



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA RIBOSOMAL L26 EN LA REPLICACIÓN
DE LOS VIRUS DEL DENGUE Y DEL ZIKA”**

TESIS

Que presenta:

M.D. FERNANDO RODRÍGUEZ LEÓN

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Director de tesis:

DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN

Ciudad de México

Agosto, 2022

COMITÉ ASESOR

Dra. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN

Dra. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, en el laboratorio número 10 bajo la dirección del Doctor Juan Ernesto Ludert León.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría: número de registro CVU 1077021 y número de matrícula del CINVESTAV 201220003.

Agradezco a CONACYT por el apoyo mediante la beca de maestría y la oportunidad de obtener una maestría en ciencias dentro del Padrón Nacional de Posgrado de Calidad.

DEDICATORIA

A mis padres; Ing. Fernando Enrique Rodríguez Burguete (QEPD) y Lic. Maricela León Cruz, quienes siempre han sabido cómo y cuándo orientarme, apoyándome en los buenos y malos momentos mediante su amor y comprensión. Los amo con todo mi corazón, son y serán lo más importante de mi vida.

A mi pareja, el Dr. Mario Velasco Córdoba, quien llegó a mi vida en el momento menos esperado, siempre a mi lado como mi compañero de aventuras y motivándome en cada paso de mi vida personal y profesional. Eres luz en mi vida, te amo.

Es por ello que les ofrezco este trabajo, fruto de todo mi esfuerzo. Espero se sientan orgullosos de mi desempeño. Siempre están en mi mente y corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la vida, que es hermosa, y una de las características principales de tal hermosura es que la podemos compartir con quienes queremos. El ser humano es sociable por naturaleza y, debido a esta interacción, es que podemos apoyar y ser apoyados y guiados por nuestro camino; es gracias al apoyo de las extraordinarias personas que forman parte de mi vida que he podido realizar este proyecto de investigación.

A mi familia, por siempre estar, apoyarme y motivarme constantemente para cumplir mis metas y sueños. Una mención especial a mi primo-hermano, el Dr. Rodrigo Bravo León, a quien agradezco su comprensión y respaldo.

A mi director de tesis, Dr. Juan Ernesto Ludert León, en quien no solo he encontrado a un mentor, sino a un amigo. Gracias por aceptarme, por su paciencia, comprensión e instrucción. Lo admiro mucho.

A mis asesoras, Dra. Ana Lorena Gutiérrez y Dra. Rosa María del Ángel. Gracias por sus consejos y sugerencias dentro del desarrollo de este proyecto. Gracias Dra. Lorena por sus consejos personales y profesionales, la quiero mucho.

Al Dr. Raymundo Cruz Pérez, por sus constantes consejos y enseñanzas. Asimismo, gracias a Óscar e Irmita, por todo el apoyo brindado.

Al Colegio de Profesores del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por los consejos, sugerencias, enseñanzas y apoyo durante mi maestría.

Al Dr. Gerson Isaac Caraballo Hernández, por guiarme y apoyarme cada vez que lo necesité. Gracias amigo.

A mis amigos y compañeros: los M. en C. Arely, Juan, Adán, César, Ángel, Yoatzin, Jesús, Dayana, Elena, Irving, Carlos, Noé, Sharon, Carolina, Adriana; y a los futuros M. en C. Itzel, Magda, Marcos, Rodolfo y Ricardo; gracias por sus constantes consejos y muestras de apoyo. Un agradecimiento especial a la Dra. Mercedes Viettri Pinto, quien estuvo conmigo desde el primer día como mi guía, gracias por tu paciencia y el conocimiento que me has transmitido, te quiero mucho.

A todos aquellos miembros del departamento: compañeros, técnicos, auxiliares y asistentes; quienes me han apoyado y aconsejado en diversas ocasiones.

A mis mejores amigos, quienes a pesar del tiempo y la distancia siempre están ahí.

ÍNDICE

COMITÉ ASESOR	II
FINANCIAMIENTO	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 ARBOVIRUS	- 1 -
1.2 FLAVIVIRUS	- 1 -
1.2.1 <i>Flavivirus DENV y ZIKV</i>	- 2 -
1.2.2 <i>Dengue</i>	- 3 -
1.2.3 <i>Zika</i>	- 4 -
1.3 BIOLOGÍA MOLECULAR Y CICLO REPLICATIVO DE LOS FLAVIVIRUS	- 6 -
1.3.1 <i>Proteína no estructural 1 (NS1)</i>	- 10 -
1.3.2 <i>Proteínas ribosomales y su interacción con los virus</i>	- 13 -
1.3.3 <i>Proteínas ribosomales y su interacción con NS1 de DENV</i>	- 14 -
1.4 PROTEÍNA RIBOSOMAL L26 (RPL26)	- 14 -
II. JUSTIFICACIÓN	- 17 -
III. HIPÓTESIS	- 18 -
IV. OBJETIVOS	- 19 -
4.1 GENERAL	- 19 -
4.2 ESPECÍFICOS	- 19 -
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	- 20 -
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	- 21 -
6.1. CULTIVO CELULAR	- 21 -
6.2. CEPAS VIRALES	- 21 -
6.3. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL	- 22 -
6.4. CINÉTICA DE INFECCIÓN Y ENSAYOS DE WESTERN BLOT	- 23 -
6.5. SILENCIAMIENTO DE RPL26 MEDIANTE SIRNA	- 25 -
6.6. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTS	- 26 -
6.7. TITULACIÓN VIRAL Y ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCOS	- 26 -

6.8. RED DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	- 28 -
6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 28 -
VII. RESULTADOS.....	- 29 -
7.1. COLOCALIZACIÓN ENTRE NS1 Y RPL26 EN CÉLULAS BHK21 INFECTADAS CON DENV2 O ZIKV-MR77-	
29 -	
7.2. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE RPL26 EN CÉLULAS BHK21 INFECTADAS CON DENV2 O ZIKV-MR77-	31 -
7.3. SILENCIAMIENTO MEDIANTE siRNA ESPECÍFICOS DE RPL26 EN CÉLULAS BHK21.....	- 33 -
7.4. TITULACIÓN DE PROGENIE VIRAL Y ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCOS DE CÉLULAS DE VERTEBRADO	
SILENCIADAS PARA RPL26 E INFECTADAS CON DENV2 O ZIKV-MR77.....	- 35 -
7.5. INTERATOMA DE RPL26 CON PROTEÍNAS DE LOS COMPLEJOS DE Sec61 Y OST	- 38 -
VIII. DISCUSIÓN.....	- 40 -
IX. CONCLUSIONES	- 45 -
X. PERSPECTIVAS.....	- 46 -
XI. BIBLIOGRAFÍA	- 47 -
XII. ANEXOS	- 52 -
11.1. ANTICUERPOS.....	- 52 -
11.2. siRNA Y VEHÍCULO.....	- 53 -
11.3. REACTIVOS Y DETERGENTES	- 53 -
11.4. SOLUCIONES Y BUFFERS	- 55 -
11.5. PRODUCTOS.....	- 58 -

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mapa global de la distribución simulada de los vectores de arbovirus basada en modelos de RF: (A) <i>Aedes aegypti</i> ; (B) <i>Aedes albopictus</i> .	- 2 -
Figura 2. Ciclos de transmisión de arbovirus.	- 2 -
Figura 3. Tropismo que presentan los virus del dengue y del Zika.	- 3 -
Figura 4. Distribución mundial de la infección por los virus del dengue y del Zika.	- 4 -
Figura 5. Organización genómica y estructura de los miembros del género <i>Flavivirus</i> .	- 6 -
Figura 6. Ciclo de replicación de <i>Flavivirus</i> .	- 8 -
Figura 7. Estructura de NS1.	- 11 -
Figura 8. NS1 dentro de la célula infectada.	- 12 -
Figura 9. Localización de RPL26 en la subunidad 60S del ribosoma.	- 14 -
Figura 10. UFMilación de RPL26.	- 15 -
Figura 11. Colocalización y ensayo de ligación por proximidad entre NS1 de DENV2 y RPL26.	- 16 -
Figura 12. Estrategia experimental.	- 20 -
Figura 13. Líneas celulares BHK21 (A), C6/36 (B) y VERO-E6 (C).	- 21 -
Resultados	
Figura 14. Colocalización de RPL26 y NS1 en células BHK21 infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77.	- 29 -
Figura 15. Expresión de RPL26 en células BHK21 infectadas con DENV2 y ZIKV-MR77.	- 31 -
Figura 16. Silenciamiento de RPL26 en células BHK21 mediante siRNA específicos.	- 33 -
Figura 17. Viabilidad de células BHK21 silenciadas para la expresión de RPL26.	- 34 -
Figura 18. Progenie viral de DENV2 y ZIKV-MR77 generada de células BHK-21 silenciadas o no, para RPL26.	- 35 -
Figura 19. Análisis de proteínas de DENV en células BHK21 silenciadas o no, para RPL26.	- 36 -
Figura 20. Análisis de proteínas de ZIKV en células BHK21 silenciadas o no, para RPL26.	- 37 -
Figura 21. Interatoma de RPL26 con proteínas de los complejos de Sec61 y OST.	- 38 -
Tabla 1. Función y estructura de las proteínas de <i>Flavivirus</i> .	- 9 -
Tabla 2. Condiciones de siRNA utilizados.	- 25 -

ABREVIATURAS

Ac.	Anticuerpo	PBS	<i>Phosphate buffered saline:</i> buffer fosfato salino
Ae.	Género <i>Aedes</i>	PLA	Ensayo de ligación por proximidad
C	Proteína de la cápside	OST	Complejo oligosacaryltransferasa
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	Pre-M	Proteína precursora de membrana
DENV	Virus del dengue	RE	Retículo endoplásmico
E	Proteína de envoltura	RPN1	Riboforina 1
EMEM	<i>Eagle's minimal essential médium:</i> medio mínimo esencial de águila	RP	<i>Ribosome protein:</i> proteína ribosomal
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay:</i> ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	RPL26	Proteína ribosomal L26
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol	RNA	<i>Ribonucleic acid:</i> ácido ribonucleico (ARN)
hpi	Horas postinfección	Sec61	Secretasa 61
hpt	Horas postransfección	SFB	Suero fetal bovino
HRP	<i>Horseradish peroxidase:</i> peroxidasa de rábano	SGB	Síndrome de Guillain-Barré
Lys	Lisina	siRNA	<i>small interfering RNA:</i> RNA pequeño de interferencia
M	Proteína de membrana	sNS1	Proteína no estructural 1 secretada
mNS1	Proteína no estructural 1 ligada a membrana	STT3 /A /B	Complejo catalítico del oligosacaryltransferasa /subunidad A y B
MOI	Multiplicidad de infección	UFL1	<i>E3 UFM1 Specific Ligase 1:</i> Proteína ligasa E3
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio	UFM1	<i>Ubiquitin fold modifier 1:</i> modificador de pliegue de ubiquitina 1
N / Ans	Aspargina	V	Volt
nm	Nanómetro	ZIKV	Virus del Zika
nM	Nanomol	µg	Microgramo
NS	Proteína no estructural	µl	Micro litro

RESUMEN

El género *Flavivirus* está conformado por alrededor de 70 miembros, los cuales se transmiten a través de artrópodos, particularmente mosquitos y garrapatas. Entre ellos existen patógenos humanos que representan un grave problema para la salud pública, como el virus del dengue (*DENV*) y el virus del Zika (*ZIKV*), ambos transmitidos por mosquitos del género *Aedes*, cuya amplia distribución pone en riesgo a 3 900 millones de personas en más de 120 países. Durante el ciclo replicativo de los flavivirus se requiere de la maquinaria celular para la replicación de su genoma y la traducción de sus proteínas virales. Entre los elementos celulares que interactúan con los virus se encuentran las proteínas ribosomales (RP), las cuales presentan funciones tanto ribosomales como extrarribosomales. Se han identificado diversas RP que interactúan con la proteína no estructural 1 (NS1) de los flavivirus durante el ciclo replicativo, de las cuales se ha corroborado que la proteína ribosomal L26 (RPL26), una proteína de la subunidad ribosómica 60S que desempeña el control de calidad sobre las proteínas translocadas al retículo endoplásmico, interactúa con NS1 en células de mosquito infectadas con *DENV*. Es debido a lo anterior que este proyecto se centró en evaluar la participación de la proteína RPL26 en el ciclo replicativo de los *DENV* y *ZIKV*.

Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal se corroboró la colocalización de RPL26 con NS1 de *DENV2* y *ZIKV-MR77* en células de vertebrado. Asimismo, por medio del silenciamiento de RPL26 mediante siRNA y la infección por ambos virus, se demostró que la progenie viral disminuye significativamente debido al silenciamiento de RPL26. Finalmente, se observó que, en células silenciadas, la expresión de NS1 se ve afectada significativamente mientras que la de NS3 no se modifica. Estos datos sugieren que RPL26 participa en el ciclo replicativo de ambos virus interactuando particularmente con NS1. Considerando los resultados de este estudio y la interacción reportada de NS1 con los complejos Sec61 y OST; se considera que RPL26, Sec61 y OST forman un complejo que favorece la translocación de NS1 al lumen del retículo endoplásmico.

ABSTRACT

Flavivirus genus encompasses around 70 members, which are transmitted by arthropods, particularly mosquitoes and ticks. Among them, there are human pathogens that represent a severe public health problem, like dengue virus (*DENV*) and Zika virus (*ZIKV*), both transmitted by *Aedes* mosquitoes, whose wide distribution put at risk over 3 900 million people in more than 120 countries. During their replicative cycle, the flaviviruses required the use of the cellular machinery for genome replication and viral protein translation. Among the cellular proteins that interact with the flaviviruses, are the ribosomal proteins (RP), which carry out both ribosomal and extraribosomal functions. Several RPs that interact with the nonstructural protein 1 (NS1) of flaviviruses during the replicative cycle have been identified; one of them is the ribosomal protein L26 (RPL26), a protein of the ribosomal subunit 60S that plays a role in the quality control for translocated proteins to the endoplasmic reticulum. It is based on the previous arguments that this project was centered on evaluating the role of RPL26 in the replicative cycle of *DENV* and *ZIKV* in cells of vertebrates.

By immunofluorescence and confocal microscopy, the co-localization of RPL26 with NS1 of *DENV2* and *ZIKV-MR77* in cells of vertebrated organisms was corroborated. By silencing RPL26 expression with siRNAs in cells infected with either virus, it was demonstrated that the viral progeny is significantly reduced due to the silencing of RPL26. Of note, the expression of NS1 is significantly affected by the RPL26 silencing, while NS3 levels remains unaltered. This data suggests that RPL26 participates in the replicative cycle of these two viruses interacting particularly with NS1. Considering the results of this study and the reported interaction of NS1 with Sec61 and OST complexes, along with the interaction of RPL26 with proteins of both complexes revealed by Sting simulations, it is proposed that RPL26, Sec61 and OST form a multi-complex that favors the translocation of NS1 into the lumen of the endoplasmic reticulum.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Arbovirus

Los arbovirus, virus transmitidos por artrópodos, son un amplio grupo taxonómico de agentes virales que se transmiten entre artrópodos hematófagos y hospederos vertebrados.¹ Se han identificado, a la fecha, aproximadamente 500 arbovirus, los cuales se clasifican en 25 géneros y 8 familias de acuerdo con sus relaciones genéticas, antigénicas, morfología y mecanismos de replicación; sin embargo, solo alrededor de 150 son patógenos para el ser humano.^{2,3} Los arbovirus más importantes desde la perspectiva clínica-epidemiológica se encuentran en la familia *Flaviviridae* (del latín *lavus*, “amarillo”) la cual está constituida por 89 especies divididas en cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* (del latín *pestis*, “peste”), *Hepacivirus* (del griego *hepar*, heparos “hígado”) y *Pegivirus* (del latín “*Pe*” que significa persistente y “*g*” es una referencia de hepatitis G).^{4,5}

1.2 Flavivirus

El grupo de arbovirus de mayor relevancia, desde el punto de vista de las enfermedades humanas, está clasificado en el género *Flavivirus*, el cual está conformado por alrededor de 70 miembros que se transmiten por artrópodos, particularmente mosquitos y garrapatas.⁶ Entre ellos, se encuentran patógenos que representan un grave problema en la salud pública mundial, tal y como lo son el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del dengue (DENV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus del Zika (ZIKV). Estos agentes virales emergen y reemergen en diversas regiones del planeta, ocasionan brotes epidémicos que trascienden de pequeños territorios a diversos países con presencia de sus respectivos vectores, convirtiéndose en virus endémicos de zonas tropicales y subtropicales, provocando una alta tasa de morbilidad, discapacidad asociada y mortalidad.^{1,7,8} Un ejemplo de ello es la actual distribución mundial de DENV, el brote de ZIKV en Sudamérica hace algunos años, los brotes de YFV en África y Brasil, y la propagación de WNV por Norteamérica.⁶ Las infecciones causadas por flavivirus van desde asintomáticas, pasando por cuadros febriles agudos, hasta enfermedades hemorrágicas y encefálicas potencialmente mortales. Asimismo, son capaces de persistir en los pacientes y propiciar morbilidades a largo plazo.⁶ Los virus del dengue y Zika son flavivirus que han provocado brotes epidémicos de gran magnitud en las últimas décadas. Ambos son transmitidos por mosquitos hembra del

género *Aedes*, específicamente *Ae. aegypti* (principal) y *Ae. albopictus* (secundario), lo que ocasiona que, debido a la amplia distribución de los vectores (**figura 1**), alrededor de 3.9 mil millones de personas, en más de 120 países, se encuentren en riesgo de infectarse por alguno de estos virus.^{1,4}

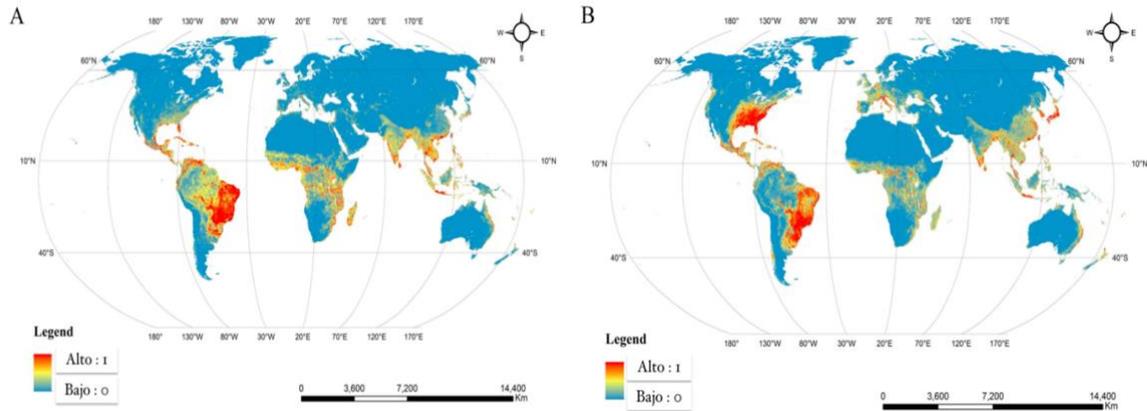


Figura 1. Mapa global de la distribución simulada de los vectores de arbovirus basada en modelos de RF: (A) *Aedes aegypti*; (B) *Aedes albopictus*. Modificado de: Ding F. y cols., 2018.⁴⁶

1.2.1 Flavivirus DENV y ZIKV

Regularmente, la transmisión de DENV y ZIKV se mantiene en un ciclo selvático estable y natural entre los vectores y animales salvajes (transmisión enzoótica); sin embargo, cuando un vector infectado pica a un animal doméstico o humano, es posible el traslado a un ciclo urbano y generar epizootias (transmisión vector-animal doméstico) o epidemias (transmisión vector-humano) [**figura 2**].⁸

