



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**Alteración de las proteínas de transporte nuclear durante la
infección por el virus Zika en células Huh-7 y U-87**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. Jonathan Hernández Castillo

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR**

DIRECTORA DE LA TESIS:

Dra. Rosa María Del Ángel Núñez De Cáceres

CRÉDITOS A LAS INSTITUCIONES

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico brindado realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y el asesoramiento de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y la Dra. Abigail Betanzos Fernández, profesoras e investigadoras del CINVESTAV unidad Zacatenco.

TUTORA:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

ASESORES:

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dra. Abigail Betanzos Fernández

NÚMERO DE CVU:

1145577

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela Clara (DEP), por haber sido un ejemplo de fortaleza, determinación y coraje; y hasta el último momento apoyarme y cuidar de mí, te dedico este trabajo con tu nombre grabado para siempre.

A mis padres Alejandra y Eduardo, mis tíos Susana y Jesse, mis abuelos, hermanos y a toda mi familia; gracias por apoyarme y guiarme una vez más en esta etapa.

A la Dra. Rosa María del Ángel por aceptarme en su laboratorio, por brindarme su confianza, su paciencia y por proporcionar los recursos y herramientas necesarios para este proyecto. A mis asesoras la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y la Dra. Abigail Betanzos Fernández por su consejo y oportuna ayuda durante el transcurso de la maestría.

A mi amigo Selvin Palacios por su apoyo, paciencia y consejo a lo largo de este proceso que inició como algo completamente nuevo para mí, así como también a mis amigos Carlos Cordero, Noé Farfán, José Bravo, Ricardo Camacho, Magda Benítez y Marcos Pérez por su amistad brindada dentro y fuera del laboratorio.

Sharon, también te dedico este trabajo y su culminación por tu cariño, así como por haberme ayudado en este apasionante rubro de la investigación científica. Espero crecer contigo siempre.

Al biólogo Fernando Medina y al señor Jaime Zarco por su apoyo en la organización y mantenimiento de los recursos necesarios para la realización de mi trabajo; así como por su consejo.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
INTRODUCCIÓN	3
Generalidades y epidemiología.....	3
Sintomatología	5
Diagnóstico	6
Tratamiento	7
Descripción del virus	7
Ciclo replicativo	8
Proteínas flavivirales: breve descripción	11
ANTECEDENTES	15
Transporte núcleo-citoplasma	15
Receptores móviles de transporte: carioferinas	16
Alteración del transporte núcleo-citoplasma mediado por virus de RNA.....	21
Alteración de transporte núcleo-citoplasma mediado por virus ZIKA	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Líneas celulares empleadas	31
Preparación y cuantificación de extractos de proteínas totales	31

Western blot.....	32
Anticuerpos	34
Inmunofluorescencia indirecta para localización subcelular.....	35
RESULTADOS.....	37
La infección por ZIKV a 24 hpi afecta la integridad de carioferinas alfa en células Huh-7 y U-87.....	37
La infección por ZIKV no altera la integridad de KPNA6 ni de la exportina CRM1 en células Huh-7 y U-87.....	42
Efectos selectivos son causados por la infección con ZIKV sobre tres carioferinas beta en células hepáticas y cerebrales.....	44
La infección por ZIKV conduce a alteraciones y cambios en la localización subcelular de KPNA1 y KPNA2 en células U-87; pero no en KPNA3.....	48
Alteraciones a nivel localización subcelular e integridad son causados por la infección con ZIKV sobre otras carioferinas alfa y carioferina beta 1	51
La infección por ZIKV a las 24 h induce aumentos significativos del nivel relativo de transportinas 1 y 3 en el núcleo de células U-87; la exportina CRM1 no se ve afectada.	53
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
CONCLUSIONES.....	64
PERSPECTIVAS.....	65
BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países y regiones con brotes actuales y/o reportados de virus Zika	3
Figura 2. Ciclo de transmisión de ZIKV	4
Figura 3. Afectaciones multiorgánicas en adultos y fetales asociadas a ZIKV	5
Figura 4. Estructura del virión de Zika	8
Figura 5. Ciclo replicativo del virus Zika.	10
Figura 6. Esquema del genoma y poliproteína viral de los flavivirus	10
Figura 7. Estructura y funciones del NPC.....	16
Figura 8. Mecanismos moleculares del importe y exporte de proteínas	17
Figura 9. Mecanismo de importe y exporte de proteínas nucleares	19
Figura 10. Apropiación viral de la maquinaria de transporte núcleo-citoplasma...	22
Figura 11. Componentes del NPC y su alteración causadas por picornavirus	23
Figura 12. Niveles de expresión de la carioferina alfa 1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	37
Figura 13. Niveles de expresión de la carioferina alfa 2 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	38
Figura 14. Niveles de expresión de la carioferina alfa 3 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	39
Figura 15. Niveles de expresión de la carioferina alfa 5 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV.....	40
Figura 16. Niveles de expresión de la carioferina alfa 6 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	42
Figura 17. Niveles de expresión de la exportina 1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	43
Figura 18. Niveles de expresión de la carioferina beta 1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	44
Figura 19. Niveles de expresión de la transportina 1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	45
Figura 20. Niveles de expresión de la transportina 3 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV	46

Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de KPNA1, KPNA2 y KPNA3 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de intensidad media de fluorescencia.....	49
Figura 22. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de KPNA5, KPNA6 y KPNB1 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de intensidad media de fluorescencia.....	52
Figura 23. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de TNPO1, TNPO3 y CRM1 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de intensidad media de fluorescencia.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos usados durante el desarrollo experimental.....	34
Tabla 2. Comparación de los efectos de la infección por ZIKV sobre los niveles relativos de expresión de las carioferinas evaluadas por WB	55
Tabla 3. Comparación de los efectos de la infección por ZIKV sobre las principales carioferinas evaluadas por WB en células U-87.....	56

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- AINES: Antiinflamatorios no esteroideos
- Asp: Ácido aspártico
- BHE: Barrera hematoencefálica
- CDC: Centros para el control y prevención de enfermedades
- CHIKV: Virus de Chikungunya
- CRM1: Exportina 1
- C-terminal: Carboxilo terminal
- DENV: Virus Dengue
- dsRNA: RNA de doble cadena
- ED: ectodominio
- FG: fenilalanina-glicina
- Fn/C: Relación de fluorescencia nuclear/citoplásmica
- g: Gravedades
- GAP: Proteína activadora de GTPasa citosólica
- GDP: Guanosín difosfato
- GEF: Factor intercambiador de nucleótido de guanina
- GTP: Guanosín trifosfato
- His: Histidina
- hnRNP: Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
- IAV: Virus de influenza
- IFN: Interferón
- IL: Interleucina
- Imp- α : Importina alfa
- Imp- β : Importina beta
- JEV: Virus de la encefalitis japonesa
- Kb: Kilobases
- kDa: Kilodalton
- KPNA: Carioferina alfa
- KPNB: Carioferina beta
- min: Minutos
- MFI: Intensidad media de fluorescencia
- mm: milímetros
- mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
- NE: Envoltura nuclear
- NES: Secuencia de exporte nuclear
- NF- $\kappa\beta$: Factor nuclear $\kappa\beta$
- NLS: Secuencia de localización nuclear
- Nm: Nanómetro
- NPC: Complejo del poro nuclear
- NS: No estructurales
- N-terminal: Amino terminal
- Nup: nucleoporina
- P65: subunidad del factor nuclear $\kappa\beta$
- PBS: Solucion amortiguadora de fosfatos
- RdRps: RNA polimerasas dependientes de RNA
- RE: Retículo endoplásmico

- RNA: Ácido ribonucleico
- RNPs: Ribonucleoproteínas
- rpm: Revoluciones por minuto
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- SARS-CoV: Síndrome respiratorio agudo grave
- Ser: Serina
- SNC: Sistema nervioso central
- ssRNA: RNA de cadena sencilla
- STAT: Transductor de señal y activador de transcripción
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TNPO: Transportina
- VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- VP: Bolsas de vesículas
- vRNP: Ribonucleoproteína del virus de la influenza A
- WNV: Virus del Nilo occidental
- YFV: Virus de fiebre amarilla
- ZIKV: Virus Zika

Resumen

En las últimas décadas desde su aislamiento en la selva de Zika, Uganda, el virus Zika (ZIKV) se ha presentado en brotes esporádicos inicialmente en regiones tropicales de Asia y África. Sin embargo, los brotes suscitados en América en el 2016 y las consecuencias de salud principalmente de tipo neurológico en recién nacidos y sus afectaciones en el desarrollo llevaron a diversos grupos de investigación a estudiar la patología de la enfermedad. ZIKV es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, y al género *Flavivirus*; su genoma es de RNA monocatenario de polaridad positiva que codifica a una poliproteína la cual es procesada en tres proteínas estructurales y siete no estructurales. Aunque su replicación es citoplásmica, se tiene evidencia de la presencia de algunas de sus proteínas en el núcleo y estudios realizados en células en cultivo infectadas con el ZIKV muestran la degradación de algunas de las proteínas del complejo del poro nuclear (NPC), principal estructura involucrada en el control del transporte núcleo-citoplasma. Esta degradación tiene efectos en la distribución del RNA mensajero (mRNA) y proteínas celulares importantes tanto para la activación de la respuesta inmune como para el mantenimiento de la homeostasis celular. El transporte entre el núcleo y el citoplasma además del NPC requiere de las proteínas de transporte o carioferinas. Recientemente, se ha reportado la sobreexpresión de la carioferina α 6 (KPNA6) en células infectadas con ZIKV, sugiriendo su participación en el ciclo replicativo viral. Asimismo, se demostró que durante la infección se afectan los niveles de expresión de otras proteínas de transporte como la KPNA2, no obstante, se desconoce si otras proteínas de la familia de las carioferinas α y β son afectadas. Por lo que, en este trabajo, estudiamos la integridad y localización subcelular de las proteínas de transporte nuclear de la familia de las carioferinas durante la infección por ZIKV en células Huh-7 y U-87. Nuestros resultados indican que a las 24 hrs post-infección con ZIKV se reducen los niveles de expresión o cambia la localización de algunas proteínas receptoras de transporte núcleo-citoplasma, principalmente en células adherentes de origen cerebral U-87, lo que podría promover la persistencia viral en el huésped y/o cambios en la respuesta inmune.

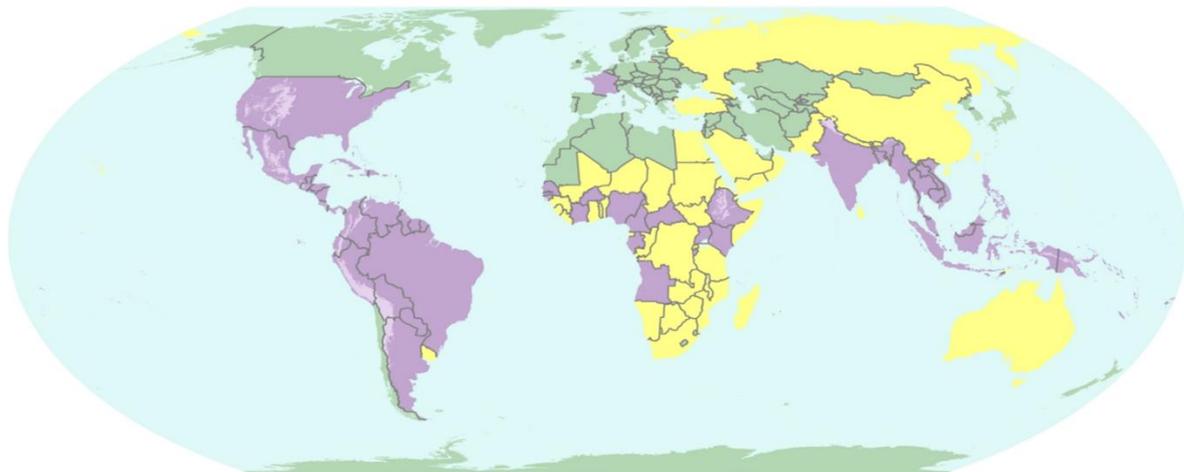
Abstract

In the last decades since its isolation in the Zika jungle, Uganda, Zika virus (ZIKV) has occurred in sporadic outbreaks initially in tropical regions of Asia and Africa. However, the outbreaks in the Americas in 2016 and the mainly neurological health consequences in newborns and their developmental effects led several research groups to study the pathogenesis of the disease. ZIKV is an arbovirus belonging to the family Flaviviridae, and to the genus Flavivirus; its genome is a single-stranded RNA of positive polarity that encodes a polyprotein which is processed into three structural and seven non-structural proteins. Although its replication is cytoplasmic, there is evidence of the presence of some of its proteins in the nucleus and studies performed in cultured cells infected with ZIKV show the degradation of some of the proteins of the nuclear pore complex (NPC), the main structure involved in the control of nucleus-cytoplasm transport. This degradation has effects on the distribution of messenger RNA (mRNA) and cellular proteins important for both the activation of the immune response and the maintenance of cellular homeostasis. Transport between the nucleus and cytoplasm in addition to NPC requires transport proteins or karyopherins. Recently, overexpression of karyopherin α 6 (KPNA6) has been reported in ZIKV-infected cells, suggesting its involvement in the viral replicative cycle. Likewise, it was demonstrated that during infection the expression levels of other transport proteins such as KPNA2 are affected, however, it is unknown whether other proteins of the α and β karyopherin family are affected. Therefore, in this work, we studied the integrity and subcellular localization of nuclear transport proteins of the karyopherin family during ZIKV infection in Huh-7 and U-87 cells. Our results indicate that at 24 hr post-infection with ZIKV the expression levels are reduced or the localization of some nuclear-cytoplasmic transport receptor proteins changes, mainly in adherent cells of brain origin U-87, which could promote viral persistence in the host and/or changes in the immune response.

INTRODUCCIÓN

Generalidades y epidemiología

El virus Zika (ZIKV) fue aislado por primera vez en Uganda en 1947 a partir de un mono Rhesus durante un estudio de la transmisión de fiebre amarilla (YFV), aunque fue hasta 1968, en Nigeria que se logró aislar el virus en muestras humanas (Petersen *et al.*, 2016; Manjarrez-Zavala & Molina-López, 2019). La infección por ZIKV se ha presentado con brotes esporádicos en diversas partes del mundo, hasta que se reportó su presencia en América en 2015, en donde hubo un gran número de casos que continuaron hasta fines de 2016 como se ilustra en la figura 1 (Campos *et al.*, 2015; CDC, 2022; ECDC, 2015). Este virus adquirió relevancia clínica mundial cuando se propagó masivamente en Brasil en 2016 extendiéndose hacia centro y sur de América; y a nivel nacional hasta 2017 se detectó el primer caso de microcefalia asociado a la infección por ZIKV en el estado de Oaxaca, México; así como 3,260 casos de infecciones reportados ante la Secretaría de Salud (Petersen *et al.*, 2016).



Simbología

- Países con brotes actuales de Zika¹
 - Países o territorios que han reportado casos de Zika² (pasados o actuales)
 - Áreas con baja probabilidad de infección por ZIKA debido a la altitud (más de 2,000 (msn))
 - Países o territorios con mosquitos³, pero sin casos reportados de Zika
 - Países o territorios sin mosquitos que propagan Zika
- ¹Actualmente no hay áreas reportando brotes de Zika
²Casos de zika transmitidos por mosquitos adquiridos localmente
³*Aedes aegypti*

Figura 1. Países y regiones con brotes actuales y/o reportados de virus Zika (CDC, 2022)

Al ser transmitido por vectores del género *Aedes* (*A. aegypti*, y en menor medida *A. albopictus*) existe un riesgo potencial de emergencia sanitaria en las mismas regiones de circulación del virus dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV). Adicionalmente, se ha documentado la transmisión de ZIKV a través de la vía transplacentaria, sanguínea y sexual (Thomas et al., 2015) como se muestra en la figura 2 (Kumar et al., 2021; Vargas-Córdoba, 2016). Actualmente, se han aislado dos linajes de ZIKV; el africano y el asiático; de los cuales se ha reportado que los casos asociados con brotes infecciosos en América son del genotipo asiático, específicamente proveniente de regiones como Camboya y Tailandia (Lanciotti et al., 2016).

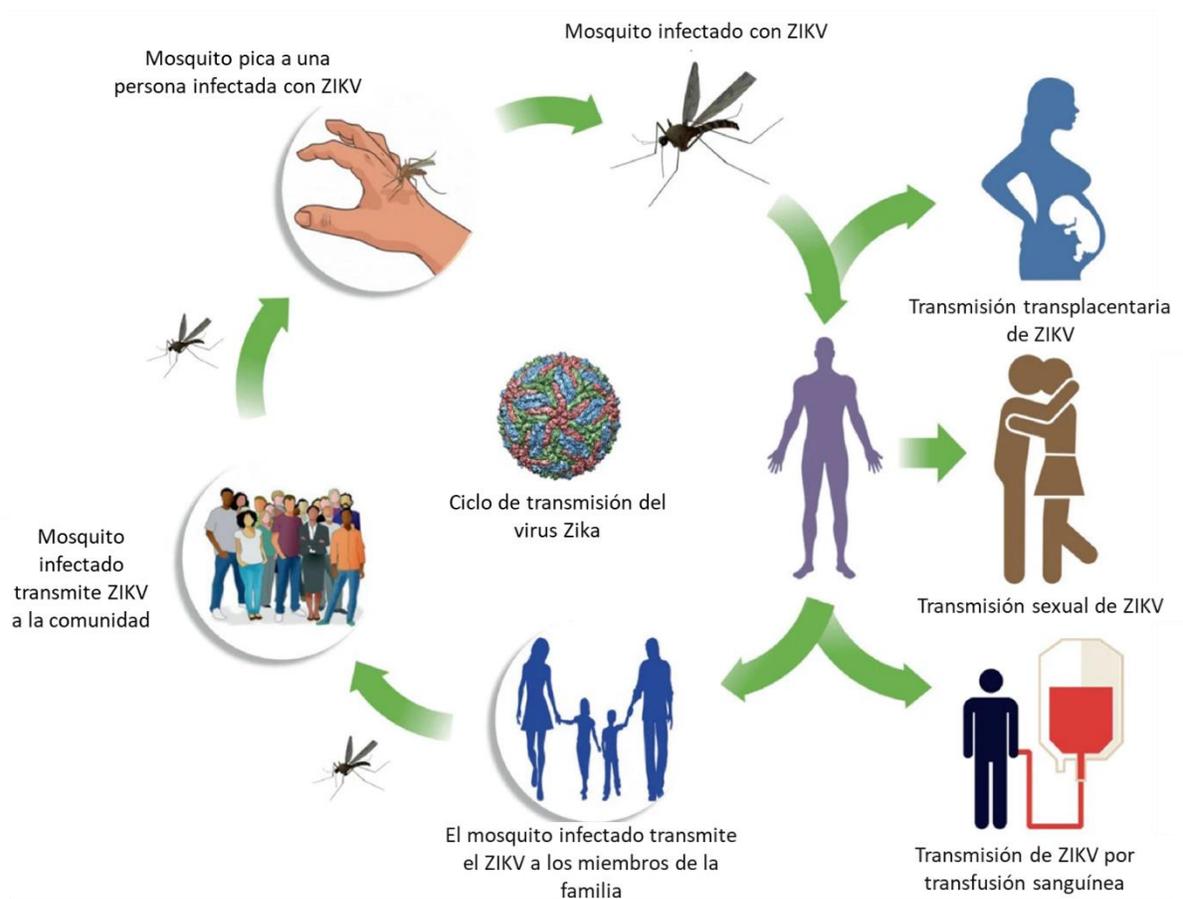


Figura 2. Ciclo de transmisión de ZIKV (modificado de Kumar et al., 2021).

Sintomatología

Históricamente la enfermedad por ZIKV cursaba con síntomas febriles autolimitados similares a la enfermedad por DENV, pero sin manifestaciones hemorrágicas; sin embargo, si se presenta exantema, artralgia, conjuntivitis no purulenta y cefalea frontal con una incubación viral de tres días (Thomas et al., 2015). Interesantemente, desde los brotes en América, la enfermedad por ZIKV se ha asociado a complicaciones multiorgánicas (figura 3). Además, tiene la capacidad de dañar preferentemente a las células progenitoras neurales (Tang et al., 2016). Este hecho, explicaría la capacidad de ZIKV para afectar el neurodesarrollo fetal con signos de alarma como microcefalia, calcificaciones cerebrales, restricción del crecimiento intrauterino, y muerte fetal (Brasil et al., 2016; Cauchemez et al., 2016). Los síntomas neurológicos en adultos como el síndrome de Guillain-Barré y microcefalia en el feto se asocian a un mecanismo que hasta la fecha no ha sido completamente elucidado (Hussain et al., 2018), por el cual ZIKV cruza la placenta y la barrera hematoencefálica a través de la disrupción de las uniones estrechas (Chiu et al., 2020). Los síntomas que se manifiestan incluyen cefalea y artritis así como otros signos de aparición post natal como la microcefalia y trastornos de tipo sensorial (Fitzgerald et al., 2018).

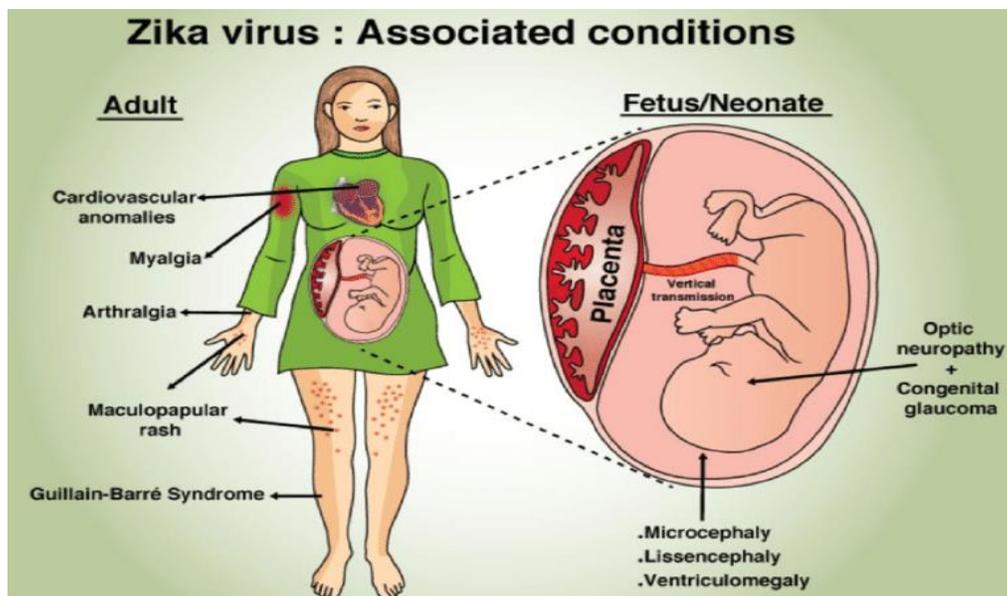


Figura 3. Afectaciones multiorgánicas en adultos y fetales asociadas a ZIKV (Hussain et al., 2018).

Los resultados de Papa et al (Papa et al., 2017) y de Alimonti et al (Alimonti et al., 2018) sugirieron un tipo de transporte endocítico por el cual las células endoteliales de la vasculatura de la barrera hematoencefálica (BHE) transportan a través de endosomas, las partículas virales sin interrumpir la BHE propiamente. Además, Chiu et al (Chiu et al., 2020) realizaron estudios de infectividad en células de trofoblasto de placenta humana (JEG-3) y en células endoteliales derivadas de cerebro humano (hCMEC/D3) a distintas multiplicidades de infección (MOI), encontrando que las células se infectaban sin afectar la viabilidad celular. Por otro lado, mediante el empleo de filtros transwell, se encontró que ZIKV puede atravesar las barreras placentaria y hematoencefálica a través de una vía paracelular por disrupción de las uniones estrechas, demostrando el pronunciado tropismo de ZIKV hacia el sistema nervioso central (SNC) (Calvet et al., 2016; Mlakar et al., 2016).

