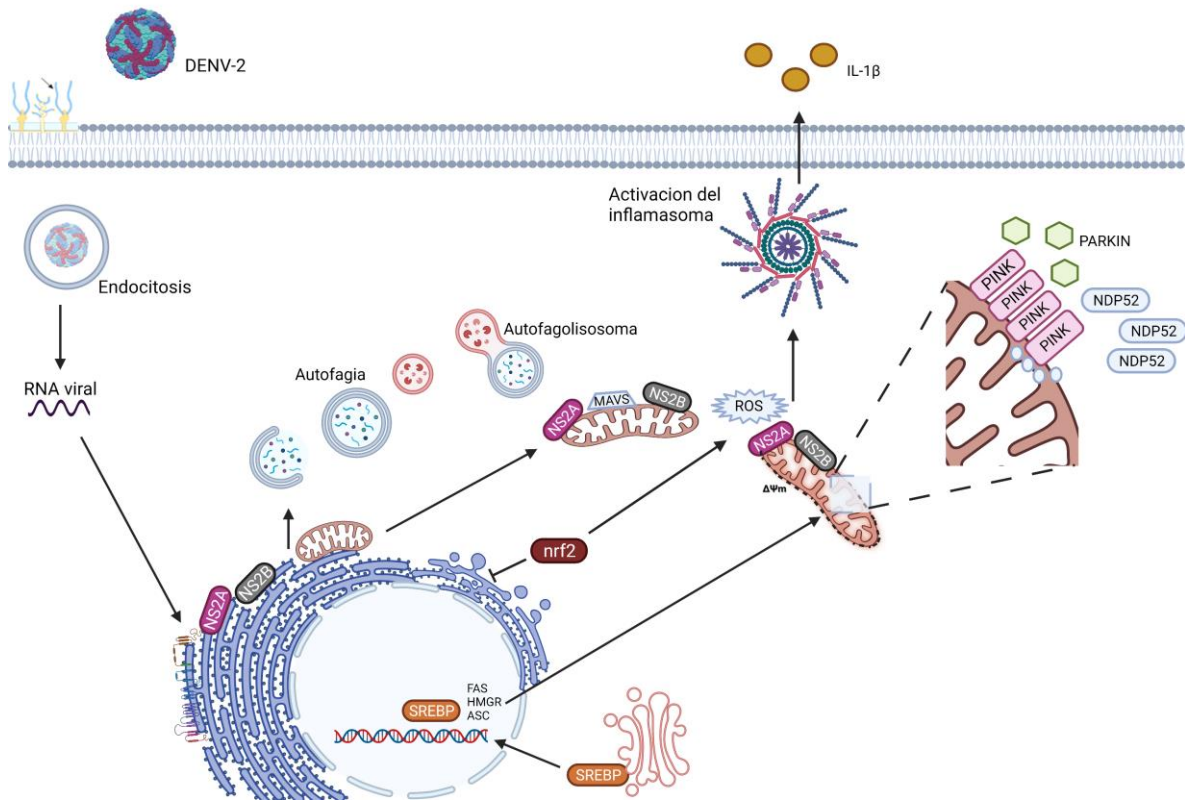
Corroborar la presencia de NS2A en la mitocondria mediante microscopia electrónica y su participación en el alargamiento mitocondrial.

Corroborar la presencia entre elementos de autofagia con elemento de mitofagia, mediante IF, microscopia electrónica (mediante marcaje de proteínas).

Evaluar la participación de las proteínas SREBP en la inducción de mitofagia mediada por DENV-2 a través de inhibición de SREBP.

Evaluar la participación de IL-1 β e IL-18 en el metabolismo de lípidos y su relación con el daño mitocondrial.

MODELO CELULAR



Infección viral de células endoteliales con DENV-2. Una vez que el virus ingresa a la célula blanco desencadena diversos fenómenos celulares, como la activación de autofagia que se ha descrito como un proceso proviral. De manera subsecuente ocurre la replicación viral y traducción de proteínas virales. Esto permite la activación de vías y mecanismos como el procesamiento de SREBPs, proteínas clave en la lipogénesis y asociadas con la inducción de mitofagia. De manera simultánea las proteínas hidrofóbicas NS2A y NS2B (probables vioporinas) han mostrado estar presentes en las mitocondrias, provocando diversas alteraciones como, alargamiento mitocondrial, disminución del potencial de membrana, etc. Estos cambios mitocondriales han sido asociados a la inducción de mitofagia, demostrando la acumulación de diversas proteínas en la mitocondria, como PINK, PARKINA y el adaptador autofágico NDP52, proteínas clave en la mitofagia. En los tiempos tardíos de la infección hemos encontrado una disminución del factor de transcripción NRF2, implicado en el sistema antioxidante de la célula, lo cual coincide con los altos niveles de ROS presentes en la célula infectada.