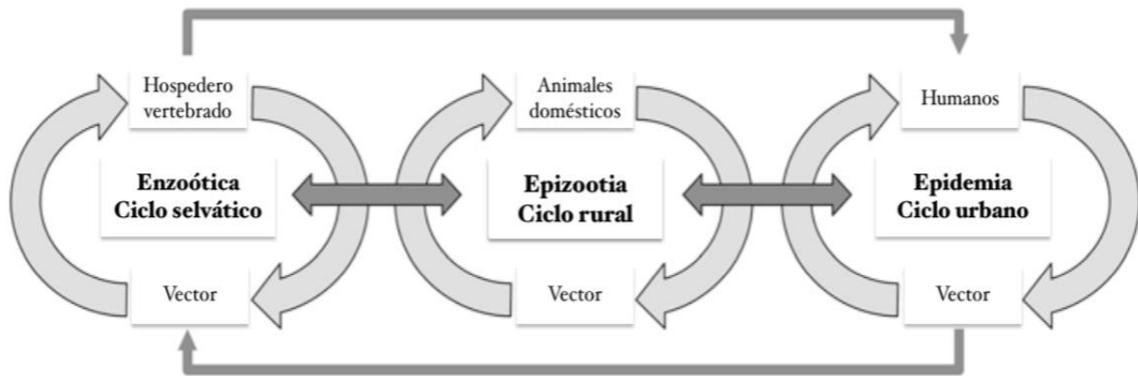


Figura 2. Ciclos de transmisión de arbovirus. Modificado de: Young P., 2018.⁸

Cuando un mosquito pica a un vertebrado infectado por DENV o ZIKV, el patógeno ingresa y viaja hacia el intestino, medio en el cual invade a las células epiteliales intestinales

y se replica. La progenie viral se libera al hemocele (sistema circulatorio de invertebrados) y, por medio de la hemolinfa, se difunde hacia tejidos secundarios, siendo las glándulas salivales el principal sitio de replicación y por lo que los títulos virales en la saliva del artrópodo aumentan alrededor de $7.50 \log^{10}$ y $6.52 \log^{10}$ copias del genoma por alas/patas para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, respectivamente (en infección por ZIKV), volviéndolo infeccioso.⁹⁻¹² Cuando un mosquito infectado pica a un hospedero vertebrado sano, el virus ingresa a través de la saliva e infecta células de la dermis y epidermis, lo que da lugar a una replicación primaria y, posteriormente, el virus se disemina por medio del sistema circulatorio por todo el organismo. El DENV y ZIKV presentan tropismo celular por diversas células del cuerpo, dando lugar al cuadro clínico sistémico que los caracteriza (**figura 3**).¹³

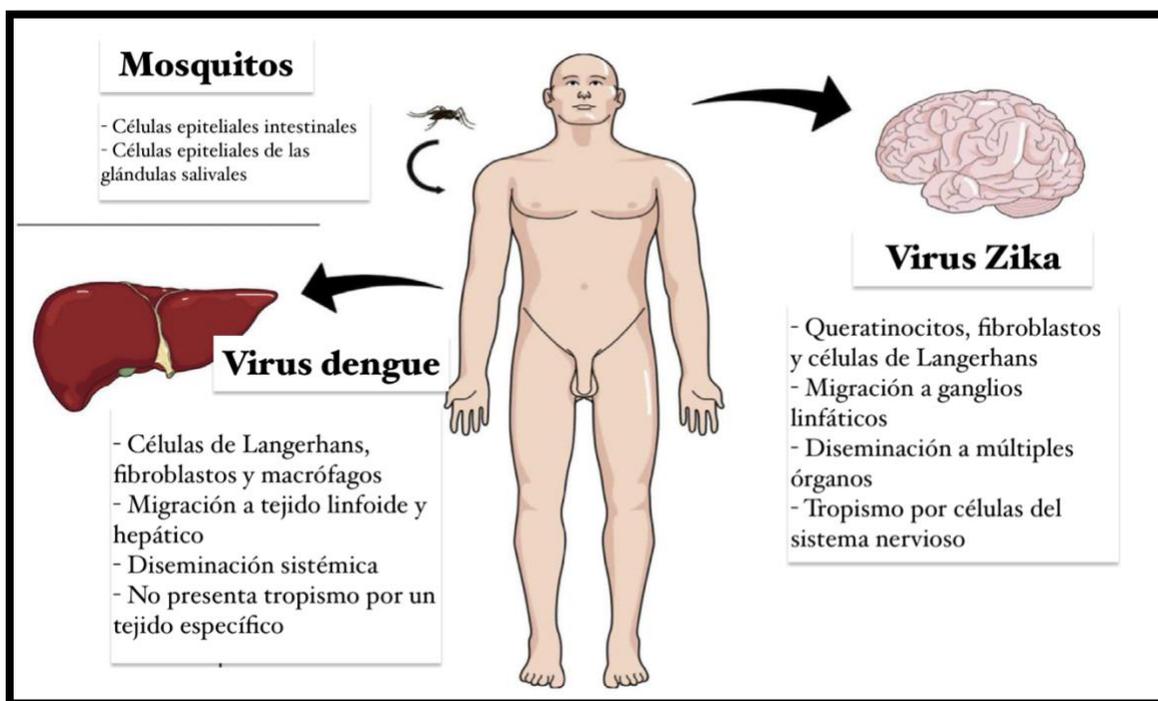


Figura 3. Tropismo que presentan los virus del dengue y del Zika.

Modificado de: Castillo-Macías y cols. 2018.¹³

1.2.2 Dengue

El agente causal de la fiebre por dengue (del swahili *dinga*, “calambre súbito”)^{4,14} es el flavivirus más relevante para los humanos desde la perspectiva de la salud pública y se encuentra distribuido a nivel mundial. Anualmente se estima genera entre 284 y 528 millones de casos, especialmente en países de África, América, Mediterráneo oriental, Asia sudoriental y Pacífico occidental.^{1,15} Un informe que abarca 1 636 años de casos de dengue en 76 países informa un aumento en la incidencia entre 1990 y 2013, notificando

aproximadamente 58.4 millones de casos en el 2013, de los cuales 10.5 millones tuvieron que ser tratados en un medio hospitalario y alrededor de 577 mil pacientes fallecieron (**figura 4**).¹

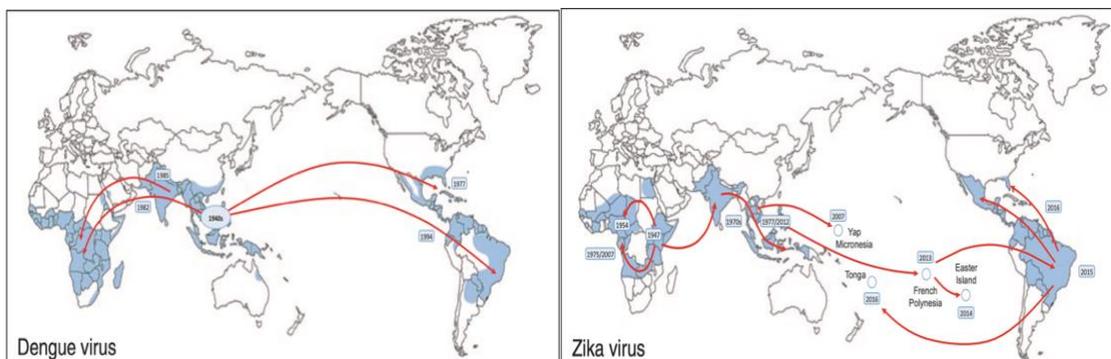


Figura 4. Distribución mundial de la infección por los virus del dengue y del Zika.
Tomado de: Young P., 2018.⁸

Existen 4 serotipos distintos del DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), los cuales tienen una similitud del 65 % en su secuencia de aminoácidos. Cualquiera de los serotipos puede producir la forma grave de la enfermedad; sin embargo, DENV2 y DENV3 se han asociado con una mayor cantidad de casos graves y mortales. La inmunidad para cada serotipo se considera duradera y probablemente de por vida; no obstante, no existe inmunidad cruzada entre estos.¹

La mayoría de los casos de dengue cursa con un cuadro febril agudo (fiebre por dengue o dengue sin signos de alarma) con una duración de 2 a 7 días, presentando manifestaciones clínicas como fiebre, mialgias, artralgias, cefalea, exantema, náuseas y vómitos. Sin embargo, hay casos que también presentan signos de alarma como dolor abdominal, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas o alteraciones en el estado de consciencia. Lo anterior representa un deterioro clínico que puede evolucionar a dengue grave (dengue hemorrágico), caracterizado por la extravasación de grandes cantidades de plasma y sangrado abundante, provocando un choque hipovolémico y falla orgánica múltiple, lo que puede conducir a la defunción de la persona infectada.^{1,4,16,17} A pesar de la relevancia de la enfermedad en el mundo, hasta la fecha no se cuenta con una vacuna eficaz para prevenirla ni con un tratamiento específico para el dengue grave.¹⁸

1.2.3 Zika

El agente etiológico de la fiebre por Zika es el ZIKV, cuyo nombre proviene del Bosque Zika, ubicado en Entebbe, Uganda, lugar donde se detectó por primera vez. La fiebre

por Zika es una enfermedad emergente en diversas partes del mundo.^{4,6,19} Desde su descubrimiento en 1947, se notificaron pequeños brotes en la región tropical de África, el sudeste asiático y las islas del Pacífico; sin embargo, a partir del 2007, la tasa de morbilidad fue en aumento hasta que en el 2013 se presentó una epidemia en la Polinesia Francesa, informándose más de 30 mil casos, de los cuales 70 presentaron manifestaciones neurológicas y autoinmunitarias.^{4,20} En el 2014 se identificó el primer caso autóctono de ZIKV en la Isla de Pascua, Chile, y en el 2015 se presentó el primer caso en Brasil, comenzando así la emergencia de este virus en el continente americano y provocando una epidemia en la cual se informarían entre 500 mil y 1.3 millones de casos distribuidos en 48 países de América y Caribe (**figura 4**).²¹⁻²³ La epidemia de ZIKV en América fue declarada el 1 de febrero de 2016 por la Organización Mundial de la Salud, una emergencia de salud pública internacional debido al aumento en la incidencia de manifestaciones neurológicas, especialmente graves en neonatos de madres infectadas durante el embarazo.^{24,25} Se han identificado tres linajes de ZIKV, de acuerdo con la secuenciación de la región codificadora completa del gen NS5: el linaje de África oriental, el de África occidental y el de Asia.²⁶

Las manifestaciones clínicas de la fiebre por Zika y dengue son muy similares. Se cursa con un cuadro febril agudo de 2 a 7 días de duración que presenta principalmente fiebre baja, conjuntivitis, artralgias, erupciones maculopapulares pruriginosas en todo el cuerpo.^{17,19} Se considera que entre el 60 y el 80 % de los casos suelen ser asintomáticos.^{27,28} A pesar de no considerarse letal en su fase aguda, el ZIKV se ha relacionado con síndromes neurológicos que pueden conducir a discapacidad y muerte, especialmente el síndrome congénito y el síndrome de Guillain-Barré (SGB).^{24,25} El SGB es un trastorno autoinmunitario postinfeccioso que se caracteriza por la afectación de la fuerza y sensibilidad de las extremidades debido al daño en los nervios periféricos; además, puede producir parálisis de los músculos respiratorios y, por ende, poner en riesgo la vida.^{24,25,28} Asimismo, cuando se infecta una mujer embarazada, es posible que el feto desarrolle un síndrome congénito caracterizado por microcefalia, con microencefalia o hidrocefalia, incluso agenesia cerebral o ausencia de cuerpo calloso y anencefalia.^{28,29} Hasta el momento no existe un tratamiento antiviral específico o una vacuna para prevenir la infección y sus complicaciones.⁴

1.3 Biología molecular y ciclo replicativo de los flavivirus

A pesar de su gran diversidad, los miembros del género *Flavivirus* comparten diferentes características biológicas y estructurales. La partícula viral es esférica con un diámetro aproximado de 50 nm y está rodeada por una envoltura lipídica. En esta bicapa lipídica se encuentran dos proteínas: la proteína de envoltura (E), la cual es el principal determinante antigénico y media la unión-fusión del virus a la célula hospedera, y la proteína de membrana (M) como un pequeño fragmento de la proteína de membrana precursora (prM), cuyo procesamiento proteolítico se produce durante la maduración del virus. Por debajo de la envoltura se encuentran múltiples copias de la proteína de la cápside (C), la cual envuelve al genoma viral (**figura 5**).^{1,5,31,32}

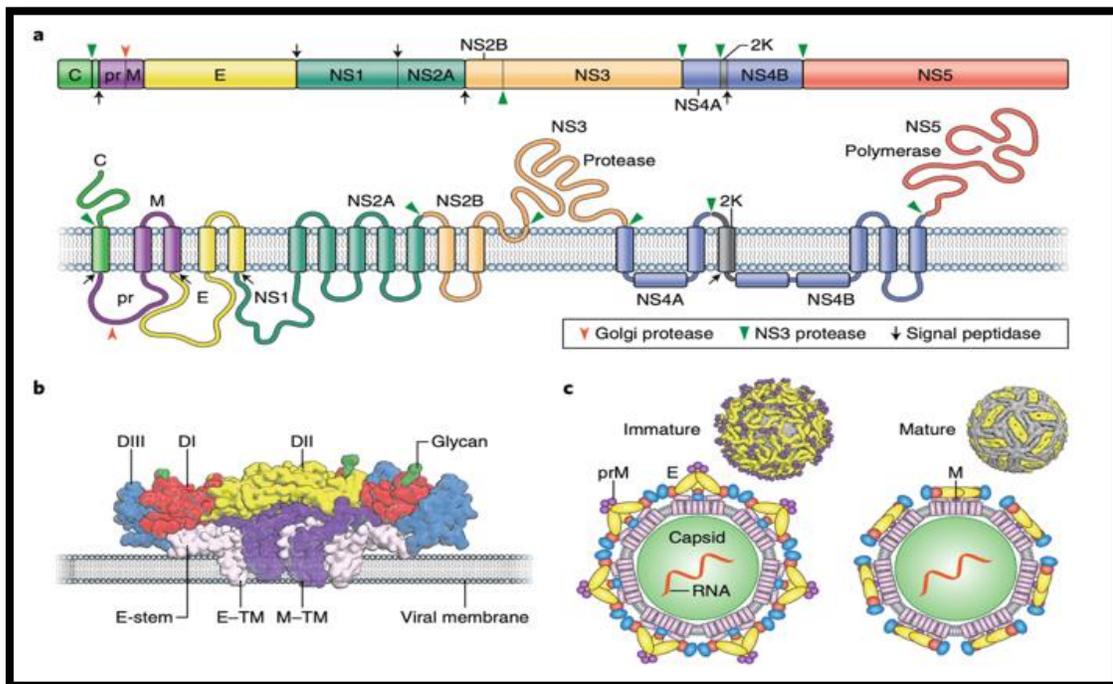


Figura 5. Organización genómica y estructura de los miembros del género *Flavivirus*.

Tomado de: Pierson T.C. y Diamond M.S. 2020.³³

El virión contiene un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, no segmentado, por lo que pertenece a la clasificación IV de Baltimore, con una longitud de entre 9.4-13 kb, con un único marco de lectura abierto (ORF), flanqueado por dos regiones no traducidas (del inglés un *translated regions* o UTR) localizadas en el extremo 5' y 3' del genoma; asimismo, presenta una estructura Cap tipo 1 (7 mG) en el extremo 5'-UTR y carece de cola de poli A en el extremo 3'-UTR.^{1,5,31,32}

Durante su ciclo de replicación, la proteína E de los flavivirus interacciona con diversos receptores localizados en la membrana de diferentes células diana como los glicosaminoglicanos (GAG), lectinas tipo C como DC-SIGN, receptores de manosa, receptores de fosfatidilserina (PtdSer) o proteínas de la inmunoglobulina-mucina de linfocitos T (TIM).^{5,32,33} Una vez unidos, el virus se internaliza en la célula por endocitosis mediada por clatrina y se deposita en endosomas tempranos o intermedios que evolucionarán a tardíos. La fusión de la envoltura vírica con la membrana endosómica es dependiente del pH ácido debido a cambios conformacionales en la proteína E, permitiendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular.³³ El desensamblaje de la cápside lleva al genoma viral al citoplasma, lo cual es un determinante primario de su infectividad ya que permite la traducción del ORF en una única poliproteína de 3 388 aminoácidos.^{5,33,34} Una vez traducida en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) mediante proteasas virales y del hospedero, se escinde en 10 proteínas: tres estructurales (C, E y prM) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (**figura 5**).^{5,30-33} La estructura y resumen de las diferentes funciones de las proteínas virales se mencionan en la **tabla 1**.

La replicación del genoma viral se lleva a cabo en compartimientos de membrana especializados derivados del RE que el propio virus induce. En los complejos de replicación (CR), la proteína NS5, que es la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp), sintetiza un RNA de cadena negativa, el cual sirve como molde para crear nuevos genomas de cadena positiva.^{5,34} Una vez sintetizados los genomas, se considera que el proceso de ensamblaje comienza por la asociación de dímeros de la proteína C con el RNA viral, seguido de la gemación de membranas del RE que contienen el complejo glicoproteínico prM-E.⁵ Durante el ensamblaje y la liberación de las nuevas partículas, las proteínas del hospedero regulan el tráfico intracelular y el procesamiento de las glicoproteínas virales.¹² Posterior al ensamblaje, los viriones inmaduros se transportan por medio de la vía secretora, experimentando un reordenamiento de prM-E debido al pH ácido del Golgi y a la acción de una proteasa residente de Golgi llamada furina, generando una escisión de prM y otras modificaciones que generan la maduración del virión (**figura 5**).^{5,34} Mediante exocitosis, las partículas virales se liberan de la célula de forma no lítica. La **figura 6** muestra un esquema del ciclo replicativo completo de *Flavivirus*.³⁴

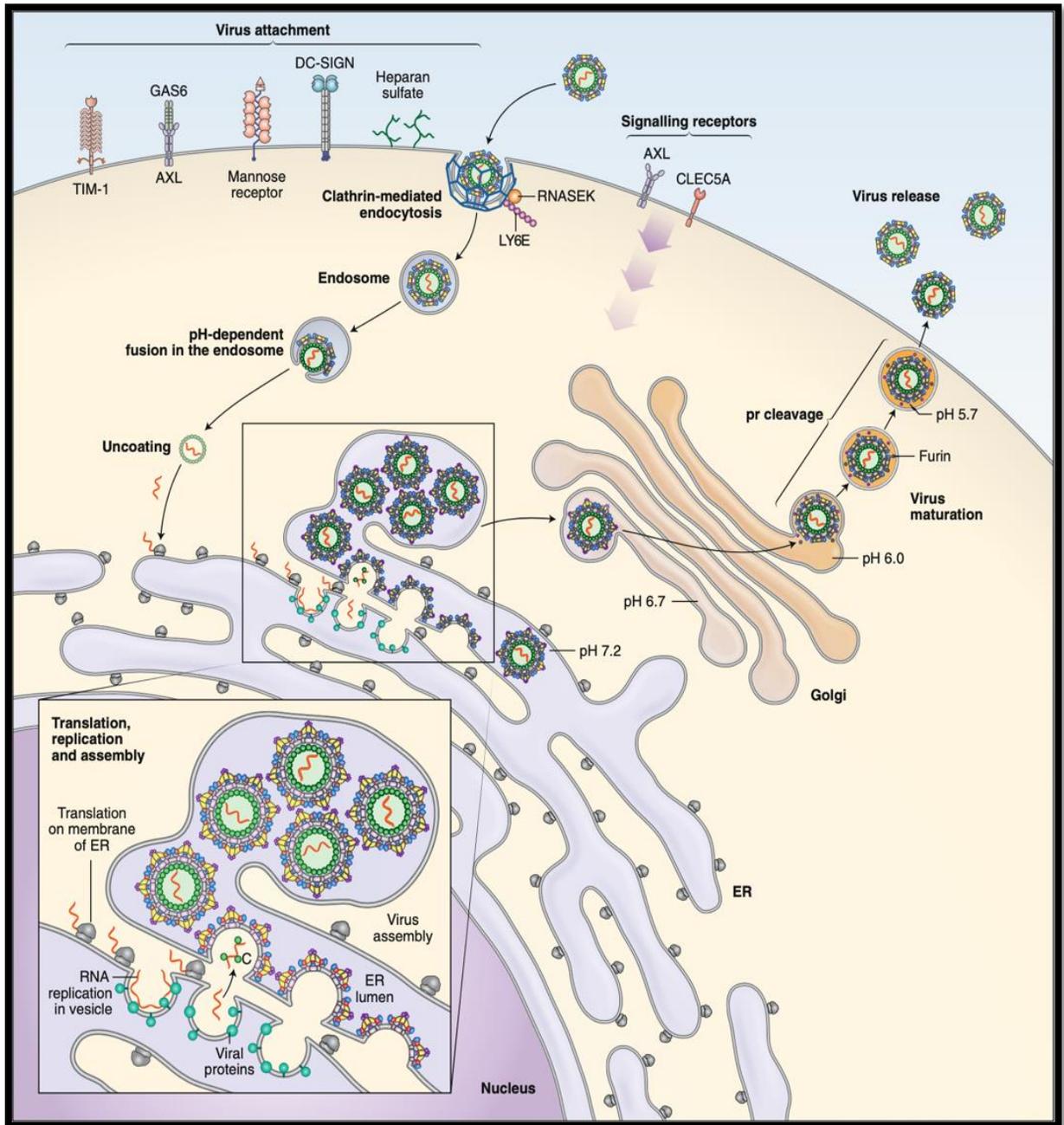


Figura 6. Ciclo de replicación de *Flavivirus*.
 Tomado de: Pierson T.C. y Diamond M.S., 2020.³³