Entre las líneas celulares permisivas a la infección por ZIKV se cuentan la línea Huh-7 por la susceptibilidad de los hepatocitos a la infección por ZIKV y a otros flavivirus. Cabe mencionar que los primeros reportes de infecciones por ZIKV en África se asociaron al desarrollo de ictericia e insuficiencia hepática (MacNamara, 1954). Además, previamente se ha reportado que los hepatocitos son células permisivas para la replicación de ZIKV con la presencia de un efecto citopático evidente (Sherman *et al.*, 2019). Paralelamente, se han usado otras líneas celulares como la U-87 derivada de glioblastoma maligno, proveniente de tejido tumoral de cerebro. En este tipo celular se ha descrito su susceptibilidad a la infección por ZIKV específicamente observada por la activación del inflammasoma (Tricarico *et al.*, 2017).

Diagnóstico

Aunque no se ha establecido completamente el periodo de viremia por ZIKV, sí se ha detectado RNA viral en suero de pacientes hasta 10 días después del inicio de los síntomas (Lanciotti et al., 2008) por lo que se recomienda la recolección de muestras dentro de esta ventana de tiempo (Lustig et al., 2016). Entre 4 a 7 días de iniciados los síntomas pueden detectarse anticuerpos IgM específicos para ZIKV que persisten aproximadamente durante 12 semanas. En tanto que los anticuerpos

neutralizantes se detectan al mismo tiempo que IgM, pero pueden persistir durante años (Landry & St. George, 2016).

Una dificultad para un diagnóstico certero de ZIKV es la fuerte reactividad cruzada con otros flavivirus tales como el virus del dengue (DENV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). Por lo que pruebas de biología molecular tales como la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) u otras pruebas de amplificación de ácidos nucleicos pueden proporcionar información más precisa, debido a que el ZIKV solo se detecta transitoriamente durante la enfermedad aguda (Lanciotti et al., 2008).

Tratamiento

Los pacientes infectados por ZIKV deben mantenerse hidratados, guardar total reposo y tratar la fiebre con antipiréticos (como el paracetamol) y soluciones líquidas con la pertinente observación médica hasta la resolución autolimitada de la enfermedad debido a la inexistencia de una vacuna. Los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) recomiendan no tomar antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como la aspirina o naproxeno hasta que se haya descartado la infección por DENV a fin de evitar el riesgo de hemorragia (Saxena et al., 2016).

Descripción del virus

El ZIKV es un arbovirus de entre 50 y 60 nanómetros (nm) de diámetro con una envoltura lipídica. Pertenece a la familia *Flaviviridae* y su genoma es de RNA monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases (kb) que codifica a una poliproteína la cual se procesa en tres proteínas estructurales (Lindenbach *et al.*, 2011): (cápside, pre-membrana/membrana y envoltura). La proteína de la cápside (C) y el RNA viral forman la nucleocápside en tanto que las proteínas de membrana (M) y la de envoltura (E) se asocian con la membrana viral (figura 4).

También el RNA codifica para siete proteínas no estructurales (NS) que participan tanto en la replicación viral como en la supresión de la respuesta inmune (Cornelissen & Hobbs, 2020; Tan *et al.*, 2019).

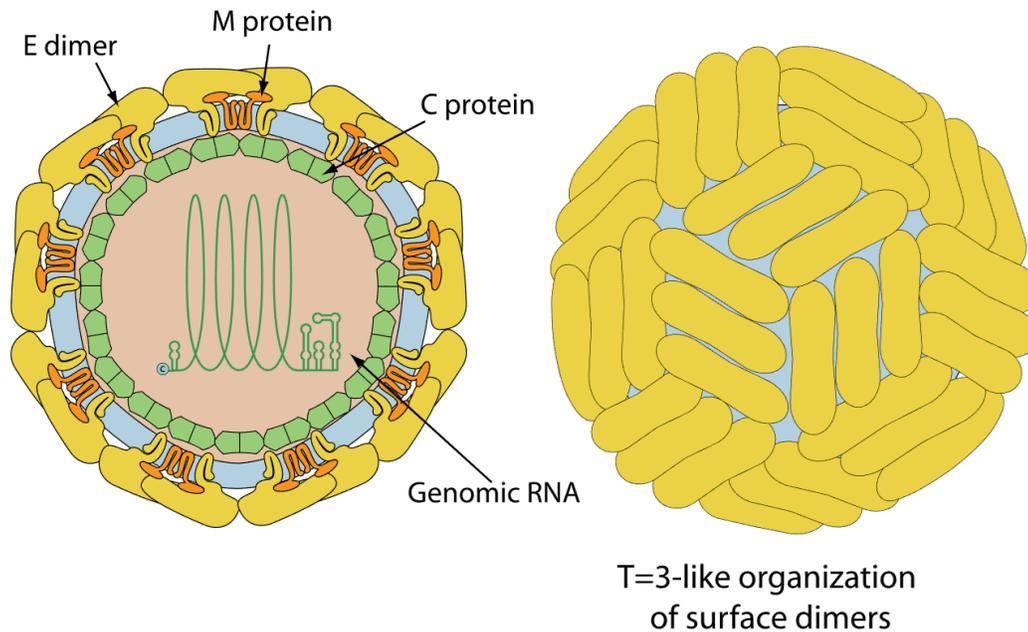


Figura 4. Estructura del virión de Zika (Zika virus ~ ViralZone, 2023).

Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del virus Zika (figura 5) inicia con la interacción de la proteína E con factores de superficie de la célula hospedera como integrinas y factores de adhesión. Posteriormente el virus se internaliza por endocitosis dependiente de clatrina. Una vez que el virus está en el endosoma, el ambiente ácido desencadena la trimerización de la proteína E, lo que lleva a la fusión de la membrana endosomal y viral (Hasan et al., 2018).

La degradación de la proteína C lleva a la liberación de RNA viral en el citoplasma celular. La traducción del RNA viral de sentido positivo ocurre inmediatamente después de su liberación en las membranas del retículo endoplásmico (RE) generando una poliproteína (figura 6) que posteriormente será procesada (Barrows et al., 2018).

La poliproteína presente en la membrana del RE comprende prM, E, NS1 y fragmentos de NS2A, NS4A y NS4B ubicadas dentro de la luz del RE, mientras que C, NS3 y NS5 miran hacia el citoplasma. Esta poliproteína es escindida por las proteasas del huésped (que cortan las partes localizadas hacia la luz del RE) y por

la proteasa viral NS3 (que procesa las partes localizadas hacia el citosol) para obtener proteínas estructurales y no estructurales maduras del virus (Stadler et al., 1997). Una vez que se han formado las proteínas virales, estas participan en la formación de los complejos de replicación que estarán involucrados en la síntesis del genoma viral. Las proteínas transmembrana NS1, NS2A, NS2B, NS4A y NS4B se asocian con lípidos modificados que proporcionan un andamiaje molecular para la replicación viral. Las proteínas virales inducen reordenamientos de la membrana del RE que facilitan la generación de bolsas de vesículas (VP) donde se encuentra el complejo de replicación (Acosta-Ampudia et al., 2018).

El RNA monocatenario positivo se transcribe por la actividad de RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRps) de NS5 para producir RNA de doble cadena (dsRNA) que se compone de cadenas positivas y negativas. Este dsRNA es desenrollado por la helicasa NS3 para generar RNA de cadena sencilla (ssRNA) tanto positivos como negativos. Los ssRNA negativos sirven como moldes para la generación de los ssRNA positivos. El RNA genómico, se asocia con C para formar las nucleocápsides que gemarán en el RE para adquirir la membrana viral. Se cree que las interacciones oligoméricas de prM y E inducen una red de superficie curva que guía la gemación del virión (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). A continuación, las partículas inmaduras transitan desde el RE al complejo de Golgi y la red trans-Golgi donde el entorno ácido expone el sitio de escisión de prM. Finalmente, la prM es escindida por una furina proteasa del huésped eliminando al péptido pr (Stade et al., 1997), lo que permite la maduración de las partículas, seguida de la liberación de viriones maduros de las células infectadas por exocitosis (Wichit et al., 2021).

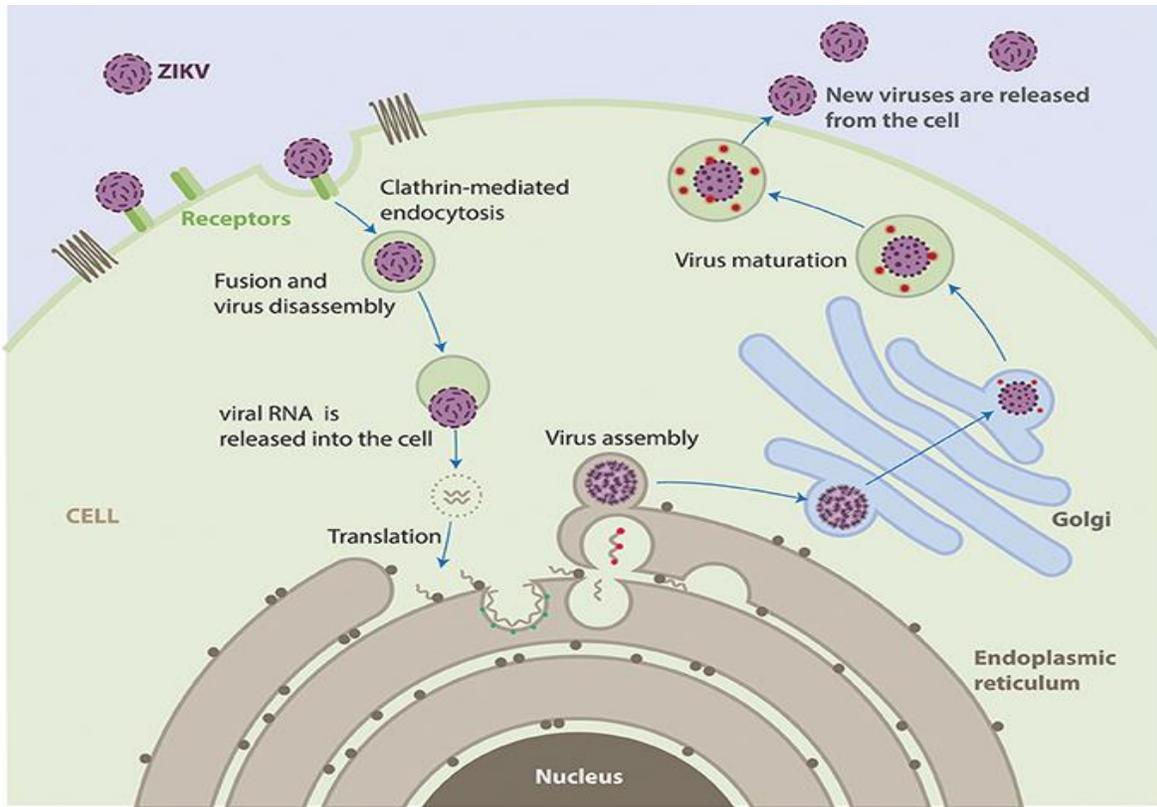


Figura 5. Ciclo replicativo del virus Zika (Acosta-Ampudia et al., 2018).

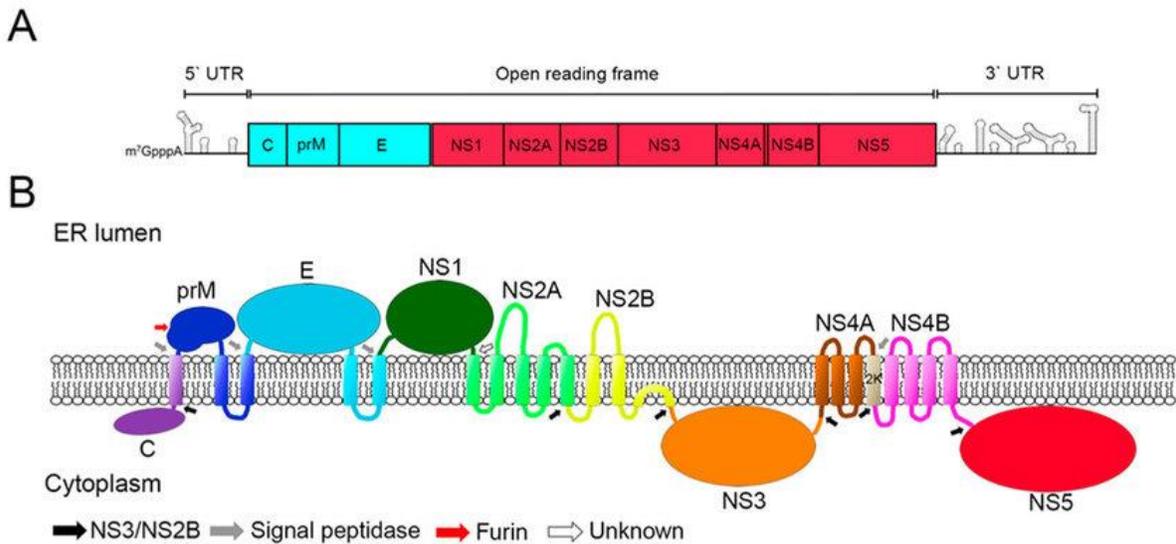


Figura 6. Esquema del genoma y poliproteína viral de los flavivirus. A) RNA de cadena sencilla en sentido positivo que posee un solo marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) (B). Topología de la proteína de los flavivirus (Barrows et al., 2018).

Proteínas flavivirales: breve descripción

Se han estudiado diferentes funciones y características de las diez proteínas flavivirales. La **glicoproteína E** es la proteína más expuesta en la partícula viral y juega un papel importante en la biología del virus y en inducir la inmunidad humoral. Forma parte de la envoltura y constituye la principal proteína estructural de los flavivirus. Esta proteína media la fusión de membrana viral y endosomal, induce la formación de anticuerpos neutralizantes, inhibidores de la hemaglutinación y anticuerpos inmunoamplificadores, además, ésta interacciona con el receptor en la célula huésped. Cada monómero de proteína E se compone de tres ectodominios ED1 a ED3, y un segmento transmembranal. ED2 incluye la interfaz de dimerización junto con dos sitios de glucosilación, y el péptido de fusión con la membrana celular. ED3 es un segmento polipeptídico continuo; su pliegue es compacto y similar a las inmunoglobulinas (Perera & Kuhn, 2008).

La **proteína C** es un componente básico de la nucleocápside, el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción; con un peso molecular de 13.5 kDa. Es rica en residuos de lisina y arginina lo que le confiere un carácter altamente básico que permite su interacción con el RNA viral, con el que forma la nucleocápside como componente estructural (Acosta-Bas & Gómez-Cordero, 2005). La forma madura de la proteína C es altamente básica y pesa 12 kDa tras la eliminación de la secuencia hidrófoba de señales carboxilo terminales (C-terminales) por la proteasa NS2B-NS3 (L. Ma et al., 2004).

La **proteína M** madura se forma a partir de un precursor (prM) y eliminación de la porción N-terminal y C-terminal no-glicosilado. Esta proteína participa en la regulación de la fusión viral y plegamiento de la proteína E. Se localiza en los viriones inmaduros en forma intracelular. La proteína prM (precursor de la proteína M) protege a la proteína E del pH ácido del medio durante la maduración viral que evita su cambio conformacional irreversible (Velázquez Flores, 2017).

La **glicoproteína NS1** (46 kDa) presenta tres formas, la residente del RE, anclada a la membrana y la forma secretada (que puede estar en el espacio extracelular, con lo cual puede estimular el sistema inmune). También, se puede hallar soluble

en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, la NS1 puede estimular al sistema inmune. Las inmunoglobulinas contra la NS1 pueden provocar lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpos en células infectadas y no infectadas, lo que explica en parte el daño al endotelio, y sus consecuencias fisiopatológicas (Laredo-Tiscareño et al., 2012). Los estudios de Brown et al., 2016; Scaturro et al., 2015; Youn et al., 2012 demuestran que NS1 es importante para la replicación viral al encontrar residuos conservados como Trp115 en su dominio N-terminal que interaccionan con el complejo de replicación y con las proteínas E y pM en la producción de viriones infecciosos

La **NS2A es una proteína** de 22 kDa aproximadamente que, in vitro, promueve el ensamblaje y la replicación viral. Al parecer, la NS2A coordina de un modo aún no muy bien elucidado, si el RNA genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como molde para generar las formas replicativas y los intermediarios de replicación o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral (Knipe & Howley, 2007). Por su parte, **la proteína NS2B** (14 kDa) posee una región hidrofóbica que la ancla a la membrana del RE. El complejo NS2B/NS3 sufre un procesamiento proteolítico, en donde un pequeño dominio hidrofílico de NS2B, recién liberado interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta (Bollati et al., 2010; Knipe & Howley, 2007; Velandia & Castellanos, 2011).

La **proteína NS3** (70 kDa) es una proteína bipartita que posee en el extremo N-terminal un dominio serina proteasa semejante a tripsina (NS3pro), y en el extremo C-terminal posee un dominio con actividad de helicasa de RNA y trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (RTPasa/NTPasa). El dominio proteasa consiste en seis hebras β acomodadas en dos barriles β formados por residuos 1-180 de la proteína. La triada catalítica (His-51, Asp-75 y Ser-135) se encuentra entre estos dos barriles β , y la actividad es dependiente de la presencia del cofactor NS2B. Este cofactor envuelve el dominio proteasa de la NS3 y se vuelve parte del sitio activo (Bollati et al., 2010).

El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/ NS5 de la poliproteína. El grupo de investigación de Heaton y colaboradores (Heaton et al., 2010) describió que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos lo cual garantiza el inicio del ensamblaje de los complejos de replicación.

Particularmente, se ha descrito que la proteína NS3 de ZIKV puede transportarse y acumularse en el núcleo de las células infectadas afectando funciones de homeostasis celular al degradar proteínas del complejo del poro nuclear (NPC) como la nucleoporina 98 (Nup98) (De Jesús-González et al., 2020). Otras proteínas virales como C y NS5, las cuales contienen una secuencia de localización nuclear (NLS) son translocadas a los núcleos de células Vero infectadas con ZIKV (Hertzong et al., 2018; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017).

La **proteína NS4** está implicada en la alteración de la curvatura de la membrana celular y la inducción de la autofagia. Además, NS4 sirve de andamio para la formación del complejo de replicación del virus y se somete a oligomerización (Le. e et al., 2015). Las proteínas **NS4A y NS4B** son proteínas de naturaleza hidrofóbica y transmembranal con un peso molecular de 16 y 27 kDa, respectivamente y se ha sugerido que participan en la inhibición de la vía del interferón (IFN) tipo I (principalmente NS4B) ya que bloquean las rutas de señalización que dan lugar a la producción de esta citocina (Muñoz-Jordán et al., 2003).

La **proteína NS5** es la proteína viral más conservada entre todos los flavivirus. Esta proteína es un péptido de 900 residuos que posee un dominio metiltransferasa y guanidiltransferasa en su extremo N-terminal (residuos 1-296) responsables del *capping* y la metilación del extremo 5' del RNA genómico y una RdRp en su extremo C-terminal (residuos 320-900) siendo así, la única polimerasa (Bollati et al., 2010; Muñoz-Jordán et al., 2003; Nomaguchi et al., 2003). El dominio metiltransferasa consiste en un complejo $\alpha/\beta/\beta$ flanqueado por subdominios N y C terminales (Perera & Kuhn, 2008).

Las partículas virales inmaduras formadas en el lumen del RE contienen a la proteína E y la prM en la envoltura lipídica y a la proteína de nucleocápside que, para ser infectivas e inducir la fusión virus-célula transitan a través de la red trans-Golgi en un proceso de maduración dependiente de pH y de proteasas hacia la superficie celular. En el aparato de Golgi las proteínas M, E y NS1 son glicosiladas (Salazar-Sánchez & Loroño-Pino, 2019). Los dímeros de glicoproteína E previamente ensamblados se encuentran cubiertos por la proteína prM, cuya porción “pr” es escindida por una furina y posteriormente secretada durante la exocitosis, dejando a la fracción “M” asociada a la membrana del virión (Hasan et al., 2018).

ANTECEDENTES

Transporte núcleo-citoplasma

Considerando la importancia del núcleo en las células eucariotas, su contenido debe estar controlado por una barrera entre el núcleo y el citoplasma y es esta característica la más relevante que distingue a las células eucariotas de las procariotas (Alberts et al., 2015). La barrera que delimita al núcleo y al citoplasma es la envoltura nuclear (NE, por sus siglas en inglés) que está formada por dos membranas paralelas entre sí que al fusionarse en determinados sitios forman aperturas especializadas llamadas poros nucleares (Becker et al., 2007). Los poros nucleares permiten el movimiento del RNA y proteínas en ambas direcciones para llevar a cabo determinadas funciones como la replicación y transcripción, el exporte de mRNA y subunidades ribosómicas al citoplasma y el importe de proteínas con secuencias de localización nuclear (NLS)(Iwasa & Marshall, 2018).

El tránsito de moléculas a través de la NE se restringe a una estructura octagonal formada por los poros nucleares que se extiende hacia el citoplasma y al nucleoplasma llamada complejo de poros nucleares (NPC) esquematizada en la figura 7 (Schwartz, 2016; Iwasa y Marshall, 2018). Los NPC funcionan como un tamiz que permite selectivamente el paso de proteínas y otras moléculas. El NPC está formado por varias copias de 30 proteínas altamente conservadas llamadas nucleoporinas (Nups) (Schwartz, 2016; Beck & Hurt, 2017), cuyos repetidos de fenilalanina-glicina (FG) les proporcionan una organización flexible que funciona como un tamiz acuoso bloqueando la difusión libre de macromoléculas y proporcionando función estructural (Beck & Hurt, 2017).