Finalmente, debido al daño severo en las mitocondrias que provoca una liberación excesiva de ROS y diversos iones, mostramos la capacidad de DENV-2 y las proteínas NS2A y NS2B para activar el inflammasoma NLRP3, induciendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1β e IL-18.

REFERENCIAS

1. Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 167.
2. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N.117 (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>).
3. Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta tropica*, 166, 155–163.
4. Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16055.
5. Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., Spannaus, R., Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., & Bodem, J. (2015). Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(2), 1100–1109.
6. Junjhon, J., Pennington, J. G., Edwards, T. J., Perera, R., Lanman, J., & Kuhn, R. J. (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of virology*, 88(9), 4687–4697.
7. Lescar, J., Soh, S., Lee, L. T., Vasudevan, S. G., Kang, C., & Lim, S. P. (2018). The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 1062, 115–129.
8. Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8), 829.
9. Egloff, M. P., Decroly, E., Malet, H., Selisko, B., Benarroch, D., Ferron, F., & Canard, B. (2007). Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *Journal of molecular biology*, 372(3), 723–736.
10. Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 25(5), 6–15.
11. Fahimi, H., Mohammadipour, M., Haddad Kashani, H., Parvini, F., &

- Sadeghizadeh, M. (2018). Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(7), 2977–2996.
12. Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature reviews. Immunology*, 15(12), 745–759.
 13. Lin, R. J., Lee, T. H., & Leo, Y. S. (2017). Dengue in the elderly: a review. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(8), 729–735.
 14. Shah, M., Wadood, A., Rahman, Z., & Husnain, T. (2013). Interaction and inhibition of dengue envelope glycoprotein with mammalian receptor DC-sign, an in-silico approach. *PloS one*, 8(3), e59211.
 15. Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual review of virology*, 3(1), 263–281.
 16. Xia, H., Xie, X., Zou, J., Noble, C. G., Russell, W. K., Holthausen, L., Choi, K. H., White, M. A., & Shi, P. Y. (2020). A cocrystal structure of dengue capsid protein in complex of inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(30), 17992–18001.
 17. Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews*, 39(2), 155–170.
 18. Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1830–1834.
 19. Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S., & Zhou, Z. H. (2013). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature structural & molecular biology*, 20(1), 105–110.
 20. Meng, F., Badierah, R. A., Almehdar, H. A., Redwan, E. M., Kurgan, L., & Uversky, V. N. (2015). Unstructural biology of the Dengue virus proteins. *The FEBS journal*, 282(17), 3368–3394.
 21. Chen, H. R., Lai, Y. C., & Yeh, T. M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of biomedical science*, 25(1), 58.
 22. Singh, S., Anupriya, M. G., Modak, A., & Sreekumar, E. (2018). Dengue virus or NS1 protein induces trans-endothelial cell permeability associated with VE-

Cadherin and RhoA phosphorylation in HMEC-1 cells preventable by Angiopoietin-1. *The Journal of general virology*, 99(12), 1658–1670.

23. Chen, H. R., Chao, C. H., Liu, C. C., Ho, T. S., Tsai, H. P., Perng, G. C., Lin, Y. S., Wang, J. R., & Yeh, T. M. (2018). Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability. *PLoS pathogens*, 14(4), e1007033.
24. Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., Popov, V. L., Chen, X., Wang, Q. Y., Dong, H., & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell host & microbe*, 26(5), 606–622.e8.
25. Nemésio, H., & Villalaín, J. (2014). Membrane interacting regions of Dengue virus NS2A protein. *The journal of physical chemistry. B*, 118(34), 10142–10155.
26. 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), e00553-15.
27. Shrivastava, G., García-Cordero, J., León-Juárez, M., Oza, G., Tapia-Ramírez, J., Villegas-Sepulveda, N. and Cedillo-Barrón, L., 2017. NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence*, 8(7), pp.1450-1456.
28. Tomar, P., Oren, R., Krugliak, M., & Arkin, I. T. (2019). Potential Viroporin Candidates From Pathogenic Viruses Using Bacteria-Based Bioassays. *Viruses*, 11(7), 632.
29. León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., Shrivastava, G., García-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragón-Castelán, M., Mondragón-Flores, R., & Cedillo-Barrón, L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology journal*, 13, 1.
30. Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2020). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of medical virology*, 92(8), 941–955.
31. Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., Spannaus, R., Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., & Bodem, J. (2015). Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(2), 1100–1109.