PROTEÍNA	ESTRUCTURA	FUNCIÓN
C	Proteína homodimérica de 100 aa (12 kDa), con cuatro regiones α -hélicas y un dominio N-terminal desestructurado.	Encapsidación del genoma viral dentro del virión.
prM / M	prM es una proteína de 166 aa (26 kDa) / M es una proteína de 75 aa (8 kDa).	prM funciona como un chaperón de la glicoproteína E, evitando la fusión prematura de esta antes de la liberación del virión. La proteasa celular furina divide prM en dos: pr y M, siendo esta última parte del virión maduro.
E	Proteína de 493-495 aa (53 kDa) que consta de tres dominios distintos (I, II, III).	Se encuentra en forma de 90 homodímeros distribuidos en la superficie del virus formando complejos de tipo cabeza-cola. Media la unión del receptor, la fusión de la membrana y es el principal antígeno neutralizante en los flavivirus.
NS1	Proteína de 352 aa (46 kDa) que pueden identificarse de forma monomérica, dimérica (mNS1) y hexamérica (sNS1).	Participa en la replicación del genoma viral y el ensamblaje de las partículas víricas; asimismo, es secretada al espacio extracelular. Es un antígeno humoral relevante, inmunomodulador y determinante de la patogénesis de la enfermedad.
NS2A	Proteína de 218 aa (22 kDa).	Participa en la replicación del genoma viral y el empaquetamiento de este en el virión inmaduro; asimismo, está involucrado en el antagonismo del IFN.
NS2B	Proteína de 130 aa (14 kDa), siendo una proteína asociada a membrana.	Se asocia con NS3 para formar el complejo de proteasas; además, es un cofactor en la activación de la serina proteasa viral NS3.
NS3	Proteína de 618 aa (70 kDa). Contiene un dominio de proteasa en la posición N-terminal (residuos 1-180) y un dominio de helicasa (residuos 180-618).	Proteína multifuncional con actividad de serina proteasa similar a la quimotripsina, RNA helicasa y RNA trifosfatasa (RTP/NTPasa). Participa en la escisión de la poliproteína y la replicación del genoma viral.
NS4A	Proteína de 150 aa (16 kDa), siendo una proteína asociada a membrana.	Induce alteraciones en la membrana del RE para la formación del complejo de replicación viral.
NS4B	Proteína de 245-249 aa (27 kDa), siendo una proteína asociada a membrana.	Participa en la replicación del genoma viral al asociarse con NS3; además, bloquea la transducción de señales inducida por el IFN.
NS5	Proteína de 900 aa (104 kDa). Contiene un dominio metiltransferasa (residuos 1-269) y un dominio RNA polimerasa dependiente de RNA (residuos 270-900).	Es una proteína bifuncional con actividad metiltransferasa y RNA polimerasa dependiente de RNA.

Tabla 1. Función y estructura de las proteínas de *Flavivirus*.^{1,5,31}

1.3.1 Proteína no estructural 1 (NS1)

La NS1 es una glicoproteína homodimérica conservada entre los flavivirus transmitidos por mosquitos. El gen NS1 de los flavivirus, con una longitud de 1 056 nucleótidos, codifica una proteína de 352 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 46-55 kDa, dependiendo de su grado de glicosilación.³⁵ Estudios filogenéticos de DENV, ZIKV, WNV, YFV, entre otros, han revelado una conservación entre el 50 y el 80 % de la proteína NS1 entre los flavivirus.³⁵ Una vez traducida, la poliproteína viral se transloca en la membrana del RE por medio del complejo de translocación de Sec61, siendo NS1 la única que ingresa completamente en el lumen del RE.³⁶

NS1 se encuentra asociada, como homodímero, a las membranas intracelulares y a los orgánulos celulares inducidos por la infección del virus; no obstante, una proporción también puede localizarse en balsas lipídicas en la membrana plasmática o soluble, secretada como hexámero, en el sobrenadante, o al suero de los pacientes, lo cual estimula al sistema inmunitario.³⁷ La escisión y translocación de NS1 es seguida por la glicosilación ligada a asparagina (N, Ans) en el lumen del RE por una glicosidasa. Existen tres sitios de glicosilación en Asn-130, Asn-207 y en algunos casos Asn-175, donde se añaden carbohidratos de glicano y manosa.^{35,38} De acuerdo con los estudios realizados por Hafirassou M.L. y cols. (2017), el complejo oligosacaryltransferasa (OST) localizado en la membrana del RE en asociación con el translocón Sec61 media la glicosilación de NS1 y NS4B.^{39,40} La glicosilación de NS1 es relevante para su eficiente secreción, replicación viral y patogenicidad.^{37,41}

Cuando NS1 fue cristalizada, se reveló que contiene 3 dominios definidos en cada monómero: dos con carácter hidrofóbico, conocidos como barril- β (*beta-roll*) (1-29 aa) como el dominio central, y ala- α/β (*alfa/beta wing*) (38-151 aa), que contiene las zonas de glicosilación, y un tercero con carácter hidrofílico: escalera- β (*beta-ladder*) (181-352 aa), unidos entre ellos por regiones sin estructura.^{39,41} Su extremo C-terminal contiene una secuencia de octopéptido que es fundamental para la escisión y se encuentra altamente conservada entre los flavivirus; asimismo, el extremo C-terminal de la escalera- β y el dominio ala- α/β son las regiones más antigénicas y contienen los epítomos regularmente identificados en la forma hexamérica (**figura 7**).³⁷

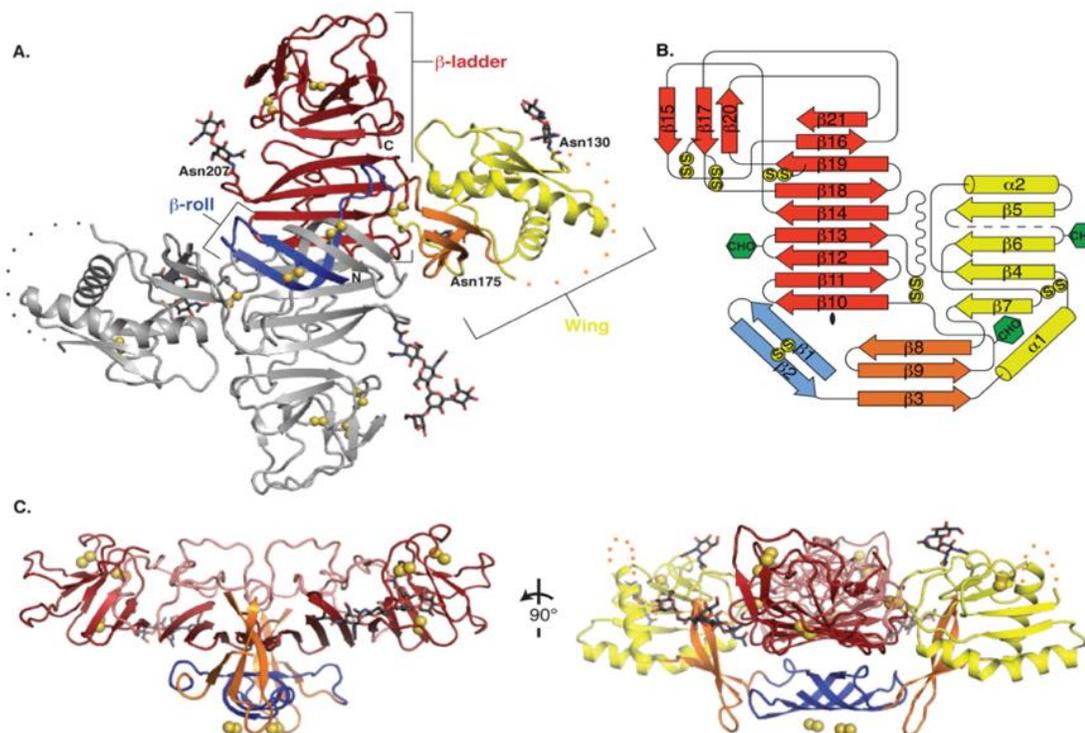


Figura 7. Estructura de NS1.

(A) Dímero de NS1 con una subunidad en gris y la otra coloreada por dominio (azul: barril- β ; amarillo: α - α/β con subdominio conector naranja y rojo escalera- β). Los enlaces disulfuros se muestran como esferas amarillas y los sitios de glicosilación ligados a N como hexágonos negros. Una región desordenada de 20 residuos se indica con líneas punteadas. (B) Diagrama topológico del monómero NS1, coloreado en azul, amarillo, naranja y rojo como en A. Los sitios de glicosilación se indican con hexágonos verdes y los disulfuros con círculos amarillos. (C) Vistas perpendiculares de NS1 desde el borde (izquierda) y el extremo (derecha) de la escalera- β . El barril- β (azul) y el subdominio β -conector (naranja) del ala forman una protuberancia en una cara de la escalera- β con el bucle espagueti (rosa) y los sitios de glicosilación en la otra cara. El dominio del ala se omite en la imagen de la izquierda para mayor claridad. Tomado de Akey D.L. y cols. 2014.⁴³

La NS1 sintetizada es liberada en su forma monomérica al lumen del RE después de la escisión de E y NS2A, y rápidamente se dimeriza (**Figura 8-1**). En su forma dimérica, NS1 se encuentra asociada a membranas a través de su cara hidrofóbica (**figura 8-2**); además, NS1 se asocia a otras proteínas no estructurales (NS4A y NS4B) para formar los complejos de replicación, donde se cree que participa como proteína de andamiaje (**figura 8-3**).⁴¹ Se ha descrito que es el dominio de barril- β (residuos 10-11 y 159-162) del dímero NS1 el que sobresale e interactúa con la membrana del lumen del RE.^{37,38} La NS1 dimérica anclada a GPI (glicosil-fosfatidilinositol) o en las balsas de colesterol/lípidos es transportada a la membrana plasmática a través de la vía endocítica o secretora y puede anclarse a través de la cola de GPI a la membrana plasmática (mNS1), modulando la patogénesis de la enfermedad (**figura 8-5**). Finalmente, la NS1 dimérica también puede fusionarse con la red trans-Golgi

para su posterior maduración y secreción (**figura 8-4**) donde glicosidasas y glicosiltransferasas cortan carbohidratos complejos de NS1 formando una lipopartícula hexamérica soluble (sNS1) que es secretada por la célula infectada (**figura 8-6**).³⁵

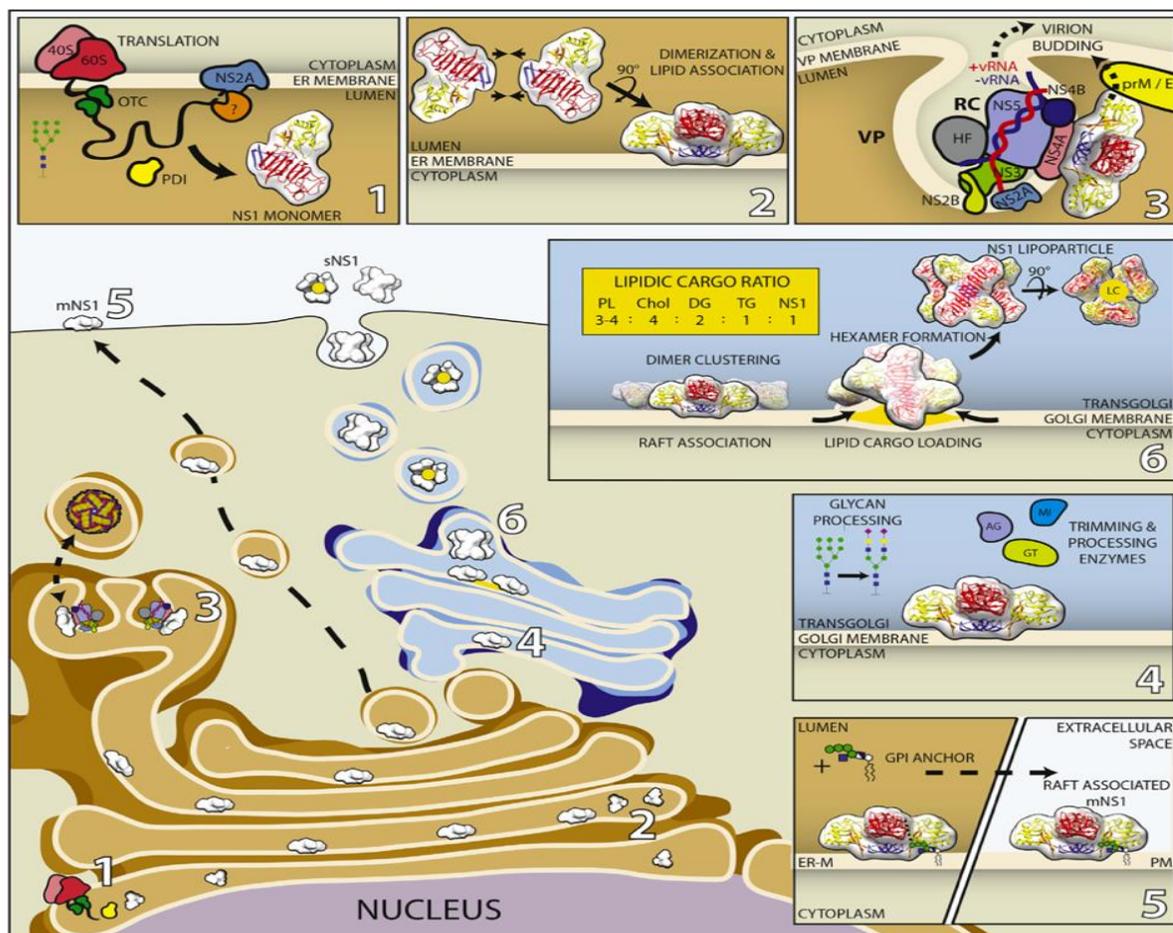


Figura 8. NS1 dentro de la célula infectada.
Tomada de: Watterson D. y cols. 2016.³⁸

Anteriormente, se consideraba que la sNS1 únicamente se secretaba en células de vertebrado; sin embargo, Alcalá y cols. (2016)⁴⁴, y otros investigadores, han identificado mediante ELISA o Western blot la presencia de NS1 en su forma hexamérica en el sobrenadante de células C6/36 (derivadas de *Ae. albopictus*) y Aag2 (derivadas de *Ae. aegypti*) infectadas con DENV.³⁸ La acción intracelular de NS1 es similar a la presentada en células de vertebrado, ya que después de su síntesis, la proteína se dimeriza y cierta proporción forma parte de los complejos de replicación como proteína de andamiaje. No obstante, en células de mosquito, la NS1 dimerizada se une a caveolina y se desplaza al espacio extracelular evitando el complejo de Golgi, evadiendo así la ruta de secreción clásica. De acuerdo con Rosales-Ramírez y Ludert (2019), la NS1 de DENV y ZIKV se asocia al

complejo chaperón de caveolina (CCC) para su secreción en células de mosquito.^{44,45} Asimismo, la NS1 se ha detectado en el interior del núcleo; sin embargo, se desconoce su función específica en este orgánulo.³⁸

1.3.2 Proteínas ribosomales y su interacción con los virus

Los ribosomas son la maquinaria de traducción celular responsable de la síntesis de proteínas a partir de RNA mensajeros (*mRNA*) y está constituido por cuatro especies de RNA ribosómicos (*rRNA*), 89 proteínas ribosomales (*RP*) y la intervención de las tres RNA polimerasas.⁴⁵ Las RP son altamente conservadas en todas las formas de vida, su nomenclatura L y S se refiere a si pertenecen a la subunidad mayor (*large*) o menor (*small*).⁴⁶ Para llevar a cabo la traducción, es necesaria la unión de las subunidades 60S (mayor) y 40S (menor) sintetizadas en el nucleolo mediante el ensamblaje coordinado de los rRNA 5S, 5.8S, 18S y 28S y las RP, para conformar la maquinaria de traducción 80S. Además de ser componente de los ribosomas, las RP también participan de forma esencial en la biogénesis ribosomal, ya que promueven el correcto ensamblaje de las subunidades ribosómicas.^{46,47} Algunas de ellas también cumplen funciones extrarribosómicas.⁴⁷

Los virus requieren de la maquinaria celular tanto para la replicación de su genoma como para la traducción de sus proteínas virales, motivo por el cual la participación de las RP es necesaria para su ciclo biológico.⁴⁷ Ante la infección por algunos virus, como el del herpes, la traducción del mRNA celular se suprime selectivamente; no obstante, la traducción de los mRNA de las proteínas ribosomales aumenta y persiste de forma tardía.^{48,49} En las células infectadas, las RP pueden favorecer el ciclo replicativo viral al participar en la traducción de las proteínas virales, o mediante otras funciones extrarribosomales que favorezcan al virus.⁴⁷

La lista de proteínas virales que interactúan con diversas RP es relativamente extensa. La proteasa N-terminal (Npro) de *Pestivirus* interactúa con 26 RP⁵⁰ y la proteína P1 del Virus del grabado del tabaco se relaciona con 17 RP en *Nicotiana benthamiana*.⁵¹ Una proteína ribosomal ampliamente estudiada en diversas infecciones virales es la RPL18, la cual interactúa con proteínas virales y favorece la infección. RPL18 se une a los viriones del virus Ébola y, al disminuir su expresión, se inhibe la infección en células 293T⁵²; asimismo, al inhibir a RPL18 en células infectadas con el vector del *Tenuivirus* de las rayas de arroz, se inhibe la traducción y replicación viral.⁵²

1.3.3 Proteínas ribosomales y su interacción con NS1 de DENV

A la fecha se han descrito 3 interatomas para la proteína NS1 de DENV y proteínas celulares de vertebrado y mosquito, siendo un común denominador la presencia de las proteínas ribosomales. Cervantes-Salazar M. y cols. (2015) identificaron alrededor de 64 proteínas celulares que interaccionan con la proteína viral NS1 en células Huh-7 infectadas con DENV, entre las cuales el 48.2 % son proteínas ribosomales implicadas en la traducción.⁵³ Al silenciar mediante siRNA a la proteína RPL18 en células Huh-7, se generó una disminución en la progenie viral, demostrando que RPL18 participa en el ciclo replicativo de DENV.^{47,53} Otras RP identificadas en ese mismo estudio son RPL26, RPLa y RPL7.⁵³ En otro estudio realizado por Hafirassou M.L. y cols. (2017), se generó un análisis proteómico global de NS1 y proteínas de tres linajes celulares de humano (Raji, HeLa y HAP1) infectados con DENV.³⁹ En este estudio se hallaron 270 proteínas solapadas entre las 3 líneas celulares que interaccionan con NS1, de las cuales 6 son RP.³⁹ Recientemente en nuestro laboratorio, Caraballo GI, *et al.* (2022) generaron un interatoma de NS1 en células de mosquito infectadas con DENV, en donde se identificaron 13 proteínas ribosomales que interactúan con la proteína viral.⁴⁰

1.4 Proteína ribosomal L26 (RPL26)

RPL26, conformada por 145 aa y con un peso aproximado de 17.3 kDa, pertenece a la familia L24P de las proteínas ribosomales que constituyen a la subunidad 60S del ribosoma. RPL26 se encuentra ubicada en la superficie del ribosoma y próxima al túnel de salida de los péptidos recién sintetizados (**figura 9**).⁵⁷⁻⁵⁹

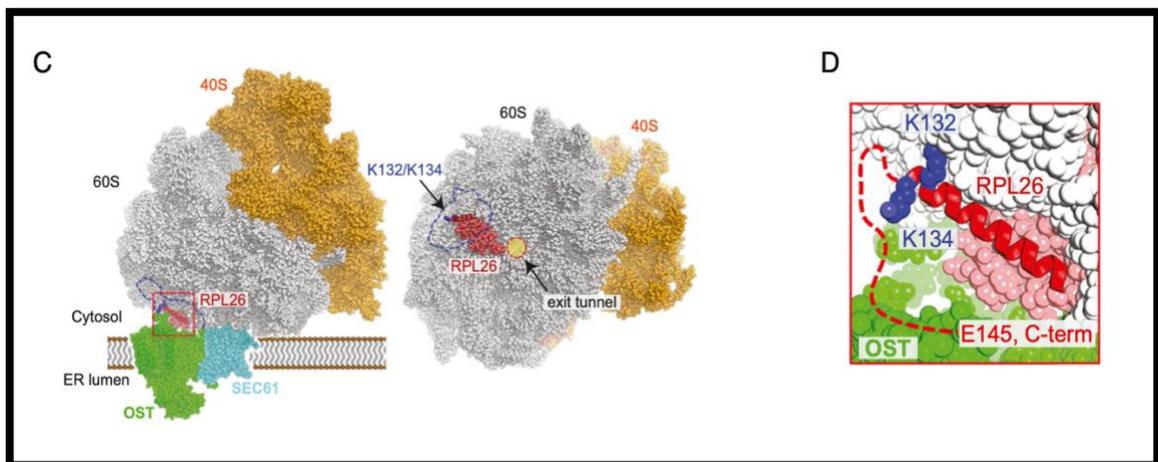


Figura 9. Localización de RPL26 en la subunidad 60S del ribosoma.

