

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Análisis de la expresión heteróloga, localización y
respuesta celular de la proteína E del virus del Zika
en un modelo in vitro”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. David Hernán Martínez Puente

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Director de la Tesis:
Dr. José Segovia Vila**

Ciudad de México

Julio, 2024

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. José Segovia Vila profesor titular del laboratorio 44 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (Becario de CONAHCYT No. 780375).

Dedicatoria

A mi madre, a quien admiro tanto por todo lo que es, su valentía y esfuerzo que dedicó por nosotros sus hijos... eternamente agradecido.

A mi papá QEPD, quien me inspiró a involucrarme en esta noble área de las ciencias para contribuir un granito de arena en el conocimiento para el desarrollo de terapias contra las diferentes enfermedades crónicas que aqueja al humano.

*“Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo que lo rodea y a sus aventuras
las llama ciencia”*

Edwin Hubble

Agradecimientos

Al Dr. José Segovia Vila, por su paciencia y enseñanzas que permitieron desarrollar mi doctorado en su grupo de trabajo.

A mis sinodales y tutores, Dra. María de Jesús Loera Arias, Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres, Dr. Daniel Martínez Fong, Dr. Juan Ludert, y al Dr. Benjamín Florán Garduño por contribuir con su vasta experiencia en la revisión de este trabajo.

A Paula Vergara y Aracely Navarrete, por todo el apoyo y asistencia experimental.

A mis hermanos Marcelo y Alejandro, quienes han estado en las buenas y en las malas a pesar de la distancia.

A las amistades y compañeros que hice en el CINVESTAV, Erick, Oscar, Adrián, Víctor, Manuel y Nicolás quienes me aconsejaron y apoyaron durante mi estancia doctoral.

Nuevamente a “Las Señoras”, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL: Hugo David López, Alan Galarza, Pablo Ramírez y Brando David Muraira, por estos 14 años y contando de nuestra gran amistad.

Índice de contenido

I) Lista de abreviaturas	7
II) Resumen	13
III) Abstract	14
IV) Introducción	15
V) Antecedentes	16
1. Virus del Zika	16
2. Transmisión del virus del Zika y la microcefalia	18
3. Tropicismo del virus del Zika.....	21
4. Características moleculares del virus del Zika.....	22
5. Ciclo de vida del virus del Zika.....	24
6. Proteína E del virus del Zika	26
7. Receptores de entrada para el virus	26
8. Retículo endoplásmico rugoso	30
9. Síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico.....	30
10. Estrés del retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas.....	31
11. Infección del virus del Zika y su relación con la respuesta a proteínas mal plegadas	34
12. La proteína E del virus del Zika y su papel en la inducción de estrés en RE.....	35
VI) Justificación	37
VII) Hipótesis	37
VIII) Objetivo General	38
IX) Objetivos específicos	38
X) Materiales y métodos	39
1. Vector de expresión	39
2. Líneas celulares	40
3. Transfecciones celulares	41
4. Extracción de proteínas.....	41
5. Ensayos de Inmunotransferencia.....	41
6. Inmunofluorescencia.....	42
7. Ensayo de azul de tripano	44
8. Análisis estadístico	44

XI) Resultados.....	45
1. El plásmido pcDNA 3.0 integró el gen que codifica a la proteína E del virus del Zika	45
2. La proteína E del virus del Zika se expresa eficientemente en células transfectadas	47
3. La expresión heteróloga de la proteína E del virus del Zika no provoca muerte celular	47
4. La expresión heteróloga de la proteína E del virus del Zika no induce una respuesta al estrés del RE	49
5. La proteína E del virus del Zika se dirige al RE	51
6. La proteína E del virus del Zika se encuentra en el citoplasma.....	54
7. La proteína E del ZIKV se expresa en la membrana celular	56
XII) Discusión	58
XIII) Conclusiones.....	63
XIV) Perspectivas	64
XV) Figuras suplementarias	65
XVI) Literatura citada	67