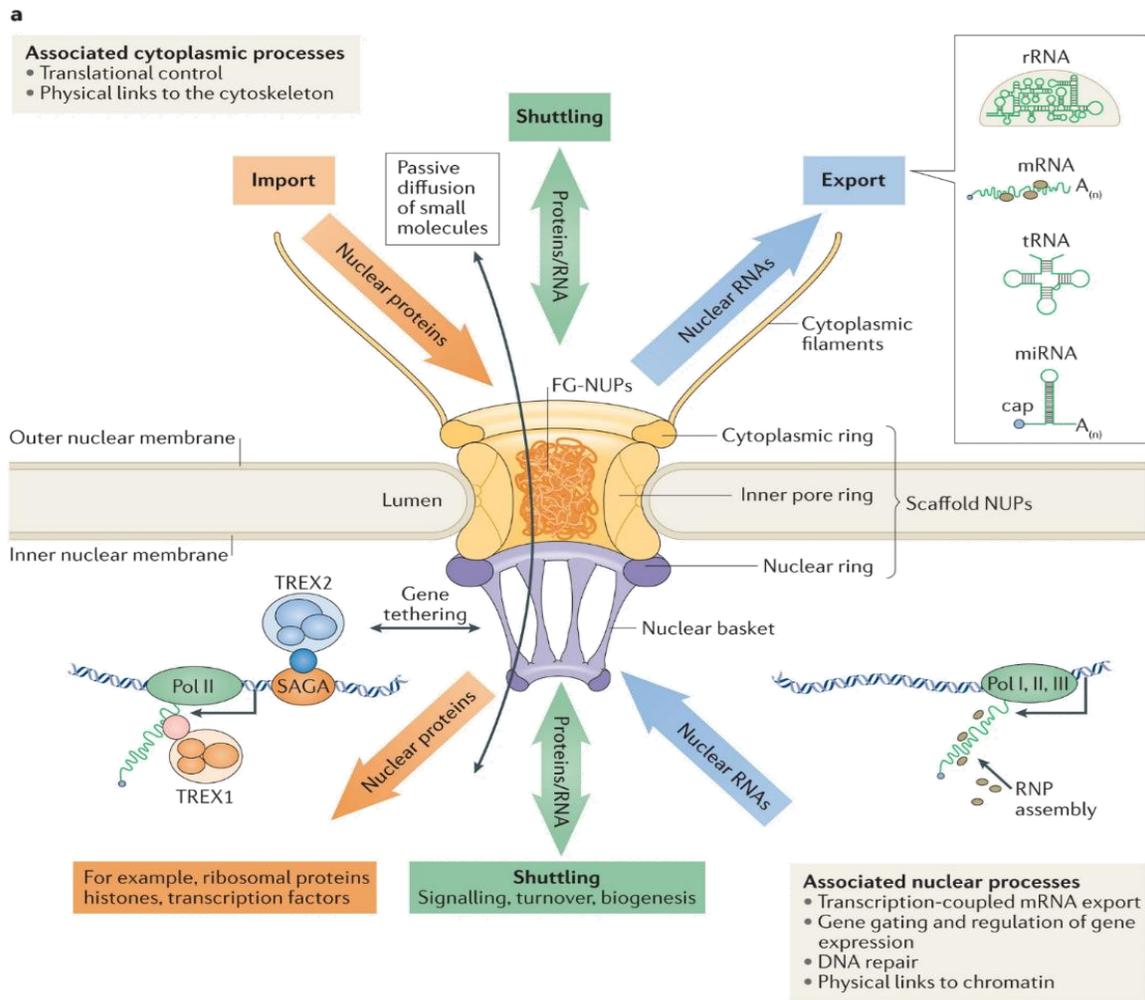


Figura 7. Estructura y funciones del NPC (Beck & Hurt, 2017).

Receptores móviles de transporte: carioferinas

Las proteínas adaptadoras que desplazan macromoléculas como proteínas, RNA y ribonucleoproteínas (RNPs) a través de los NPCs. Entre estos receptores se encuentran las **carioferinas**, que transportan moléculas entre el citoplasma y el núcleo en un proceso dependiente de energía al interactuar con las FG-Nups (Chook & Blobel, 2001; Radu *et al.*, 1995).

En la vía clásica de importe de proteínas al núcleo, las proteínas citoplásmicas que poseen una NLS son reconocidas por la carioferina α (KPNA) seguido por una asociación con la carioferina β (KPNB) formando un complejo heterodimérico. Se ha propuesto que esta estructura receptor-carga mostrada en la figura 8 se asocia

con filamentos citoplásmicos del NPC en la superficie externa del núcleo que la internalizan hacia el núcleo (Iwasa & Marshall, 2018). Posteriormente, las carioferinas se unen a GTPasas de tipo Ran que crean un gradiente a través del NPC y que se requieren tanto para la importación como para la exportación nuclear (Becker et al., 2007).

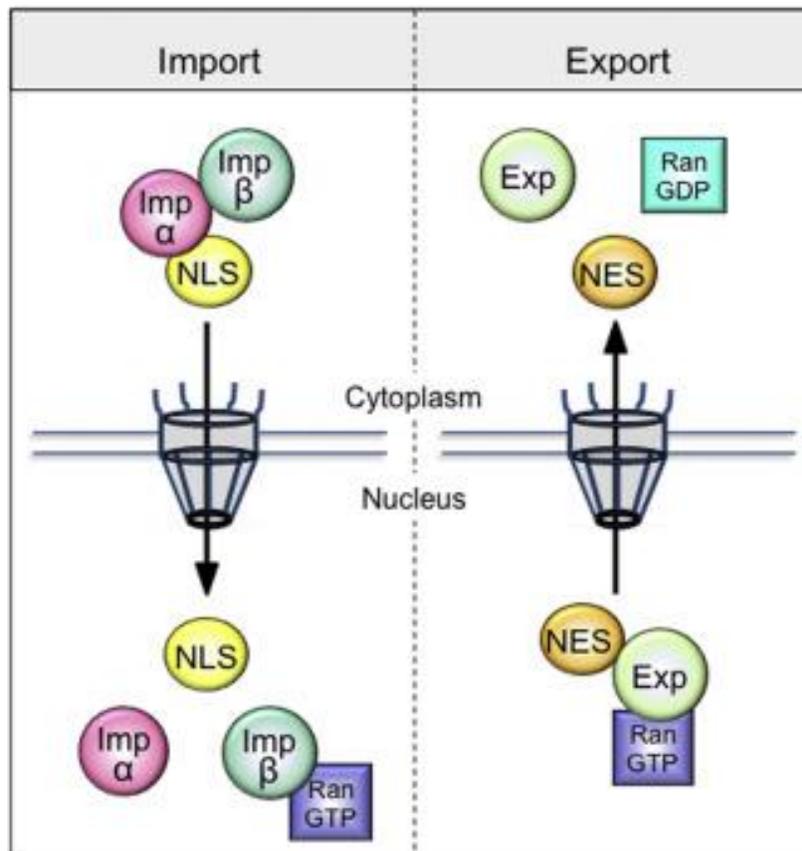


Figura 8. Mecanismos moleculares del importe y exporte de proteínas (Miyamoto et al., 2018).

Ran puede existir en dos estados conformacionales, dependiendo de si se une a GDP o a GTP. Dos proteínas reguladoras desencadenan la conversión entre los dos estados: una proteína activadora de GTPasa citosólica (GAP) desencadena la hidrólisis de GTP y, por lo tanto, convierte a Ran-GTP en Ran-GDP, y un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) promueve el intercambio de GDP por GTP y convierte Ran-GDP en Ran-GTP. Debido a que Ran-GAP está ubicado en el citosol y Ran-GEF está ubicado en el núcleo donde está anclado a la cromatina, el citosol contiene principalmente Ran-GDP y el núcleo contiene principalmente Ran-GTP (Alberts et al., 2015; Iwasa & Marshall, 2018).

Este gradiente de las dos formas conformacionales de Ran se impulsa el transporte nuclear en la dirección adecuada (figura 9). El acoplamiento de los receptores de importación nuclear a los repetidos de FG en el lado citosólico del NPC ocurre ya sea que estos receptores estén o no cargados con la carga adecuada. Los receptores de importación, facilitados por la unión de repetición de FG, luego ingresan al canal. Si llegan al lado nuclear del NPC, Ran-GTP se une a ellos y, si los receptores llegan cargados con moléculas de carga, la unión de Ran-GTP hace que los receptores liberen su carga (Becker et al., 2007).

Debido a que Ran-GDP en el citosol no se une a los receptores de importación (o exportación), la descarga ocurre solo en el lado nuclear de la NPC (fig.9.1). De esta forma, la localización nuclear de Ran-GTP crea la direccionalidad del proceso de importación. Habiendo descargado su carga en el núcleo, el receptor de importación vacío con Ran-GTP unido es transportado de regreso a través del complejo de poros al citosol (fig. 9. 2 y 3). Allí, Ran-GAP activa a Ran-GTP para hidrolizar su GTP unido, convirtiéndolo así en Ran-GDP, que se disocia del receptor (fig.9.4). El receptor está entonces listo para otro ciclo de importación nuclear (Alberts et al., 2015).

La exportación nuclear ocurre por un mecanismo similar, excepto que Ran-GTP en el núcleo promueve la unión de la carga al receptor de exportación, en lugar de promover la disociación de la carga. Una vez que el receptor de exportación se mueve a través del poro hacia el citosol, se encuentra con Ran-GDP, que induce al receptor a hidrolizar su GTP a GDP. Como resultado, el receptor de exportación libera tanto su carga como Ran-GDP en el citosol (fig. 9.5). Luego, los receptores de exportación libre se devuelven al núcleo para completar el ciclo (Alberts et al., 2015; Beck & Hurt, 2017; Becker et al., 2007; Iwasa & Marshall, 2018).

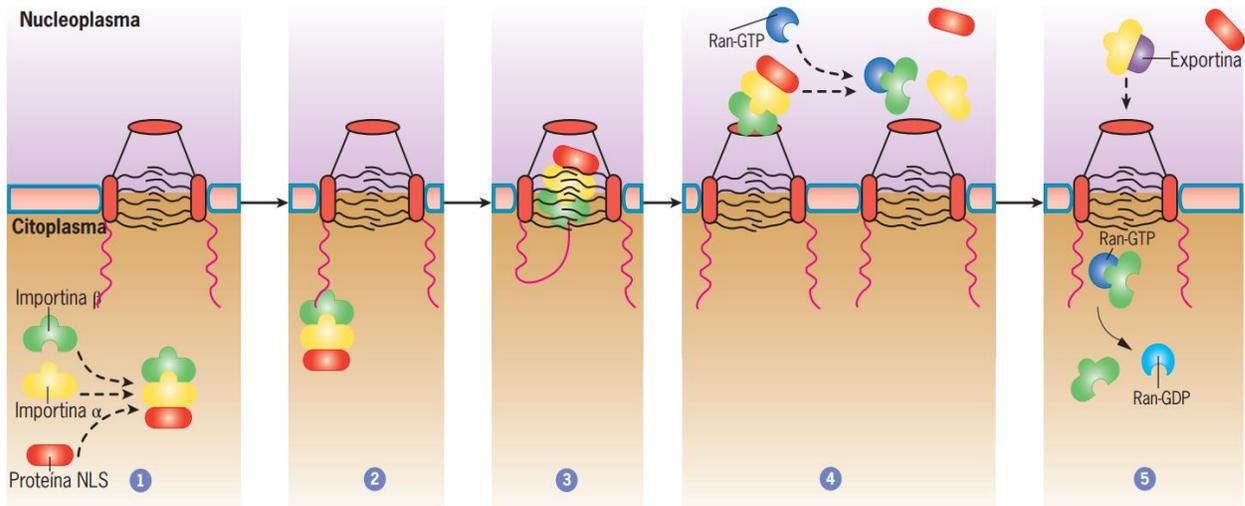


Figura 9. Mecanismo de importe y exporte de proteínas nucleares (Iwasa & Marshall, 2018).

Funciones asociadas a las carioferinas

Existen siete isoformas de KPNA (KPNA1 a KPNA7) que poseen especial importancia debido a su actividad en la transducción de señales, especialmente las involucradas en la respuesta inmune (Goldfarb *et al.*, 2004; Kelley *et al.*, 2010; Pumroy & Cingolani, 2015). La KPNA1 efectúa la translocación nuclear de STAT1 en la expresión estimulada por IFN; KPNA1 y KPNA6 transportan a STAT3 para activar la vía de señalización de interleucina 6 (IL-6) (Goldfarb *et al.*, 2004). KPNA4 es una de las isoformas que regulan el importe nuclear de las subunidades p50/p65 de NF- κ B (Fagerlund *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2012; Sachan *et al.*, 2013). Como evidencia del resultado anterior, las observaciones de Ye *et al.*, 2017 reportaron que algunos virus de RNA bloquean la interacción de KPNA3 y KPNA4 con los factores de transcripción IRF3 y p65, inhibiendo directamente su translocación nuclear, la activación de IFN tipo 1 y la respuesta antiviral.

Diversos grupos de investigación han reportado que la proteína VP24, altamente conservada en los filovirus como Ébola y Marburg, y en el virus Lloviu de la misma familia (Feagins & Basler, 2015) es capaz de reconocer un sitio de unión de NLS en KPNA5 y bloquear la unión de STAT1 fosforilada a KPNA5 y a KPNA1 inhibiendo la respuesta inmune innata (Reid *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2014)

Otro miembro de las KPNA es KPNA7 que se une fuertemente a las carioferinas β , con una distribución principalmente nuclear que contrasta con KPNA2 y su localización citoplasmática (Kelley *et al.*, 2010). Las proteínas que conforman a la subfamilia de las importinas α son, en resumen, receptores de proteínas que llevan una NLS clásica (formadas por repetidos de arginina y lisina) (Nguyen Ba *et al.*, 2009).

Las carioferinas β (KPNB, también conocidas como importinas β) median el anclaje a las Nups y, por ende, la translocación de proteínas al núcleo (Poon & Jans, 2005). Una función importante desempeñada por KPNB1 es la translocación nuclear de la proteína activadora 1 (AP-1) que promueve la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 en respuesta a estímulos como infecciones (Shaulian & Karin, 2001). Sin embargo, los resultados de Pollard *et al.*, 1996 y de Aitchison *et al.*, 1996 también demuestran la existencia de receptores de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) capaces de unir sus cargos sin el empleo de una KPNA adaptadora. Estos receptores se llaman transportinas (TNPO) y se caracterizan por unirse a proteínas con NLS principalmente formadas por repetidos de prolina y tirosina en el extremo C-terminal (también conocidas como secuencias M9), entre estas proteínas cargo se encuentran proteínas de unión a RNA y otras moléculas asociadas con la transcripción y procesamiento de RNA (Twyffels *et al.*, 2014; Soniat & Chook, 2015).

Sin olvidar el fundamento de la bidireccionalidad del transporte núcleo-citoplasma, dentro de la familia de las KPNB se encuentra el primer receptor de exportación identificado, llamado exportina 1 o CRM1 (Fornerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997) que reconoce secuencias de exporte nuclear (NES) ricas en leucina o aminoácidos hidrofóbicos, presentes tanto en factores de transcripción como en proteínas virales (Görlich & Kutay, 1999; Mosammamaparast & Pemberton, 2004). Por regla general, se asume que una proteína que se transporta entre el núcleo y el citoplasma suele contener una NLS a la que se une una importina, o una NES que se une a una exportina (Harel & Forbes, 2004).

Alteración del transporte núcleo-citoplasma mediado por virus de RNA

Considerando el indispensable papel que desempeñan la barrera nuclear-citoplásmica y las carioferinas en la transducción de señales relacionadas con la proliferación celular y la respuesta inmune; a menudo son las moléculas blanco de distintos virus que para asegurar su permanencia en la célula hospedera efectúan estrategias como la replicación del genoma dentro del núcleo eucariota y su posterior exporte a través de la membrana nuclear, así como el importe y exporte de proteínas virales al núcleo (Fay & Panté, 2015).

Estos patógenos intracelulares se apropian o degradan a la maquinaria de transporte núcleo-citoplasma para garantizar su propia replicación o evasión de la respuesta inmune ya sea mediante la interacción directa con las carioferinas o con el propio NPC como se esquematiza en la figura 10 (Yarbrough *et al.*, 2014; Alberts *et al.*, 2015). En numerosos estudios se reportan mecanismos diversos ejercidos por virus que interactúan con la NE o con los componentes implicados en su funcionamiento normal. Por ejemplo, entre los virus que causan afectaciones respiratorias (Frieman *et al.*, 2007) la proteína ORF6 del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) interacciona con KPNA2, reteniendo este complejo en la membrana del RE y del aparato de Golgi e, impidiendo la translocación nuclear de STAT1 (Yarbrough *et al.*, 2014).

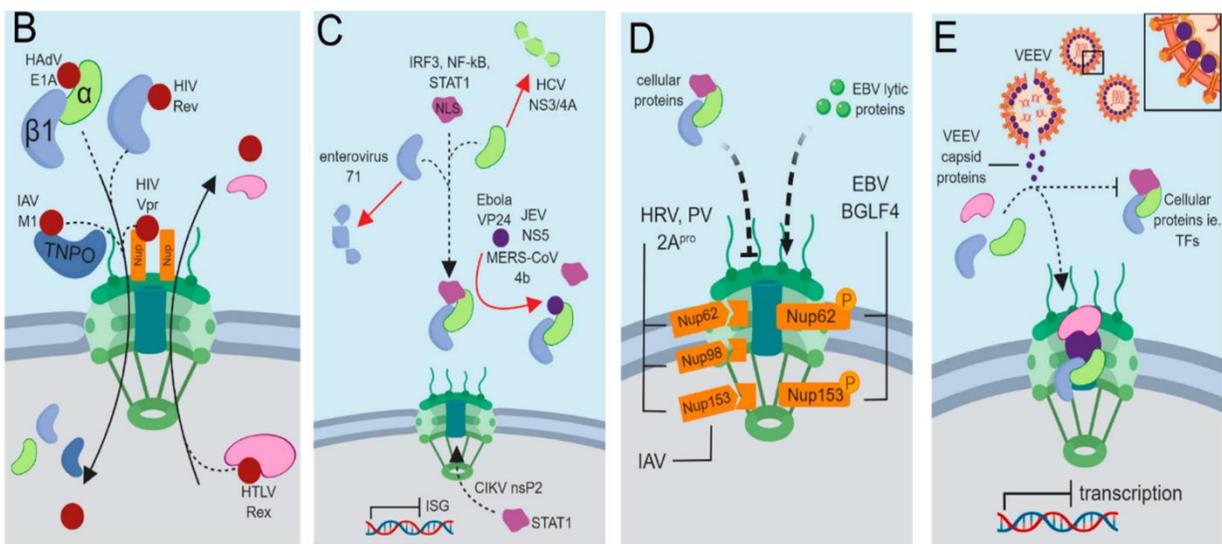


Figura 10. Apropiación viral de la maquinaria de transporte núcleo-citoplasma. B) Uso de receptores. C) Degradación de carioferinas. D) Bloqueo de respuesta inmune. E) Bloqueo del NPC (modificado de Tessier et al., 2019).

Los virus pueden utilizar la vía clásica de importe α/β , Imp- β directamente, el NPC, a las transportinas a través de una señal de localización nuclear prolina-tirosina (PY-NLS) para la importación nuclear (figura 10 B), así como CRM1 para la exportación nuclear de proteínas virales; tal como lo realiza la proteína BGLF4 del virus Epstein-Barr (EBV); la integrasa y la proteína Vpr del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) (Chang et al., 2012; Fouchier et al., 1998; Jenkins et al., 1998) y la proteína NP y PB2 del virus de influenza (IAV) (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2007; Hudjetz & Gabriel, 2012; Pumroy *et al.*, 2015).

Ensayos basados en la inmunodetección de proteínas hnRNP que utilizan las vías de las importinas α y β demostraron que estas proteínas cargo se relocalizan hacia el citoplasma durante la infección por poliovirus (Mili *et al.*, 2001). Para los rinovirus también se ha evidenciado que la proteasa 3Cpro degrada Nup153 y Nup162, lo que conduce a una alteración de la vía de las importinas α/β (Twyffels *et al.*, 2014). Estos estudios evidencian la actividad de las proteasas 2Apro y 3Cpr de los picornavirus sobre la actividad de transporte núcleo-citoplasma, específicamente sobre el NPC (figura 10 D y 11) y consecuentemente inhibiendo al complejo importina α/β , a TNPO1, TNPO3 y a la proteína de exporte CRM1 (Watters *et al.*, 2017).

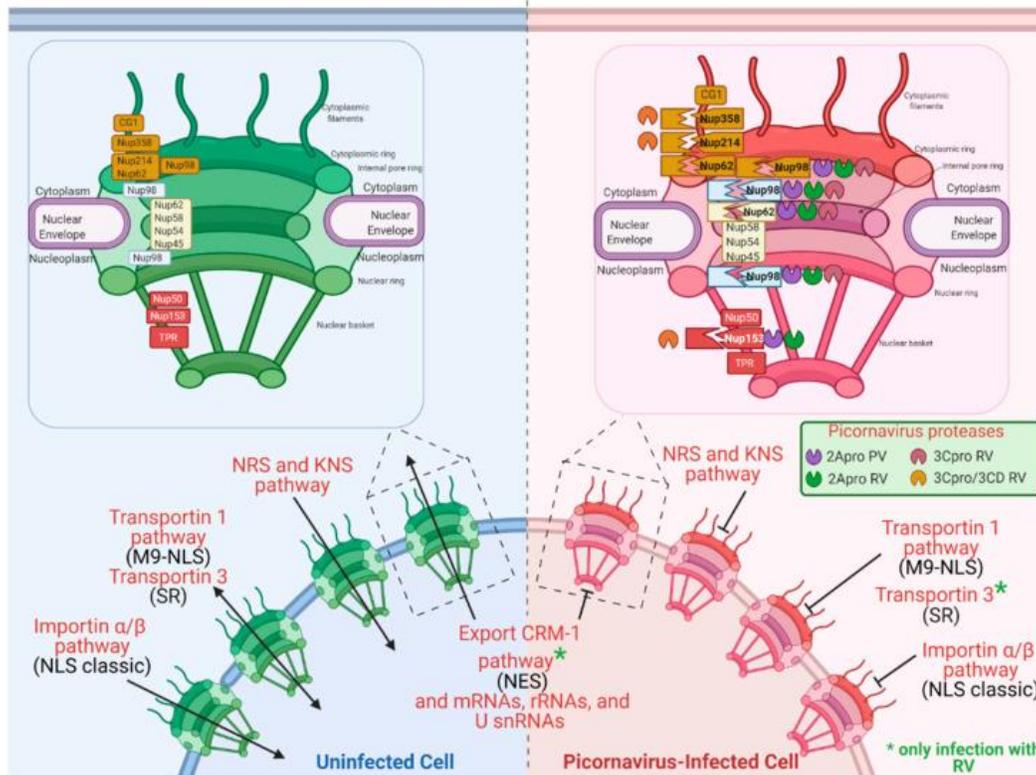


Figura 11. Componentes del NPC y su alteración causada por picornavirus (De Jesús-González et al., 2021).

Los virus DENV y ZIKV también ejercen afectaciones sobre el NPC a través de la proteasa NS3, escindiendo algunas nucleoporinas como las Nup153, Nup98 y Nup62 en caso de DENV; y TPR, Nup153 y Nup98 para ZIKV (De Jesús-González et al., 2021).

Específicamente, para diversos flavivirus, también se han reportado resultados contundentes acerca de su alteración del transporte nuclear. La proteína NS5 del virus de la encefalitis japonesa (JEV) interactúa con KPNA2, KPNA3 y KPNA4 bloqueando la interacción de estas proteínas con sus cargos IRF3 y p65; asimismo, una sobreexpresión de KPNA3 y KPNA4 además de restaurar la translocación de factores de transcripción también incrementa la replicación viral (Ye et al., 2017). La proteína C del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) se asocia con la exportina CRM1 y con el dímero de importina α/β formando un complejo tetramérico que se acumula en el canal central del NPC y por consiguiente bloquea la importación nuclear (figura 10 E) de otras proteínas celulares como KPNA2, KPNA3

y KPNA4, suprimiendo la interacción con IRF3 y p65. Todos los datos anteriores demuestran que el NPC y las proteínas de transporte son susceptibles de ser bloqueadas por diversos virus (Atasheva *et al.*, 2010).

Estos hallazgos se asemejan a los obtenidos por Bhuvanankantham *et al.*, 2009 donde identificaron un mecanismo a través del cual la proteína C del WNV se asocia con el complejo de importina α/β en células Vero. Otro miembro de la familia *Flaviviridae* es el virus de la hepatitis C (HCV) cuya proteasa NS3/4A escinde directamente a la KPNB1 (Gagné *et al.*, 2017), impidiendo la translocación de los factores de transcripción IRF3 y NF κ B (siendo dicha carioferina su principal importador) y así suprimiendo la respuesta inmune mediada por IFN (figura 10 C) (Gagné *et al.*, 2017; Morikawa *et al.*, 2011).