32. Zou, J., Xie, X., Wang, Q. Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P. Y. (2015). Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *Journal of virology*, 89(7), 3455–3470.
33. Gopala Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochemical pharmacology*, 154, 54–63.
34. Chatel-Chaix, L., Fischl, W., Scaturro, P., Cortese, M., Kallis, S., Bartenschlager, M., Fischer, B., & Bartenschlager, R. (2015). A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *Journal of virology*, 89(14), 7170–7186.
35. Zmurko, J., Neyts, J., & Dallmeier, K. (2015). Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Reviews in medical virology*, 25(4), 205–223.
36. Lim, S. P., Noble, C. G., & Shi, P. Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral research*, 119, 57–67.
37. Zhao, Y., Soh, T. S., Zheng, J., Chan, K. W., Phoo, W. W., Lee, C. C., Tay, M. Y., Swaminathan, K., Cornvik, T. C., Lim, S. P., Shi, P. Y., Lescar, J., Vasudevan, S. G., & Luo, D. (2015). A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004682.
38. Klema, V. J., Ye, M., Hindupur, A., Teramoto, T., Gottipati, K., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS pathogens*, 12(2), e1005451.
39. Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., Filgueira, L., Marovich, M. A., Wong, H. K., Blauvelt, A., Murphy, G. S., Robb, M. L., Innes, B. L., Birx, D. L., Hayes, C. G., & Frankel, S. S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*, 6(7), 816–820.
40. Bustos-Arriaga, J., Mita-Mendoza, N. K., Lopez-Gonzalez, M., García-Cordero, J., Juárez-Delgado, F. J., Gromowski, G. D., Méndez-Cruz, R. A., Fairhurst, R. M., Whitehead, S. S., & Cedillo-Barrón, L. (2016). Soluble mediators produced by the crosstalk between microvascular endothelial cells

- and dengue-infected primary dermal fibroblasts inhibit dengue virus replication and increase leukocyte transmigration. *Immunologic research*, 64(2), 392–403.
41. Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews. Microbiology*, 5(7), 518–528.
 - Brand, C., Bisailon, M., & Geiss, B. J. (2017). Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(6), 10.1002/wrna.1437.
 42. You, S., Falgout, B., Markoff, L., & Padmanabhan, R. (2001). In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), 15581–15591. 91.
 43. Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & molecular biology letters*, 21, 29.
 - Rodges et al., 2014. Regulation Where Autophagy Intersects the Inflammasome. *Antioxidants & Redox Signaling* Vol. 20, No. 3.
 44. Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2015). Autophagy and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 125(1), 65–74.
 45. Rathinam, V. A., & Fitzgerald, K. A. (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*, 165(4), 792–800.
 46. Mathew, A., & Rothman, A. L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*, 225, 300–313.
 - Wu, M. F., Chen, S. T., Yang, A. H., Lin, W. W., Lin, Y. L., Chen, N. J., Tsai, I. S., Li, L., & Hsieh, S. L. (2013). CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*, 121(1), 95–106.
 47. Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews. Microbiology*, 5(7), 518–528.
 48. Bäck, A. T., & Lundkvist, A. (2013). Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*, 3, 10.3402/iee.v3i0.19839.
 49. Chiramel, A. I., Brady, N. R., & Bartenschlager, R. (2013). Divergent roles of autophagy in virus infection. *Cells*, 2(1), 83–104.
 50. Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*, 162(3), 488–492.

- McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *The Journal of biological chemistry*, 286(25), 22147–22159.
51. Yuk, J. M., & Jo, E. K. (2013). Crosstalk between autophagy and inflammasomes. *Molecules and cells*, 36(5), 393–399.
52. Jackson W. T. (2015). Viruses and the autophagy pathway. *Virology*, 479-480, 450–456.
53. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19(21), 5720–5728.
54. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 107–132.
55. Shi, C. S., Shenderov, K., Huang, N. N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., Sher, A., & Kehrl, J. H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology*, 13(3), 255–263.
56. Hamasaki, M., & Yoshimori, T. (2010). Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS letters*, 584(7), 1296–1301.
57. Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., & Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), 389–393.
58. Randall-Demllo, S., Chieppa, M., & Eri, R. (2013). Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Frontiers in immunology*, 4, 301.
59. Gallagher, L. E., Williamson, L. E., & Chan, E. Y. (2016). *Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms*. *Cells*, 5(2), 24.
60. Kanneganti T. D. (2010). Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature reviews. Immunology*, 10(10), 688–698.
61. Chen, I. Y., & Ichinohe, T. (2015). Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends in microbiology*, 23(1), 55–63.
62. Kuo, C. C., Lin, W. T., Liang, C. M., & Liang, S. M. (2006). Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(10), 5943–5949.
63. Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*, 21(7), 677–687.

64. Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., & Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox biology*, 4, 296–307.
65. Jo, E. K., Kim, J. K., Shin, D. M., & Sasakawa, C. (2016). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*, 13(2), 148–159.
66. Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology*, 13(6), 397–411.
67. Lupfer, C., & Kanneganti, T. D. (2013). The expanding role of NLRs in antiviral immunity. *Immunological reviews*, 255(1), 13–24.
68. Diehl, N., & Schaal, H. (2013). Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses*, 5(12), 3192–3212.
69. Liao, P. C., Chao, L. K., Chou, J. C., Dong, W. C., Lin, C. N., Lin, C. Y., Chen, A., Ka, S. M., Ho, C. L., & Hua, K. F. (2013). Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1 β secretion. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 62(1), 89–96.
70. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation, and immunity. (2014). *Nat Rev Immunol* 13, 722–737.
71. 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.
72. Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–832.
73. Jaber, N., & Zong, W. X. (2013). Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1280, 48–51.
74. Diehl, N., & Schaal, H. (2013). Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses*, 5(12), 3192–3212.
75. Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*, 4(3),

166–175.

76. Ichinohe et al. (2010). Influenza virus activates inflammasomes through intracellular M2 channel. *Nat Immunol*; 11(5): 404–410.
77. Xing, Y., Cao, R., & Hu, H. M. (2016). TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (DRibbles). *Cell death & disease*, 7(8), e2322.
78. Lee, H. K., & Iwasaki, A. (2008). Autophagy and antiviral immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1), 23–29.
79. Baroja-Mazo, A., Martín-Sánchez, F., Gomez, A. I., Martínez, C. M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barberà-Cremades, M., Yagüe, J., Ruiz-Ortiz, E., Antón, J., Buján, S., Couillin, I., Brough, D., Arostegui, J. I., & Pelegrín, P. (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature immunology*, 15(8), 738–748
80. Lee, Y. R., Lei, H. Y., Liu, M. T., Wang, J. R., Chen, S. H., Jiang-Shieh, Y. F., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., & Liu, H. S. (2008). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology*, 374(2), 240–248.
81. Saitoh- Akira, (2016). Regulation of inflammasomes by autophagy. *J Allergy Clin Immunol*; 138(1):28-36.
82. Saitoh, T., Akira, S., (2016). Regulation of inflammasomes by autophagy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 28–36.
83. Virgin HW, Levine B. (2009). Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol*; 10:461–47.
84. Zhang, R., Chi, X., Wang, S., Qi, B., Yu, X., & Chen, J. L. (2014). The regulation of autophagy by influenza A virus. *BioMed research international*, 2014, 498083.
85. Lin, R. J., Lee, T. H., & Leo, Y. S. (2017). Dengue in the elderly: a review. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(8), 729–735.
86. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol.* 2021 Jan;78(1):17-32. doi: 10.1007/s00284-020-02284-w. Epub 2020 Nov 24.
87. Acharya B, Gyeltshen S, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Significance of Autophagy in Dengue Virus Infection: A Brief Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Apr;100(4):783-790. doi: 10.4269/ajtmh.18-0761.