I) Lista de abreviaturas

°C.- Grados Celsius

A549.- Línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano

ARPE19.- Línea celular epitelial pigmentada de retina humana

ASK1.- Apoptosis signal-regulating kinase

ATF4.- Activating transcription factor 4

ATF6(N).- The cytosolic N-terminal domain of ATF6

ATF6.- Activating transcription factor 6

BCA.- Bicinchoninic acid

Bcl-2.- B-cell lymphoma 2

BFA.- Brefeldina A

BHK-21.- Línea celular de fibroblastos de riñón de hámster bebé

BiP/GRP78.- Binding immunoglobulin protein/Glucose regulated protein 78 kDa

BSA.- Bovine serum albumin

C.- Cápside

C6 cells.- Línea celular de glioma de rata

C6/36.- Línea celular derivada del mosquito *Aedes albopictus*

Caco.2.- Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano

cDNA.- Complementary deoxyribonucleic acid

CHOP.- C/EBP homologous protein

CO₂.- Dióxido de carbono

COS7.- Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano

CRT.- Calreticulina

DAPI.- 4',6-diamidino-2-phenylindole

DC-SIGN.- Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin

DENV.- Virus del dengue

DF-1.- Línea celular de fibroblastos de embrión de pollo

DMEM.- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO.- Dimethyl sulfoxide

DNA.- Deoxyribonucleic acid

DNAasa 1.- Desoxirribonucleasa I

E.- Proteína de envoltura

EDTA.- Ethylenediaminetetraacetic acid

eIF2 α .- Eukaryotic translation initiation factor 2 α

EMEM.- Eagle's minimum essential medium modified

ER.- Endoplasmic reticulum

ERAD.- Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation

E-ZIKA.- Transgén de la proteína E

GFAP.- Glial Fibrillary acidic protein

GFP.- Green fluorescent protein

h.- Horas

HaCat.- Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados

HEK-293.- Línea celular epitelial de riñón embrionario humano

HEK-293T.- Línea celular epitelial de riñón embrionario humano altamente transfectable

HepC2/C32A.- Línea celular epitelial de carcinoma hepatocelular humano

Hep-2.- Línea celular de carcinoma epidermoide de laringe humano

HFL.- Línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario humano

HRP.- Enzyme horseradish peroxidase

Huh7.5.- Línea celular de carcinoma hepatocelular humano

IRE1 α .- Inositol-requiring enzyme type 1 α

JEG-3.- Línea celular de coriocarcinoma placentario humano

JNK.- c-Jun N-terminal protein kinase

kb.- kilobase

kDa.- Kilodalton

LC3-1.- Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LLC-MK2.- Línea celular epitelial de riñón de mono Rhesus

LNCaP.- Línea celular de adenocarcinoma de próstata metastásico humano

LP.- Lipofectamina

M.- Proteína de membrana

M.- Mol

min.- Minutos

mL.- Mililitros

mM.- Milimolar

MOS61.- Línea celular derivada del mosquito *Aedes pseudoscutellaris*

mRNA.- Messenger RNA

N29.1.- Línea celular de hipotálamo embrionario de ratón

NaCl.- Cloruro de sodio

NEG.- Negativo

nm.- nanómetros

ns.- Nanosegundos

NS1.- Nonstructural protein 1

NS2A.- Nonstructural protein 2A

NS2B.- Nonstructural protein 2B

NS3.- Nonstructural protein 3

NS4A.- Nonstructural protein 4A

NS4B.- Nonstructural protein 4B

NS5.- Nonstructural protein 5

pb.- Pares de bases

PBS.- Phosphate buffer saline

PCR.- Polymerase Chain Reaction

p-EIF2 α .- Phosphorylated eIF2 α

PERK.- Protein kinase R (PKR) like endoplasmic reticulum kinase

PK-15.- Línea celular epitelial de riñón de cerdo

p-PKR.- Phosphorylated PKR

pr.- Proteína precursora de membrana

PVDF.- Polyvinylidene fluoride

pXBP1(s).- Transcription factor protein (p) XBP1 spliced (S)