Tomado de Walczak C. y cols. 2019.⁵⁸

Además de formar parte del complejo ribosomal y participar tanto en la biogénesis del ribosoma como en la traducción de proteínas, diversos estudios han identificado funciones extrarribosomales de RPL26.

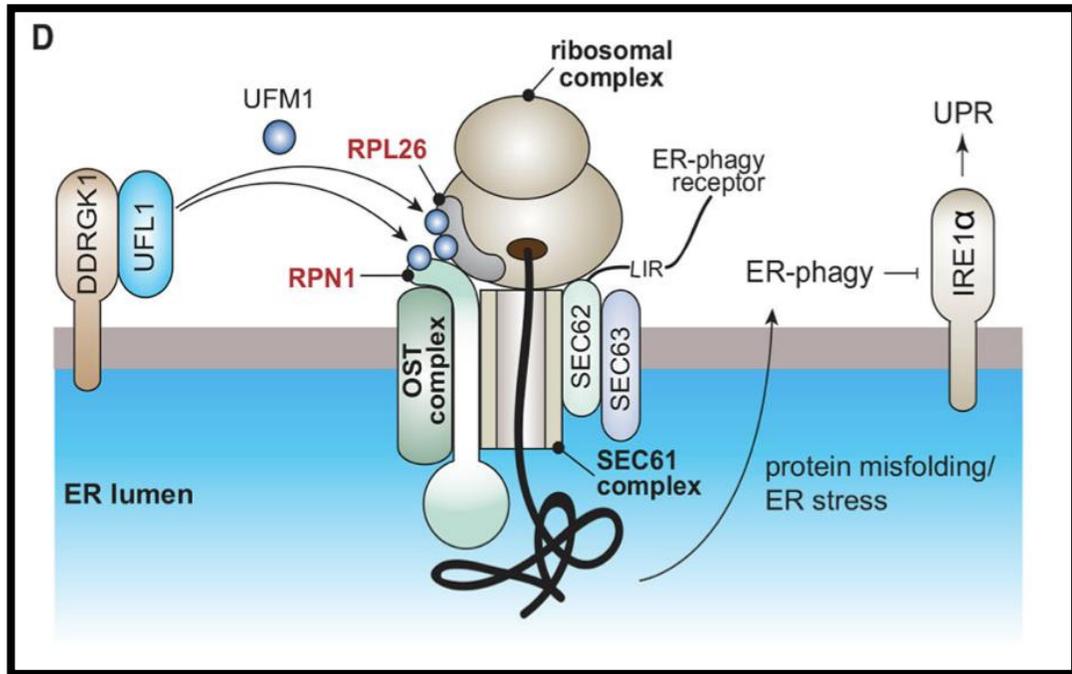


Figura 10. UFMilación de RPL26.

El estrés del RE debido a una proteína mal plegada translocada y el paro de la traducción. DDRGK1 recluta a UFL1-UFM1 para que esta UFMilice a RPL26 en sus dos residuos de lisina y se lleve a cabo un control de calidad. Tomado de Walczak C. y cols. 2019.⁵⁸

Los estudios hechos por Walczak C. y cols. (2019) y Wang L. y cols. (2020) identificaron que RPL26 es el principal blanco de una modificación postraduccional conocida como UFMilación. El modificador de pliegue de ubiquitina 1 (*ubiquitin fold modifier 1, UFM1*) es una proteína de 85 aa (11 kDa) esencial para el desarrollo cerebral y hematopoyético en la etapa embrionaria de diferentes mamíferos. Esta proteína se liga covalentemente a residuos de lisina de sus proteínas diana mediante una cascada de tres pasos catalizada por las enzimas E1, E2 y E3 (**figura 10**).⁵⁹ UFM1 se une a dos residuos de lisina (Lys 132 y Lys 134) que se encuentran en el extremo C-terminal de la proteína RPL26.^{58,59} Ante el estrés del RE por el estancamiento de cadenas nacientes en el translocón de Sec61 y al detenerse la traducción por los ribosomas, las proteínas DDRGK1 (cofactor), localizado en la membrana del RE, y CDK5RAP3, reclutan a UFL1 (*E3 protein ligase that mediates UFMylation*) y forman el complejo E3 ligasa. El complejo E3 ligasa media la actividad ligasa de UFM1, ocasionando la unión de este a RPL26/uL24 y Riboforina 1 (RPN1), una proteína

del complejo oligosacaryltransferasa (OST). La proteína adaptadora de UFL1, DDRGK1, que es crucial para promover la localización tanto de UFL1 como de CDK5RAP3, promueve la UFMilación de la lisina 134 de RPL26, mientras que la evidencia experimental sugiere que CDK5RAP3 dirige la UFMilación del segundo residuo de lisina (132).⁶⁰ La UFMilación de RPL26 permite que esta desempeñe un control de calidad distinto del ERAD (degradación asociada al RE) sobre las proteínas translocadas al RE, llevando a la degradación las cadenas nacientes aberrantes por vía lisosomal.⁵⁸⁻⁶¹ Una vez eliminada la proteína mal plegada, la proteína UFSP2 (*UFM1 Specific Peptidase 2*: peptidasa 2 específica de UFM1) se encarga de desUFMilizar a RPL26.⁶⁰

En un estudio realizado por Kulsuptrakul J. y cols. (2021), utilizando la técnica CRISPR a escala del genoma, se identificó que el virus de la Hepatitis A, un virus con genoma de RNA en sentido positivo que pertenece a la familia *Picornaviridae*, depende específicamente de la conjugación de la UFM1 con la proteína ribosomal RPL26 para llevarse a cabo la traducción del RNA viral.^{62,63}

Entre otras funciones de RPL26, se ha encontrado que interactúa con HDM2, una ubiquitina ligasa E3 cuya sobreexpresión conduce a la inactivación de p53. RPL26 modula la interacción de HDM2 y p53 formando un complejo ternario que estabiliza a p53 al inactivar la actividad ubiquitina ligasa de HDM2.⁶³ Además, se ha identificado que la expresión de la proteína p73, un supresor tumoral de la familia p53, es controlada por RPL26 a través de la estabilidad de la proteína y la traducción de su mRNA.⁶⁵

Recientemente, como parte de un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, Caraballo G.I. y cols. (2022), se identificó mediante inmunofluorescencia y ensayo de ligación por proximidad (PLA) una fuerte interacción de RPL26 con NS1 del DENV en células infectadas en mosquito (**figura 11**).⁴⁰

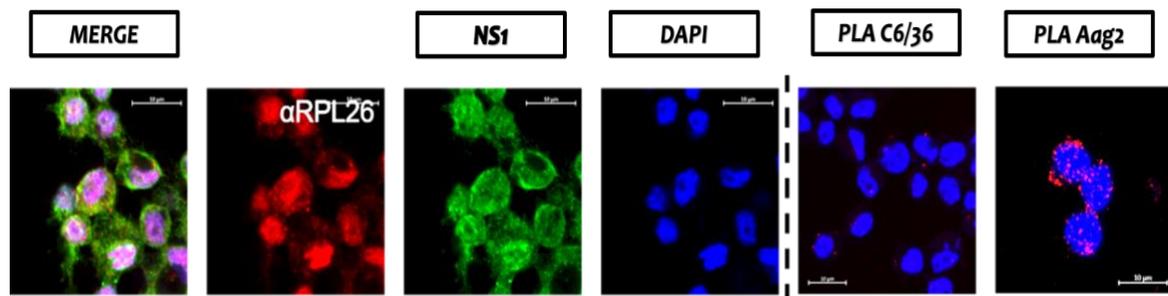


Figura 11. Colocalización y ensayo de ligación por proximidad entre NS1 de DENV2 y RPL26.

Tomado de Caraballo G.I. y cols. 2022.⁴⁰

II. JUSTIFICACIÓN

La NS1 de los diferentes miembros del género *Flavivirus* es una proteína viral multifuncional necesaria para el proceso de replicación y patogénesis viral. Su interacción con diversas proteínas celulares facilita el desarrollo del ciclo replicativo de flavivirus como los DENV y ZIKV.

De acuerdo con los interatomos realizados por Cervantes-Salazar M. y cols. (2015)⁵², Hafirassou M.L. y cols. (2017)³⁸ y Caraballo G. y cols. (2022)³⁹, la NS1 de DENV interacciona con RPL26 y con los complejos OST y Sec61 en células de vertebrado y de mosquito. Debido a su cercanía y funciones, se considera que el translocón de Sec61 y el complejo OST, ambos presentes en la membrana del RE, forman un complejo con RPL26. La importancia del complejo OST y de Sec61 en la replicación de DENV y ZIKV se conoce; no obstante, hace falta estudiar la importancia y la participación de RPL26 durante el ciclo replicativo viral. Es debido a lo anterior, que se plantea evaluar la participación de la RPL26 en el ciclo replicativo de DENV. Los resultados obtenidos nos ayudarán a comprender mejor la biología de los flavivirus y la interacción virus-célula.

III. HIPÓTESIS

- **Hi1** “La RPL26 participa en el ciclo replicativo de los flavivirus DENV y ZIKV”.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la participación de la proteína RPL26 en el ciclo replicativo de los flavivirus DENV y ZIKV en células de vertebrado.

4.2 Específicos

- 1) Evaluar la interacción de RPL26 con la proteína NS1 de DENV-2 y ZIKV-MR77 en células BHK-21 infectadas.
- 2) Analizar cambios en la expresión de la proteína RPL26 en células BHK-21 infectadas con DENV-2 y ZIKV-MR77.
- 3) Medir la progenie de DENV-2 y ZIKV-MR77 en células BHK-21 silenciadas para RPL26.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

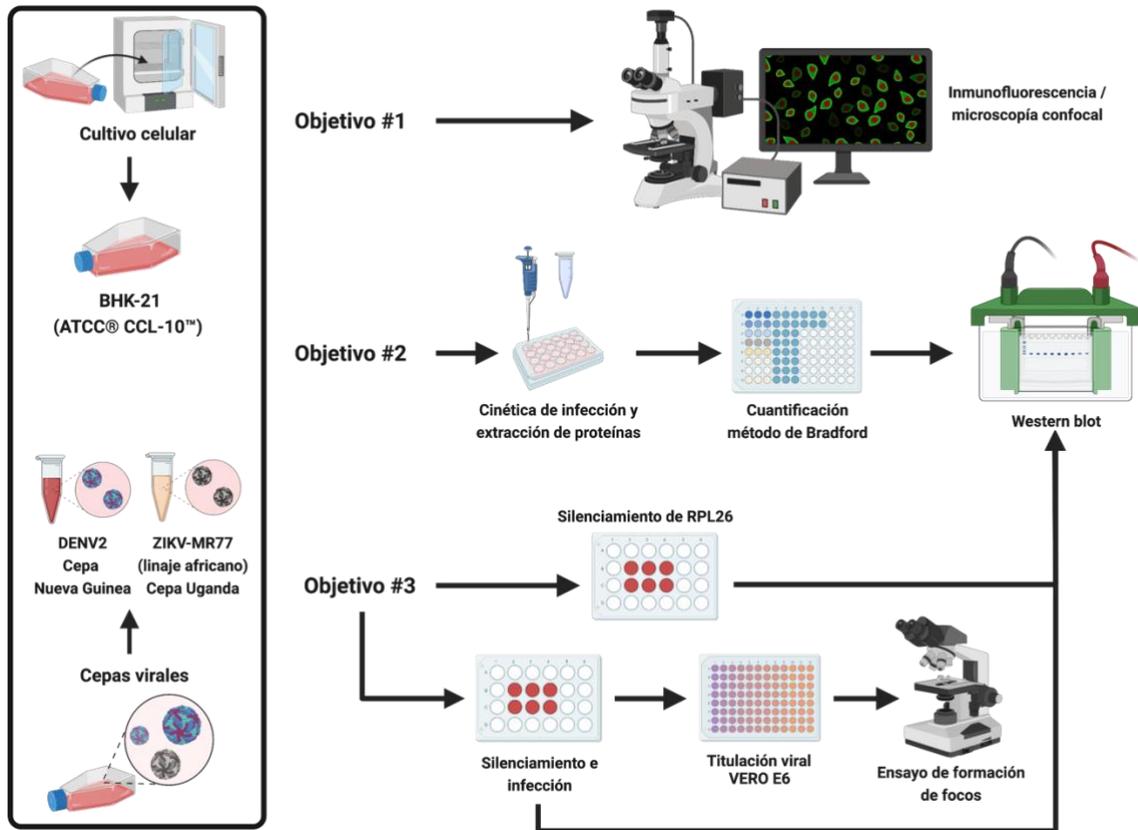


Figura 12. Estrategia experimental.
Elaboración propia en BioRender.com

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivo celular

Para la realización de los experimentos, se empleó la línea celular BHK-21 (ATCC® CCL-10™) (**figura 13**), derivada de fibroblastos de riñón de hámster bebé. Las células BHK-21 se cultivaron en placas T-25 a 37 °C con 5 % de CO₂ en medio mínimo esencial de águila (*Eagle's minimal essential médium*, EMEM, ATCC®: 30-2003) con 100 U/ml de penicilina-estreptomicina complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Asimismo, se utilizaron células C6/36 (ATCC® CRL-1660™), células de epitelio intestinal de la etapa larvaria de *Ae. albopictus*, cultivadas en placas T-25 a 28 °C con 5 % de CO₂ crecidas con EMEM + antibiótico + SFB al 5%; y células VERO-E6 (ATCC® CRL-1586™), células epiteliales del riñón de mono verde africano, cultivadas en placas T-25 a 37 °C con 5 % de CO₂ crecidas con EMEM + antibiótico + SFB al 5 %.

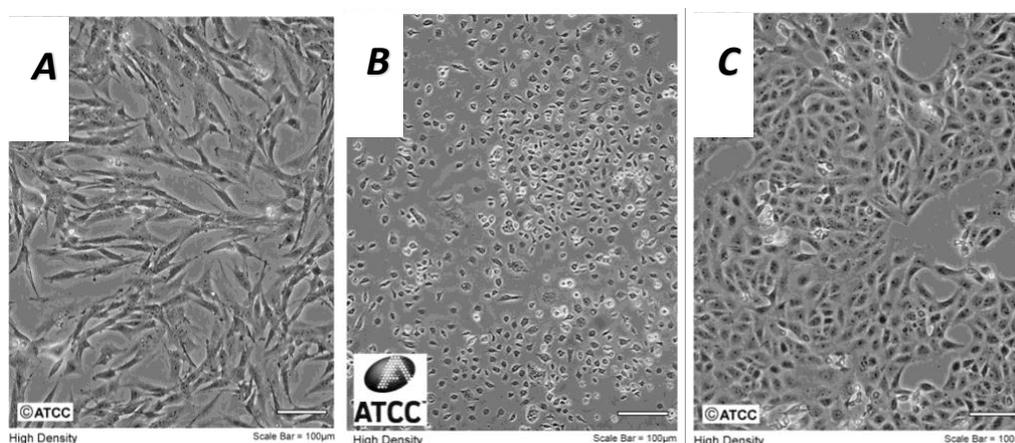


Figura 13. Líneas celulares BHK21 (A), C6/36 (B) y VERO-E6 (C).

6.2. Cepas virales

Se utilizó DENV serotipo 2 (DENV2) cepa Nueva Guinea y ZIKV linaje africano (ZIKV-MR77), cepa Uganda. Las cepas de DENV2 y ZIKV-MR77 se propagaron en células C6/36. Los títulos virales se valoraron mediante un ensayo de formación de focos en células VERO E6; para ello, las células sembradas en placas de 96 pozos se inocularon con diluciones seriadas (10X) de los sobrenadantes de cultivo y se fijaron a las 24 hpi. Las células infectadas se revelaron utilizando un Mab pan-flavivirus (4G2) antiproteína E como anticuerpo primario y un antirratón conjugado a peroxidasa, como anticuerpo secundario. Los títulos virales obtenidos fueron de 4.5×10^8 UFF/ml para DENV2 y 2.2×10^8 UFF/ml para ZIKV-MR77.

6.3. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células BHK-21 se cultivaron en multiplacas de 24 pozos, sobre cubreobjetos de 12 mm, células BHK-21 suplementadas con EMEM + SFB al 10 % y se dejaron crecer por 24 horas. Al alcanzar una confluencia entre el 80 y el 90 %, las células se infectaron con DENV2 y ZIKV-MR77 usando una MOI=3 en un volumen de 300 µl; además, se utilizó la condición “MOCK” como control de no infección. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Se agregaron 700 µl EMEM + SFB al 10 % por pozo a las 2 horas.

Pasadas las 24 horas postinfección, se retiró el inóculo y los pozos se lavaron con 1 ml de PBS 1x por dos ocasiones. Las células se fijaron a temperatura ambiente por 12 minutos con 300 µl de formaldehído al 4 %. Enseguida, se repitieron los lavados con 1 ml de PBS 1x y se permeabilizaron por 12 minutos con 300 µl de PBS + Tritón al 0.2 %. Se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS 1x y las células se bloquearon con gelatina de pescado al 2.5 % por una hora a 37 °C. Se retiró la solución de bloqueo y se agregaron 300 µl de la mezcla de anticuerpos primarios: anti-RPL26 hecho en conejo (GeneTex-GTX118577, 1:300) y anti-Flavivirus NS1 hecho en ratón (abcam-ab214337, 1:500); la mezcla de anticuerpos se realizó con 10 % de solución de bloqueo y PBS Tween al 0.1 %. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con 1 ml de PBS-Tween al 0.1 % por pozo y se agregaron 300 µl de la mezcla de anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 647 antirratón (Abcam-ab150111, 1:800) y Alexa Fluor 488 anticonejo (Abcam-ab150065, 1:800); la mezcla de anticuerpos se realizó con 10 % de solución de bloqueo y PBS-Tween al 0.1 %. Las multiplacas de 24 pozos se cubrieron con papel aluminio y se dejó incubar con los anticuerpos secundarios por 2 horas a 37 °C. Se retiró la mezcla de anticuerpos, se agregó la mezcla de DAPI (SIGMA-D9542) en PBS-Tween al 0.1 % y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en movimiento. Se retiró la mezcla con DAPI y los pozos se lavaron con 1 000 µl de PBS Tween al 0.1 % por cuatro ocasiones. Los cubreobjetos se colocaron en portaobjetos con solución de montaje y fueron observadas por microscopía confocal en un microscopio Zeiss LSM700. Las imágenes se editaron con el software ZEN 3.4 (*blue edition*).