Alteración de transporte núcleo-citoplasma mediado por ZIKV

Existen numerosos estudios y resultados referentes a la patogénesis con flavivirus y la participación de sus proteínas en diferentes procesos de alteración del transporte núcleo-citoplasma en células infectadas. Como antecedentes relevantes del presente trabajo se encuentran los datos de Yang *et al.*, 2018 que reportan una sobreexpresión de KPNA6 (o Imp- α 7) en células Vero infectadas con ZIKV a una MOI de 10, a 24 horas post infección (hpi), en comparación con las células sin infectar. Interesantemente, la disminución de KPNA6 por silenciamiento génico (*knock down*) disminuye la replicación de ZIKV, y el aumento de la vida media proteosomal indicaron que esta proteína es necesaria para el ciclo replicativo del virus (Yang *et al.*, 2018).

En el estudio de He y cols (He *et al.*, 2020) se analizaron los efectos de la infección con ZIKV sobre otras isoformas de KPNA, hallando que la infección por ZIKV en células Vero a una MOI de 10 reduce hasta en un 80% los niveles de KPNA2 a 24 hpi, con mínimas afectaciones sobre KPNA1, esto analizado a través de Western Blot. Por otro lado, mediante (RT-qPCR) demostraron que ZIKV tiene efectos mínimos sobre los niveles de mRNA de KPNA2, dando pie a la hipótesis de que los niveles reducidos de la proteína no se deben a un efecto transcripcional sino posiblemente a la degradación a nivel de proteína. Paralelamente, un experimento

semejante utilizando células SK-N-SH de neuroblastoma humano y células HeLa de carcinoma cervical arrojaron resultados similares a 48 hpi (He et al., 2020).

Además de estudiar los efectos de la infección en la integridad de las KPNA1 y KPNA2, más profundamente He y cols (He et al., 2020) demostraron que la vía de autofagia mediada por chaperonas es la responsable de la degradación de KPNA2 por la interacción de ésta con el receptor de membrana lisosomal LAMP2A inducida por ZIKV. Además, determinar que la proteína viral NS2A era la responsable de promover la degradación de KPNA2, mediante ensayos de transfección (He et al., 2020).

Finalmente, ensayos realizados sobre la proteína NS5 de ZIKV (Zhao et al., 2021) describieron que esta proteína se localiza principalmente en el núcleo de células Vero, HeLa y C6/36 y que los residuos de lisina-arginina-prolina-arginina presentes en la proteína son esenciales para su interacción con KPNA2 puesto que la introducción de mutaciones en estos aminoácidos lleva a una localización principalmente citoplasmática de la proteína viral (Zhao et al., 2021). Estos resultados demuestran que las proteínas de ZIKV y los receptores de transporte nuclear, como son las carioferinas, interaccionan activamente durante la infección, favoreciendo la replicación del virus al evitar que factores de transcripción que activan la respuesta antiviral sean importados al núcleo.

JUSTIFICACIÓN

Desde los primeros brotes del virus Zika (ZIKV) en América en el 2016, ha sido un desafío para los sistemas de salud de países en vías de desarrollo poder controlar los contagios, aumentando la preocupación por las afectaciones ocasionadas por este virus principalmente de tipo neurológico en adultos y alarmantemente en recién nacidos, teniendo consecuencias en su desarrollo, lo que llevó a diversos grupos de investigación a estudiar la patología de la enfermedad. Esto incluye el conocer las manifestaciones graves de la enfermedad, las proteínas virales implicadas en afectaciones del hospedero, las vías de señalización alteradas o activadas en la respuesta inmune y/o la degradación o modificación de proteínas celulares que pudieran participar en el ciclo replicativo viral.

Los estudios realizados con ZIKV evidencian la degradación de algunas de las proteínas del NPC durante la infección viral, sugiriendo que esto podría llevar a cambios en la distribución de mRNA y proteínas celulares importantes para la activación de la respuesta inmune. Durante mucho tiempo se pensó que el ciclo de replicación de este virus era exclusivamente citoplasmático; sin embargo, se ha reportado que algunas proteínas virales son transportadas al núcleo durante el ciclo replicativo utilizando la maquinaria celular de transporte nuclear. Además, se ha reportado la sobreexpresión de algunas proteínas de transporte nuclear como la KPNA6, sugiriendo su participación en el CR del virus. Así mismo, se demostró que durante la infección con ZIKV se afectan los niveles de expresión de otras proteínas de transporte como la KPNA2 degradándose por la vía de autofagia. No obstante, se desconoce si otras proteínas de la familia de las carioferinas α y β son afectadas durante la infección por ZIKV; por lo que, estudiar la integridad de las proteínas de transporte nuclear de la familia de las carioferinas durante la infección por ZIKV nos permitirá comprender con más detalle la biología de la infección.

HIPÓTESIS

La infección por ZIKV promueve cambios en la integridad y/o en la localización subcelular de las carioferinas α y β en células Huh-7 y U-87.

OBJETIVOS

Objetivo general

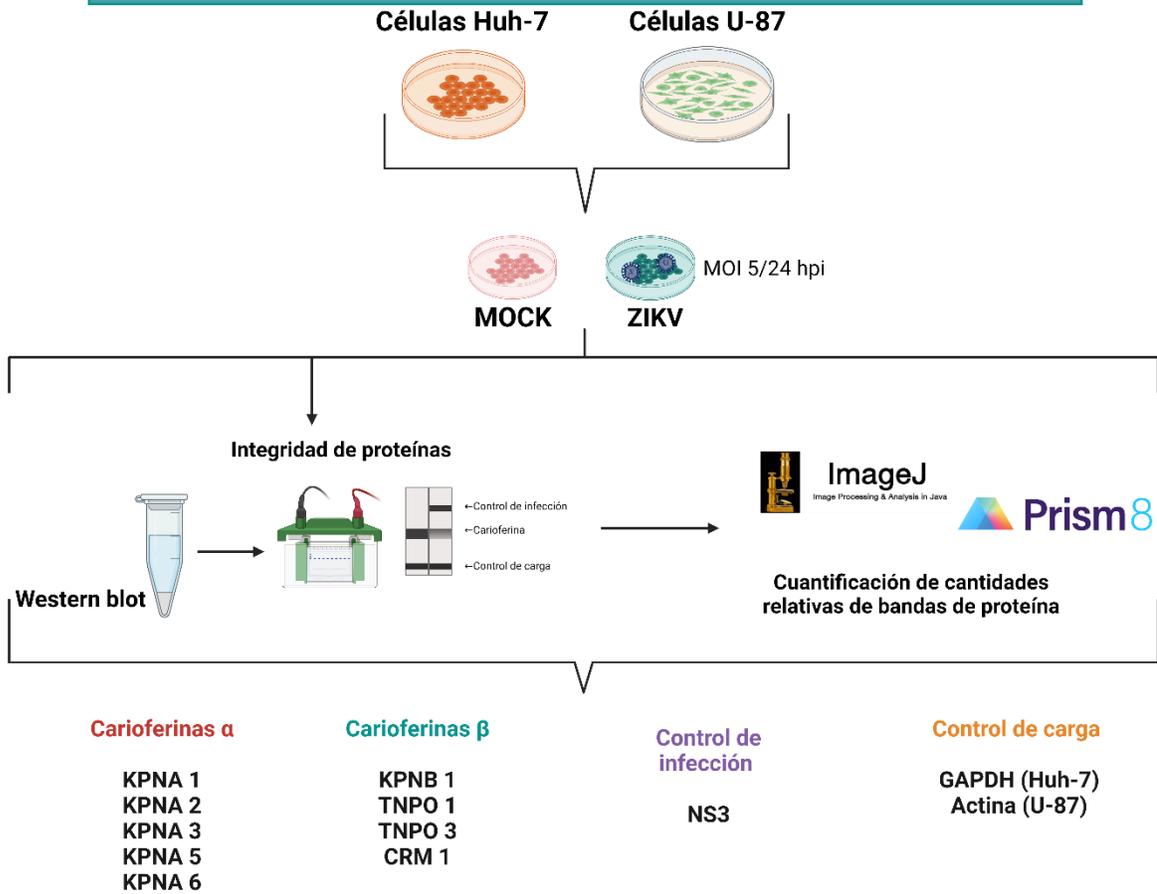
Estudiar la integridad y localización subcelular de las proteínas de transporte de las familias de las carioferinas durante la infección por el virus Zika.

Objetivos específicos

1. Evaluar la integridad de las carioferinas α y β durante la infección por ZIKV en células Huh-7 y U-87.
2. Determinar si existen cambios en la localización subcelular de las carioferinas α y β durante la infección por ZIKV en células U-87.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

OBJETIVO 1: Estudiar la integridad de las carioferinas α y β durante infección por ZIKV en células Huh-7 y U-87

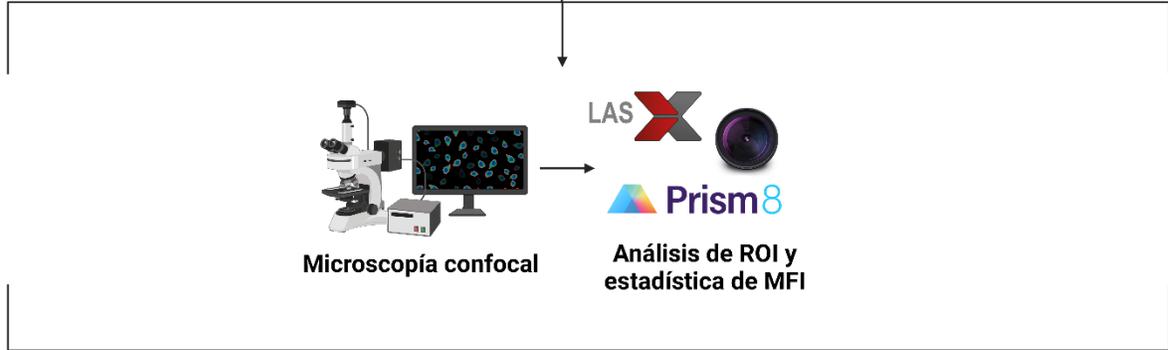


OBJETIVO 2: Estudiar la localización subcelular de las carioferinas α y β durante infección por ZIKV en células U-87

Células U-87



MOI 5/24 hpi



Carioferinas α

KPNA 1
KPNA 2
KPNA 3
KPNA 5
KPNA 6

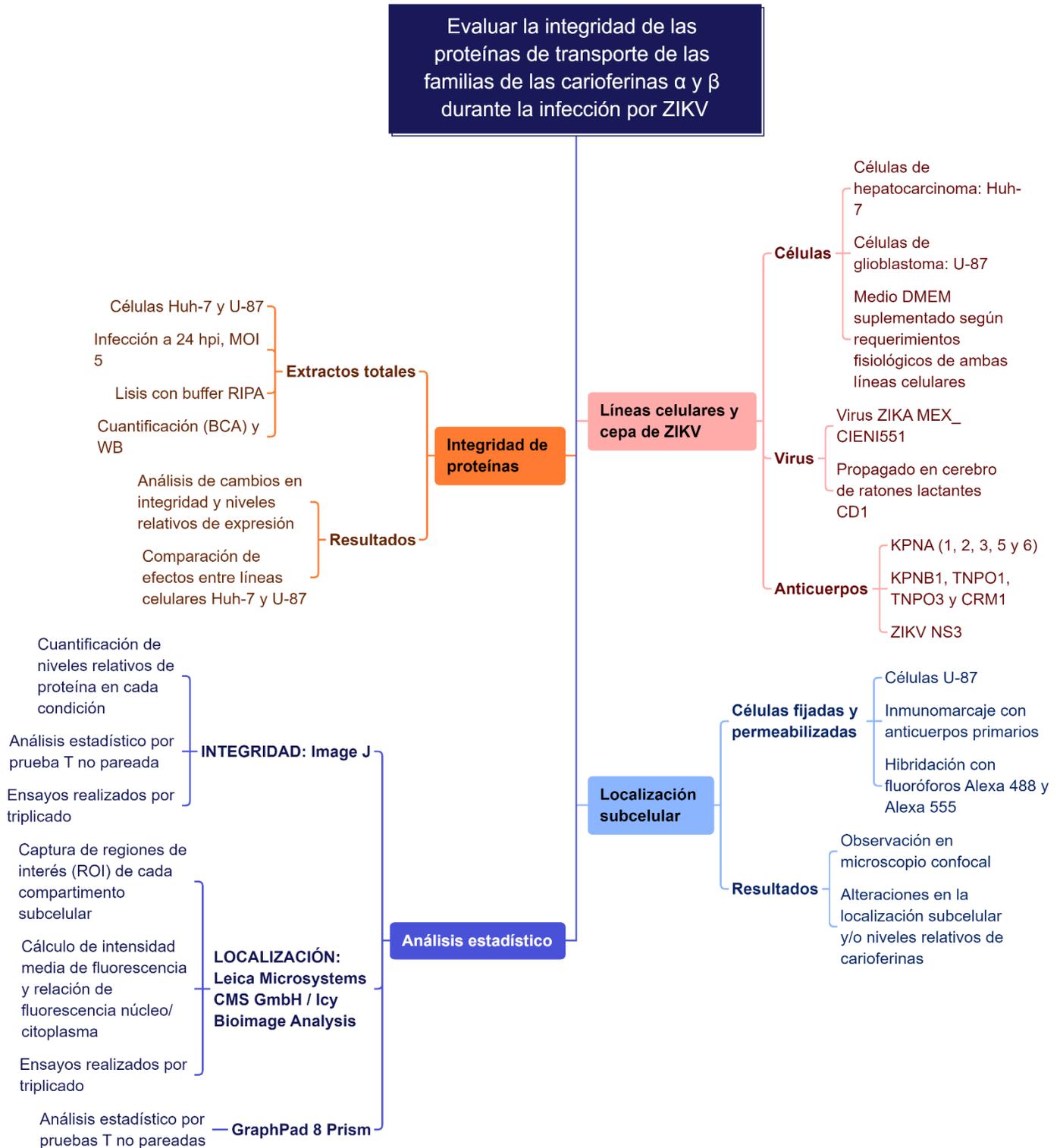
Carioferinas β

KPNB 1
TNPO 1
TNPO 3
CRM 1

Control de infección

NS3

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En el presente proyecto se evaluó la integridad de las carioferinas α y β en dos líneas celulares, una correspondiente a carcinoma celular derivada de hepatocitos (Huh-7) y otra derivada de glioblastoma maligno (U-87). Se emplearon ambas líneas celulares ya que existe evidencia que el hígado y el SNC constituyen órganos blanco de la infección por ZIKV en modelos animales y pacientes humanos con los subsecuentes daños a nivel funcional y estructural (White *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018). Dichos linajes celulares fueron cultivados desde los días 5 al 20 aproximadamente.

La línea Huh-7 se cultivó a 37°C con 5% de CO₂ en placas de 100 mm de diámetro con medio Advanced DMEM GIBCO™ 1X suplementado al 7% con suero fetal bovino, glutamina 2X 200 milimolar (mM), 1X de solución de penicilina-estreptomicina y 1X de fungizona GIBCO™ durante aproximadamente 2 a 3 días para alcanzar la confluencia deseada. La línea celular U-87 se subcultivó en placas de 100 mm de diámetro con medio Advanced DMEM GIBCO™ 1X suplementado al 12% con suero fetal bovino, glutamina 2X 200 mM y 1X de solución de penicilina-estreptomicina durante aproximadamente 3 a 4 días para alcanzar la confluencia deseada. La cepa del virus ZIKA MEX_CIENI551 (generosamente donada por el Dr. Jesús Torres, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional) fue propagada en cerebros de ratones lactantes CD1; y sometida a ensayos de plaqueo sobre células BHK en una matriz de carboximetilcelulosa al 0.8% (concentración final) para la obtención de títulos virales.

Preparación y cuantificación de extractos de proteínas totales

Se crecieron células Huh-7 y U-87 en formatos de placas de 6 pozos al 70-80% de confluencia, sin infectar para ensayos control (mock) y células infectadas a una MOI de 5 con ZIKV, para la obtención de extractos totales a las 24 hpi.

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron a partir de células sembradas al 80-90% de confluencia en placas de cultivo celular Corning® de 6 pozos, tratadas durante dos horas (h) con medio Hanks 1X (Hank's Balanced Salt Solution) suplementado con cloruro de calcio y cloruro de magnesio en conjunto con la cantidad de virus previamente titulada para los ensayos infectados o control respectivamente; siendo retirado el medio Hank's y adicionando medio completo durante 24 h.

Transcurrido este tiempo post infección, las monocapas celulares fueron lavadas con PBS 1X estéril y posteriormente lisadas adicionando buffer de radio-inmunoprecipitación RIPA (25mM Tris HCL pH 7.6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón x100, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) con inhibidor de proteasas Roche (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Cat. No. 11 697 498 001) en una proporción 7X. Las monocapas se recolectaron con ayuda de scrappers en tubos de polipropileno de 600 µL.

Las células recolectadas fueron sometidas a 4°C durante 5 minutos (min) y posteriormente, centrifugadas a 10,000 gravedades (g) durante 10 min a 4°C en una microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 21R, refrigerada (Thermo Scientific™ cat. 75002447). Dichos extractos se almacenaron a -20°C en un congelador vertical de uso biomédico (SANYO Biomedical Freezer MDF-U537) hasta su uso.

La cuantificación de proteínas de los extractos totales se realizó por duplicado con el método colorimétrico del ácido bicinconínico Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific #23225). Se construyó una curva estándar de albúmina en una placa Corning® de 96 pozos de fondo plano, incubada a 37°C durante 30 min y analizada en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan SkyHigh a una absorbancia de 550 nm.

Western blot

40 µg de proteína de extractos mock e infectados de ambos linajes celulares se sometieron a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12%, (Bio-Rad

modelo Mini PROTEAN Tetra Cell) y peines de 1.5 mm de grosor en buffer de corrida 1X (Tris base 1.51 g, glicina 7.2 g, dodecil sulfato de sodio 0.5 g). La electroforesis se realizó inicialmente durante 20 minutos a 80 voltios y, posteriormente, a 110 voltios durante 2 h para separar las proteínas. El progreso en el gel se siguió observando el frente de corrida coloreado por el colorante presente en el tampón de carga y la posición de los marcadores de peso PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa añadidos por cada experimento.

Al finalizar la electroforesis, se realizó la transferencia en casetes donde el sándwich de gel y membrana de nitrocelulosa de 0.2 se mantienen unidos entre dos almohadillas de esponja y hojas de papel de filtro. El sándwich se colocó en el tanque con buffer de transferencia para permitir el flujo de corriente durante 70 min a 100 volts en el equipo Bio-Rad modelo Mini Trans-Blot Cell.

Después de la transferencia las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar visualmente el patrón de bandas de las proteínas en cada carril para ser posteriormente lavadas con PBS 1X Tritón X100 al 0.01%. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Realizado esto, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (en las diluciones establecidas como se muestra en la tabla 1) en PBS 1X Tritón-X100 (como vehículo) correspondientes a KPNA 1, 2, 3, 5 y 6, KPNB1, TNPO1, TNPO3, CRM1; a NS3 como control de infección, y GAPDH como control de carga para las células Huh-7 y actina como control de carga para las células U-87. Para revelar las bandas de interés, después de la hibridación con anticuerpos primarios se realizó una segunda incubación con los anticuerpos secundarios Anti-Mouse IgG HRP Cell Signaling (para los anticuerpos generados en ratón) y Anti-Rabbit IgG HRP Cell Signaling (para los anticuerpos generados en conejo como la anti-NS3 viral) ambos diluidos 1:5000 en leche descremada al 5% durante 1 hora. A continuación, las membranas fueron lavadas con PBS 1X Tritón X100 al 0.01% e incubadas con el sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal™ West Femto (Cat. No. 34095) en un digitalizador de imágenes C-DiGit® Blot Scanner LI-COR Biosciences durante 6 a 12 minutos utilizando el software Image Studio para realizar las capturas. Después

de obtener las imágenes de cada proteína de interés con sus respectivas réplicas se sometieron a análisis densitométrico empleando el software ImageJ mediante la selección individual de cada banda correspondiente al experimento por analizar, cotejando cada valor con la constante del control de carga y comparando estadísticamente la información obtenida con una prueba T no pareada en GraphPad Prism 8.

Los experimentos se realizaron por triplicado, lo que permitió comparar estadísticamente los resultados de la integridad relativa de las carioferinas en células Huh-7 y U-87 infectadas con ZIKV. Los anticuerpos empleados en este trabajo, sus respectivas diluciones, así como el número de catálogo y proveedor se muestran en la tabla 1 adjunta.

Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos usados durante el desarrollo experimental

ANTICUERPO	DILUCIÓN		NÚMERO DE CATÁLOGO
	WB	IFIs	
Carioferinas			
KPNA1	1:1000	1:50	karyopherin α 1 (187.1): sc-101292
KPNA2	1:1000	1:50	karyopherin α 2 (8G5): sc-136204
KPNA3	1:1000	1:50	karyopherin α 3 (B-1): sc-514101
KPNA5	1:1000	1:50	karyopherin α 5 (1D2): sc-517105
KPNA6	1:1000	1:50	karyopherin α 6 (E-11): sc-390055
KPNB1	1:5000	1:500	Anti-KPNB1 antibody [3E9]

TNPO1	1:1000	1:100	karyopherin β 2 (F-6): sc-166127
TNPO3	1:1000	1:50	Importin-12 (C-2): sc-376346
CRM1	1:1000	1:100	CRM1 (G-9): sc-373865
Control de infección			
Anti-NS3	1:5000	1:300	Zika virus NS3 protein antibody: GTX133309
Controles de carga			
GAPDH (Huh-7)	1:2000	/	GAPDH (0411): sc-47724
ACTINA (U-87)	1:2000	/	β -Actin (ACTBD11B7): sc-81178
Anticuerpos secundarios			
Anti Mouse IgG HRP Cell Signaling	1:5000	/	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076
Anti Rabbit IgG HRP Cell Signaling	1:5000	/	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074
Alexa-Fluor 488 donkey anti mouse	/	1:750	Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150105)
Alexa-Fluor 555 goat anti rabbit	/	1:300	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555) (ab150078)

Inmunofluorescencia indirecta para localización subcelular

Para determinar la localización subcelular de las KPNA 1, 2, 3, 5 y 6; y KPNB1, TNPO1, TNPO3 y CRM1 ante la infección por ZIKV, las células Huh-7 y U-87 se sembraron al 40-50% de confluencia sobre laminillas estériles colocadas en placas Corning® de 24 pozos. Las células mock e infectadas con ZIKV a una MOI de 5

durante dos horas, se incubaron con medio completo según los requerimientos del linaje celular, durante 24 horas.

Transcurridas las 24 h, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a 4°C. A continuación, las células fueron tratadas con solución permeabilizadora (saponina al 0.2%, SFB al 1%, PBS 1X) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación suave para facilitar que los anticuerpos penetren en la célula por gradiente de concentración.