88. Zonetti LFC, Coutinho MC, de Araujo AS. Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review. *Protein Pept Lett.* 2018;25(8):712-719. doi: 10.2174/0929866525666180709115506.
89. Nasar S, Rashid N, Iftikhar S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *J Med Virol.* 2020 Aug;92(8):941-955. doi: 10.1002/jmv.25646.
90. Lo YL, Liou GG, Lyu JH, Hsiao M, Hsu TL, Wong CH. Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex. *PLoS One.* 2016 Nov 10;11(11):e0166474. doi: 10.1371/journal.pone.0166474.
91. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 2015 Mar;39(2):155-70. doi: 10.1093/femsre/fuu004.
92. Vicenzi E, Pagani I, Ghezzi S, Taylor SL, Rudd TR, Lima MA, Skidmore MA, Yates EA. Subverting the mechanisms of cell death: flavivirus manipulation of host cell responses to infection. *Biochem Soc Trans.* 2018 Jun 19;46(3):609-617. doi: 10.1042/BST20170399.
93. Khandia R, Dadar M, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Yattoo MI, Iqbal HMN, Singh KP, Joshi SK, Chaicumpa W. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells.* 2019 Jul 3;8(7):674. doi: 10.3390/cells8070674.
94. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2; 85:685-713. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014556.
95. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Dec;72(24):4721-57. doi: 10.1007/s00018-015-2034-8.
96. Zhang S, Hama Y, Mizushima N. The evolution of autophagy proteins - diversification in eukaryotes and potential ancestors in prokaryotes. *J Cell Sci.* 2021 Jul 1;134(13): jcs233742. doi: 10.1242/jcs.233742.

97. Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov.* 2020 May 26;6(1):32. doi: 10.1038/s41421-020-0161-3.
98. Abdoli A, Alirezaei M, Mehrbod P, Forouzanfar F. Autophagy: The multi-purpose bridge in viral infections and host cells. *Rev Med Virol.* 2018 Jul;28(4): e1973. doi: 10.1002/rmv.1973.
99. Chen HR, Lai YC, Yeh TM. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *J Biomed Sci.* 2018 Jul 24;25(1):58.
100. Norazharuddin H, Lai NS. Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. *Malays J Med Sci.* 2018;25(5):6-15. doi:10.21315/mjms2018.25.5.2.
101. Tomar PPS, Oren R, Krugliak M, Arkin IT. Potential Viroporin Candidates From Pathogenic Viruses Using Bacteria-Based Bioassays. *Viruses.* 2019 Jul 9;11(7):632.
102. Miao M, Yu F, Wang D, Tong Y, Yang L, Xu J, Qiu Y, Zhou X, Zhao X. Proteomics Profiling of Host Cell Response via Protein Expression and Phosphorylation upon Dengue Virus Infection. *Virol Sin.* 2019 Oct;34(5):549-562.
103. Xiaoyu Tian, Junlin Teng & Jianguo Chen (2021) New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion, *Autophagy*, 17:10, 2680-2688.
104. Wang Y, Li L, Hou C, et al. SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 60:97-104.
105. Shi, CS., Shenderov, K., Huang, NN. *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* **13**, 255–263 (2012).
106. Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M. et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* 2, 17037 (2017).
107. Sun, B., Sundström, K. B., Chew, J. J., Bist, P., Gan, E. S., Tan, H. C.,