RD.- Línea celular de rhabdomyosarcoma humano

RE.- Retículo endoplásmico

ReN cells.- Línea celular progenitora neural humana

RFU.- Relative fluorescence units

RIDD.- Regulated IRE1-dependent decay

RNA.- Ribonucleic acid

rpm.- Revoluciones por minuto

SF268.- Línea celular de astrocitoma anaplásico humano

SFB.- Suero fetal bovino

SH-SY5Y.- Línea celular de neuroblastoma de médula ósea humana

SOX2.- SRY-Box Transcription Factor 2

SRP.- Signal recognition particle

TBST.- Buffer salino con Tris, Tween 1X

TGN.- Trans-Golgi network

TIM.- T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin

TRAF2.- TNF receptor associated factor 2

tRNAⁱmet.- methionine transfer RNA

U.- Unidades

U87-MG.- Línea celular de glioblastoma humano

UPR.- Unfolded protein response

UTR.- Untranslated regions

Vero E6.- Línea celular epitelial de riñón de mono verde africano

XBP1.- X-Box Binding Protein 1

ZIKV.- Virus del zika

ZIKV.HPAN.- Virus del zika derivado de ratones de la cepa Panamá humano

µg.- Microgramos

µL.- Microlitros

µm.- Micrómetros

II) Resumen

La infección por el virus Zika (ZIKV) se ha asociado con daño a las células troncales neurales en los recién nacidos causando microcefalia. Diferentes estudios han mostrado también que el virus posee tropismo específico por las células troncales de glioma mediado por la proteína E del ZIKV. Esta infección provoca estrés en el retículo endoplasmático (RE) y con ello, la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene la producción de la proteína E en el funcionamiento de las células y las alteraciones que pueda provocar en ellas. En este estudio determinamos el efecto de la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV sobre las respuestas celulares y su localización subcelular *in vitro* en la línea celular epitelial de riñón embrionario humano (HEK-293T), ya que estas células son ampliamente utilizadas como herramienta biotecnológica para llevar a cabo diferentes tipos de tratamientos terapéuticos como lo son la terapia celular y la generación de partículas virales para la terapia génica. En este trabajo observamos que la proteína E del ZIKV se sintetiza en el citoplasma y se inserta en el RE, sin provocar estrés en el RE ni muerte celular, y finalmente es transportada y localizada en la membrana celular. Además, también se observó que la expresión de la proteína E del ZIKV no induce estrés en el RE ni apoptosis en una línea de células de glioma. Estos resultados nos ayudan a comprender mejor las características de esta proteína y su posible uso como herramienta biotecnológica para la creación de diferentes estrategias de terapia génica, vacunas y vectores sintéticos con tropismo por células troncales neurales y de glioma.

III) Abstract

Zika virus (ZIKV) infection has been associated with damage to neural stem cells in newborns causing microcephaly. The virus possesses specific tropism for glioma stem cells mediated by the ZIKV E protein. This infection causes endoplasmic reticulum stress and activation of the unfolded protein response (UPR). However, the cellular response to the expression of the ZIKV E protein alone is unknown. Therefore, in this study, we determined the effect of the expression of the ZIKV E protein on cellular responses and its subcellular localization in HEK-293T cells, due to their use as a biotechnological tool for cellular and lentiviral therapy. We observed that the ZIKV E protein is synthesized in the cytoplasm and inserted into the endoplasmic reticulum (ER), without causing activation of the UPR or cell death, and it is finally transported and located in the cell membrane. Moreover, the expression of the ZIKV E protein does not induce UPR or apoptosis in glioma cells. These results help us to better understand the characteristics of this protein and its possible use as a biotechnological tool for the creation of different gene therapy strategies, vaccines, and synthetic vectors with tropism for neural and glioma stem cells.

IV) Introducción

El ZIKV es transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*. En Brasil hubo casos alarmantes de microcefalia en productos de madres infectadas por el virus. Por otro lado, en modelos animales, se ha observado que el ZIKV es el responsable de inducir microcefalia al eliminar células troncales neurales. Este fenómeno está directamente relacionado con el estrés crónico del RE por la presencia del virus. El ZIKV no sólo tiene tropismo por las células troncales neurales, sino también por células troncales de la glía. También se ha evidenciado un tropismo específico por las células troncales de glioma, por lo que es capaz de contrarrestar tumores derivados de células de la glía, como los glioblastomas. La proteína E del ZIKV ha sido identificada como responsable de estos tropismos, por lo tanto, se puede utilizar para dirigir estrategias terapéuticas a estas células blanco. Por lo que es de gran interés conocer lo que sucede en la célula al expresar de manera heteróloga la proteína E del ZIKV. En este trabajo dilucidamos el efecto que tiene la síntesis de la proteína E del ZIKV sobre la respuesta celular y su sub-localización en células HEK-293T. Estos resultados nos ayudan a comprender mejor las características de la expresión de la proteína *in vitro*, y su posible uso como herramienta biotecnológica para la creación de diferentes estrategias de terapia génica, vacunas y vectores sintéticos con tropismo por células troncales neurales y de glioma.