6.4. Cinética de infección y ensayos de Western blot

Se cultivaron células BHK-21 suplementadas con EMEM + SFB al 10 % en multiplacas de 24 pozos y se dejaron crecer por 24 horas. Al alcanzar una confluencia de entre el 80 y 90 %, las células se infectaron con DENV2 y ZIKV-MR77 usando una MOI=3 en un volumen de 300 μ l y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Se agregaron 700 μ l de EMEM + SFB al 10 % por pozo a las 2 horas. Las células fueron lisadas con 100 μ l de buffer de lisis (RIPA) a las 6, 12, 24 y 48 horas postinfección. Se utilizaron dos condiciones MOCK a las 0 y 48 horas como controles de no infección. El extracto total fue cuantificado para proteínas por el método de Bradford y se leyó en un espectrofotómetro de la marca BioTek a una longitud de onda de 620 nm.

Se colocaron μ g de proteína en geles de poliacrilamida al 12 % y se llevó a cabo la electroforesis por 2 horas en buffer de corrida 1x a un voltaje entre 90 y 130 V. Posteriormente, el gel se colocó en el casete de transferencia y se dejó incubar por 30 minutos en buffer de transferencia frío. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a un voltaje de 100 V en buffer de transferencia frío. Una vez concluida la transferencia, la membrana se reveló con rojo de Ponceu durante 5 minutos en movimiento continuo. La membrana se cortó de acuerdo con los pesos moleculares de interés y se lavaron en tres ocasiones con PBS 1x para retirar el rojo de Ponceu. Las membranas se bloquearon con leche descremada (Carnation) al 5 % + PBS Tween al 0.1 % durante una hora con movimiento continuo. Se retiró el bloqueo, se realizó un lavado con PBS-Tween al 0.1 % y se agregó la mezcla de anticuerpos primarios: anti-RPL26 hecho en conejo (GeneTex-GTX118577, 1:500), Mab pan-flavivirus (E1D8) antiproteína NS3 hecho en ratón (sin catálogo, 1:1000) y anti- β -actina hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology-sc-81178, 1:1000); la mezcla de anticuerpos se realizó con 1 % de leche descremada y PBS Tween al 0.1 %. Las membranas se dejaron incubar a 4 °C en agitación continua por toda la noche.

Posteriormente, se retiraron los anticuerpo primarios y se realizaron dos lavados con PBS Tritón al 0.2 % y dos lavados con PBS-Tween al 0.1 %, cada lavado con una duración de 10 minutos en movimiento continuo. Se agregó la mezcla de anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (Genetex-GTX26721, 1:5,000) y anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (HRP) (Jackson ImmunoResearch-115-035-003, 1:5,000); la mezcla de anticuerpos se realizó con 1 % de leche descremada y PBS Tween al 0.1 %. Las

membranas se dejaron incubar por dos horas en movimiento continuo a temperatura ambiente. Se retiraron los anticuerpos secundarios y se repitieron 2 lavados con PBS-Tritón al 0.2 % y 2 lavados con PBS-Tween al 0.1 %, cada lavado con una duración de 10 minutos en movimiento continuo. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo-Scientific - Lot:WG328673) en un fotodocumentador ImageQuant LAS 400. Finalmente, la intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría mediante el software icy-*ImageJ* y los datos se normalizaron mediante las bandas de β -actina.

6.5. Silenciamiento de RPL26 mediante siRNA

Se cultivaron células BHK-21 suplementadas con medio EMEM más suero fetal bovino al 10 % en multiplacas de 24 pozos y se dejaron crecer por 24 horas. Se utilizó un siRNA comercial específico para RPL26 (Qiagen- FlexiTube GeneSolution GS6154 for RPL26 [1 nmol] GS6154) que contiene 4 siRNA específicos, el reactivo AllStars™ Neg. Control siRNA (Qiagen, Cat. No. / ID: SI03650318) que contiene siRNA irrelevantes y el vehículo HiPerFect Transfection Reagent (Cat. No. 301705). Las condiciones para la transfección fueron las siguientes:

	siRNA	Vehículo (Hiperfect)	EMEM	Volumen final por pozo
Sin tratamiento	-----	-----	300 µl	300 µl
Vehículo	-----	3 µl	297 µl	300 µl
AllStars	3 µl	3 µl	294 µl	300 µl
siRNA RPL26 (100 nM)	12 µl	3 µl	285 µl	300 µl
siRNA RPL26 (50 nM)	6 µl	3 µl	291 µl	300 µl

Tabla 2. Condiciones de los siRNA utilizados.

Las diferentes mezclas se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A las células se les retiró el medio y se lavaron por dos ocasiones con 800 µl EMEM. Una vez transcurrida la incubación de las mezclas, se agregaron los 300 µl a su respectivo pozo. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. Las células transfectadas se complementaron con 300 µl EMEM + SFB al 10 % a las 5 horas. Una vez pasadas las 24 horas posttransfección, las células fueron extraídas y lisadas con 100 µl de buffer de lisis (RIPA). El extracto total fue cuantificado por el método de Bradford y el silenciamiento se corroboró por medio de Western blot siguiendo el protocolo del punto 6.4. Las membranas se incubaron con los Ac. primarios: anti-RPL26 hecho en conejo (GeneTex-GTX118577, 1:500) y anti-β-actina hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology-sc-81178, 1:1000).

6.6. Ensayo de viabilidad celular MTS

Se cultivaron células BHK-21 suplementadas con medio EMEM más suero fetal bovino al 10 % en multiplacas de 96 pozos y se dejaron crecer durante 24 horas. Se siguió el protocolo planteado en el punto 6.5 para llevar a cabo el silenciamiento de RPL26, utilizando un volumen final de 50 µl por pozo. Las células se incubaron 37 °C con 5 % de CO₂ por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas postransfección, se retiró el medio y agregó 50 µl de EMEM + 10 µl del reactivo The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, G3580) por pozo. Se dejó incubar durante 30 minutos a 37 °C observando el cambio de coloración. La viabilidad se midió a los 30 minutos en un espectrofotómetro de la marca BioTek a una longitud de onda de 490 nm. Los valores de viabilidad fueron expresados como porcentaje, tomando como 100 % la condición control, sin tratamiento.

Este método colorimétrico para la evaluación de la proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular consiste en la conversión de la sal de tetrazolio MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) en un formazán púrpura en presencia de metosulfato de fenazina. Las enzimas responsables son deshidrogenasas dependientes de NADPH, que están activas en las células viables

6.7. Titulación viral y ensayo de formación de focos

Se cultivaron células BHK-21 suplementadas con EMEM + SFB al 10 % en multiplacas de 24 pozos y se dejaron crecer durante 24 horas. Al alcanzar una confluencia de entre el 80 y el 90 %, las células se transfectaron con siRNA y vehículos de acuerdo con el protocolo descrito en el punto 6.7. Las condiciones utilizadas fueron: sin tratamiento, siRNA irrelevantes y siRNA específico para RPL26 a una concentración de 100 nM; se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. Las células se complementaron con 300 µl EMEM + SFB al 10 % a las 5 horas. Pasadas las 24 horas postransfección, las células se infectaron con DENV2 y ZIKV-MR77 usando una MOI=3 en un volumen de 300 µl y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Se agregaron 700 µl EMEM + SFB al 10 % por pozo a las 2 horas. Una vez pasadas las 24 horas postinfección, se retiró el sobrenadante de las células, se alicuotó y se guardó a -80 °C hasta su uso en los ensayos de focos. Además, para corroborar el silenciamiento de RPL26 por WB, las células fueron lisadas con 100 µl de buffer de lisis (RIPA).

Los sobrenadantes de las células silenciadas para RPL26 e infectadas fueron titulados por ensayos de focos. Para ello, se cultivaron células VERO-E6 suplementadas con EMEM + SFB al 5 % en multiplacas de 96 pozos y se dejaron crecer durante 72 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Al alcanzar una confluencia del 100 %, las células se infectaron con los sobrenadantes recolectados de las células BHK21 silenciadas e infectadas. Se hicieron tres diluciones seriadas 1:10 con los sobrenadantes (10:1, 10:2, 10:3 y concentraciones totales) siendo infectadas las células VERO-E6 con 50 µl de las diluciones; posteriormente, se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 48 horas. Se hicieron dos réplicas técnicas de cada réplica biológica. Las células se complementaron con 150 µl EMEM + SFB al 12% a las 2 horas

Pasadas las 48 horas postinfección, se retiró el inóculo y las células se fijaron con 100 µl de formaldehído al 4 % a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se retiró el medio de fijación y se realizaron dos lavados con 200 µl de PBS 1x. A continuación, se permeabilizaron con 100 µl metanol frío (-20 °C) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se retiró el metanol y se agregaron 50 µl de SFB al 10 % como agente bloqueador diluido en PBS Tween al 0.1 % y el anticuerpo primario Mab pan-flavivirus (4G2) antiproteína E (sin catálogo, 1:500). Se dejó incubar toda la noche a 4 °C.

Se retiró la mezcla y realizaron tres lavados con 200 µl de PBS Tween al 0.1%. Se agregó 50 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (HRP) (Jackson ImmunoResearch-115-035-003, 1:2,500) diluido en PBS Tween al 0.1%. Se dejó incubar 1 hr. A 37 °C. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados con 200 µl de PBS-Tween al 0.1%. Se agregaron 50 µl del DAB substrate kit peroxidase (with Nickel) (Vector Laboratories – SK-4100) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Se cuantificó la cantidad de focos (células con el citoplasma marcado en gris) de la dilución más baja perceptible a los focos. Los resultados se expresaron como UFF/ml, utilizando la siguiente formula:

$$(número\ de\ focos) \times (factor\ de\ dilución) \times 20$$

El extracto total de las proteínas recolectadas se cuantificó por método de Bradford y el silenciamiento e infección se corroboraron por medio de Western blot siguiendo el protocolo del punto 6.5 y usando los anticuerpos primarios: anti-RPL26 hecho en conejo (GeneTex-GTX118577, 1:500), anti-β-tubulina hecho en conejo (GeneTex-GTX101279,

1:10,000), Mab pan-flavivirus (7E11) antiproteína NS1 hecho en ratón (sin catálogo, 1:1000), Mab pan-flavivirus (E1D8) antiproteína NS3 hecho en ratón (sin catálogo, 1:1000) y anti- β -actina hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology-sc-81178, 1:1000). Finalmente, la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría mediante el software icy-ImageJ y los datos se normalizaron mediante las bandas de β -tubulina para RPL26 y NS1 o β -actina para el caso de NS3.

6.8. Red de interacción proteína-proteína

Se realizó la red *in silico* de interacción proteína-proteína mediante la base de datos STRING: <https://string-db.org/>. Se analizó la interacción entre RPL26, RPL18 y otras 11 proteínas, tres del complejo de Sec61: Sec61 α 1, Sec61 α 2 y Sec61 β ; y ocho del complejo OST: RPN1, RPN2, STT3A, STT3B, DDOST, DAD1, OST4 y MAGT1. La red se realizó de acuerdo con los antecedentes experimentales y descritos en la especie *Homo sapiens*.

6.9. Análisis estadístico

Los resultados se graficaron de acuerdo con los datos de tres experimentos independientes, expresándose sus medias \pm desviación estándar en el software GraphPad Prism, versión 6.01. Los análisis estadísticos utilizados fueron: ANOVA de múltiples comparaciones y t de student. Para corroborar la colocalización entre las proteínas de interés, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson en el software icy-Imagej.

VII. RESULTADOS

7.1. Colocalización entre NS1 y RPL26 en células BHK21 infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77

La colocalización en células BHK21 entre NS1 de DENV2 o ZIKV-MR77 con la RPL26 se evaluó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. En la **figura 14**, la marca de RPL26 (verde) se encuentra distribuida en el citoplasma y el núcleo, tanto en las células infectadas como no infectadas (MOCK). Esta es la distribución normal reportada para esta proteína, ya que parte de la síntesis de las subunidades ribosomales (pre-60S y pre-40S) se lleva a cabo en el nucleoplasma y los ribosomas maduros (80S) se encuentran asociados al RE en el citoplasma.^{46,66} Asimismo, la marca de NS1 (rojo) específica en las células infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77 presenta una distribución nuclear y citoplásmica, aunque de mayor intensidad en citoplasma en comparación con la marca nuclear.

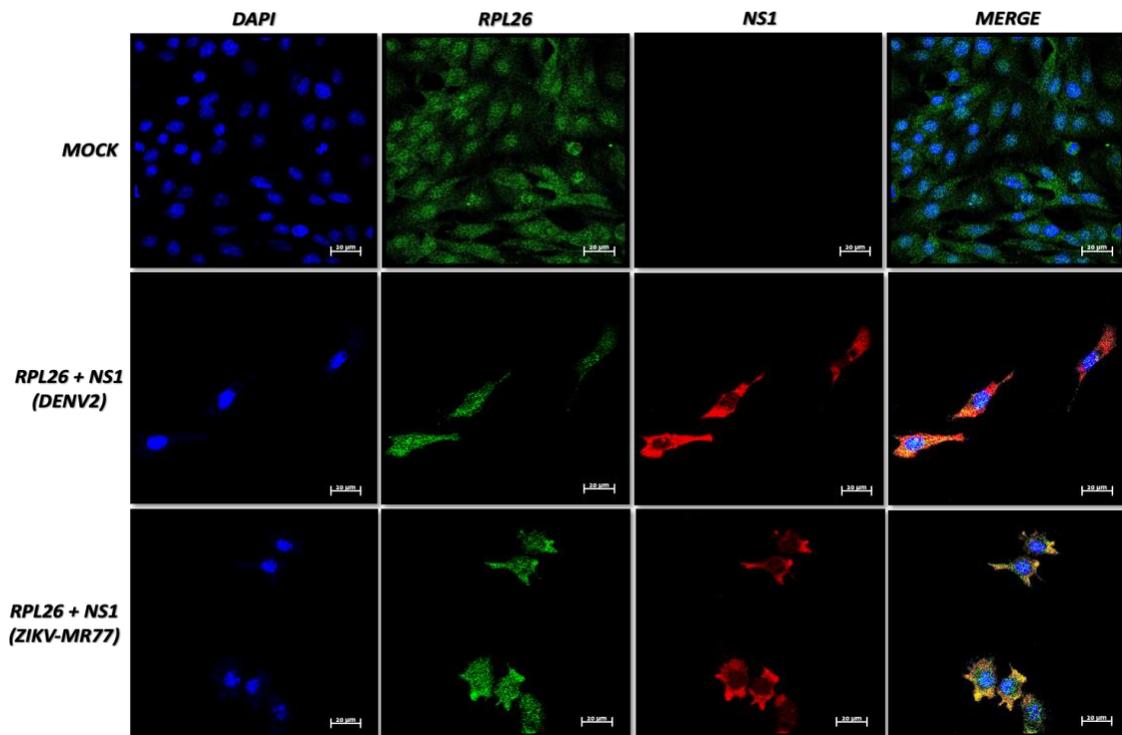


Figura 14. Colocalización de RPL26 y NS1 en células BHK21 infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77. Imágenes de inmunofluorescencia por microscopía confocal de células fijadas a las 24 hpi. La señal de NS1 de los virus DEN2 o ZIKV-MR77 se muestra en rojo; la proteína celular RPL26 se muestra en verde, y la colocalización de ambas proteínas en amarillo. El panel “merge” muestra los valores de PCC obtenidos para cada condición.

A pesar de que el ciclo replicativo de los flavivirus se lleva a cabo en el citoplasma, se ha informado la presencia de algunas proteínas virales en el núcleo, como C, NS5 y NS3,

aunque su papel todavía no ha sido del todo dilucidado.⁶⁷ De acuerdo con Reyes-Ruíz J.M. y cols. (2018), la NS1 de DENV también se encuentra en el núcleo de células de mosquito infectadas, en concordancia con los resultados de nuestro estudio.⁶⁷

Por medio de la microscopía confocal, se pudo observar colocalización positiva entre las proteínas RPL26 y NS1 (MERGE) en las células infectadas con DENV2 y con ZIKV-MR77, obteniéndose coeficientes de correlación de Pearson por encima de 0.6 (0.64 para DENV2 y 0.61 para ZIKV-MR77). Estos resultados sugieren que en células BHK21 infectadas con DENV y ZIKV, la proteína NS1 colocaliza con RLP26. Además, estos resultados concuerdan y expanden resultados previos obtenidos por Cervantes-Salazar M. y cols. (2015)⁵² en células de hígado humanas y Caraballo G.I. y cols. (2022)⁴⁰ en células de mosquito que sugieren dicha interacción.

7.2. Cinética de expresión de RPL26 en células BHK21 infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77

Para evaluar los niveles de expresión de RPL26 durante la infección con DENV2 y ZIKV-MR77, se realizaron ensayos de Western blot en células BHK21 infectadas a una MOI=3. Los extractos celulares totales se cosecharon a las 6, 12, 24 y 48 hpi, además de extractos de condiciones MOCK a las 0 y 48 horas. Como control de infección, se midió la proteína viral NS3 (70 kDa). En la **figura 15** se muestra la cinética de expresión de RPL26 durante la infección por DENV2 (**A**) o ZIKV-MR77 (**B**).

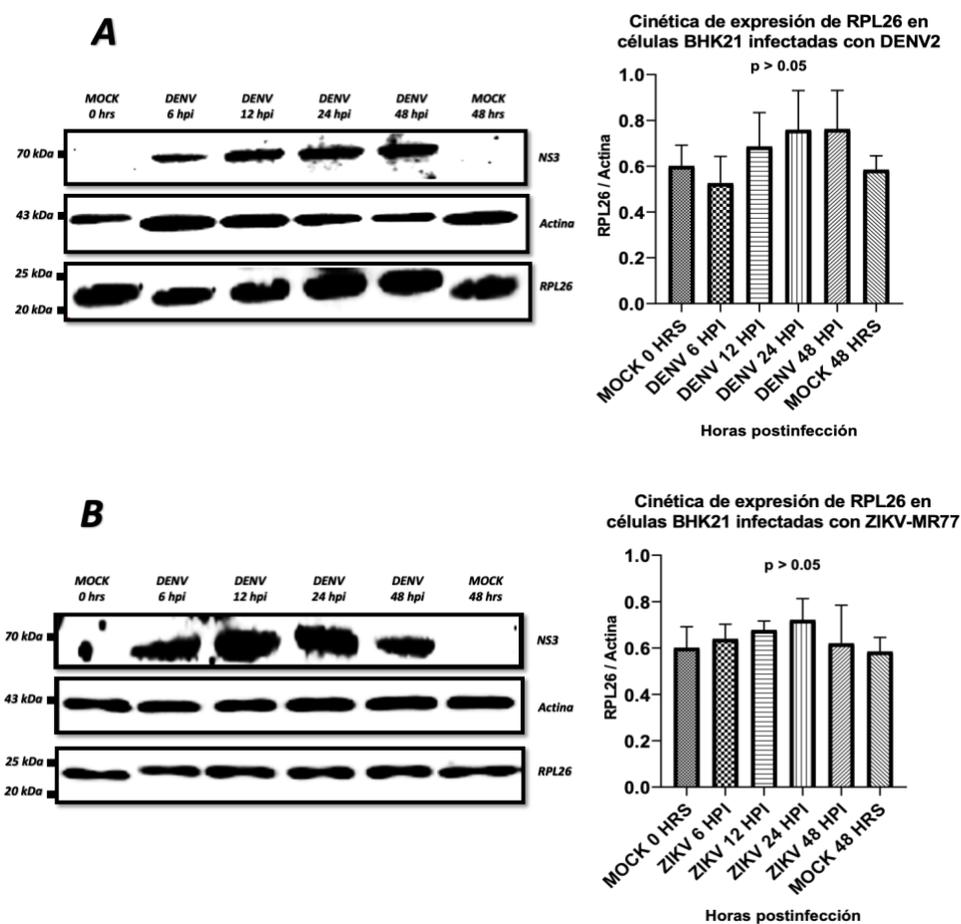


Figura 15. Expresión de RPL26 en células BHK21 infectadas con DENV2 y ZIKV-MR77.