- Goh, K. C., Chawla, T., Tang, C. K., & Ooi, E. E. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Scientific reports*, 7(1), 3594.
108. Jalily PH, Eldstrom J, Miller SC, Kwan DC, Tai SS, Chou D, Niikura M, Tietjen I, Fedida D. Mechanisms of Action of Novel Influenza A/M2 Viroporin Inhibitors Derived from Hexamethylene Amiloride. *Mol Pharmacol*.
109. Farag NS, Breitingen U, Breitingen HG, El Azizi MA. Viroporins and inflammasomes: A key to understand virus-induced inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020; 122:105738.
110. Liang JJ, Fraser IDC, Bryant CE. Lipid regulation of NLRP3 inflammasome activity through organelle stress. *Trends Immunol*. 2021 Sep;42(9):807-823.
111. Zhou Y, Tong Z, Jiang S, Zheng W, Zhao J, Zhou X. The Roles of Endoplasmic Reticulum in NLRP3 Inflammasome Activation. *Cells*. 2020 May 14;9(5):1219.
112. Shao W, Espenshade PJ. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage regulates Golgi-to-endoplasmic reticulum recycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *J Biol Chem*. 2014;289(11):7547-7557.
113. Lee, Jae-Ho et al. "SREBP-1a-stimulated lipid synthesis is required for macrophage phagocytosis downstream of TLR4-directed mTORC1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 115,52 (2018).
114. Guo C, Chi Z, Jiang D, Xu T, Yu W, Wang Z, Chen S, Zhang L, Liu Q, Guo X, Zhang X, Li W, Lu L, Wu Y, Song BL, Wang D. Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages. *Immunity*. 2018 Nov 20;49(5):842-856.e7.
115. Surasombatpattana P, Hamel R, Patramool S, Luplertlop N, Thomas F, Desprès P, Briant L, Yssel H, Missé D. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infect Genet Evol*. 2011 Oct;11(7):1664-73.
116. Huang SC, Chang CL, Wang PS, Tsai Y, Liu HS. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J*

Med Virol. 2009 Jul;81(7):1241-52.

117. Wu Y, Cui L, Zhu E, Zhou W, Wang Q, Wu X, Wu B, Huang Y, Liu HJ. Muscovy duck reovirus σ NS protein triggers autophagy enhancing virus replication. *Virology*. 2017 Mar 14;14(1):53.
118. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG and Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 2000; 6(7): 816- 820.
119. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis*. 2013 Nov;33(4):301-11.
120. Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 2008 Mar 28;319(5871):1830-4.
121. Jeon M, Park J, Yang E, Baek HJ, Kim H. Regulation of autophagy by protein methylation and acetylation in cancer. *J Cell Physiol*. 2021 Jul 8.
122. Ferrari, M., Zevini, A., Palermo, E., Muscolini, M., Alexandridi, M., Etna, M. P., Coccia, E. M., Fernandez-Sesma, A., Coyne, C., Zhang, D. D., Marques, E., Olganier, D., & Hiscott, J. (2020). Dengue Virus Targets Nrf2 for NS2B3-Mediated Degradation Leading to Enhanced Oxidative Stress and Viral Replication. *Journal of virology*, 94(24), e01551-20.
123. Nagy PD, Lin W. Taking over Cellular Energy-Metabolism for TBSV Replication: The High ATP Requirement of an RNA Virus within the Viral Replication Organelle. *Viruses*. 2020 Jan 3;12(1):56. doi: 10.3390/v12010056. PMID: 31947719; PMCID: PMC7019945.
124. Jordan, T. X., & Randall, G. (2016). Flavivirus modulation of cellular metabolism. *Current opinion in virology*, 19, 7–10.
125. Chung, C., Seo, W., Silwal, P., & Jo, E. K. (2020). Crosstalks between inflammasome and autophagy in cancer. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 100.
126. Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Front Immunol*. 2020 Oct 9; 11:591803. doi:

10.3389/fimmu.2020.591803. PMID: 33163006; PMCID: PMC7583715.

127. Du W, Zhen J, Zheng Z, Ma S, Chen S. Expression of AIM2 is high and correlated with inflammation in hepatitis B virus associated glomerulonephritis. *J Inflamm (Lond)*. 2013 Dec 10;10(1):37. doi: 10.1186/1476-9255-10-37. PMID: 24325587; PMCID: PMC4028891.
128. Kumar M, Roe K, Orillo B, Muruve DA, Nerurkar VR, Gale M Jr, Verma S. Inflammasome adaptor protein Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in west Nile virus encephalitis. *J Virol*. 2013 Apr;87(7):3655-67. doi: 10.1128/JVI.02667-12. Epub 2013 Jan 9. Erratum in: *J Virol*. 2018 Jul 17;92(15): PMID: 23302887; PMCID: PMC3624239.
129. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990; 44:649-88. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245. PMID: 2174669.
130. Li, Y., Xu, S., Jiang, B., Cohen, R. A., & Zang, M. (2013). Activation of sterol regulatory element binding protein and NLRP3 inflammasome in atherosclerotic lesion development in diabetic pigs. *PloS one*, 8(6), e67532.
131. Molla, MD, Ayelign, B., Dessie, G. et al. Caspasa-1 como molécula reguladora del metabolismo de los lípidos. *Lípidos Salud Dis* 19, 34 (2020).
132. Lee, Y. R., Kuo, S. H., Lin, C. Y., Fu, P. J., Lin, Y. S., Yeh, T. M., & Liu, H. S. (2018). Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 8(1), 489.
133. Perera N, Miller JL, Zitzmann N. The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2017 May;19(5). doi: 10.1111/cmi.12734. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28207988.
134. Yoshizumi T, Yasukawa K, Koshiba T. [Interaction between Viral Proteins and Mitochondria]. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2016 Aug;107(8):148-54. Japanese. PMID: 29227063.
135. Eid N, Ito Y, Otsuki Y. Enhanced mitophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats: morphological evidence and clinical relevance. *J Mol Histol*. 2012 Feb;43(1):71-80. doi: 10.1007/s10735-011-9372-0. Epub 2011 Nov 11. PMID: 22076330.