V) Antecedentes

1. Virus del Zika

El ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 de un mono centinela en el bosque de Zika en Uganda (Dick et al., 1952). Pertenece a la familia Flaviviridae que se caracterizan por ser virus icosaédricos con envoltura, tienen un diámetro de 50 nm, y contienen una sola hebra positiva de RNA (del inglés Ribonucleic acid) de entre 9 a 12 kb (kilobase) (Ryu, 2017, p. 12). Dentro de la familia Flaviviridae, se encuentran los géneros Hepacivirus, Pestivirus, Peguivirus y los Flavivirus. Estos últimos incluyen 53 especies transmitidas por artrópodos, principalmente mosquitos y garrapatas (Figura 1), siendo mamíferos y aves los principales hospederos. Este género de virus puede provocar enfermedades neurológicas y fiebre hemorrágica severa o mortal (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019).

Los virus de importancia médica para el humano son: el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue (que tienden a causar síndromes febriles sistémicos y fiebre hemorrágica severa), el virus de la encefalitis japonesa, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el ZIKV. Estos flavivirus encefalíticos son neurotrópicos y causan encefalitis focales y manifestaciones neurológicas además de enfermedad febril inespecífica (Hills & Fischer, 2018).

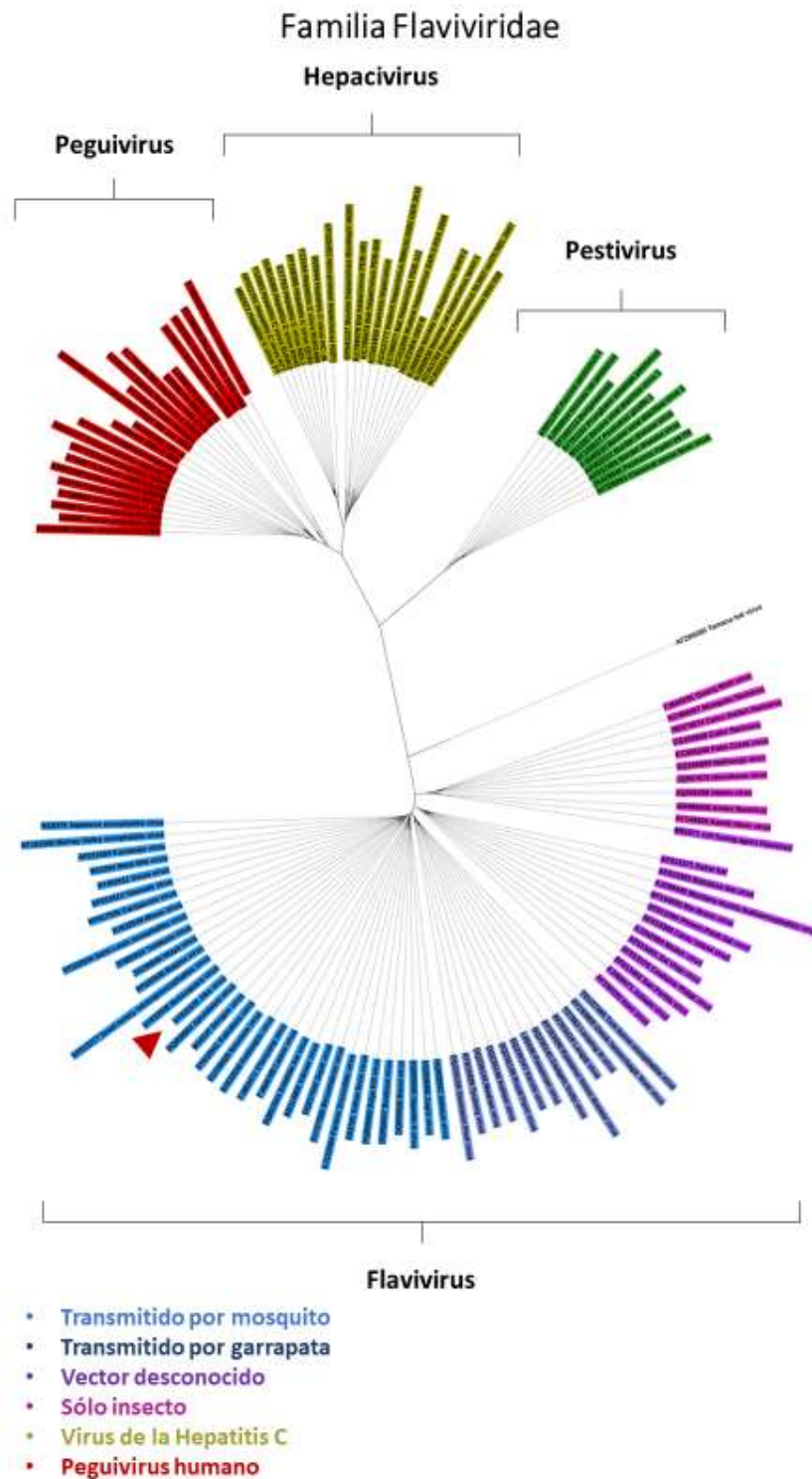