La hibridación con anticuerpos primarios correspondientes a las carioferinas α y β ; y con el anticuerpo anti-NS3 como marcador de la infección viral se realizó en una cámara húmeda perfectamente sellada y protegida de la luz a 4°C durante toda una noche. Más adelante las laminillas fueron lavadas con solución permeabilizadora e hibridadas durante 2 horas a 37°C (igualmente en una cámara húmeda) con los anticuerpos secundarios Alexa-Fluor 488 donkey anti-mouse (1:750) y Alexa-Fluor 555 goat anti-rabbit (1:300) para la detección de la marca celular y viral en los ensayos. A partir de este punto, la placa de 24 pocillos empleada para los lavados se cubrió con aluminio para evitar la degradación de los fluoróforos previamente adicionados. Para finalizar el montaje de las preparaciones, las laminillas fueron teñidas con Hoechst (1:1000) durante 10 min en agitación suave para favorecer la tinción específica de núcleos y lavadas por última vez antes de colocarlas en portaobjetos limpios con 3 μ L del medio de montaje VectaShield®. Las laminillas se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 MP y las imágenes con los canales alineados y corregidos se exportaron desde el software LAS X (Leica Microsystems CMS GmbH) seleccionando regiones de interés (ROI) de cada compartimento subcelular en el programa Icy (Bioimage Analysis) de 30 eventos de experimentos independientes (30 células mock y 30 células infectadas para cada carioferina) y analizando estadísticamente la información obtenida por ANOVA de una vía y con pruebas T no pareadas en GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

La infección por ZIKV a 24 hpi afecta la integridad de carioferinas alfa en células Huh-7 y U-87

Con el fin de estudiar la integridad y los niveles de expresión de las nueve carioferinas evaluadas durante la infección por el ZIKV por 24 hpi se realizaron ensayos de Western blot de cada carioferina. Los resultados demostraron que la infección de células Huh-7 y U-87 por ZIKV redujo de manera significativa los niveles relativos de **KPNA1** en aproximadamente un 50% en U-87 y en un 20% aproximadamente en Huh-7 en relación con los niveles de expresión de las células control (figura 12A). Los niveles de expresión obtenidos por análisis densitométrico se muestran en la figura 12B. La infección se demuestra con la expresión de NS3; actina y GAPDH se usaron como controles de carga.

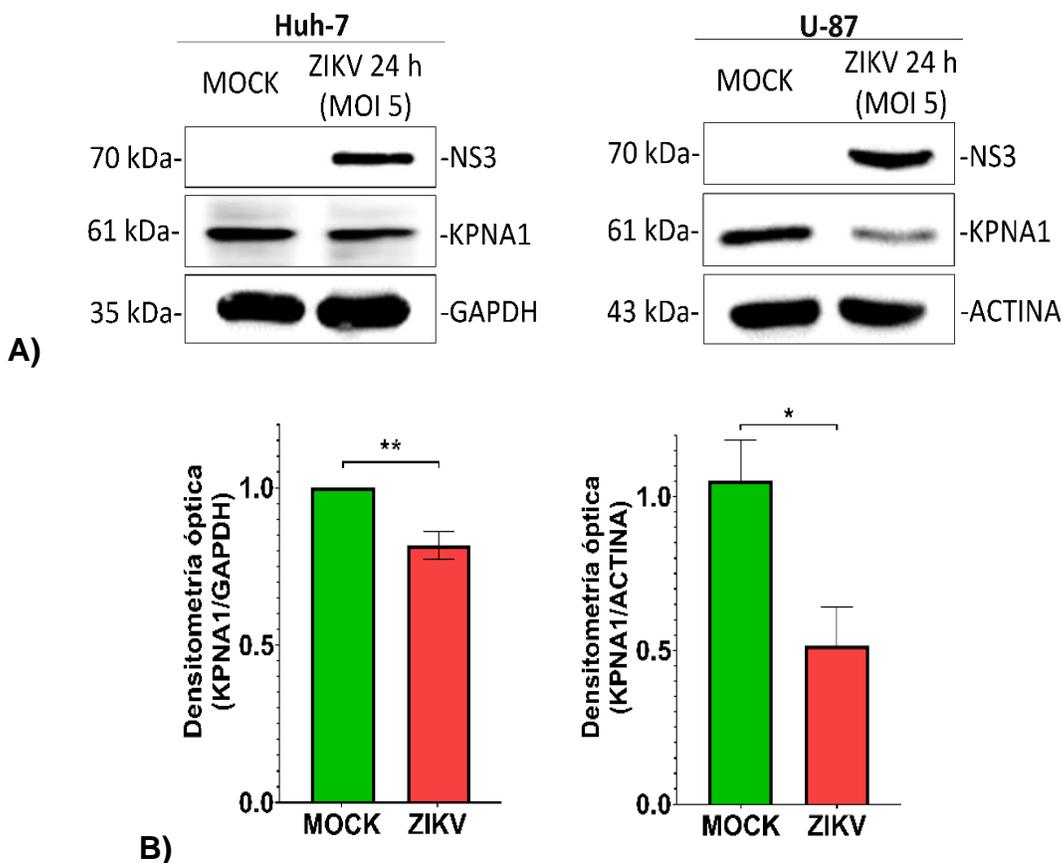


Figura 12. Niveles de expresión de la KPNA1 en células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV. A) Los extractos proteicos (40 µg) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-carioferina alfa 1 y anti-

NS3 como control de infección. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de KPNA1 disminuye significativamente tanto en células Huh-7 como en células U-87 a las 24 horas post infección con ZIKV a MOI de 5, sin embargo, la disminución es más evidente en células U-87 de glioblastoma. (ns: no significativo.: significativo a una $P < 0.05$. *: significativo a una $P < 0.01$. **: significativo a una $P < 0.001$).

Con respecto a la proteína **KPNA2** su inmunodetección también reveló una reducción significativa que osciló entre el 20 al 50% de los niveles de expresión confirmado por densitometría óptica (fig. 13B), a 24 hpi en extractos proteicos totales de ambos linajes celulares hepático y cerebral. La reducción más drástica se observó en las células de glioblastoma, demostrando que la infección por ZIKV disminuye la expresión de esta carioferina (fig. 13).

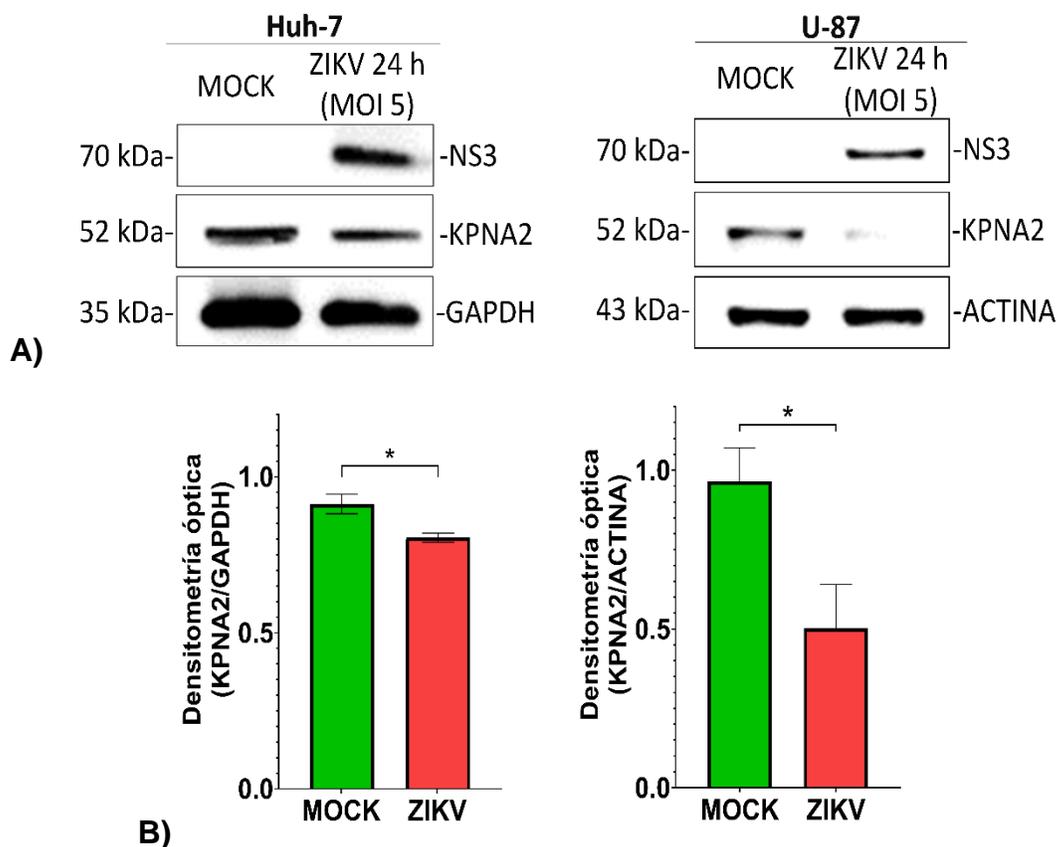


Figura 13. Niveles de expresión de la KPNA2 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. A) Los extractos proteicos (40 μ g) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-carioferina alfa 2 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de

carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de KPNA2 disminuye significativamente tanto en células Huh-7 como en células U-87 a las 24 hpi con ZIKV, sin embargo, la disminución es más evidente en células U-87. (**ns**: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Al evaluar la **KPNA3** se encontró que la infección por ZIKV indujo una disminución significativa del nivel de expresión relativa de dicha carioferina solamente en células U-87 en un 40% de la densitometría evaluada, pero no así en las células Huh-7, demostrando que el virus puede estar teniendo un efecto selectivo sobre carioferina alfa 3 solo en la microglía y no en las células hepáticas.

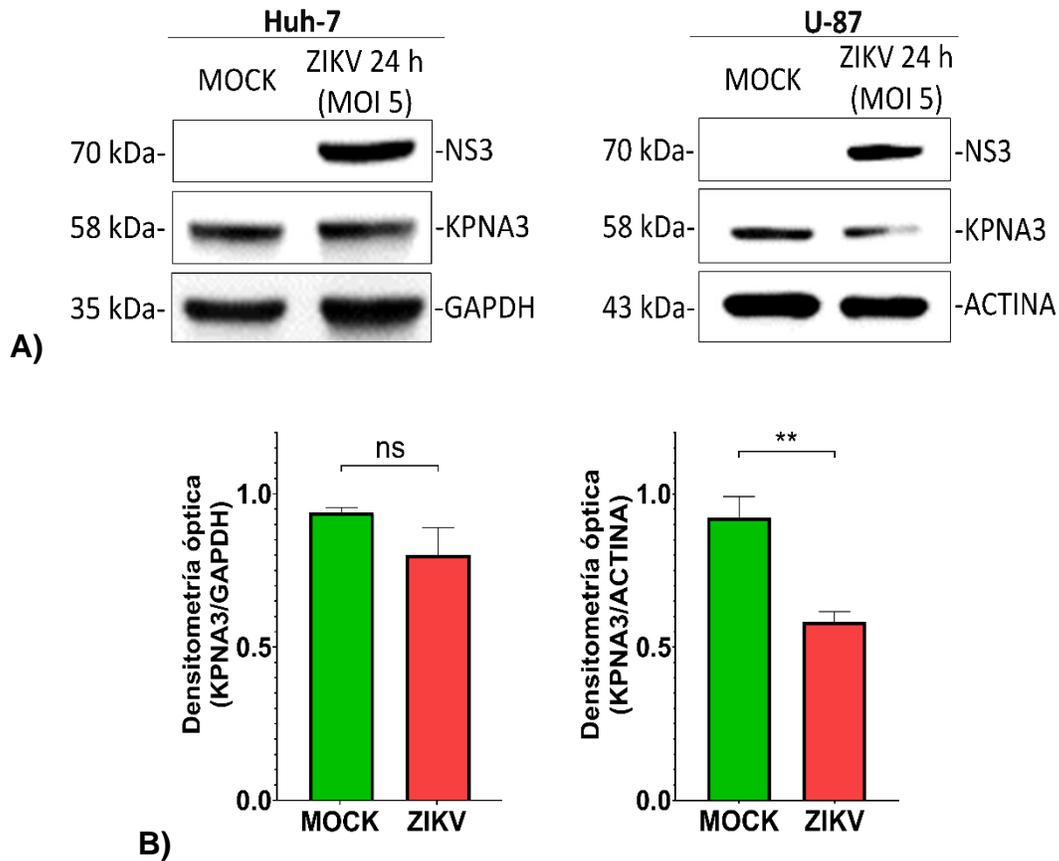


Figura 14. Niveles de expresión de la KPNA3 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. A) Los extractos proteicos (40 μ g) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-carioferina alfa 3 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de

carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de KPNA3 en células Huh-7, no se afecta significativamente tras la infección con ZIKV; por otra parte, la disminución de KPNA3 si es significativa en células U-87. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Lo observado en la KPNA3 es semejante para **KPNA5** donde también se observó una disminución estadísticamente significativa de su expresión aproximadamente en un 45% solo en las células de glioblastoma, pero no así en las células Huh-7.

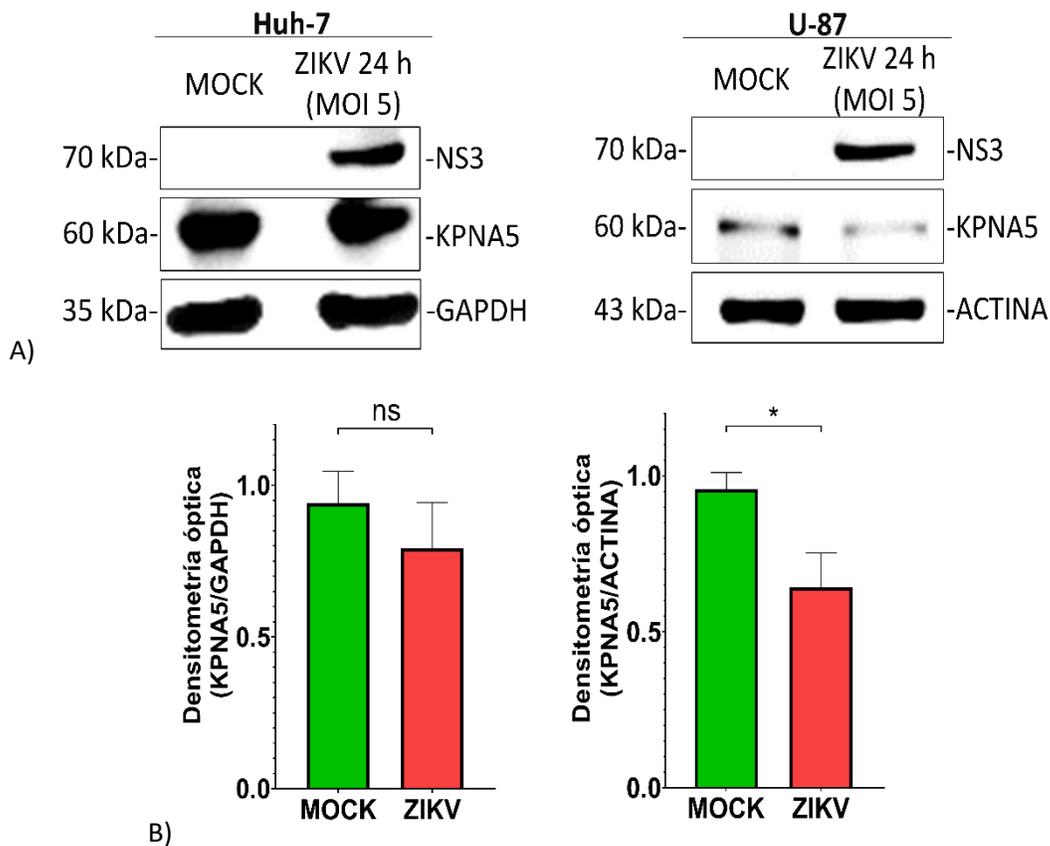


Figura 15. Niveles de expresión de la KPNA5 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 µg) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-KPNA5 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de

ambos ensayos. La infección por ZIKV no afecta significativamente la expresión de KPNA5 en células Huh-7, sin embargo, en células U-87, la disminución de KPNA5 si es significativa. (**ns**: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Todos estos resultados en su conjunto nos indican que la infección por ZIKV los niveles de las KPNA 1 y 2, se redujeron en ambas líneas celulares neuronales y hepáticas, mientras que otras como las isoformas de KPNA 3 y 5 solo se alteraron en las células hepáticas.

La infección por ZIKV no altera la integridad de la KPNA6 ni de la exportina CRM1 en células Huh-7 y U-87

Los resultados de densitometría de **KPNA6** demuestran que los niveles de expresión de esta proteína se mantienen sin cambio durante la infección de ambos linajes celulares con ZIKV, sugiriendo que la infección por ZIKV no modifica los niveles de expresión de esta carioferina. (figura 16).

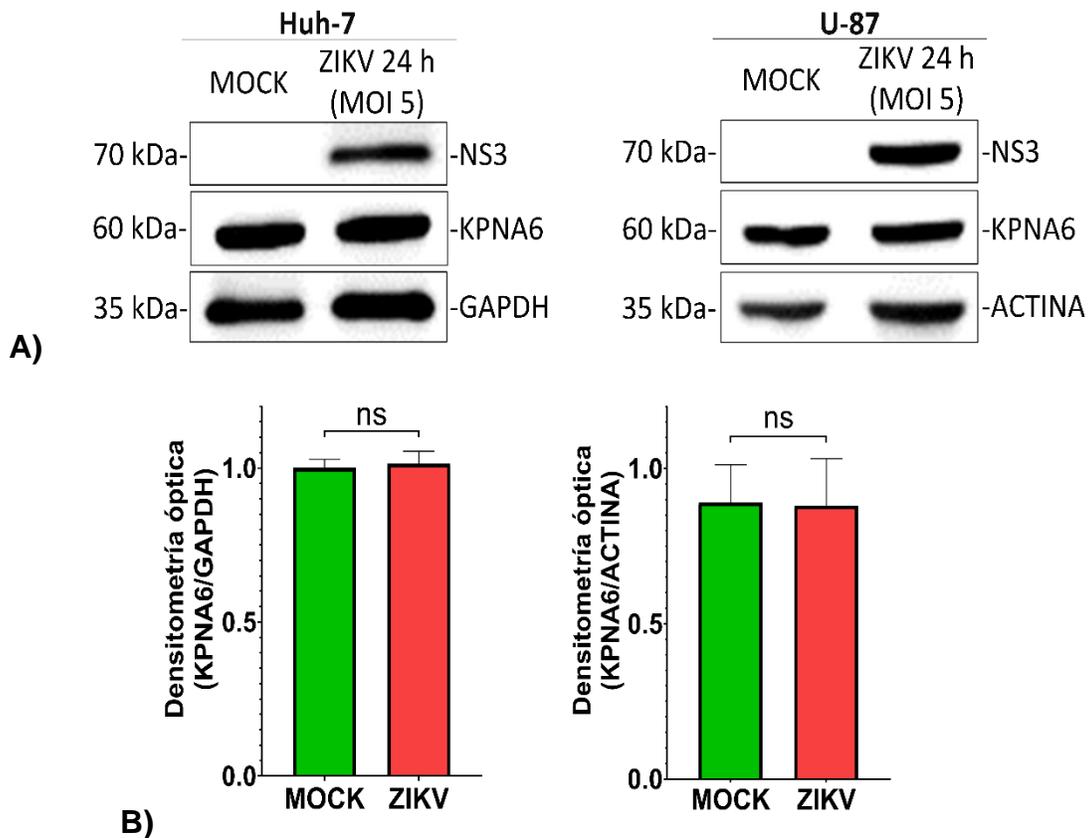


Figura 16. Niveles de expresión de la KPNA6 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 μ g) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-carioferina alfa 6 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de KPNA6 no se afecta significativamente en células Huh-7 y U-87 infectadas con ZIKV. (**ns**: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la exportina **CRM1** en ninguna de las líneas celulares infectadas analizadas, en comparación a las no infectadas (figura 17).

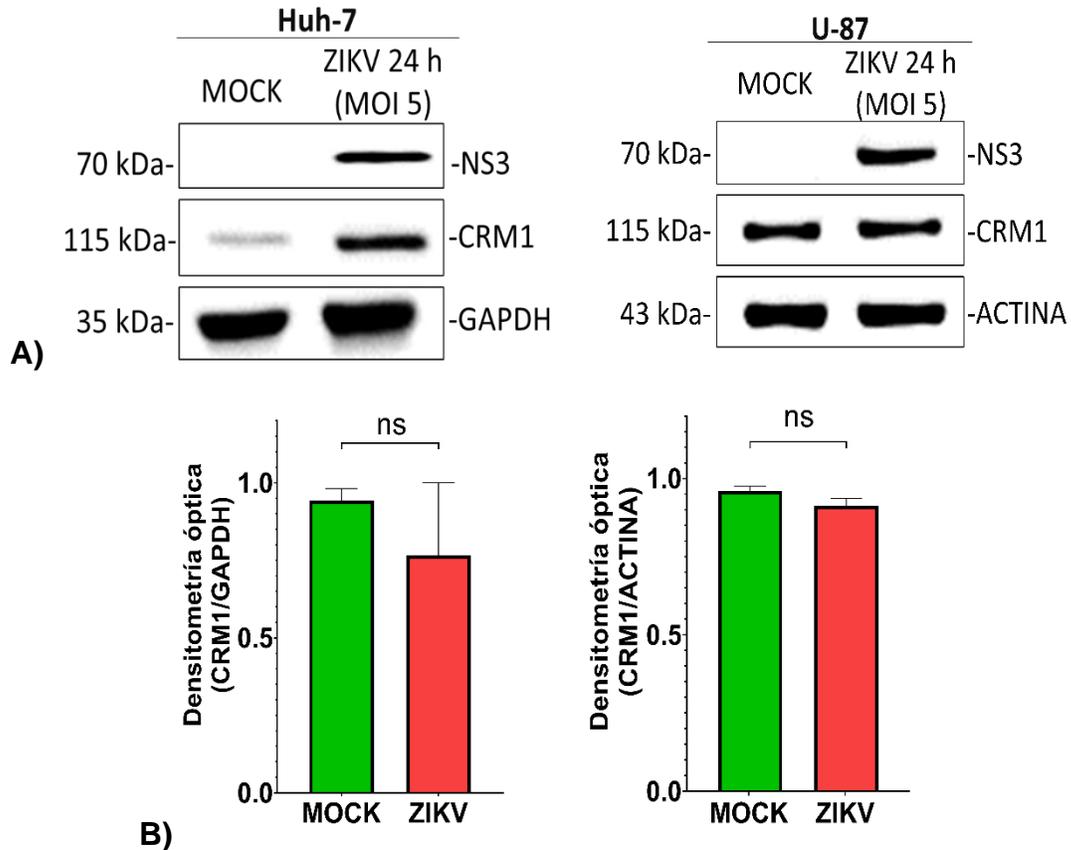


Figura 17. Niveles de expresión de CRM1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 µg) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-exportina 1 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de la exportina CRM1 en células Huh-7 y células U-87 no se afecta significativamente tras la infección con ZIKV. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Estos resultados indican que el cambio en los niveles de las carioferinas implicadas en el importe y el exporte nuclear, durante la infección por ZIKV son alteradas de manera selectiva y al menos bajo estas condiciones de trabajo KPNA6 ni CRM1 no se alteran a nivel expresión.

Efectos evidentes de la infección por ZIKV sobre carioferinas beta en células Huh-7.

Al analizar los niveles de la **carioferina beta 1** y **transportinas 1 y 3** durante la infección por ZIKV, encontramos una reducción estadísticamente significativa de KPNB1, TNPO1 y TNPO3 respectivamente, en la línea celular hepática, mientras que estos niveles no se modificaron en las células U-87 (figuras 18-20).