Extractos totales de células BHK21 infectadas fueron recolectados a las 6, 12, 24 y 48 hpi; como control negativo, se recolectaron extractos de células “mock” a las 0 y 48 horas. Los diferentes tiempos postinfección se analizaron por Western blot usando anticuerpos anti-RPL26, anti- β -actina como control de carga y anti-NS3 como control de infección. **Panel A**, células infectadas con DENV. **Panel B**, células infectadas con ZIKV. A la derecha de cada panel se muestra el análisis por densitómetro de 3 experimentos independientes. $p > 0.05$.

Se puede apreciar que durante la infección con DENV2 (**figura 15-A**), la proteína celular RPL26 aumenta moderadamente su expresión con respecto a los MOCK de 0 y 48 horas a partir de las 12 hpi y mantiene una meseta a las 24 y 48 hpi; sin embargo, dichos cambios no resultaron estadísticamente significativos. Una situación similar ocurre con la infección con ZIKV-MR77 (**figura 15-B**) ya que RPL26 comienza a aumentar su expresión a las 6 hpi y se mantiene al alza hasta las 24 hpi, encontrándose un descenso para las 48 hpi; sin embargo, como ocurre en la infección por DENV2, los cambios de expresión no resultaron estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que RPL26 no modifica de manera importante sus niveles a lo largo de la infección con DENV o ZIKV; esto en concordancia con lo observado por Cervantes-Salazar M. y cols. (2015) en su estudio realizado con otras proteínas ribosomales, como L18, L18a, L7 y S3a.

7.3. Silenciamiento mediante siRNA específicos de RPL26 en células BHK21.

Se identificó que la RPL26 colocaliza con NS1 de DENV2 y ZIKV-MR77; sin embargo, no varía significativamente su expresión a lo largo de la infección. Con el fin de identificar si esta proteína ribosomal participa en el ciclo replicativo de estos virus, se procedió a silenciar a RPL26 por medio de siRNA específicos. Debido a la relevancia de las proteínas ribosomales como parte del ribosoma maduro y su función en la traducción de proteínas, se procedió, además, a estandarizar la concentración ideal de siRNA para silenciar la expresión de RPL26 sin alterar la viabilidad celular.

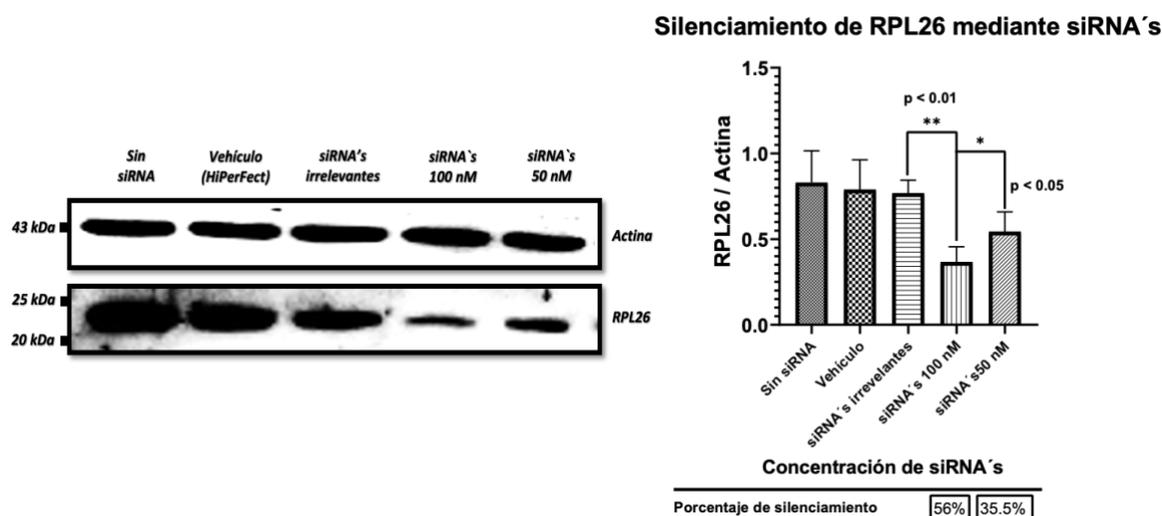


Figura 16. Silenciamiento de RPL26 en células BHK21 mediante siRNA específicos.

Las células BHK21 fueron transfectadas con 50 o 100 nM de siRNA anti-RPL26 o con 100 nM de siRNA irrelevantes; además, se incluyó una condición con el transfectante HiPerFect y otra sin tratamiento. Los extractos totales de las proteínas se analizaron por Western blot (panel derecho). Los análisis densitométricos y estadísticos mostraron un silenciamiento significativo de la expresión de RLP26 en las concentraciones de 50 y 100 nM de los siRNA. Los análisis densitométricos se realizaron sobre 3 experimentos independientes.

Se observó una reducción significativa de los niveles de la proteína con las 2 concentraciones probadas de los siRNA específicos para RPL26, a las 24 hpt. El silenciamiento se midió en contraste con los siRNA irrelevantes, observándose una reducción en la expresión de RPL26 del 35.5 % para la concentración 50 nM ($p < 0.05$) y del 56 % para 100 nM ($p < 0.01$) en tres experimentos independientes (**figura 16**).

Una vez corroborado el silenciamiento, se procedió a evaluar la viabilidad de las células en estas condiciones; para ello, se utilizó la prueba de viabilidad celular MTS mediante el reactivo The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Los resultados de la prueba de viabilidad celular utilizando MTS presentados en la **figura 17**

indican que el tratamiento con los siRNA para RLP26 no afectan significativamente la viabilidad celular, ya que esta se mantuvo por encima del 95 % en todas las condiciones probadas. En particular, al utilizar la concentración de 100 nM de ambos siRNA, se determinó que no se produjo citotoxicidad. Como en estas condiciones se obtuvo un silenciamiento mayor al 50 % con el siRNA específico para la RLP26, se utilizó esta concentración para los experimentos subsecuentes.

Porcentaje de prueba de viabilidad celular MTS de células BHK21 silenciadas

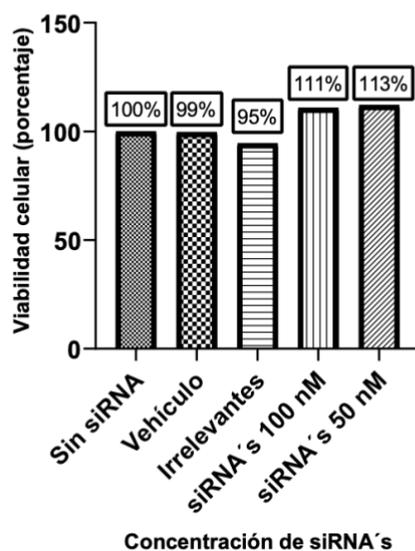


Figura 17. Viabilidad de células BHK21 silenciadas para la expresión de RPL26.

Se evaluó la viabilidad de las células BHK21 silenciadas para RPL26 con las concentraciones de siRNA de 50 y nM, así como para el vehículo HiPerFect, los siRNA irrelevantes y las células sin tratamiento. La viabilidad se midió a las 24 hpt con el reactivo The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. La absorbancia se evaluó a 490 nm en un espectrofotómetro y los resultados se expresaron como porcentaje. Se presentan resultados promedio de 4 experimentos independientes.

7.4. Titulación de progenie viral y ensayo de formación de focos de células de vertebrado silenciadas para RPL26 e infectadas con DENV2 o ZIKV-MR77

Una vez estandarizadas las condiciones para el silenciamiento de RPL26, se procedió a transfectar a las células, y a las 24 hpt se infectaron con DENV2 o ZIKV-MR-77 a una MOI=3. Lo anterior con el objetivo de evaluar el efecto de la ausencia de RPL26 en la producción de progenie viral y en la expresión de proteínas virales como NS1 y NS3.

Los sobrenadantes de las células transfectadas e infectadas se recolectaron a las 24 hpi y se titularon en células VERO-E6. Los resultados pueden observarse en la **figura 18**.

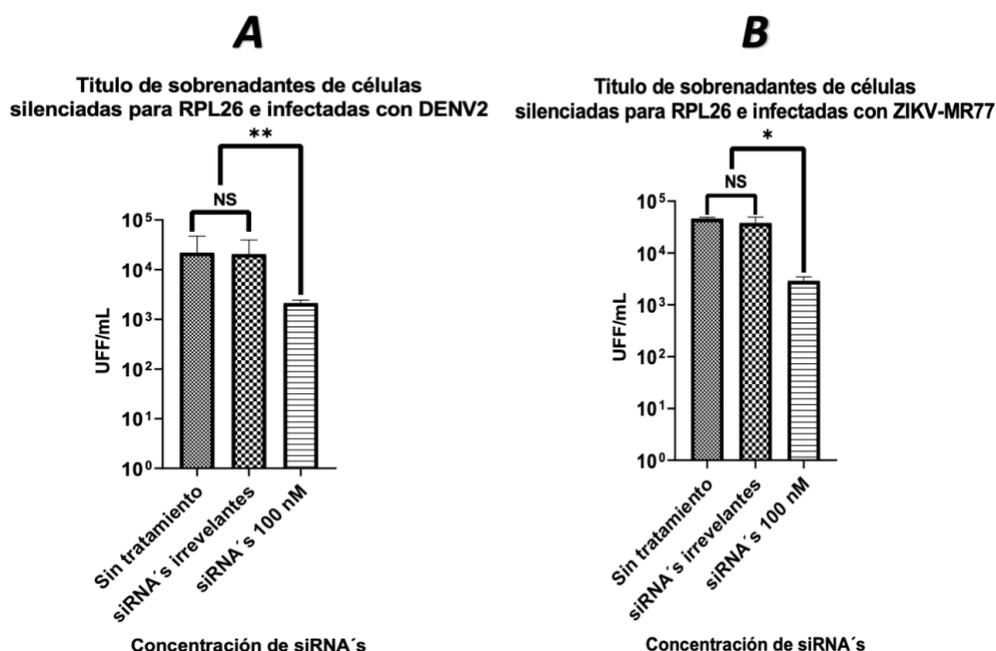


Figura 18. Progenie viral de DENV2 y ZIKV-MR77 generada de células BHK-21 silenciadas o no, para RPL26.

Las células BHK21 silenciadas con una concentración de 100 nM de siRNA específicos para RPL26 fueron infectadas con DENV2 (panel A) o ZIKV-MR77 (panel B), además se tomó como control a siRNA irrelevantes. Los sobrenadantes, cosechados a las 24 hpi, se titularon en células VERO-E6 por un ensayo de formación de focos. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. $n = 3$.

Se obtuvo una reducción estadísticamente significativa de la progenie viral en las células silencias con los siRNA específicos para RPL26 en relación con los controles, tratados con siRNA irrelevantes. En las células silenciadas, las progenies virales se redujeron aproximadamente en 1 log en la infección por DENV2 ($p < 0.01$) y ZIKV-MR77 ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la RPL26 es necesaria en el ciclo replicativo de DENV2 y ZIKV-MR77.

Al comprobarse la reducción de la progenie viral cuando se reducen los niveles de RPL26, se procedió a evaluar los niveles de expresión de las proteínas NS1 y NS3 en las células infectadas utilizando los extractos protéicos de las células, por ensayos de Western blot. Además, se utilizaron los extractos para evaluar la eficiencia de silenciamiento de RPL26 sobre el mismo experimento. Los resultados de estos ensayos pueden apreciarse en las **figuras 19 y 20** para los DENV y ZIKV, respectivamente.

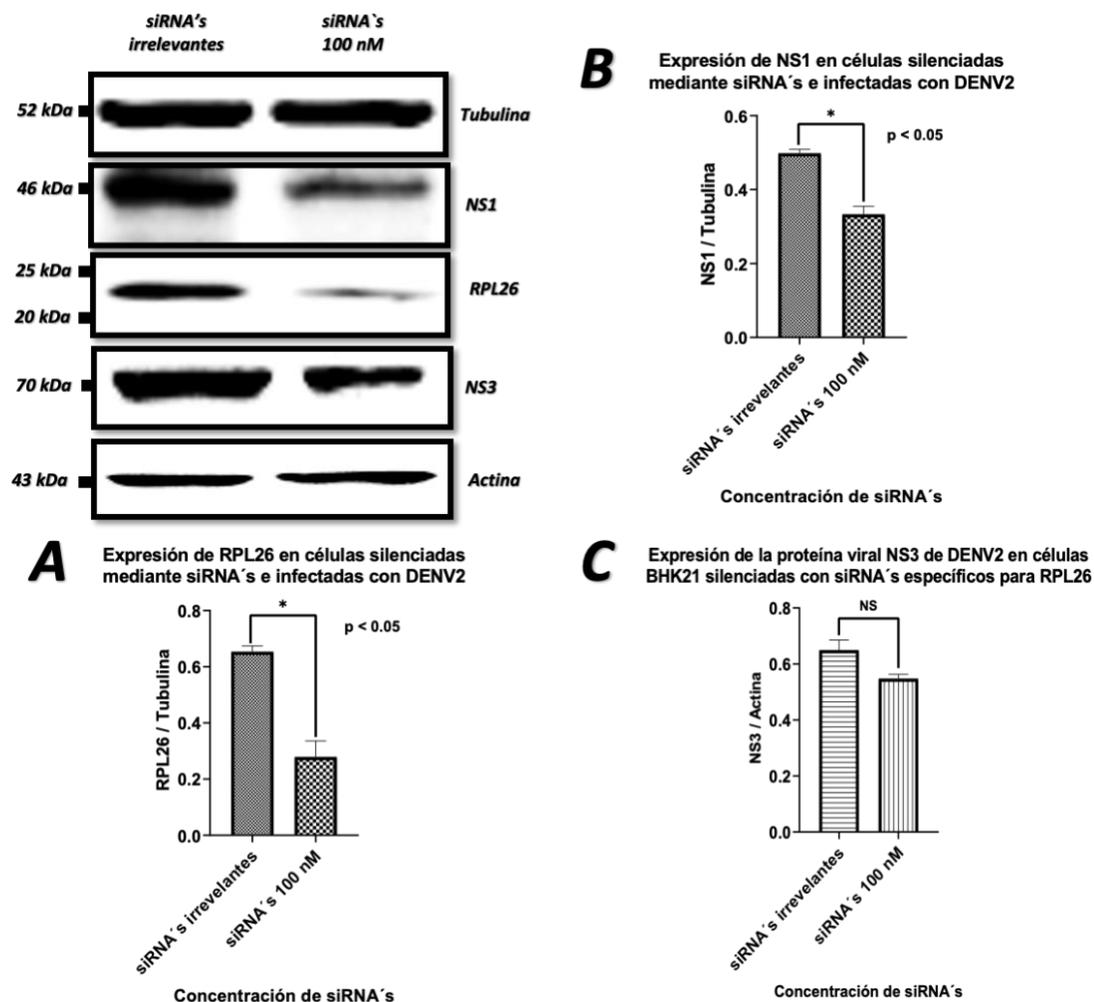


Figura 19. Análisis de proteínas de DENV en células BHK21 silenciadas o no, para RPL26.

Los lisados de células infectadas se analizaron por Western blot, normalizando con tubulina y actina como controles de carga. **Panel A**, análisis densitométrico de la expresión de RPL26. **Panel B**, análisis densitométrico de la expresión de NS1. **Panel C**, análisis densitométrico de la expresión de NS3. n=3.

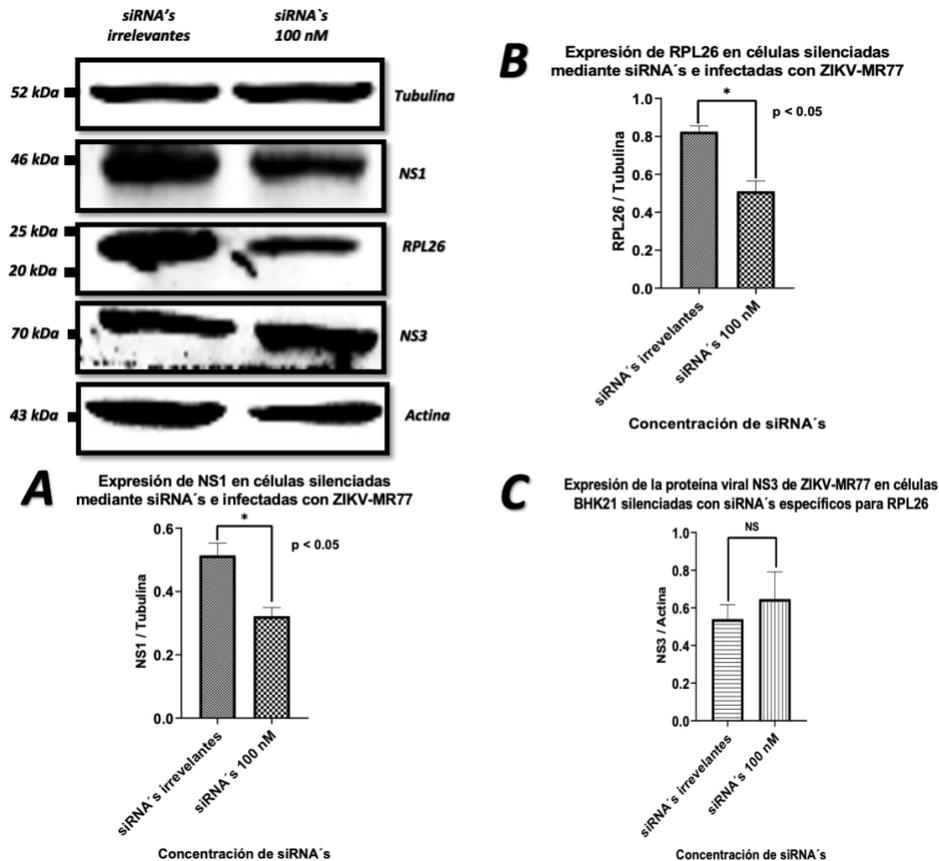


Figura 20. Análisis de proteínas de ZIKV en células BHK21 silenciadas o no, para RPL26.

Los lisados de células infectadas se analizaron por Western blot, normalizando con tubulina y actina como controles de carga. **Panel A**, análisis densitométrico de la expresión de RPL26. **Panel B**, análisis densitométrico de la expresión de NS1. **Panel C**, análisis densitométrico de la expresión de NS3. n=3.

Como resultado de la reducción de la expresión de la RPL26, se detectó que la expresión de la proteína viral NS1 también disminuye significativamente ($p < 0.05$) en las células silenciadas en comparación con el control, en ambas infecciones virales. En contraste, la expresión de la proteína NS3 no disminuyó significativamente ($p > 0.05$). Estos resultados sugieren que la traducción de proteínas en la célula infectada no es afectada por el silenciamiento de RPL26, ya que únicamente se afectan los niveles de la proteína NS1 en ambas infecciones virales; a su vez, la caída en la síntesis de esta proteína viral de carácter multifuncional genera la disminución de la progenie viral.

7.5. Interatoma de RPL26 con proteínas de los complejos de Sec61 y OST

Debido a los resultados obtenidos y considerando que NS1 interactúa con proteínas de los complejos de Sec61 y OST, se supuso que RPL26 también podría estar interactuando con proteínas de los complejos de Sec61 y OST. Debido a ello, se procedió con apoyo de la base de datos STRING para elaborar una red *in silico* de interacción proteína-proteína de RPL26 con las proteínas que conforman a los complejos de Sec61 y OST, tomando en consideración la evidencia experimental y descrita. El interatoma obtenido se muestra en la **figura 21**.