Figura 1: Familia Flaviviridae. Filogenia de secuencias de aminoácidos conservadas en la RNA helicasa y RNA polimerasa dependiente de RNA (del inglés RNA helicase and RNA-dependent RNA polymerase, RdRp.), que se codifican en ubicaciones similares entre las posiciones 8.040–8.897 a lo largo del genoma en todos los géneros. El ZIKV se encuentra señalado con flecha roja (Modificado de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019).

2. Transmisión del virus del Zika y la microcefalia

El ZIKV, hallado en el mono centinela (Dick et al., 1952), es un flavivirus transmitido principalmente a humanos por medio de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* infectado (Sikka et al., 2016); sin embargo, otras especies de mosquito dentro del género *Aedes* (*A. africanus*, *A. luteocephalus*, *A. furcifer*, and *A. taylori* y *A. albopictus*) tienen alto potencial de propagar el virus (Grard et al., 2014). Generalmente la infección por el ZIKV en adultos y niños produce una enfermedad febril leve y autolimitada (Raghunath, 2018).

En algunos casos recientes, se ha evidenciado el contagio del ZIKV en mujeres a través de contacto sexual con personas infectadas con la enfermedad (Musso et al., 2015; Rawal et al., 2016). Muchos de los últimos casos que han ido al alza, tienen una correlación con los casos de síndrome de Guillan Barré y un aumento en los recién nacidos con microcefalia (Figura 2).

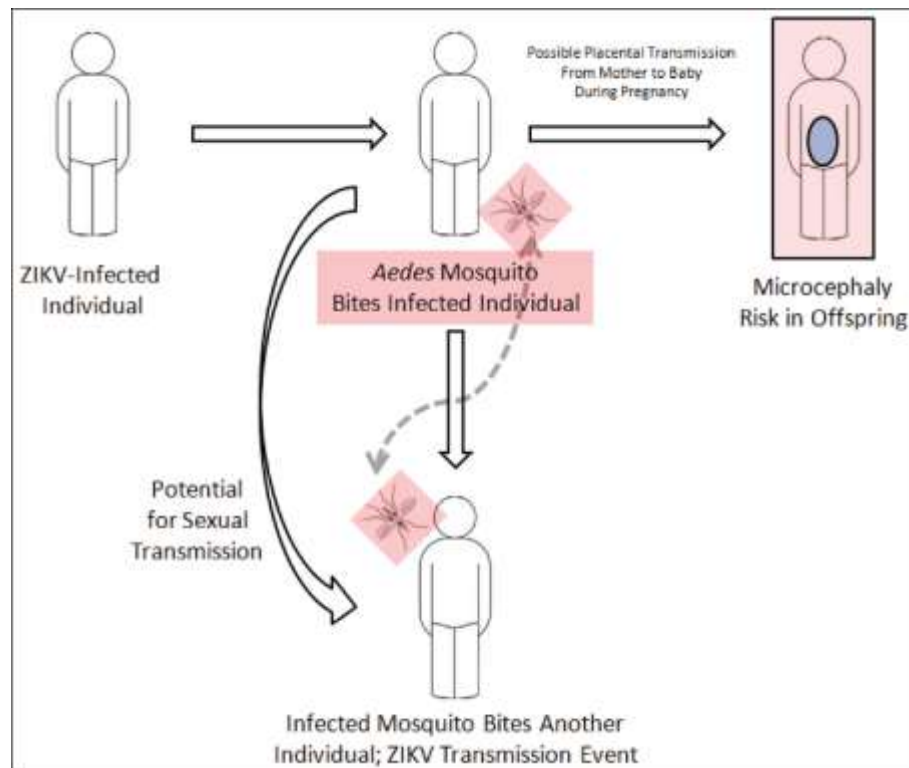


Figura 2. Representación esquemática de la propagación del ZIKV. La propagación del ZIKV puede ocurrir por transmisión sexual, por vía transplacentaria y a través de la picadura del mosquito *Aedes* (Sikka et al., 2016).