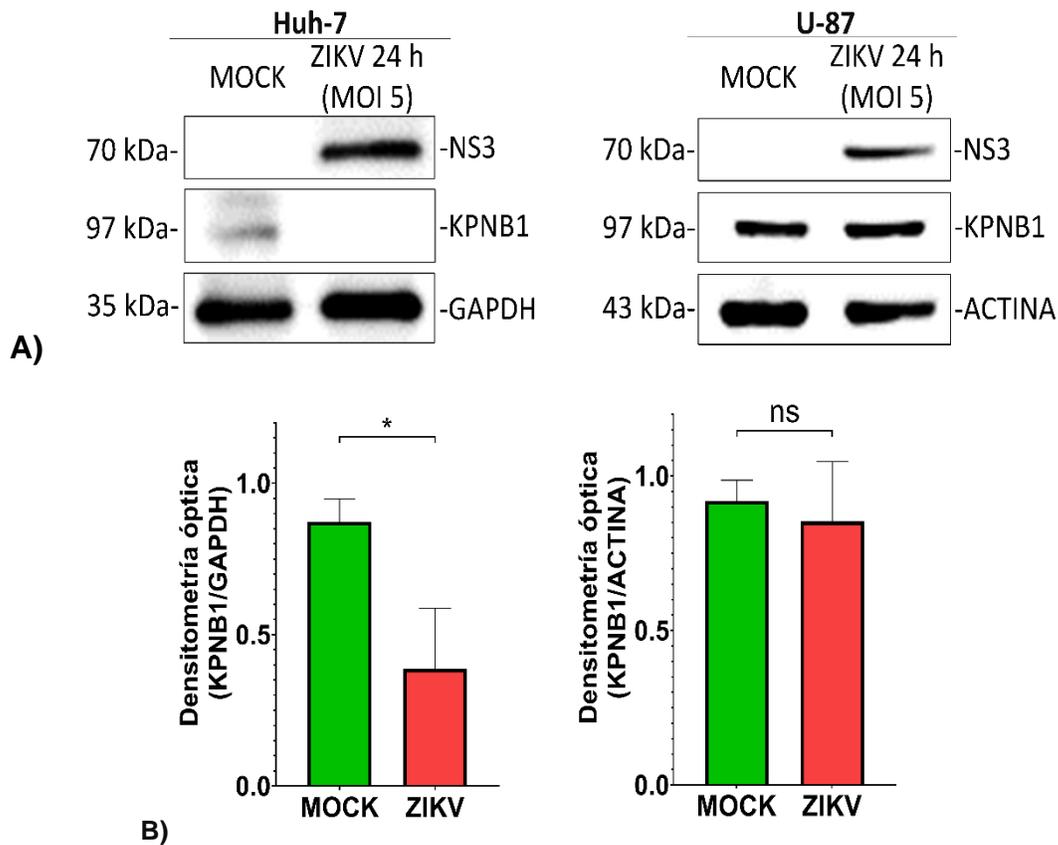


Figura 18. Niveles de expresión de la KPNB1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 µg) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-carioferina beta 1 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. En células Huh-7 infectadas con ZIKV a MOI de 5 durante 24 horas KPNB1 disminuye significativamente; mientras que en células U-87, KPNB1 no se ve afectada de manera significativa. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Un efecto similar a lo observado con la carioferina beta 1 se observó con la **TNPO1** (carioferina de tipo beta capaz de efectuar el transporte nucl incluso sin necesidad de un adaptador), ya que la infección por ZIKV indujo una reducción significativa de los niveles de expresión de la TNPO1 solo en células Huh-7.

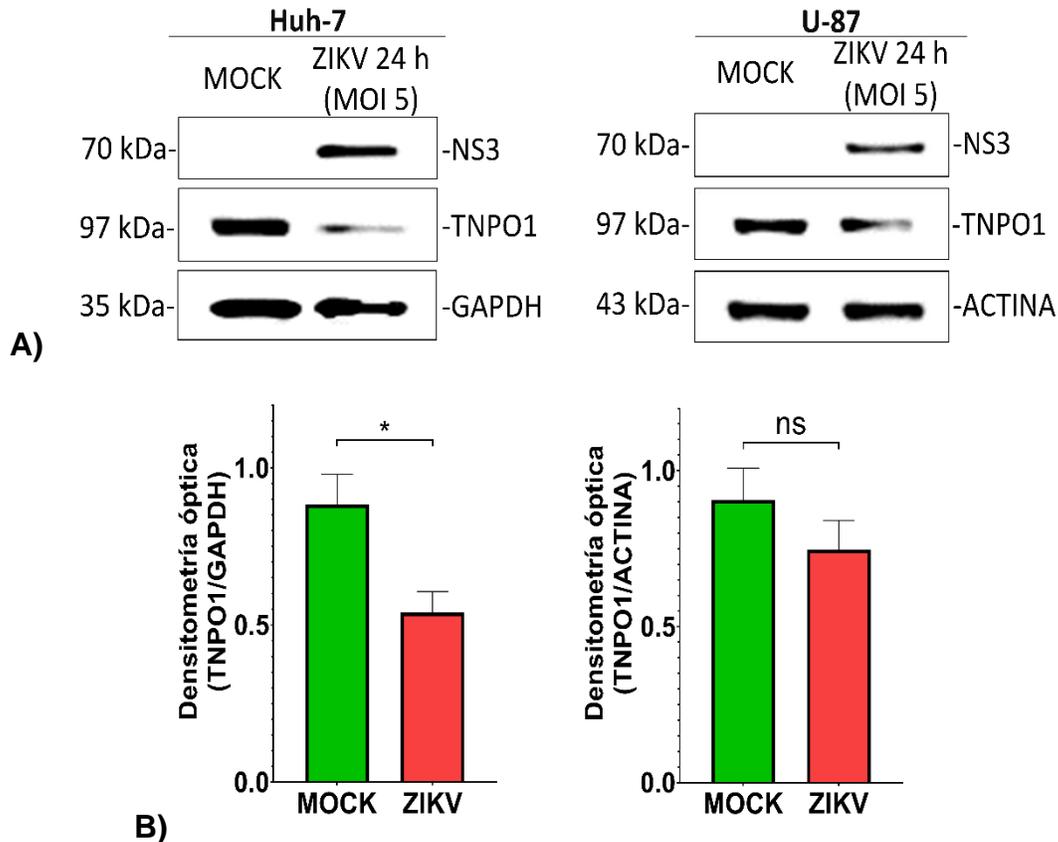


Figura 19. Niveles de expresión de la TPNO1 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 µg) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-transportina 1 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usó como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la de la densitometría óptica de ambos ensayos. Tras la infección con ZIKV durante 24 hpi, la TNPO1 disminuye su expresión de manera significativa en células Huh-7, pero no así en células U-87. (ns: no significativo. *: significativo a una P< 0.05. **: significativo a una P< 0.01. ***: significativo a una P<0.001).

Finalmente, la segunda transportina evaluada, la **TNPO3**, siguió el mismo patrón que KPNB1 y TNPO1, pues se observó que la infección por ZIKV indujo una reducción con significancia estadística $P < 0.001$ (99% de confianza) de los niveles de expresión en la línea celular Huh-7 y no así en células U-87.

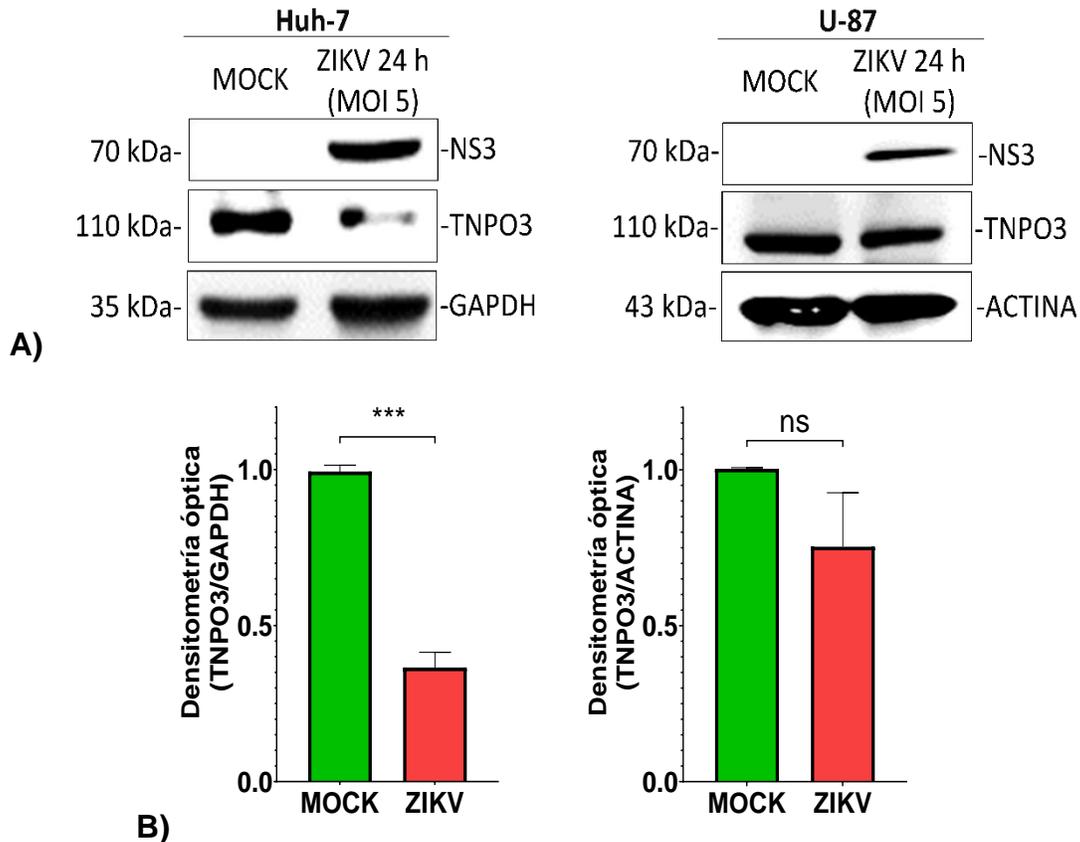


Figura 20. Niveles de expresión de TNPO3 en extractos de células Huh-7 y U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV. Los extractos proteicos (40 μ g) obtenidos de células Huh-7 y U-87 mock e infectadas con ZIKV por 24h se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-transportina 3 y anti-NS3. Los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina se usaron como control de carga para células Huh-7 y U-87, respectivamente. B) ANOVA de una vía de la densitometría óptica de ambos ensayos. La expresión de TNPO3 disminuye drásticamente en células Huh-7 a las 24 hpi con ZIKV; no obstante, la disminución de la transportina no es significativa en células U-87 de glioblastoma. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Como se observa en las figuras 12-20 y en sus gráficas respectivas de cada análisis, existe una disminución significativa de los niveles relativos de ciertas carioferinas en una y otra línea celular evaluada, teniendo así que las proteínas KPNA3 y KPNA5 que no se afectan en células Huh-7 si se muestran alteradas en células U-87; en tanto que las proteínas KPNB1, TNPO1 y TNPO3 inalteradas en células U-87, de manera interesante, se afectan en células Huh-7. Estos resultados evidencian que diversas isoformas de ambas familias de las carioferinas α y β son afectadas diferencialmente al menos en las células representativas de cerebro e hígado, desde las proteínas que interaccionan con secuencias NLS, hasta las proteínas que se unen directamente al andamiaje del NPC.

La infección por ZIKV conduce a cambios en la localización subcelular de algunas carioferinas en las células U-87

Los niveles de expresión de las distintas carioferinas son importantes para su función, así mismo es relevante que éstas tengan una localización subcelular correcta. Por esta razón, se analizó el efecto de la infección por ZIKV en la localización de las distintas carioferinas en las células U-87. El análisis por imagen se realizó sólo en esta línea considerando los antecedentes del tropismo cerebral de ZIKV y por la poca información disponible acerca de las alteraciones compartimentales de proteínas transportadoras durante este contexto de infección.

Al evaluar los niveles de expresión por western blot de la **KPNA1** encontramos que la infección por ZIKV de células U-87 inducía una reducción de los niveles de expresión. Esta reducción también fue observada en los ensayos de microscopía confocal analizando la localización subcelular de la KPNA 1 durante la infección con el ZIKV; encontramos que mientras que esta proteína tiene una localización principalmente citoplásmica en células no infectadas, en la infección con ZIKV se observa una reducción en su localización citoplásmica y aumento en su localización nuclear (figura 21A y 21B), al calcular el cociente de MFI (fig. 21 B). Asimismo, la intensidad de fluorescencia correspondiente a la marca verde es menor en las células infectadas, lo cual concuerda con los resultados presentados en la sección anterior. Esto fue confirmado a través de la relación de fluorescencia nuclear/citoplásmica (Fn/C) calculada a través del cociente de la intensidad media de fluorescencia de compartimentos nuclear y citoplásmico de cada evento misma que aumenta durante la infección por ZIKV (fig. 21 C).

U-87

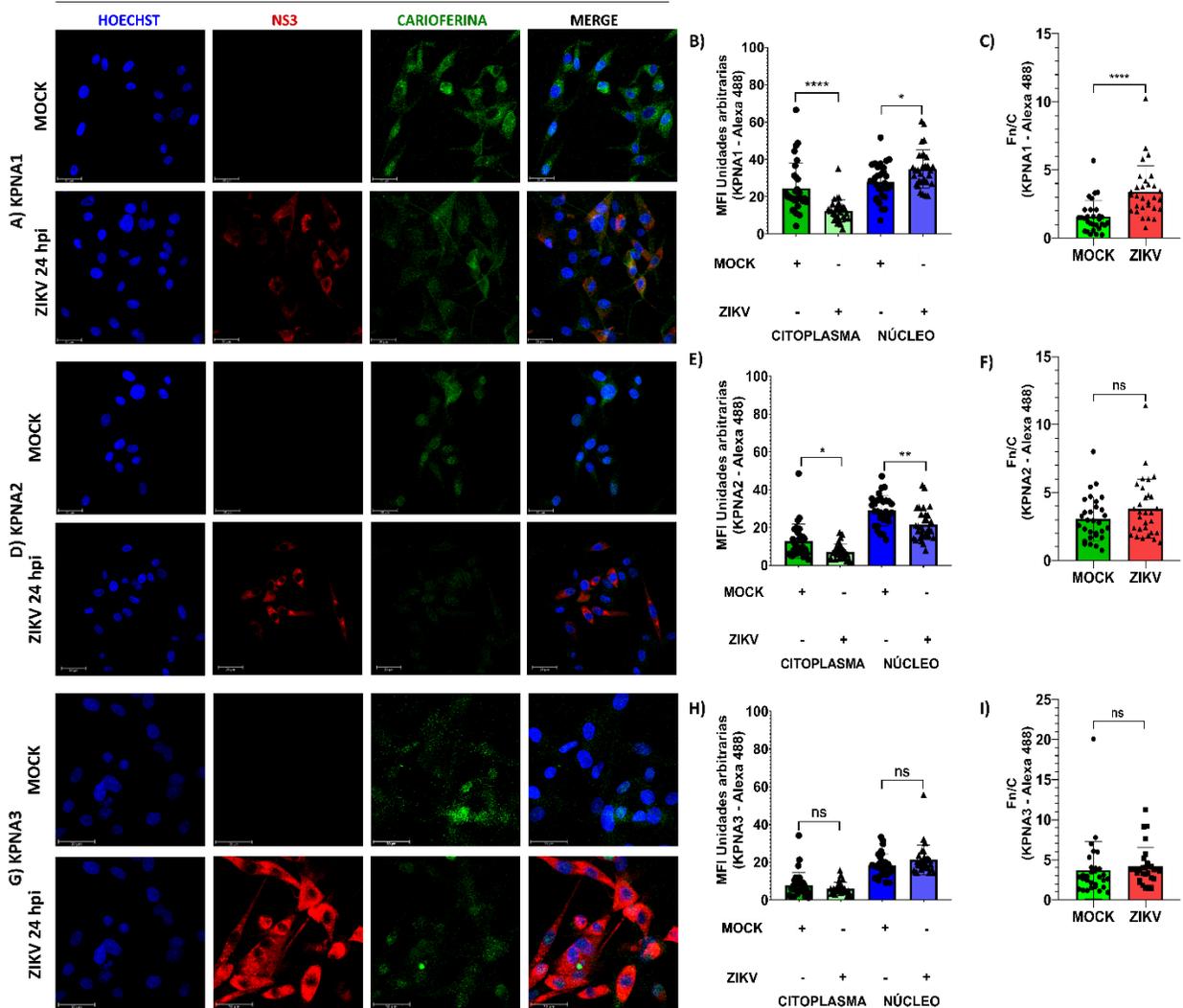


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de KPNA1, KPNA2 y KPNA3 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de MFI. A) Las células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV por 24 hrs fueron analizadas por microscopía confocal usando anticuerpos dirigidos contra la carioferina alfa 1, carioferina alfa 2 y carioferina alfa 3 (verde). Como control de infección se usaron anticuerpos anti la proteína viral NS3 (rojo). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). B) MFI de cada compartimento subcelular analizado por prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C) Fn/C de condiciones mock e infectadas con ZIKV. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

A la luz de los resultados de western blots de extractos totales de células U-87 (figura 13) en donde se observó que la infección por ZIKV de células U-87 indujo

una reducción significativa de los niveles de expresión de **KPNA2** se decidió evaluar su localización subcelular por inmunofluorescencia. Lo que se observó fue una notable disminución de la marca de fluorescencia verde correspondiente a la carioferina en las células infectadas con respecto a las no infectadas en ambos compartimentos citoplásmico y nuclear (fig. 21 D, E y F).

Interesantemente, a pesar de que observamos que la infección por ZIKV inducía una reducción de los niveles de expresión de la **KPNA3** en células de glioblastoma U-87 (figura 14), por los ensayos de microscopía confocal (fig. 21 G) no se encontraron alteraciones en la localización o cantidad relativa de dicha carioferina entre núcleo y citoplasma (fig. 23 H e I).

Alteraciones a nivel localización subcelular e integridad son causados por la infección con ZIKV sobre otras carioferinas alfa y carioferina beta

1

Es importante hacer notar que, aunque los niveles de expresión de la carioferina alfa 5 no se modificaron en las células U-87 por efecto de la infección con ZIKV (fig. 22 B), la localización de la proteína si se ve alterada. Específicamente, una mayor cantidad de la proteína **KPNA5** se observó presente en el núcleo de células infectadas con respecto a las no infectadas (figura 22 A y 22C). Este resultado concuerda con lo observado en el western blot (figura 15) que mostró una disminución de expresión relativa.

Entre las isoformas alfa evaluadas para la única carioferina alfa en la que no se encontró una modificación de los niveles de expresión durante la infección con ZIKV que fue **KPNA6** (figura 16), si se observó un aumento de su presencia en ambos compartimentos en las células U-87 (fig 22 D). Este aumento se confirmó a través del análisis estadístico (fig. 22 E y F), lo que nos indica que entre las carioferinas alfa evaluadas en esta línea celular su alteración se puede reportar como un aumento y recambio en localización o como su disminución.

Ahora bien, como primer elemento evaluado de las carioferinas beta y a manera de profundizar en el resultado de Western blot donde no se encontraron disminuciones en la expresión de **KPNB1** en extractos totales proteicos de células U-87 (figura 18), los resultados basados en imagen de esta carioferina confirman que no hay una afectación significativa a nivel citoplasma entre células (eventos) mock e infectados; pero sí es estadísticamente significativa la disminución de proteína nuclear (figura 22 G y 22H) que se traduce en una disminución de la relación Fn/C, indicando que la infección por ZIKV induce la acumulación citoplásmica de KPNB1 (figura 22I).

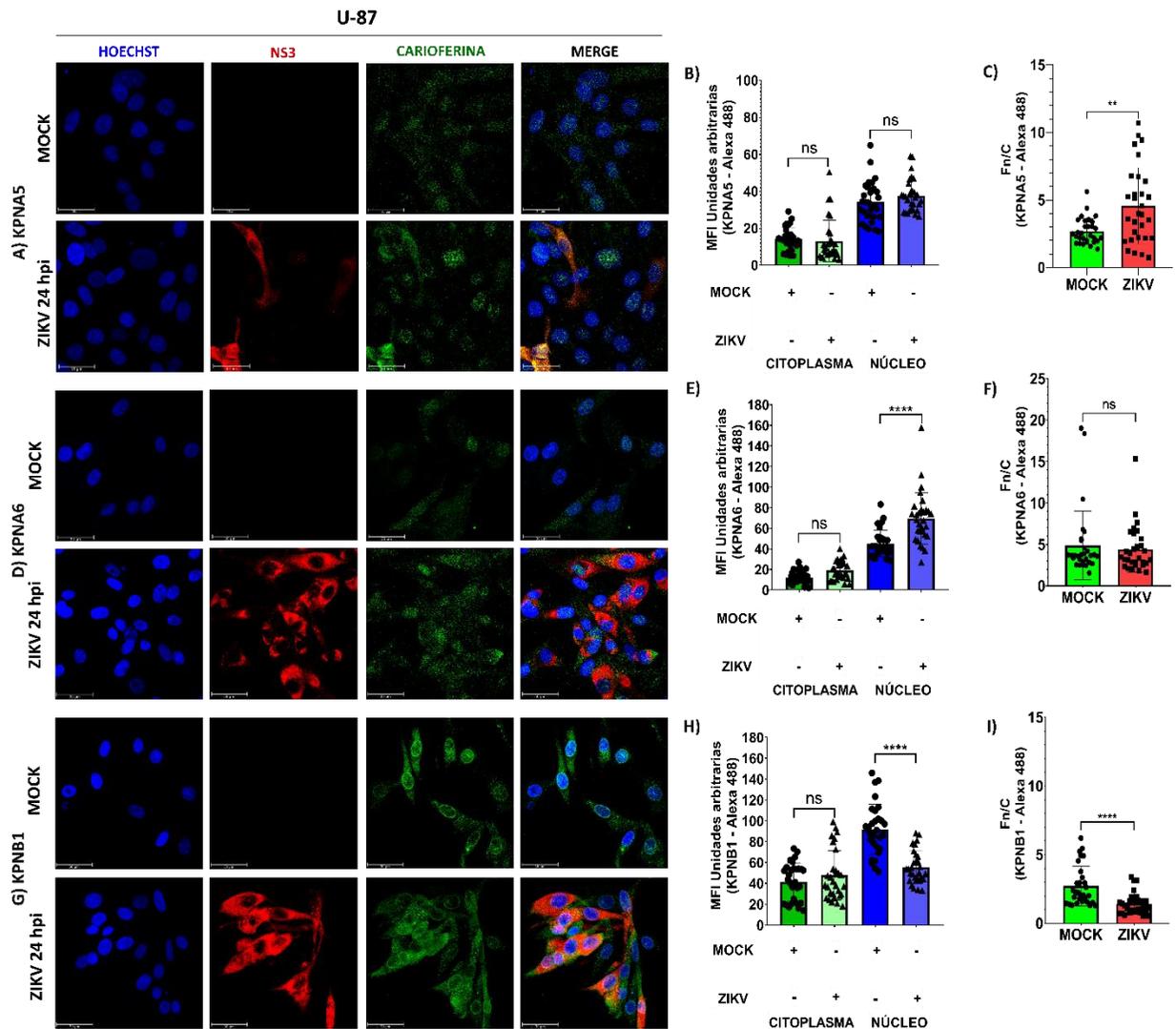


Figura 22. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de KPNA5, KPNA6 y KPNB1 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de MFI. A) Las células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV por 24 hrs fueron analizadas por microscopía confocal, usando anticuerpos dirigidos contra la carioferina alfa 6, carioferina alfa 5 y carioferina beta 1 (verde). Como control de infección se usaron anticuerpos anti la proteína viral NS3 (rojo). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). B) MFI de cada compartimento subcelular analizado por prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C) Fn/C de condiciones mock e infectadas con ZIKV. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

La infección por ZIKV a las 24 h induce aumentos significativos del nivel relativo de transportinas 1 y 3 en el núcleo de células U-87, mientras que la exportina CRM1 no se ve afectada.