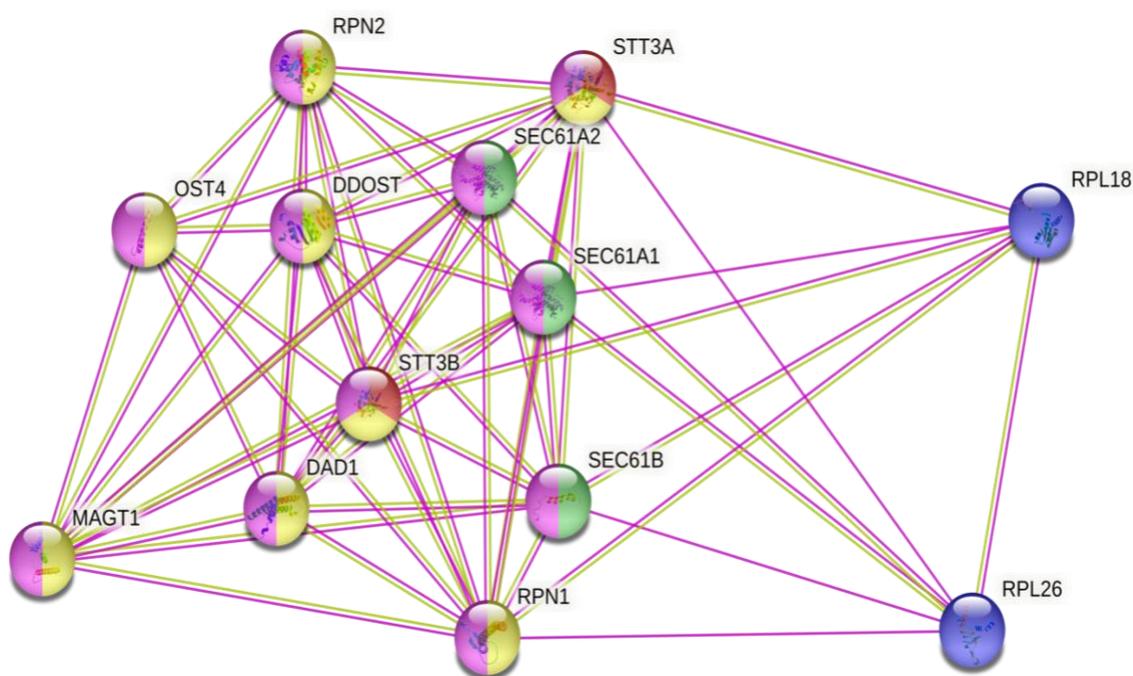


Figura 21. Interatoma de RPL26 con proteínas de los complejos de Sec61 y OST.

Se analizó la interacción entre la RPL26 y las proteínas que conforman los complejos de Sec61 y OST. Se consideró la evidencia científica escrita y experimental para su elaboración. Elaborado en <https://string-db.org/>.

El interatoma muestra los componentes del translocón de Sec61 de color verde y del complejo OST en amarillo; además, los sitios que catalizan la glicosilación están marcados de color rojo. Todas las proteínas que se encuentran ligadas a la membrana del RE están marcadas de color rosa, mientras que aquellas ligadas a los ribosomas se presentan de color lila. Se puede apreciar que el programa sugiere que, efectivamente, RLP26 interacciona con cinco proteínas, tres del complejo de Sec61 (Sec61 α 1, Sec61 α 2 y Sec61 β) y dos del complejo OST (RPN1 y STT3A), de acuerdo con la evidencia experimental (líneas rosas) y únicamente con dos proteínas (Sec61 α 1 y Sec61 α 2) de acuerdo con la evidencia experimental y descrita

(línea amarilla). La evidencia científica que sustenta estas interacciones proviene principalmente de estudios estructurales o proteómicos en mamíferos y otras especies.

También se analizó la interacción de la proteína ribosomal L18, que interactúa de forma directa con cinco proteínas: dos del complejo de Sec61 (Sec61 α 1 y Sec61 β) y tres del complejo OST (STT3A, STT3B y RPN1). Esta interacción se realizó considerando que RPL18 es una proteína que interactúa con NS1 y participa en el ciclo replicativo de DENV y se utilizó como base para corroborar las interacciones de RPL26.

VIII. DISCUSIÓN

La proteína viral NS1 de los miembros del género *Flavivirus* es multifuncional y se requiere para la replicación viral. NS1 está presente y es altamente conservada entre los flavivirus transmitidos por mosquitos, como DENV y ZIKV, y varios estudios han corroborado que interacciona con diversas proteínas celulares durante la infección. Se ha demostrado que diversos complejos proteicos celulares, como el de translocación de Sec61 y el complejo OST, se asocian a NS1 para que esta proteína lleve a cabo sus funciones.

El translocón de Sec61 es un conjunto de tres subunidades, Sec61 α , Sec61 β y Sec61 γ , localizadas en la membrana del RE. Este complejo tiene la función de realizar la inserción cotraduccional de proteínas que presentan un péptido señal, través de la membrana del RE, hacia el lumen.^{54,69} De las proteínas de los flavivirus, tres de ellas son solubles (C, NS3 y NS5), no se encuentran insertadas en la membrana de RE y se posicionan del lado citoplasmático; por el contrario, NS1 y E están ubicadas en el lumen del RE y asociadas a la membrana. Finalmente, NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son proteínas virales completamente embebidas en la membrana del RE.⁷⁰ Se ha identificado que el C-terminal de la proteína E contiene el péptido señal para escindir y translocar a NS1 del polipéptido traducido, al lumen del RE.⁴¹ En un estudio realizado por Shah P.S, y cols. (2018), se menciona que el receptor de partículas de reconocimiento de señales (SRPR) y la subunidad Sec61 γ son altamente específicos para interactuar con NS4A, mientras las proteínas que conforman la subunidad Sec61 α , Sec61 α 1 y Sec61 α 2 interactúan con diversas proteínas de flavivirus que incluyen dominios transmembrana y requieren una translocación cotraduccional en la membrana del RE.³⁶ En ese estudio, se informó que la inhibición de Sec61 en células dendríticas primarias derivadas de monocitos humanos utilizando el inhibidor de la translocación cotranslacional (cotransina o CT8) inhibe la replicación del DENV. Es debido a lo anterior que se ven afectadas etapas muy tempranas de la translocación cotraduccional de proteínas virales, lo cual sugiere que el complejo de Sec61 es el responsable de la translocación de las proteínas virales a la membrana del RE.³⁶

El complejo oligosacariltransferasa (OST), ubicado en la membrana del RE junto al complejo del translocón de Sec61, es el encargado de transferir oligosacáridos preensamblados a las proteínas receptoras.⁷¹ De acuerdo con los estudios realizados en plantas y metazoos, el sitio catalítico del complejo OST es la subunidad STT3.^{71,72} Se han

identificado dos OST en la membrana del RE en la mayoría de los organismos metazoos y mamíferos, cada uno con un sitio catalítico específico: STT3A y STT3B, los cuales son oligosacariltransferasas que catalizan la transferencia de oligosacáridos con alto contenido en manosa a las proteínas objetivo en el lumen del RE; estas proteínas pueden glicosilar residuos específicos de asparagina dentro de la secuencia Asn-X-Ser/Thr en las proteínas objetivo.⁷³ En conjunto con el sitio catalítico existen subunidades compartidas (riboforinas 1 y 2 [RPN1 y RPN2], OST48, DAD1, OST4 y TMEM258 en las células de mamíferos) y subunidades accesorias específicas del complejo que solo se ensamblan con STT3A (DC2 y KCP2) o STT3B (MagT1 o TUSC3).^{71,73} Una vez que la proteína NS1 de DENV se transloca al lumen del RE, su forma monomérica es glicosilada en Asn-130 y Asn-207, donde se añaden motivos de glicano y manosa.^{38,41} Marceau C.D. y cols. (2016) demostraron que la infección por DENV depende tanto de STT3A como de STT3B⁷⁴ y Lin D.L. y cols. (2017) afirman que OST que contiene STT3B, a través de la subunidad MAGT1, proporciona una actividad catalítica necesaria para la replicación eficiente del DENV; asimismo, el NS4B del DENV interactúa con los complejos OST de STT3B/MAGT1.⁷³ Con los resultados de Lin D.L. y cols., se plantea la hipótesis de que la actividad oxidorreductasa no canónica de MAGT1 en proteínas no estructurales de DENV sirve para mediar la síntesis eficiente, el plegado o el reclutamiento de las proteínas no estructurales a sitios específicos del RE.⁷³ Más recientemente, el grupo de Hafirassou M.L. y Ali Amara P.V. (2017) identificaron que NS1 y NS4B están glicosiladas, por lo que silenciaron RPN1, DDOST, STT3A o STT3B, respectivamente. Al evaluar la expresión de NS1, observaron una menor expresión al silenciar a todas ellas, pero no en las células silenciadas para cada subunidad catalítica por separado. Además, se examinó el efecto de NGI-1, un inhibidor de la glicosilación ligada a N, deteriorando fuertemente la glicosilación de NS1 del DENV y del ZIKV e inhibiendo la infección por estos virus. En conjunto, estos resultados demuestran que el complejo OST es necesario para la glicosilación de la NS1.³⁹

La razón para analizar estos dos complejos proteicos, además de sus funciones ya estudiadas y la cercanía que presentan con RPL26, es que en el interactoma realizado en 2017 por Hafirassou M.L. y su equipo, se identificó la interacción de NS1 de DENV con proteínas de los complejos de Sec61 (Sec61 α 1) y de OST (RPN1, RPN2, STT3A, STT3B y DDOST) en las células de vertebrado.³⁹ Además, en el interactoma de NS1 de DENV realizado por

Caraballo G.I. y cols. (2022) de igual forma se identificaron proteínas de Sec61 (Sec61 α 2) y OST (RPN1, RPN2, STT3A y STT3B).⁴⁰

El interactoma de RPL26 y las proteínas de los complejos de Sec61 y OST elaborado por medio de la base de datos STRING en este estudio expresó que la proteína ribosomal interactúa con tres proteínas del complejo de Sec61 (Sec61 α 1, Sec61 α 2 y Sec61 β) y dos del complejo OST (RPN1 y STT3A). La interacción de RPL26 con los componentes de Sec61 se ha corroborado, ya que de acuerdo con los estudios realizados por Walczak (2019), Wang (2020) y Witting (2021), la UFMilación de RPL16 conlleva a que esta realice un control de calidad sobre las proteínas que son translocadas en la membrana del RE por medio del complejo de Sec61.⁵⁸⁻⁶⁰ Sin embargo, no existen antecedentes sobre la interacción que puede tener esta proteína ribosomal con el complejo oligosacaryltransferasa.

Los resultados de este proyecto corroboran la interacción de RPL26 con la proteína viral NS1 de DENV2 y ZIKV-MR77, reflejando que la colocalización de NS1 con RPL26 se lleva a cabo en el citoplasma de la célula infectada; sin embargo, ambas proteínas se encuentran también en el núcleo y no se aprecia una colocalización en este. Lo anterior nos lleva a cuestionar el motivo por el cual ambas proteínas están colocalizando en el citoplasma, pero no así en el núcleo. La probable respuesta a ello es que la cercanía de las proteínas y su interacción sea justo al momento de la traducción de NS1 y su translocación al lumen del RE, y quizá también se relacione con la modificación postraduccional que sufre RPL26, la UMFilación. Se necesitan más estudios para responder esta pregunta.

Por otra parte, se observó que las células BHK21 transfectadas con los siRNA específicos para RPL26 a las 24 hpt mantuvieron su viabilidad a pesar del silenciamiento. Sin embargo, en ambas concentraciones existe un aumento del 11 y el 13 %, respectivamente con relación a las células sin ningún tratamiento, lo cual puede deberse al estrés mitocondrial de la célula al metabolizar el reactivo utilizado. Son pocos los estudios realizados hasta ahora sobre RPL26 y aún en menor medida los involucrados con virus; sin embargo, en el estudio hecho por Kulsuptrakul J. y cols. (2021), se identificó que el virus de la Hepatitis A requiere de la UFMilación de RPL26 para llevar a cabo su ciclo de replicación. Lo anterior se llevó a cabo mediante la técnica CRISPR a escala del genoma en células Huh7.5.1 (humano), en donde corroboraron mediante la eliminación del WT-RPL26 endógeno la reducción de la replicación viral.⁶²

En otro estudio realizado por Zhang Y. y cols. (2010), se utilizaron siRNA específicos para RPL26 a una concentración de 100 nM para silenciar células U2OS o H1299 (ambas de humano) a la proteína y probar su participación en la activación de p53; además, la viabilidad celular se evaluó por ensayo de MTS.⁶⁴ Por otra parte, en el estudio hecho por Zhang M. y cols. (2016), donde se demostró que RPL26 regula la traducción y estabilidad de la proteína p73, se silenciaron células HCT116 (humano) con siRNA específicos para RPL26⁶⁵. Estos estudios, en los cuales se disminuye o anula la expresión de RPL26 *in vitro* y, al igual que en este proyecto, las células se mantienen viables de acuerdo con las prueba de viabilidad celular aplicadas, lo que sugiere que, a pesar de las funciones ribosomales y extrarribosomales en la célula, su silenciamiento no aparenta afectar la traducción de proteínas y probablemente se compensan las funciones extrarribosomales hasta la fecha identificadas.

Lo anterior se corrobora con otros estudios en los cuales se han silenciado proteínas ribosomales. En el estudio realizado por Cervantes-Salazar M. y cols. (2015) sobre RPL18 y su participación en la infección por DENV, se procedió a silenciar las células Huh-7 con siRNA específicos para esta proteína ribosomal. El silenciamiento de RPL18 logró la disminución de la progenie viral de entre 1 y 1.5 log. Asimismo, se demostró una disminución en la secreción de NS1 en los sobrenadantes, la expresión de NS3 y NS5 se redujo significativamente y la marca de la proteína E casi desaparece en comparación con las células con siRNA irrelevantes, y el genoma viral tuvo una disminución significativa debido al silenciamiento de RPL18. Todos estos datos demostraron que el silenciamiento de RPL18 afectó la traducción de la poliproteína viral y la replicación de su genoma.⁵²

En contraste con nuestro estudio, RPL18 está participando en la replicación y traducción del DENV, ya que su silenciamiento afecta a todos los componentes virales, mientras que RPL26 parece afectar únicamente a NS1 de DENV2 y ZIKV-MR77 y con ello el ciclo replicativo de estos virus. Es decir, si bien RPL18 y RPL26 son proteínas ribosomales que interactúan con NS1, la función de estas proteínas durante la replicación parece ser distinta.

La relevancia de estudiar a la NS1 y su interacción con proteínas celulares recae en ser una proteína multifuncional fundamental durante la infección por flavivirus. De acuerdo con Scaturro P. y cols. (2015), la NS1 es esencial para la replicación del genoma viral, ya que en su forma dimérica conforma un andamio en conjunto con NS4A y NS4B para formar

el complejo de replicación; asimismo, ellos proponen que esta proteína no estructural interacciona con las proteínas estructurales E y pr-M para participar en la biogénesis de las nuevas partículas virales.⁷⁵

En resumen, considerando: i) la interacción de RPL26 con NS1 y proteínas de Sec61 y OST; ii) la importancia de los complejos Sec61 y OST durante la infección por DENV y iii) la evidencia que presentamos en este trabajo sobre la participación de RPL26 durante la infección con DENV2 y ZIKV-MR77. Se considera que RPL26 forma parte de un complejo proteico junto a Sec61 y OST, el cual favorece la translocación de NS1 al lumen del RE durante la infección por flavivirus. A su vez, la ausencia de NS1 en el lumen del RE afecta las funciones de andamiaje para la estabilización del complejo de replicación y la biogénesis de las nuevas partículas virales, lo que conlleva a la caída en la progenie viral.

IX. CONCLUSIONES

- NS1 de DENV2 y ZIKV-MR77 colocaliza con la RPL26 en células de vertebrado.
- RPL26 participa en el ciclo replicativo de DENV2 y ZIKV-MR77 en células de vertebrado.
- RPL26, en asociación a Sec61 y OST, conforma un complejo multiproteico necesario para la translocación de la proteína no estructural 1 (NS1) de *Flavivirus* al lumen del retículo endoplásmico.

X. PERSPECTIVAS

- Corroborar la interacción de NS1 con RPL26 mediante el ensayo de ligación por proximidad o inmunoprecipitación.
- Evaluar los niveles de replicación viral en células silenciadas para RLP 26 mediante qRT-PCR.
- Demostrar que el silenciamiento de RPL26 no está afectando la traducción de proteínas celulares u otras proteínas virales, mediante ensayos de WB.
- Evaluar los niveles (cantidad) de NS1 translocada al lumen del RE en células infectadas y silenciadas para RPL26, por medio de fraccionamiento de RE, inmunomicroscopía electrónica o ensayos de ELISA de NS1 secretada.
- Evaluar el estado de UFMilación de RLP26 en células infectadas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses*. el 30 de julio de 2020;12(8):829.
2. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. *Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control*. Poole, UK: Caister Academic Press; 2016.
3. Calisher, CH.; Karabatsos, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: Monath, TP., editor. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Vol. I. CRC Press; Boca Raton, FL: 1988. p. 19-57.
4. Fong IW. Chikungunya Virus and Zika Virus Expansion: An Imitation of Dengue Virus. In: *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century*. Canada: Springer; 2017. P.101-130.
5. Lindenbach B, Murray C, Thiel HJ and Rice C. *Flaviviridae*. In: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM, editores. 7th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p:712-790.
6. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol*. el 26 de septiembre de 2018;9:2180.
7. Zárate ML. Arbovirus y arbovirosis en México. *Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. SSA. Ciencia Veterinaria* 1978; (2)157-182.
8. Young P. Arboviruses: A Family on the Move. In: *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Hilgenfeld R, Vasudevan S G, editores. Singapore: Springer Singapore; 2018. p:1-10.
9. Wichit S, Ferraris P, Choumet V, Missé D. The effects of mosquito saliva on dengue virus infectivity in humans. *Current Opinion in Virology*. diciembre de 2016;21:139-45.
10. Carrington LB, Simmons CP. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. 17 de junio del 2014;5(290).
11. Conway MJ, Watson AM, Colpitts TM, Dragovic SM, Li Z, Wang P, et al. Mosquito Saliva Serine Protease Enhances Dissemination of Dengue Virus into the Mammalian Host. *Journal of Virology*. el 1 de enero de 2014;88(1):164-75.
12. Castillo-Macías A, Salinas-Carmona MC, Torres-López E. Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika. *Medicina Universitaria*. enero de 2018;S1665579617301023.
13. Hugo LE, Stassen L, La J, Gosden E, Ekwudu O, Winterford C, et al. Vector competence of Australian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* for an epidemic strain of Zika virus. Bartholomay LC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. el 4 de abril de 2019;13(4):e0007281.
14. Lugones N, Ramírez M. Dengue. *Rev Cubana Med Gen Integ* 2012;28(1):123-126.
15. Fajardo DG, Meljem MJ, Vicente GE, Venegas PF, Mazón GB, Aguirre GH. El dengue en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2012; 50 (6): 631-639.
16. Thomas SJ, Endy TP, Rothman, AL, Barrett AD. Flaviviruses (Dengue, Yellow Fever, Japanese Encephalitis, West Nile Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis, Kyasanur Forest Disease, Alkhurma Hemorrhagic Fever, Zika). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser Martin J. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: ELSEVIER, Saunders; 2015. p. 1880-1903.
17. Organización Panamericana de la Salud. Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis. Washington, D.C.: OPS; 2016.
18. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la región de las Américas. 2ª ed. Washington, DC: OPS; 2016.
19. Organización Mundial de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. México: 2016.
20. Barrera-Cruz A, Díaz-Ramos R, López-Morales A, Grajales-Muñiz C, Viniestra-Osorio A, Zaldívar-Cervera J, et al. Lineamientos técnicos para la prevención, diagnóstico y