La microcefalia se caracteriza por ser un trastorno del desarrollo neurológico, con una reducción muy evidente del tamaño de la masa cerebral y la discapacidad intelectual causada por la poca proliferación celular, que disminuye debido a la muerte de las células troncales corticales y su progenie neuronal (Barbelanne & Tsang, 2014). Los análisis prenatales de placenta, líquido amniótico y sangre de recién nacidos con microcefalia resultaron positivos para el RNA del ZIKV. Además de esta evidencia en humanos, se ha reportado también en modelos animales, lo que indica una transmisión transplacentaria del ZIKV (Figura 3) (Cugola et al., 2016; Mysorekar & Diamond, 2016; Wen et al., 2017).

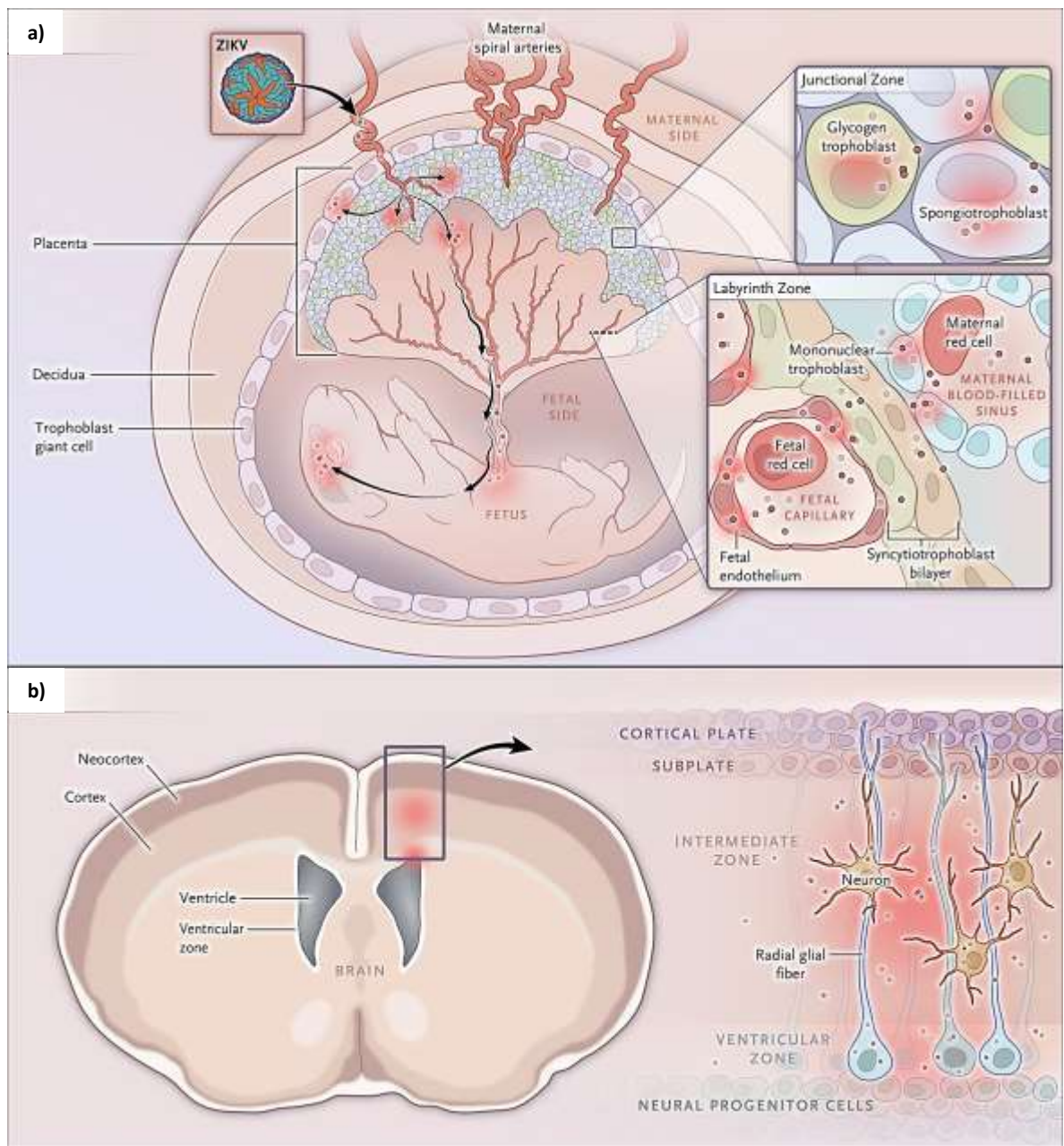


Figura 3. Modelo de infección del virus del ZIKV en feto y la inducción de microcefalia en ratón. a) La barrera placentaria se ve comprometida por la infección del ZIKV, permitiendo el paso del virus, desde la madre al feto, por medio de las células de la placenta y los capilares fetales. b) El ZIKV viaja por torrente sanguíneo e infecta las células la barrera hematoencefálica y posteriormente la corteza cerebral y ventricular, teniendo un tropismo por las células troncales neurales corticales y las células gliales radiales (Mysorekar & Diamond, 2016).

3. Tropismo del virus del Zika