Sustentando el resultado obtenido por Western blot de los extractos totales proteicos de células U-87 en donde no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de **TNPO1** durante la infección con ZIKV (figura 19), por microscopía confocal tampoco se observaron disminuciones o aumentos en la presencia de dicha proteína (fig. 23A). Solo pudo observarse un aumento significativo de la proteína en el compartimento nuclear, pero sin modificaciones en la cantidad relativa o la retención/translocación evidente.

Para otra proteína de transporte no clásica, la **TNPO3**, se encontró que la disminución de la proteína en el compartimento citoplásmico durante la infección correlaciona con una tendencia a su aumento en el núcleo. Esto correlaciona con los resultados de Western blot (figura 20) en donde no se observaron alteraciones significativas en su expresión en extractos totales.

En el caso de la exportina **CRM1**, nuestros resultados demostraron que los niveles de expresión de esta proteína no se modificaban durante la infección con ZIKV (figura 17). Esto correlaciona directamente con lo observado por microscopía confocal en las células U-87 bajo infección con ZIKV donde no se detectaron cambios significativos ni en su presencia ni en su localización.

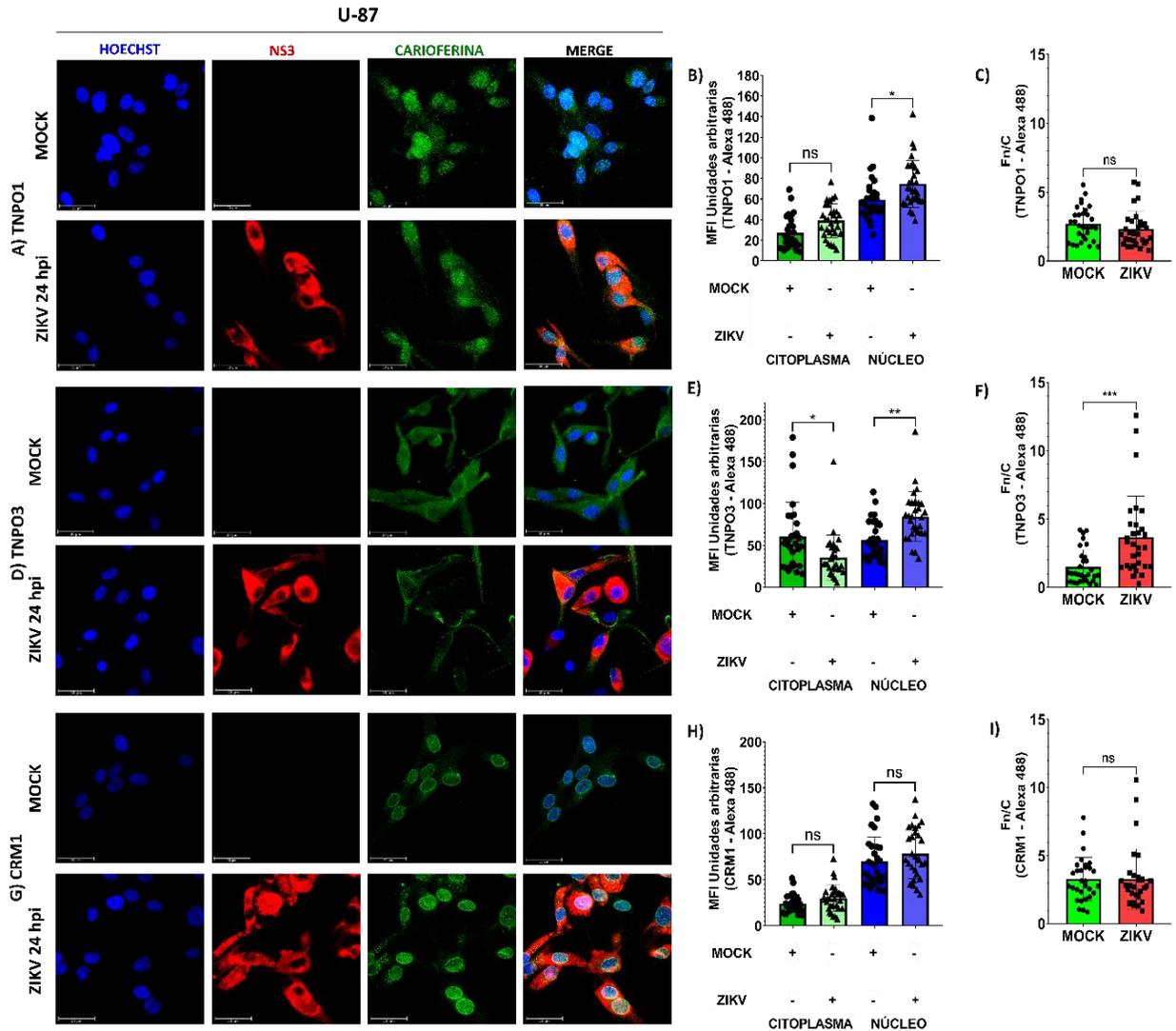


Figura 23. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de TNPO1, TNPO3 y CRM1 en células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV y gráficas de MFI. A) Las células U-87 no infectadas e infectadas con ZIKV por 24 h fueron analizadas por microscopía confocal usando anticuerpos dirigidos contra la transportina 1, transportina 3 y exportina 1 (verde). Como control de infección se usaron anticuerpos anti la proteína viral NS3 (rojo). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). B) MFI de cada compartimento subcelular analizado por prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C) Fn/C de condiciones mock e infectadas con ZIKV. (ns: no significativo. *: significativo a una $P < 0.05$. **: significativo a una $P < 0.01$. ***: significativo a una $P < 0.001$).

Los resultados de los niveles de expresión de las distintas carioferinas en ambas líneas celulares se resume en la tabla 2. En letras rojas se muestran los comportamientos de las carioferinas que son comunes y en negro aquellos comportamientos que son diferenciales en ambas líneas celulares. Estos resultados indican que la infección por ZIKV, tiene efectos diferenciales las proteínas de transporte nuclear en órganos tan diferentes como son el hígado y el cerebro. Hay proteínas como KPNA6 y la exportina CRM1 que no mostraron cambios durante infección. En el caso de KPNA6 se ha sugerido que puede tener un papel en el ciclo de replicación de ZIKV (Yang et al., 2018) lo que ofrecería una explicación preliminar a su inalteración. Nótese que existen carioferinas que presentan una alteración o no, en un linaje celular u otro; este patrón puede estar dado por la diferenciación entre células empleadas, el inicio o no de una respuesta inmune ante la infección o la permisividad de determinado tejido a la replicación por ZIKV.

Tabla 2. Comparación de los efectos de la infección por ZIKV sobre los niveles relativos de expresión de las carioferinas evaluadas por WB

CARIOFERINA	Huh-7	U-87
	ALFAS	
KPNA1	DISMINUCIÓN	DISMINUCIÓN
KPNA2	DISMINUCIÓN	DISMINUCIÓN
KPNA3	SIN AFECTACIÓN	DISMINUCIÓN
KPNA5	SIN AFECTACIÓN	DISMINUCIÓN
KPNA6	SIN AFECTACIÓN	SIN AFECTACIÓN
	BETAS	
KPNB1	DISMINUCIÓN	SIN AFECTACIÓN
TNPO1	DISMINUCIÓN	SIN AFECTACIÓN
TNPO3	DISMINUCIÓN	SIN AFECTACIÓN
CRM1	SIN AFECTACIÓN	SIN AFECTACIÓN

Con respecto a los resultados obtenidos de las observaciones microscopía confocal, éstos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de los efectos de la infección por ZIKV sobre las principales carioferinas evaluadas por WB en células U-87

U-87		
CARIOFERINA	Localización subcelular normal	Localización subcelular durante la infección por ZIKV
ALFAS		
KPNA1	Citoplasma	Aumentada en núcleo
KPNA2	Citoplasma y núcleo	Reducida en citoplasma y núcleo
KPNA3	Citoplasma y núcleo	Sin alteración en citoplasma y núcleo
KPNA5	Citoplasma	Aumentada en núcleo
KPNA6	Citoplasma	Aumentada en núcleo
BETAS		
KPNB1	Núcleo	Reducida en núcleo y aumentada en citoplasma
TNPO1	Citoplasma y núcleo	Aumentada en núcleo
TNPO3	Citoplasma y envoltura nuclear	Reducida en citoplasma y aumentada en núcleo
CRM1	Citoplasma y núcleo	Sin alteración en citoplasma y núcleo

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gracias a los esfuerzos de distintos grupos de investigación, se ha conseguido comprender con mayor detalle los mecanismos de patogenia que tienen diversos flavivirus que están en constante circulación y presencia en el mundo. Dentro de estos mecanismos se encuentran las distintas interacciones entre proteínas virales y celulares durante la infección por el ZIKV que llevan, a la supresión de la respuesta inmune, la activación de mecanismos celulares que permiten la replicación viral en órganos inumoprivilegiados tales como el encéfalo o la placenta, la generación de complejos de replicación en organelos membranosos que impiden al sistema inmune detectar RNA de doble cadena y la degradación o secuestro de moléculas celulares involucradas en transporte núcleo-citoplasma.

Las infecciones virales normalmente inducen cambios en la célula que favorecen la replicación viral e inhiben la respuesta inmune antiviral. Durante la infección con los flavivirus como DENV y ZIKV, a pesar de ser virus de replicación citoplásmica, algunas de sus proteínas son transportadas al núcleo y se modifica el transporte núcleo-citoplasma. En este sentido, se sabe que la infección con ambos virus induce la degradación de algunas de las nucleoporinas del NPC implicadas en el transporte de biomoléculas. Este hecho, correlaciona con una reducción del exporte de mRNA celulares y con un importe deficiente de algunas proteínas de respuesta antiviral tales como factores STAT1 al núcleo celular. Este hecho inhibe principalmente la respuesta inmune antiviral dependiente de IFN tipo 1.

Con la finalidad de entender en mayor detalle el transporte núcleo-citoplasma, se ha analizado la integridad y localización de algunas carioferinas, las cuales son moléculas indispensables en el importe y exporte nuclear y que, para desempeñar su función, deben encontrarse en su compartimento específico.

Para una familia de proteínas tan conservadas como son las carioferinas alfa, se podría esperar que todas realizan el mismo proceso de importe y por tanto estuvieran afectadas de la misma forma. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que algunas importinas tenían un reducido nivel de expresión,

mientras otras no se afectaron y esto podría ocurrir en una línea celular o en las dos líneas celulares.

A este respecto, He y col. 2020 ya habían reportado que el ZIKV disminuye los niveles de expresión relativa de KPNA2 en otros tipos celulares como Vero en un 80%, HeLa también en un 80% y en la línea de neuroblastoma SK-N-SH hasta en un 70%, no así para KPNA1 evaluada en las mismas líneas. No obstante, nuestros resultados muestran una clara reducción de los niveles de KPNA2 (hasta en un 80%) y de KPNA1 (60% obtenido en un replicado) en la línea celular U-87, derivada de glioblastoma, Este hecho sugiere que el efecto sobre algunas de las carioferinas podría ser tejido u órgano específico (Tang et al., 2016). Se demostró igualmente una afectación significativa de estas dos carioferinas en células hepáticas Huh-7 (en menor proporción respecto a las células U-87) que concuerda con los resultados de Sherman et al., 2019 de la permisividad de células Huh 7.5 y para la infección e inducción de apoptosis por ZIKV.

Además, de acuerdo con diversos autores (J. Ma & Cao, 2006; McBride et al., 2002) la proteína **KPNA1** transloca hacia el núcleo a STAT1, transductor de señales y activador de transcripción que interviene en la respuesta celular mediada por interferón, citocinas y factores de crecimiento. Los niveles de esta carioferina se encontraron claramente disminuidos en ambos tipos celulares estudiados lo que de alguna manera podría sugerir que esto podría reducir la señalización de STAT1. Este hecho, sería proviral, pues la respuesta de IFN claramente reduciría la infección.

Al evaluar **KPNA2** algunos autores (He et al., 2020) encontraron disminución de los niveles de proteína en células Vero, HeLa y SK-N-SH lo que concuerda con los resultados de nuestro trabajo, sugiriendo que la afectación en las carioferinas puede ser dependiente del tiempo de infección y constante entre algunos tipos celulares derivados de SNC. De acuerdo con los resultados de (Liang et al., 2013), la KPNA2 es el importador primario de la subunidad p65 que conforma al factor NF- κ B, el cual activa a la vía inflamatoria en respuesta infecciones virales. Por tanto, la reducción de su expresión y el cambio en los compartimentos celulares en donde se encuentra

podría estar prolongando la infección de manera más acentuada en SNC al interferir con la vía que produce citocinas inflamatorias.

Estudios sobre la proteína NS5 de ZIKV realizados por Ng et al., 2019 demostraron que esta proteína viral forma estructuras similares a esferas al secuestrar a **KPNA3** en el núcleo de células Huh-7 infectadas. Este proceso induce la fosforilación, activación y relocalización de STAT1 y una activación de la respuesta inmunitaria en células de glioma maligno LN-229. La información obtenida en nuestros ensayos fue significativa al evaluar los niveles disminuidos de expresión relativa de KPNA3 en células U-87 apoyando indirectamente la idea de estos autores (Ng et al., 2019) donde observan una inducción de respuesta inmune en las neuronas, pero no en hepatocitos (células Huh-7 igualmente empleadas en nuestros experimentos). Será necesario ahondar en las imágenes confocales donde no se observó una alteración de significancia estadística en la localización de la proteína.

Para el caso de **KPNA6** no se encontró diferencia en su expresión o localización en las células infectadas con ZIKV, sugiriendo que pudiera ser relevante durante infección. A este respecto, se ha demostrado la interacción de KPNA6 con otras proteínas virales como la ribonucleoproteína del virus de la influenza A (vRNP) y la proteína del huésped ANP32, permitiendo la eficiente replicación de influenza.

Se sabe que **KPNA6** transporta a STAT3 que es otro transductor de señales que activa a interleucina-6. Se ha demostrado para esta citosina, su actividad de inducir a la proteína colesterol 25-hidroxilasa que posee un espectro de propiedades antivirales. El hecho de que esta transportadora no se altere, indica que el efecto de la infección podría estar promoviendo su propia autolimitación.

Los autores (Yang et al., 2018) describieron que la carioferina alfa 6 (**KPNA6**) podría desempeñar algún papel en el ciclo replicativo del ZIKV por la disminución del RNA viral en células Vero *knock out* para esta carioferina. Su posible función se refuerza con el incremento de hasta dos veces en la expresión de esta carioferina (de acuerdo con sus análisis realizados). Ya que KPNA6 es el transportador de factores como STAT3 (J. Ma & Cao, 2006) podría no ser un blanco celular de este virus o emplearla de alguna manera a lo largo de su ciclo replicativo intracelular.

Estos resultados coinciden con los del presente trabajo con respecto a la cantidad de proteína evaluada en células Huh-7 y U-87 donde tampoco se observa disminución en la expresión de esta proteína (pero tampoco una tendencia al aumento con respecto al control de carga endógeno) e interesantemente, también con nuestros resultados de la evaluación de localización. Si bien no se demuestra una disminución de la proteína evaluada, si existe una relocalización de dicha carioferina al núcleo de las células infectadas (figura 22) lo que también apoya la teoría de Yang et al., 2018 sugiriendo la participación de esta proteína durante el ciclo replicativo de ZIKV interactuando con algún componente viral. En nuestras imágenes no se observó una proximidad de la proteína indicadora de infección NS3 con la carioferina, sin embargo, se requieren estudios de colocalización entre esta proteína celular y proteínas virales para determinar si existe una interacción directa entre proteínas virales que son movilizadas al núcleo por efecto de las importinas.

Como se demuestra en nuestro trabajo y correlacionado con diversos antecedentes de otros autores, las carioferinas intervienen en distintos procesos de importe nuclear, siendo las distintas carioferinas alfa las que reconocen a proteínas toda vez que posean una NLS. Sin embargo, las especificidades de carga distintas son las que determinan qué importinas estarán ejerciendo el transporte activo. Además, encontramos que, al menos durante la infección por ZIKV, KPNA3 y KPNA6 de esta familia evaluada se muestran afectadas en menor medida o sin alteraciones significativas; probablemente debido a un mecanismo viral que autolimita la infección o que retiene productos proteicos en un compartimento u otro; o que son necesarias para interactuar con alguna proteína viral.

La **KPNB1** sirve como el importador primario y predominante de la familia de las carioferinas beta para la subunidad p65 en conjunto con KPNA2 como parte de esta vía canónica de importe/exporte, sin embargo, sus niveles de expresión no parecen modificarse durante la infección por ZIKV (Ng et al., 2019). Lo que si pudimos observar, al menos en células de glioblastoma cerebral, fue su retención o secuestro en el citoplasma y la periferia nuclear. Los trabajos de Dean et al., 2001 demuestran que KPNB1 se une a proteínas ribosomales involucradas en el empalme de mRNA

(proteínas SR, por sus siglas en inglés), por lo que la disminución de su expresión en células hepáticas podría indicar indirectamente un efecto en la traducción del mRNA celular.

Existen transportadores no clásicos que también fueron evaluados en este trabajo durante la infección por ZIKV; llamados no clásicos por reconocer secuencias no semejantes a NLS, denominadas M9 (Pollard et al., 1996) y que funcionan como secuencias de importe y exporte (Matthew Michael et al., 1995). Las proteínas TNPO1 y TNPO3 fueron las que mostraron afectaciones más evidentes a nivel de expresión en células hepáticas Huh-7 (no así en células cerebrales); y efectos en grado variable en cuanto a la localización subcelular. Estos datos sugieren que el virus afecta a proteínas involucradas en el transporte de otros cargos que deben permanecer en el núcleo, tales como las ribonucleoproteínas y proteínas ricas en motivos de serina y arginina, las cuales contribuyen en el metabolismo de ácidos nucleicos y estabilizan el mRNA.

En la tesis de doctorado de De Jesús González (De Jesús González, 2022) se evaluaron los efectos sobre la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNP A1) a las 48 h post infección con ZIKV, mostrando principalmente localización citoplasmática, a diferencia de su estado normal predominantemente nuclear. De esta manera se analizaron indirectamente las vías de transporte no clásicas como **TNPO1** a través del marcaje de proteínas que son cargo de carioferinas como hnRNPA1.

Del mismo modo De Jesús González evaluó la localización subcelular de las proteínas SR (proteínas con dominios de serina y arginina que participan en el splicing constitutivo y alternativo del pre-mRNA) en un ensayo sin infectar, encontrando que las proteínas se presentan principalmente en el núcleo. En cambio, durante la infección por ZIKV esta localización cambia a un patrón citoplasmático y en menor medida nuclear, sugiriendo indirectamente que la vía dependiente de **TNPO3** implicada en el transporte de estas proteínas también se pueden afectar por la infección.

Nuestros resultados sobre extractos totales de células Huh-7 y U-87 no arrojaron alguna alteración evidente ni mucho menos significativa para la única exportina evaluada, la proteína **CRM1**. Del mismo modo para los resultados de imagen por inmunofluorescencia, no se encontraron alteraciones significativas. Esto apoya los antecedentes descritos (De Jesús-González et al., 2022) donde se demuestra que la proteína viral NS5 que poseen secuencias NES, interaccionan con la vía de importación alfa/beta pero también con la exportina CRM1 al tener documentada la acumulación de NS5 en el núcleo de las células infectadas con DENV y tratadas con leptomicina B que inhibe la vía de exporte. Esta información no se conoce por completo para ZIKV, pero ofrece interrogantes acerca de la apropiación (en caso de no observar disminuciones o aumentos en la expresión de proteínas) de la maquinaria celular para el exporte de mRNA eucariota.

Dentro de las familias de las carioferinas se han descrito funciones no canónicas como chaperonas al actuar en la deposición de histonas en los nucleosomas (Bernardes & Chook, 2020) y al poseer péptidos similares a NLS que interaccionan con carioferinas alfa y beta (Greiner et al., 2004; Mosammaparast & Pemberton, 2004); lo que igualmente podría verse interrumpido durante la infección por flavivirus.

Los resultados presentados en este trabajo, ofrece una idea preliminar de las alteraciones de estos receptores móviles en linajes celulares derivados de órganos como hígado y cerebro en donde se han reportado la infección por ZIKV y se ha evidenciado la generación de efecto citopático e incremento de marcadores de apoptosis (Sherman et al., 2019) (Tricarico et al., 2017).

Los distintos órganos blancos de la infección por ZIKV son principalmente placenta, testículos, útero y vagina, ojos, hígado y cerebro, (Miner & Diamond, 2017 y de Sherman et al., 2019). Este extenso tropismo del virus aunado a las afectaciones diferenciales que realiza en cada tejido, abarcando desde malformaciones fetales, enfermedades inflamatorias de la vista, síndromes neurológicos en adultos y probables afectaciones hepática sugiere la existencia de cierta adaptación del virus a una célula u órgano específico. Esta versatilidad podría traducirse en puntuales

funciones de las proteínas virales o del genoma viral durante el ciclo replicativo en el hospedero, funciones que podrían estar implicadas en la compartimentalización de factores de patogenicidad y/o la supresión de las respuestas inmunes del hospedero que favorezcan la permanencia de la infección o un mayor daño a nivel de SNC.

Es sabido que una misma carioferina puede desempeñar la función de transportadora de distintas proteínas cargo y a su vez, varias proteínas cargo sean factores de iniciación de respuesta inmune, de crecimiento o reguladores de la expresión génica con afinidad por más de un transportador. Es esta diversidad de interacciones la que podría propiciar que un flavivirus como ZIKV pueda usar la maquinaria móvil de transporte nuclear-citoplásmica para relocalizar ciertas proteínas virales como la proteína C, NS1, NS3 y NS5 del citoplasma hacia el núcleo (con información de Hertzog et al., 2018; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017).

Las alteraciones de KPNA1 y KPNA2 compartidas en ambas líneas celulares estudiadas ofrecen una idea de que estos transportadores que localizan a factores como STAT1 y p65 respectivamente a través de la interacción con una secuencia NLS (Sekimoto et al., 1997) son el blanco del ZIKV para promover la replicación en hígado y cerebro por igual. Tal como se ha reportado, la permisividad de estos tejidos para la infección y, por ende, la supresión de la respuesta inmune inflamatoria puede deberse en parte a la modificación de los transportadores núcleo-citoplasma. Sin lugar a duda, la realización de estudios directos sobre las proteínas cargo que poseen afinidad directa sobre las carioferinas evaluadas complementarán la comprensión del transporte núcleo-citoplasma y sus implicaciones durante la infección con ZIKV.

CONCLUSIONES

- La infección por ZIKV en células Huh-7 conduce a una disminución en la expresión y niveles relativos de las carioferinas KPNA1, KPNA2, KPNB1, TNPO1 y TNPO3.
- La infección por ZIKV en células U-87 conduce a una disminución en la expresión y niveles relativos de las carioferinas KPNA1, KPNA2, KPNA3 y KPNA5.
- La expresión de la carioferina KPNA6 y la exportina CRM1 no se disminuyen de manera significativa ni se modifica su localización subcelular durante la infección por ZIKV en células Huh-7 ni U-87.
- Sobre células U-87, la infección por ZIKV llevó a alteraciones en la integridad y localización a nivel subcelular de las proteínas KPNA1, KPNA2, KPNA5, KPNA6, KPNB1, TNPO1 y TNPO3.
- Carioferinas ampliamente reportadas como transportadoras de factores de transcripción y de mantenimiento del ciclo celular, como son KPNA1 y KPNA2, son afectadas de manera significativa en células de origen hepático y cerebral.