- tratamiento de la infección por virus Zika. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2016;54(2):211-24.
21. World Health Organization, Pan American Health Organization (PAHO). Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2018 Cumulative cases. Washington: 2018.
 22. Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Can J Microbiol.* febrero de 2020;66(2):87–98.
 23. Song B-H, Yun S-I, Woolley M, Lee Y-M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology.* julio de 2017;308:50–64.
 24. Dirlikov E, Major CG, Mayshack M, Medina N, Matos D, Ryff KR, et al. Guillain-Barré Syndrome During Ongoing Zika Virus Transmission – Puerto Rico, January 1-July 31, 2016. *Centers for Disease Control and Prevention MMWR* 2016; 65.
 25. Dirlikov E, Kniss K, Major C, Thomas D, Virgen CA, Mayshack M, et al. Guillain-Barré syndrome and healthcare needs during Zika virus transmission, Puerto Rico, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017
 26. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* julio de 2016;29(3):487–524.
 27. Paixao E, Barreto F, Teixeira M, Conceicao M, Rodríguez L. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *AJPH* 2016 April;106(4):606-612.
 28. Grajales-Muñoz C, Borja-Aburto VH, Cabrera-Gaytán DA, Rojas-Mendoza R, Arriaga-Nieto L, Vallejos-Páras A. Zika virus: Epidemiological surveillance of the Mexican Institute of Social Security. *PLoS One* 2019;14(2); e0212114.
 29. Barreto T, Cunha L, de Alencar R, Miranda-Filho D, Ramos U, López A et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Dec;16(12):1356-1363.
 30. Diosa-Toro M, Prasanth KR, Bradrick SS, Garcia Blanco MA. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virol J.* diciembre de 2020;17(1):60.
 31. Chong HY, Leow CY, Abdul Majeed AB, Leow CH. Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Research.* diciembre de 2019;274:197770.
 32. Heinz FX, Stiasny K. Proteolytic Activation of Flavivirus Envelope Proteins. In: Böttcher-Friebertshäuser E, Garten W, Klenk H. (eds) *Activation of Viruses by Host Proteases.* Springer, Cham. 2018.
 33. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol.* junio de 2020;5(6):796–812.
 34. Gerold G, Bruening J, Weigel B, Pietschmann T. Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics.* abril de 2017;16(4):S75–91.
 35. Glasner DR, Puerta-Guardo H, Beatty PR, Harris E. The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. 2019;33.
 36. Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell.* diciembre de 2018;175(7):1931-1945.e18.
 37. Reyes-Sandoval A, Ludert JE. The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 (NS1) in Protection and Immuno-Pathogenesis. *Front Immunol.* el 18 de julio de 2019;10:1651.
 38. Watterson D, Modhiran N, Young PR. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Research.* junio de 2016;130:7–18.
 39. Hafirassou ML, Meertens L, Umaña-Díaz C, Labeau A, Dejarnac O, Bonnet-Madin L, Kümmerer BM, Delaunay C, Roingeard P, Vidalain P-OO, Amara A. 2017. A Global

- Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell Rep* 21:3900–3913. 36b.
40. Caraballo GI, Rosales R, Vietri M, Castillo JM, Cruz R, Ding S, et al. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Interacts with the Putative Epigenetic Regulator DIDO1 to Promote Flavivirus Replication in Mosquito Cells. López S, editor. *J Virol.* el 2 de junio de 2022;e00704-22.
 41. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology*. diciembre de 2016;13(1):131.
 42. Alcalá AC, Palomares LA, Ludert JE. Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations. Tsai B, editor. *J Virol.* 2018. 92:e00275-18.
 43. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, DelProposto J, Ogata CM, Skinotis G, Kuhn RJ, Smith JL. 2014. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* 343:881–5.
 44. Alcalá AC, Medina F, González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Fragoso-Soriano RJ, Vásquez C, Cervantes-Salazar M, Del Angel RM, Ludert JE. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently from infected mosquito cells. *Virology*. 2016;488:278–287.
 45. Ramirez RR, Ludert JE. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Is Secreted from Mosquito Cells in Association with the Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex. *Journal of Virology*. 2019;93(4):25.
 46. Zhou X, Liao W-J, Liao J-M, Liao P, Lu H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*. abril de 2015;7(2):92–104.
 47. Li S. Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells*. el 27 de mayo de 2019;8(5):508.
 48. Simonin D, Diaz JJ, Massé T, Madjar JJ. Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* febrero de 1997;78 (Pt 2):435–43.
 49. Greco A, Laurent AM, Madjar JJ. Repression of beta-actin synthesis and persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1 infection are under translational control. *Mol Gen Genet.* octubre de 1997;256(3):320–7.
 50. Jefferson M, Donaszi-Ivanov A, Pollen S, Dalmay T, Saalbach G, Powell PP. Host Factors That Interact with the Pestivirus N-Terminal Protease, Npro, Are Components of the Ribonucleoprotein Complex. *J Virol.* septiembre de 2014;88(18):10340–53.
 51. Martínez F, Daròs JA. Tobacco etch virus Protein P1 Traffics to the Nucleolus and Associates with the Host 60S Ribosomal Subunits during Infection. *J Virol.* septiembre de 2014;88(18):10725–37.
 52. Spurgers KB, Alefantis T, Peyser BD, Ruthel GT, Bergeron AA, Costantino JA, et al. Identification of essential filovirion-associated host factors by serial proteomic analysis and RNAi screen. *Mol Cell Proteomics.* el 1 de diciembre de 2010;9(12):2690–703.
 53. Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Hurtado-Monzon AM, Alcaraz-Estrada SL, et al. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology*. octubre de 2015;484:113–26.
 54. Zidane N, Ould-Abeih MB, Petit-Topin I, Bedouelle H. The folded and disordered domains of human ribosomal protein SA have both idiosyncratic and shared functions as membrane receptors. *Biosci Rep.* el 20 de diciembre de 2012;33(1):113–24.
 55. Campos RK, Wong B, Xie X, Lu YF, Shi PY, Pompon J, et al. RPLP1 and RPLP2 Are Essential Flavivirus Host Factors That Promote Early Viral Protein Accumulation. *J Virol.* el 15 de febrero de 2017;91(4):e01706-16.

56. Ding F, Fu J, Jiang D, Hao M, Lin G. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Tropica*. febrero de 2018;178:155–62.
57. RPL26 ribosomal protein L26 [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado el 11 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6154>
58. Walczak CP, Leto DE, Zhang L, Riepe C, Muller RY, DaRosa PA, et al. Ribosomal protein RPL26 is the principal target of UFMylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. el 22 de enero de 2019;116(4):1299–308.
59. Wang L, Xu Y, Rogers H, Saidi L, Noguchi CT, Li H, et al. UFMylation of RPL26 links translocation-associated quality control to endoplasmic reticulum protein homeostasis. *Cell Res*. enero de 2020;30(1):5–20.
60. Witting KF, Mulder MPC. Highly Specialized Ubiquitin-Like Modifications: Shedding Light into the UFM1 Enigma. *Biomolecules*. el 10 de febrero de 2021;11(2):255.
61. Liang JR, Lingeman E, Luong T, Ahmed S, Muhar M, Nguyen T, et al. A Genome-wide ER-phagy Screen Highlights Key Roles of Mitochondrial Metabolism and ER-Resident UFMylation. *Cell*. marzo de 2020;180(6):1160-1177.e20.
62. Kulsuptrakul J, Wang R, Meyers NL, Ott M, Puschnik AS. A genome-wide CRISPR screen identifies UFMylation and TRAMP-like complexes as host factors required for hepatitis A virus infection. *Cell Reports*. marzo de 2021;34(11):108859.
63. Anton H, Taha N, Boutant E, Richert L, Khatter H, Klaholz B, et al. Investigating the Cellular Distribution and Interactions of HIV-1 Nucleocapsid Protein by Quantitative Fluorescence Microscopy. Chauhan A, editor. *PLoS ONE*. el 27 de febrero de 2015;10(2):e0116921.
64. Zhang Y, Wang J, Yuan Y, Zhang W, Guan W, Wu Z, et al. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Research*. el 1 de octubre de 2010;38(19):6544–54.
65. Zhang M, Zhang J, Yan W, Chen X. p73 expression is regulated by ribosomal protein RPL26 through mRNA translation and protein stability. *Oncotarget*. el 29 de noviembre de 2016;7(48):78255–68.
66. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem*. el 20 de junio de 2019;88(1):281–306.
67. Reyes-Ruiz JM, Osuna-Ramos JF, Cervantes-Salazar M, Lagunes Guillen AE, Chávez-Munguía B, Salas-Benito JS, et al. Strand-like structures and the nonstructural proteins 5, 3 and 1 are present in the nucleus of mosquito cells infected with dengue virus. *Virology*. febrero de 2018;515:74–80.
68. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay | MTS Assay | MTT Assay [Internet]. [citado el 29 de junio de 2022]. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/
69. Pfeffer S, Burbaum L, Unverdorben P, Pech M, Chen Y, Zimmermann R, et al. Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat Commun*. diciembre de 2015;6(1):8403.
70. Li Q, Kang C. Structures and Dynamics of Dengue Virus Nonstructural Membrane Proteins. *Membranes*. el 17 de febrero de 2022;12(2):231.
71. Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*. agosto de 2016;41:57–65.
72. Knauer R, Lehle L. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. enero de 1999;1426(2):259–73.

73. Lin DL, Cherepanova NA, Bozzacco L, MacDonald MR, Gilmore R, Tai AW. Dengue Virus Hijacks a Noncanonical Oxidoreductase Function of a Cellular Oligosaccharyltransferase Complex. 2017;8(4):16.
74. Marceau CD, Puschnik AS, Majzoub K, Ooi YS, Brewer SM, Fuchs G, et al. Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*. el 7 de julio de 2016;535(7610):159–63.
75. Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. Pierson TC, editor. *PLoS Pathog*. el 12 de noviembre de 2015;11(11):e1005277.

XII. ANEXOS

11.1. Anticuerpos

Anticuerpo	Compañía	Identificación
RPL26 antibody	GeneTex	Cat No. GTX118577
Goat Anti-Rabbit IgG antibody (HRP)	GeneTex	Cat No. GTX26721
beta Tubulin antibody	GeneTex	Cat No. GTX101279
Anti-Flavivirus NS1 antibody [D/2/D6/B7]	abcam	ab214337
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) preadsorbed	abcam	ab150111
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed	abcam	ab150065
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542
Anti-β-Actin Antibody (ACTBD11B7)	Santa Cruz Biotechnology	sc-81178
Mab pan-flavivirus (4G2) anti-proteína E	N/A	N/A
Mab pan-flavivirus (E1D8) anti-proteína NS3	N/A	N/A
Mab pan-flavivirus (7E11) anti-proteína NS1	N/A	N/A

11.2. siRNA y vehículo

siRNA	Compañía	Características
FlexiTube GeneSolution GS6154 for RPL26	QIAGEN	4 siRNAs para el gen Entrez 6154: SI04347063 (FlexiTube siRNA) SI04200294 (FlexiTube siRNA) SI04172266 (FlexiTube siRNA) SI03194345 (FlexiTube siRNA)
AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN	Es el siRNA de control negativo más probado y validado actualmente. Este siRNA no tiene homología con ningún gen de mamífero conocido.
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN	El reactivo de transfección HiPerFect es una mezcla única de lípidos catiónicos y neutros que permite una captación eficaz del siRNA y una liberación eficiente del siRNA dentro de las células, lo que da lugar a un elevado <i>knockdown</i> de genes, incluso cuando se utilizan bajas concentraciones de siRNA.

11.3. Reactivos y detergentes

Reactivo	Compañía	Identificación
<i>Eagle's minimal essential medium (EMEM)</i>	ATCC	30-2003
Cloruro de sodio, Cristal (NaCl)	Thermo Fisher Scientific – J.T.Baker	3624-01
EDTA, sal disódica, dihidrato, cristal	Thermo Fisher Scientific – J.T.Baker	8993-01
Fosfato de potasio monobásico, cristal (KH ₂ PO ₄)	Thermo Fisher Scientific – J.T.Baker	3246-01
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro (Na ₂ HPO ₄)	Thermo Fisher Scientific – J.T.Baker	3828-01
Metanol (CH ₃ OH)	Thermo Fisher Scientific – J.T.Baker	9070-03
Solución de detergente Triton™ X-100 Surfact-Amps™	Thermo Fisher Scientific	28314
Solución de detergente Tween™ 20 Surfact-Amps™	Thermo Fisher Scientific	28320

<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific	34096
<i>Ammonium Persulfate</i>	BIO-RAD	1610700
<i>Bio-Rad Protein Assay</i>	BIO-RAD	5000002
<i>Bis (N,N'-Methylene-bis-acrylamide)</i>	BIO-RAD	1610201
<i>Glycine</i>	BIO-RAD	1610718
<i>SDS Sodium dodecyl sulfate Electrophoresis purity reagent</i>	BIO-RAD	1610301
<i>TEMED</i>	BIO-RAD	1610800
<i>Albumin from bovine serum, minimum 98% agarose gel electrophoresis</i>	Merck, Sigma-Aldrich	082K1054
Cloruro de potasio (KCl)	Merck, Sigma-Aldrich	5030304936
<i>Gelatin from cold water fish skin</i>	Merck, Sigma-Aldrich	SLBW353543
Ponceau S	Merck, Sigma-Aldrich	106H3614
<i>Complete Mini (tabletas de inhibidores de proteasas)</i>	Roche Diagnostics GmbH	14337700
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propanediol (C ₄ H ₁₁ NO ₃))	Roche Diagnostics GmbH	10073340
<i>DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, (3,3'-diaminobenzidine)</i>	Vector Laboratories	SK-4100
<i>Vectashield Mounting Medium For Fluorescence</i>	Vector Laboratories	X1215
<i>SDS (sodium dodecyl sulfate)</i>	Biotech	151-21-3
Suero fetal bovino	ByProductos	20002
Formaldehido al 37 %	Productos Químicos y Farmacéuticos R&M	10850
Penicilina / Estreptomicina 10 000 unidades/ml / 10 000 µg/ml	Gibco	15140-122
<i>The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay</i>	Promega	G3580

11.4. Soluciones y buffers

Cultivos celulares

Reactivo	Preparación
EMEM + penicilina / estreptomycin	Para una botella de 500 ml de EMEM utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Penicilina / Estreptomycin 10 000 unidades/ml: 5 ml
EMEM + SFB 10 %	Para 15 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - SFB: 1.5 ml (1 500 µl) - EMEM: 13.5 ml (13 500 µl)

Detergentes

Buffers / detergentes	Preparación
Amortiguador fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>) PBS 10x / 1x	Para 1 000 ml de PBS 10x utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de sodio (NaCl₂): 80 g - Cloruro de potasio (KCl): 2 g - Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄): 11.5 g - Fosfato de potasio monobásico (K₂HPO₄): 2 g Aforar hasta 1 000 ml con H ₂ O destilada y ajustar a pH de 7.4 PBS 1x: diluir 100 ml de PBS 10x en 900 ml de H ₂ O destilada.
PBS Tween 0.1 %	Para 500 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - PBS 1x: 499.5 ml - Tween 20: 0.5 ml (500 µl)
PBS Tritón 0.2 %	Para 500 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - PBS 1x: 499.5 ml - Tritón X-100: 0.5 ml (500 µl)

Inmunofluorescencia

Solución	Preparación
Formaldehído al 4 %	Para 10 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Formaldehído al 37 %: 1.1 ml - PBS 1x: 8.9 ml
PBS Tritón	Para 10 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - PBS 1x: 9.8 ml - Tritón X-100: 0.2 ml (200 µl)
Solución de bloqueo	Para 20 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Gelatina de pescado: 0.5 g Aforar a 20 ml de PBS Tween al 0.1 %

Lisis celular

Buffer	Preparación
Buffer de lisis (RIPA)	Para 40 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de sodio (NaCl) 5 M: 1.2 ml (1 200 µl) - EDTA 0.5 M pH 8: 0.4 ml (400 µl) - Tris-HCl 1 M pH 7: 2 ml (2 000 µl) - Desoxicolato sódico (Na) 10 %: 2 ml (2 000 µl) - SDS 10 %: 0.4 ml (400 µl) - Tritón X-100: 0.4 ml (400 µl) - Tabletas de inhibidores de proteasas: 4 tabletas Aforar a 40 ml con H ₂ O MiliQ.

Cuantificación de proteínas

BCA	Para 10 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - BCA: 10 mg. Aforar a 10 ml con PBS 1x.
-----	---

Western blot

Solución / buffer	Preparación
Buffer de corrida 10x / 1x	Para 1 000 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Tris base: 30 g (0.25 M) - Glicina: 144 g (1.92 M) - SDS: 10 g (1 %) Aforar a 1 000 ml con H ₂ O destilada y ajustar a pH de 8.6 Buffer de corrida 1x: dimuir 100 ml de buffer de corrida 10x en 900 ml de H ₂ O destilada.
Buffer de transferencia 10x / 1x	Para 1 000 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Tris base: 30.2 g - Glicina: 144.2 g Aforar a 1 000 ml con H ₂ O destilada y ajustar a pH de 8.3 Buffer de transferencia 1x: dimuir 100 ml de buffer de transferencia 10x en 700 ml de H ₂ O destilada y completar con 200 ml de metanol (CH ₃ OH).
Poliacrilamida al 30 %	Para 100 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - Acrilamida: 29 g - Bisacrilamida: 1 g Aforar a 100 ml con H ₂ O destilada.
Tris base 1.5 M pH 8.8	Para 100 ml utilizar: <ul style="list-style-type: none"> - 18.17 g Agregar H ₂ O destilada (sin aforar) y ajustar pH a 8.8, aforar a 100 ml.

Tris base 1 M pH 6.8	<p>Para 100 ml utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris base: 12.11 g <p>Agregar H₂O destilada (sin aforar) y ajustar pH a 6.8, aforar a 100 ml.</p>
Dodecilsulfato sódico (SDS)	<p>Para 10 ml utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SDS: 1 g <p>Disolver en 10 ml de H₂O destilada.</p>
Persulfato de amonio al 10 % (APS)	<p>Para 1 ml utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Persulfato de amonio: 100 mg. <p>Disolver en 1 ml de H₂O destilada.</p>
Gel de resolución (separador) para electroforesis en gel de tris-glicina-SDS-poliacrilamida al 12 %	<p>Para un gel de 1.5 mm (10 ml) utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Poliacrilamida al 30 %: 4 ml - Tris-HCl 1.5 M pH 8.8: 2.5 ml - SDS al 10 %: 0.1 ml (100 µl) - H₂O destilada: 3.3 ml - APS al 10 %: 0.1 ml (100 µl) - TEMED: 0.004 ml (4 µl)
Gel de concentración para electroforesis en gel de tris-glicina-SDS-poliacrilamida	<p>Para un gel de 1.5 mm (6 ml) utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Poliacrilamida al 30 %: 1 ml - Tris-HCl 1 M pH 6.8: 0.75 ml (750 µl) - SDS al 10 %: 0.06 ml (60 µl) - H₂O destilada: 4.1 ml - APS al 10 %: 0.06 ml (60 µl) - TEMED: 0.006 ml (6 µl)
<i>Loading buffer</i> Laemmli 4x	<ul style="list-style-type: none"> - TRIS-HCl 1 M pH 6.8: 1.6 ml - SDS: 0.8 g - Glicerol: 4 ml - Azul de bromofenol: 0.04 g - B-mercaptoetanol: 2 ml <p>Antes de usar agregar 200 µl de B-mercaptoetanol para 800 µl del amortiguador.</p>
Rojo de Ponceau	<p>Para 100 ml utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rojo de ponceau 0.2 %: 0.2 g - Ácido acético glacial 1 %: 1 ml. <p>Aforar a 100 ml con H₂O destilada.</p>
Solución de bloqueo para membranas	<p>Para 50 ml utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leche descremada (Carnation): 2.5 g <p>Aforar a 50 ml con PBS Tween al 0.1 %.</p>

11.5. Productos

- Mercedes Viettri, **Fernando Rodríguez León**, José Luíz Zambrano y Juan E. Ludert. Dengue virus replication in vertebrate and mosquito cells induces stress response in the endoplasmis reticulum and in the Golgi complex. Universitas Medica. Aceptado julio 2022, en prensa.