136. De Falco F, Gentile I, Cerino P, Cutarelli A, Catoi C, Roperto S. Prohibitin 2 is Involved in Parkin-Mediated Mitophagy in Urothelial Cells of Cattle Infected with Bovine Papillomavirus. *Pathogens*. 2020 Jul 29;9(8):621.
137. 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. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. *J Virol*. 2016 Jul 27;90(16):7219-7230.
138. Zou J, Xie X, Wang QY, Dong H, Lee MY, Kang C, Yuan Z, Shi PY. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J Virol*. 2015 Apr;89(7):3455-70.
139. murrayMurray, C., Jones, C. & Rice, C. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6, 699–708 (2008).
140. Shrivastava, G., García-Cordero, J., León-Juárez, M., Oza, G., Tapia-Ramírez, J., Villegas-Sepulveda, N. and Cedillo-Barrón, L., 2017. NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence*, 8(7), pp.1450-1456.
141. Scott, C. and Griffin, S., 2015. Viroporins: structure, function, and potential as antiviral targets. *Journal of General Virology*, 96(8), pp.2000-2027
142. Chen, I.Y., Moriyama, M., Chang, M.F. and Ichinohe, T., 2019. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Frontiers in microbiology*, 10, p.50.
143. Ivatt, R. M., & Whitworth, A. J. 2014. SREBF1 links lipogenesis to mitophagy and sporadic Parkinson disease. *Autophagy*, 10(8), 1476–1477.
144. Ivatt, R. M., Sanchez-Martinez, A., Godena, V. K., Brown, S., Ziviani, E., & Whitworth, A. J. 2014. Genome-wide RNAi screen identifies the Parkinson disease GWAS risk locus SREBF1 as a regulator of mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8494–8499.
145. Toleikis, A., Trumbeckaite, S., Liobikas, J., Pauziene, N., Kursvietiene, L., & Kopustinskiene, D. M. (2020). Fatty Acid Oxidation and Mitochondrial Morphology Changes as Key Modulators of the Affinity for ADP in Rat Heart Mitochondria. *Cells*, 9(2), 340.

146. Choi, Y., Bowman, J. W., & Jung, J. U. (2018). Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nature reviews. Microbiology*, 16(6), 341–354.
147. Netea-Maier, R. T., Plantinga, T. S., van de Veerdonk, F. L., Smit, J. W., & Netea, M. G. (2016). Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*, 12(2), 245–260.
148. Mao, J., Lin, E., He, L., Yu, J., Tan, P., & Zhou, Y. (2019). Autophagy and Viral Infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 1209, 55–78.
149. Reglero-Real, N., Pérez-Gutiérrez, L., Yoshimura, A., Rolas, L., Garrido-Mesa, J., Barkaway, A., Pickworth, C., Saleeb, R. S., Gonzalez-Nuñez, M., Austin-Williams, S. N., Cooper, D., Vázquez-Martínez, L., Fu, T., De Rossi, G., Golding, M., Voisin, M. B., Boulanger, C. M., Kubota, Y., Muller, W. A., Tooze, S. A., ... Nourshargh, S. (2021). Autophagy modulates endothelial junctions to restrain neutrophil diapedesis during inflammation. *Immunity*, 54(9), 1989–2004.e9.