PERSPECTIVAS

- Analizar la localización subcelular de las carioferinas α y β en células Huh-7 en la infección por ZIKV.
- Examinar estadísticamente significativa los resultados derivados de los fraccionamientos subcelulares en células Huh-7 y U-87.
- Medir los niveles de expresión de mRNA por RT-qPCR de las carioferinas α y β durante la infección por ZIKV.
- Evaluar si las vías de degradación proteosomal o autofágica participan en la degradación de las carioferinas α y β afectadas durante la infección por ZIKV.
- Determinar a la(s) proteína(s) viral(es) responsable(s) de las alteraciones de las carioferinas afectadas.
- Estudiar algunas moléculas cargo de las KPNA y KPNB, con el fin de confirmar si la afectación observada en nuestro trabajo se traduce en alteraciones de la respuesta inmune durante la infección por ZIKV.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Castillo-Medina, L. F., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Halstead, S., Willison, H. J., Anaya, J.-M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00116>
- Acosta-Bas, C., & Gómez-Cordero, I. (2005). Biology and diagnostic methods for dengue. *Revista Biomédica*, 16(2), 113–138.
- Agrawal, T., Gupta, G. K., & Agrawal, D. K. (2012). Calcitriol Decreases Expression of Importin α 3 and Attenuates RelA Translocation in Human Bronchial Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Immunology*, 32(5), 1093–1103. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9696-x>
- Aitchison, J. D., Blobel, G., & Rout, M. P. (1996). *Kap104p: A Karyopherin Involved in the Nuclear Transport of Messenger RNA Binding Proteins*. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.624>
- Alberts, B., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Chapter 12 Intracellular Compartments and protein sorting. En *Molecular Biology of the Cell* (6a ed., pp. 649–653). Garland Science, Taylor & Francis Group. www.garlandscience.com
- Alimonti, J. B., Ribecco-Lutkiewicz, M., Sodja, C., Jezierski, A., Stanimirovic, D. B., Liu, Q., Haqqani, A. S., Conlan, W., & Bani-Yaghoub, M. (2018). Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15, 15. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0100-y>
- Atasheva, S., Fish, A., Fornerod, M., & Frolova, E. I. (2010). Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Forms a Tetrameric Complex with CRM1 and Importin α/β That Obstructs Nuclear Pore Complex Function. *Journal of Virology*, 84(9), 4158–4171. <https://doi.org/10.1128/JVI.02554-09>

- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Beck, M., & Hurt, E. (2017). The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., & Hardin, J. (2007). Capítulo 18 Base estructural de la información celular: DNA, cromosomas y el núcleo. En *El mundo de la célula* (6a ed., pp. 592–595). PEARSON EDUCACIÓN, S. A. <https://www.pearsoneducacion.net/mexico/tienda-online/el-mundo-de-la-celula-becker-6ed-ebook>
- Bernardes, N. E., & Chook, Y. M. (2020). Nuclear import of histones. *Biochemical Society Transactions*, 48(6), 2753–2767. <https://doi.org/10.1042/BST20200572>
- Bhuvanakantham, R., Chong, M.-K., & Ng, M.-L. (2009). Specific interaction of capsid protein and importin- α/β influences West Nile virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.108>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Gabaglia, C. R., de Sequeira, P. C., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., da Cunha, D. C., ... Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus

Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*, 375(24), 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>

Brown, W. C., Akey, D. L., Konwerski, J., Tarrasch, J. T., Skiniotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2016). Extended Surface for Membrane Association in Zika Virus NS1 Structure. *Nature structural & molecular biology*, 23(9), 865–867. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3268>

Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M., de Sequeira, P. C., de Mendonça, M. C. L., de Oliveira, L., Tschoeke, D. A., Schrago, C. G., Thompson, F. L., Brasil, P., dos Santos, F. B., Nogueira, R. M. R., Tanuri, A., & de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)

Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>

Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M. D., Abadie, V., Garel, C., Fontanet, A., & Mallet, H.-P. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: A retrospective study. *The Lancet*, 387(10033), 2125–2132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)

CDC. (2022). *Zika Travel Information | Travelers' Health | CDC*. Zika Travel Information. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-information>

Chang, C.-W., Lee, C.-P., Huang, Y.-H., Yang, P.-W., Wang, J.-T., & Chen, M.-R. (2012). Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Targets the Nucleus through Interaction with Nucleoporins. *Journal of Virology*, 86(15), 8072–8085. <https://doi.org/10.1128/jvi.01058-12>

Chiu, C.-F., Chu, L.-W., Liao, I.-C., Simanjuntak, Y., Lin, Y.-L., Juan, C.-C., & Ping, Y.-H. (2020). The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the

Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00214>

Chook, Y., & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 703–715. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00264-0)

Cornelissen, C. N., & Hobbs, M. M. (2020). Capítulo 27. Virus RNA de cadena positiva. En *Lippincott Illustrated Reviews. Microbiology* (4a ed., pp. 605–611). Wolters Kluwer. <https://meded.lwwhealthlibrary.com/book.aspx?bookid=2605>

De Jesús González, L. A. de. (2022). *Evaluación del tráfico núcleo-citoplasma durante la infección con el virus Zika* [Doctoral Thesis, Tesis (D.C.)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4103>

De Jesús-González, L. A., Cervantes-Salazar, M., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Palacios-Rápalo, S. N., Pérez-Olais, J. H., Cordero-Rivera, C. D., Hurtado-Monzón, A. M., Ruíz-Jiménez, F., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2020). The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses. *Viruses*, 12(6), 583. <https://doi.org/10.3390/v12060583>

De Jesús-González, L. A., Palacios-Rápalo, S. N., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Cordero-Rivera, C. D., Cisneros, B., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2022). Nucleo-Cytoplasmic Transport of ZIKV Non-Structural 3 Protein Is Mediated by Importin- α/β and Exportin CRM-1. *Journal of Virology*, 97(1), e01773-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01773-22>

De Jesús-González, L. A., Palacios-Rápalo, S., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). The Nuclear Pore Complex Is a Key Target of Viral Proteases to Promote Viral Replication. *Viruses*, 13(4), 706. <https://doi.org/10.3390/v13040706>

Dean, K. A., von Ahsen, O., Görlich, D., & Fried, H. M. (2001). Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin. *Journal of Cell Science*, 114(19), 3479–3485. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.19.3479>

- ECDC. (2015). *Rapid Risk Assessment. Zika virus infection outbreak, Brazil and the Pacific region* (p. 8). European Centre for Disease Prevention and Control. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/rapid-risk-assessment-Zika%20virus-south-america-Brazil-2015.pdf>
- Fagerlund, R., Kinnunen, L., Köhler, M., Julkunen, I., & Melén, K. (2005). NF- κ B Is Transported into the Nucleus by Importin α 3 and Importin α 4*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15942–15951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500814200>
- Fay, N., & Panté, N. (2015). Nuclear entry of DNA viruses. *Frontiers in Microbiology*, 6, 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00467>
- Feagins, A. R., & Basler, C. F. (2015). Lloviu virus VP24 and VP35 proteins function as innate immune antagonists in human and bat cells. *Virology*, 485, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.07.010>
- Fitzgerald, B., Boyle, C., & Honein, M. A. (2018). Birth Defects Potentially Related to Zika Virus Infection During Pregnancy in the United States. *JAMA*, 319(12), 1195–1196. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0126>
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., & Mattaj, I. W. (1997). CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell*, 90(6), 1051–1060. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80371-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80371-2)
- Fouchier, R. A. M., Meyer, B. E., Simon, J. H. M., Fischer, U., Albright, A. V., González-Scarano, F., & Malim, M. H. (1998). Interaction of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Protein with the Nuclear Pore Complex. *Journal of Virology*, 72(7), 6004–6013. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.7.6004-6013.1998>
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *Journal of Virology*, 81(18), 9812–9824. <https://doi.org/10.1128/JVI.01012-07>

- Gagné, B., Tremblay, N., Park, A. Y., Baril, M., & Lamarre, D. (2017). Importin β 1 targeting by hepatitis C virus NS3/4A protein restricts IRF3 and NF- κ B signaling of IFNB1 antiviral response. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *18*(6), 362–377. <https://doi.org/10.1111/tra.12480>
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., & Adam, S. A. (2004). Importin α : A multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology*, *14*(9), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.016>
- Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *15*, 607–660. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.607>
- Greiner, M., Caesar, S., & Schlenstedt, G. (2004). The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *European Journal of Cell Biology*, *83*(10), 511–520. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00418>
- Harel, A., & Forbes, D. J. (2004). Importin Beta: Conducting a Much Larger Cellular Symphony. *Molecular Cell*, *16*(3), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.026>
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
- He, J., Yang, L., Chang, P., Yang, S., Lin, S., Tang, Q., Wang, X., & Zhang, Y.-J. (2020). Zika virus NS2A protein induces the degradation of KPNA2 (karyopherin subunit alpha 2) via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, *16*(12), 2238–2251. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1823122>
- Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., LaCount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17345–17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107>

- Hertzog, J., Dias Junior, A. G., Rigby, R. E., Donald, C. L., Mayer, A., Sezgin, E., Song, C., Jin, B., Hublitz, P., Eggeling, C., Kohl, A., & Rehwinkel, J. (2018). Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European Journal of Immunology*, *48*(7), 1120–1136. <https://doi.org/10.1002/eji.201847483>
- Hou, W., Cruz-cosme, R., Armstrong, N., Obwolo, L. A., Wen, F., Hu, W., Luo, M.-H., & Tang, Q. (2017). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*, *628*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>
- Hudjetz, B., & Gabriel, G. (2012). Human-like PB2 627K Influenza Virus Polymerase Activity Is Regulated by Importin- α 1 and - α 7. *PLoS Pathogens*, *8*(1), e1002488. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002488>
- Hussain, A., Ali, F., Latiwesh, O. B., & Hussain, S. (2018). A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. *Cureus*, *10*(9), e3290. <https://doi.org/10.7759/cureus.3290>
- Iwasa, J., & Marshall, W. (2018). Capítulo 12 Control de la expresión genética. En *Karp. Biología celular y molecular* (8a ed., pp. 460–462). McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2817>
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K., & Greene, W. C. (1998). Characterization of HIV-1 Vpr Nuclear Import: Analysis of Signals and Pathways. *Journal of Cell Biology*, *143*(4), 875–885. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.4.875>
- Kelley, J. B., Talley, A. M., Spencer, A., Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2010). Karyopherin α 7 (KPNA7), a divergent member of the importin α family of nuclear import receptors. *BMC Cell Biology*, *11*, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-63>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2021). Zika Virus Disease: Progress and Prospects. En S. I. Ahmad (Ed.), *Human Viruses: Diseases, Treatments and*

Vaccines: The New Insights (pp. 223–232). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-71165-8_12

- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Stanfield, S. M., & Duffy, M. R. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & Signor, L. del C. C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 933–935. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160065>
- Landry, M. L., & St. George, K. (2016). Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(1), 60–67. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA>
- Laredo-Tiscareño, S. V., Guo, X., & Bocanegra-García, V. (2012). Virus del dengue: Estructura de serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUAT*, (2007 7858) Vol.6 (2012). <https://riuat.uat.edu.mx/handle/123456789/1909>
- Lee, C. M., Xie, X., Zou, J., Li, S.-H., Lee, M. Y. Q., Dong, H., Qin, C.-F., Kang, C., & Shi, P.-Y. (2015). Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. *Journal of Virology*, 89(12), 6171–6183. <https://doi.org/10.1128/jvi.00546-15>
- Liang, P., Zhang, H., Wang, G., Li, S., Cong, S., Luo, Y., & Zhang, B. (2013). KPNB1, XPO7 and IPO8 Mediate the Translocation of NF- κ B/p65 into the Nucleus. *Traffic*, 14(11), 1132–1143. <https://doi.org/10.1111/tra.12097>
- Lindenbach, B. D., Thiel, H. J., & Rice, C. M. (2011). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. En D. M. Knipe & O. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (5a ed., 1–2, pp. 1101–1151). Lippincot William & Wilkins. [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqw2orz553k1w0r45\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1313522](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqw2orz553k1w0r45))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1313522)
- Lustig, Y., Mendelson, E., Paran, N., Melamed, S., & Schwartz, E. (2016). Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after

symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Eurosurveillance*, 21(26), 30269. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30269>

Ma, J., & Cao, X. (2006). Regulation of Stat3 nuclear import by importin α 5 and importin α 7 via two different functional sequence elements. *Cellular Signalling*, 18(8), 1117–1126. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.06.016>

Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>

MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)

Manjarrez-Zavala, M. E., & Molina-López, J. (2019). Sección II. Introducción a la virología. En J. Molina-López, R. López-Martínez, & J. T. Sánchez-Vega, *Microbiología y Parasitología Médicas de Tay* (5a ed., pp. 120–126). Méndez Editores, S.A. de C.V. <https://mendezeditores.com.mx/microbiolog%C3%ADa%20y%20parasitolog%C3%ADa%20m%C3%A9dicas%20de%20tay%20-%20libro.html>

Matthew Michael, W., Choi, M., & Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*, 83(3), 415–422. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90119-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90119-1)

McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C., & Reich, N. C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *The EMBO Journal*, 21(7), 1754–1763. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1754>

Mili, S., Shu, H. J., Zhao, Y., & Piñol-Roma, S. (2001). Distinct RNP Complexes of Shuttling hnRNP Proteins with Pre-mRNA and mRNA: Candidate Intermediates in Formation and Export of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7307–7319. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7307-7319.2001>

- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Miyamoto, Y., Yoneda, Y., & Oka, M. (2018). 17—Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm. En C. Lavelle & J.-M. Victor (Eds.), *Nuclear Architecture and Dynamics* (Vol. 2, pp. 387–403). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803480-4.00025-9>
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodušek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., & Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Morikawa, K., Lange, C. M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., & Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: The Swiss army knife of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(5), 305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01451.x>
- Mosammamarast, N., & Pemberton, L. F. (2004). Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in Cell Biology*, 14(10), 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.004>
- Muñoz-Jordán, J. L., Sánchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., & García-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14333–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>
- Ng, I. H. W., Chan, K. W.-K., Tan, M. J. A., Gwee, C. P., Smith, K. M., Jeffress, S. J., Saw, W.-G., Swarbrick, C. M. D., Watanabe, S., Jans, D. A., Grüber, G., Forwood, J. K., & Vasudevan, S. G. (2019). Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- α and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. *ACS Infectious Diseases*, 5(6), 932–948. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00373>

- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., & Moses, A. M. (2009). NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, *10*, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202>
- Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., & Aida, Y. (2007). Novel Nuclear Import of Vpr Promoted by Importin α Is Crucial for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Macrophages. *Journal of Virology*, *81*(10), 5284–5293. <https://doi.org/10.1128/JVI.01928-06>
- Nomaguchi, M., Ackermann, M., Yon, C., You, S., & Padmanbhan, R. (2003). De Novo Synthesis of Negative-Strand RNA by Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase In Vitro: Nucleotide, Primer, and Template Parameters. *Journal of Virology*, *77*(16), 8831–8842. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8831-8842.2003>
- Papa, M. P., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A., Lucas, C. G. de O., Mustafá, Y. M., Lemos Matassoli, F., Silveira, P. P., Frost, P. S., Pezzuto, P., Ribeiro, M. R., Tanuri, A., Nogueira, M. L., Campanati, L., Bozza, M. T., Paula Neto, H. A., Pimentel-Coelho, P. M., Figueiredo, C. P., de Aguiar, R. S., & de Arruda, L. B. (2017). Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557>
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current opinion in microbiology*, *11*(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *The New England Journal of Medicine*, *374*(16), 1552–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F., & Dreyfuss, G. (1996). A Novel Receptor-Mediated Nuclear Protein Import Pathway. *Cell*, *86*(6), 985–994. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80173-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80173-7)

- Poon, I. K. H., & Jans, D. A. (2005). Regulation of Nuclear Transport: Central Role in Development and Transformation? *Traffic*, 6(3), 173–186. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00268.x>
- Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *The Biochemical journal*, 466(1), 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>
- Pumroy, R. A., Ke, S., Hart, D. J., Zachariae, U., & Cingolani, G. (2015). Molecular determinants for nuclear import of Influenza A PB2 by importin α isoforms 3 and 7. *Structure (London, England: 1993)*, 23(2), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.015>
- Radu, A., Moore, M. S., & Blobel, G. (1995). The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*, 81(2), 215–222. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90331-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90331-3)
- Reid, St. P., Leung, L. W., Hartman, A. L., Martinez, O., Shaw, M. L., Carbonnelle, C., Volchkov, V. E., Nichol, S. T., & Basler, C. F. (2006). Ebola Virus VP24 Binds Karyopherin α 1 and Blocks STAT1 Nuclear Accumulation. *Journal of Virology*, 80(11), 5156–5167. <https://doi.org/10.1128/jvi.02349-05>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Sachan, N., Mishra, A. K., Mutsuddi, M., & Mukherjee, A. (2013). The Drosophila Importin- α 3 Is Required for Nuclear Import of Notch In Vivo and It Displays Synergistic Effects with Notch Receptor on Cell Proliferation. *PLOS ONE*, 8(7), e68247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068247>
- Salazar-Sánchez, M. I., & Loroño-Pino, M. A. (2019). Capítulo 22. Familia FLAVIVIRIDAE. En J. Molina-López, R. López-Martínez, & J. T. Sánchez-Vega, *Microbiología y Parasitología Médicas de Tay* (5a ed., pp. 453–461). Méndez Editores, S.A. de C.V. <https://mendezeditores.com.mx/microbiolog%C3%ADa%20y%20parasitolog%C3%ADa%20m%C3%A9dicas%20de%20tay%20-%20libro.html>

- Saxena, S. K., Elahi, A., Gadugu, S., & Prasad, A. K. (2016). Zika virus outbreak: An overview of the experimental therapeutics and treatment. *VirusDisease*, 27(2), 111–115. <https://doi.org/10.1007/s13337-016-0307-y>
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*, 11(11), e1005277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>
- Schwartz, T. U. (2016). The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex. *Journal of molecular biology*, 428(10 Pt A), 1986–2000. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.015>
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., & Yoneda, Y. (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *The EMBO Journal*, 16(23), 7067–7077. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7067>
- Shaulian, E., & Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20(19), Article 19. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204383>
- Sherman, K. E., Rouster, S. D., Kong, L. X., Aliota, M. T., Blackard, J. T., & Dean, G. E. (2019). Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. *PLoS ONE*, 14(3), e0214016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214016>
- Soniat, M., & Chook, Y. M. (2015). Nuclear localization signals for four distinct karyopherin- β nuclear import systems. *The Biochemical Journal*, 468(3), 353–362. <https://doi.org/10.1042/BJ20150368>
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., & Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) Is an Essential Nuclear Export Factor. *Cell*, 90(6), 1041–1050. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80370-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80370-0)
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, 71(11), 8475–8481. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997>

- Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Ng, I. H. W., Kong, S. Y. Z., Gwee, C. P., Watanabe, S., & Vasudevan, S. G. (2019). The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. *Cells*, 8(12), 1519. <https://doi.org/10.3390/cells8121519>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., & Ming, G. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Tessier, T. M., Dodge, M. J., Prusinkiewicz, M. A., & Mymryk, J. S. (2019). Viral Appropriation: Laying Claim to Host Nuclear Transport Machinery. *Cells*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells8060559>
- Thomas, S. J., Endy, T. P., Rothman, A. L., & Barrett, A. D. (2015). Flavivirus (dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis transmitida por garrapatas, enfermedad del bosque de Kyasanur, fiebre hemorrágica de Alkhurma, Zika). En *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. (Octava, Vol. 2, pp. 1980–1997). Elsevier Saunders.
- Tricarico, P. M., Caracciolo, I., Crovella, S., & D'Agaro, P. (2017). Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 597–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.158>
- Twyffels, L., Gueydan, C., & Kruys, V. (2014). Transportin-1 and Transportin-2: Protein nuclear import and beyond. *FEBS Letters*, 588(10), 1857–1868. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.023>
- Vargas-Córdoba, M. (2016). Capítulo 12 Enfermedades transmitidas por vectores. En *Virología médica* (2a ed., pp. 851–930). Editorial El Manual Moderno (Colombia) S.A.S. <https://medicina.bogota.unal.edu.co/dependencias/unidades/publicaciones/item/1005-virologia-medica-2da-edicion>

- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: Estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33–43.
- Velázquez Flores, A. L. (2017). *Identificación del antígeno NS1 y anticuerpo IgM para virus del dengue en estudiantes de Nivel Superior de la UAEMéx.* <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/70659>
- Wang, C., Yang, S. N. Y., Smith, K., Forwood, J. K., & Jans, D. A. (2017). Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(4), 1555–1559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.016>
- Watters, K., Inankur, B., Gardiner, J. C., Warrick, J., Sherer, N. M., Yin, J., & Palmenberg, A. C. (2017). Differential Disruption of Nucleocytoplasmic Trafficking Pathways by Rhinovirus 2A Proteases. *Journal of Virology*, 91(8), e02472-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02472-16>
- White, M. K., Wollebo, H. S., David Beckham, J., Tyler, K. L., & Khalili, K. (2016). Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of Neurology*, 80(4), 479–489. <https://doi.org/10.1002/ana.24748>
- Wichit, S., Gumpangseth, N., Hamel, R., Yainoy, S., Arikitt, S., Punsawad, C., & Missé, D. (2021). Chikungunya and Zika Viruses: Co-Circulation and the Interplay between Viral Proteins and Host Factors. *Pathogens*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040448>
- Wu, Y.-H., Tseng, C.-K., Lin, C.-K., Wei, C.-K., Lee, J.-C., & Young, K.-C. (2018). ICR suckling mouse model of Zika virus infection for disease modeling and drug validation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(10), e0006848. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006848>
- Xu, W., Edwards, M. R., Borek, D. M., Feagins, A. R., Mittal, A., Alinger, J. B., Berry, K. N., Yen, B., Hamilton, J., Brett, T. J., Pappu, R. V., Leung, D. W., Basler, C. F., & Amarasinghe, G. K. (2014). Ebola virus VP24 targets a unique NLS-binding site on karyopherin5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1. *Cell host & microbe*, 16(2), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.008>

- Yang, L., Wang, R., Yang, S., Ma, Z., Lin, S., Nan, Y., Li, Q., Tang, Q., & Zhang, Y.-J. (2018). Karyopherin Alpha 6 Is Required for Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Zika Virus. *Journal of Virology*, 92(9), e00072-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00072-18>
- Yarbrough, M. L., Mata, M. A., Sakthivel, R., & Fontoura, B. M. A. (2014). Viral Subversion of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 15(2), 127–140. <https://doi.org/10.1111/tra.12137>
- Ye, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, Z., He, W., Zohaib, A., Song, Y., Deng, C., Zhang, B., Chen, H., & Cao, S. (2017). Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. *Journal of Virology*, 91(8), e00039-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00039-17>
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology*, 86(13), 7360–7371. <https://doi.org/10.1128/jvi.00157-12>
- Zhao, Z., Tao, M., Han, W., Fan, Z., Imran, M., Cao, S., & Ye, J. (2021). Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *The Journal of General Virology*, 102(3). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001376>
- Zika virus ~ ViralZone*. (2023). <https://viralzone.expasy.org/6756>