Cada capa germinal (endodermo, ectodermo y mesodermo) da origen a diferentes tipos de tejidos (Figura 4), y los virus tienen tropismos específicos por ciertos tipos (Chappell & Dermody, 2015; McFadden et al., 2009).

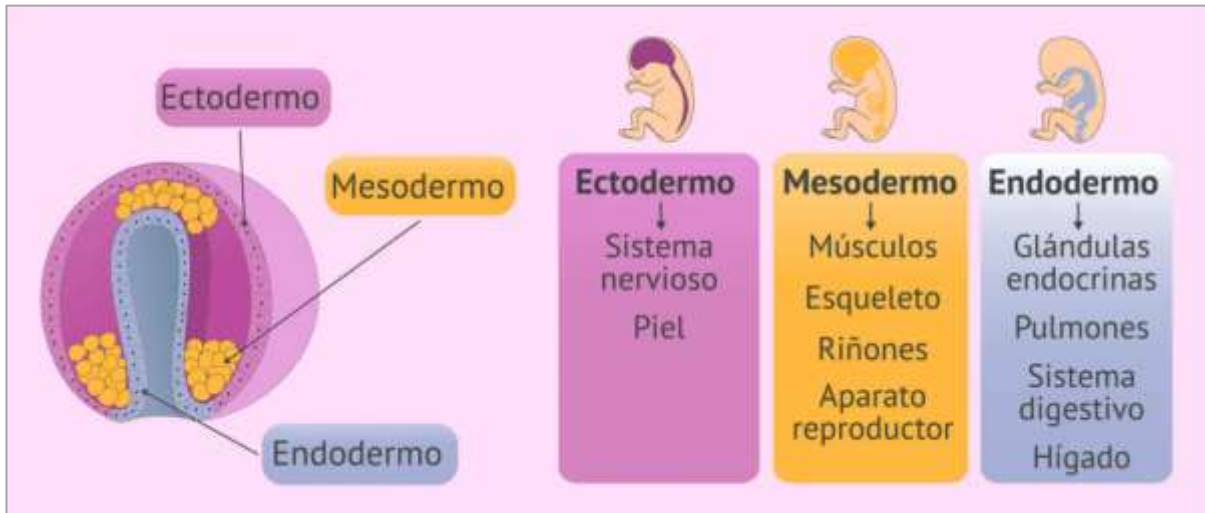


Figura 4. Origen de los distintos tipos de tejidos. Ectodermo: tejido embrionario que origina la epidermis, pelo y uñas, además de los sistemas nervioso central y periférico, los ojos y los oídos internos, células de la cresta neural y tejidos conjuntivos de la cabeza. Mesodermo: a partir de esta capa se originan todos los músculos esqueléticos, las células sanguíneas y el revestimiento de los vasos sanguíneos, además de las capas viscerales lisas. Endodermo: es el origen de los revestimientos epiteliales de las vías respiratorias y del tubo digestivo, incluidas las glándulas que desembocan en el tubo digestivo y las células glandulares de los órganos asociados como el hígado y el páncreas (Moore et al., 2009; Reproducción Asistida ORG, 2024).

Se ha reportado que el ZIKV tiene un tropismo a diferentes tipos de líneas celulares tumorales en cultivos *in vitro*, independientemente del origen embrionario (Tabla 1), además de poseer un mayor tropismo a tejido neural, ocular, testicular y placentario en ensayos *in vivo* (Shaily & Upadhy, 2019).

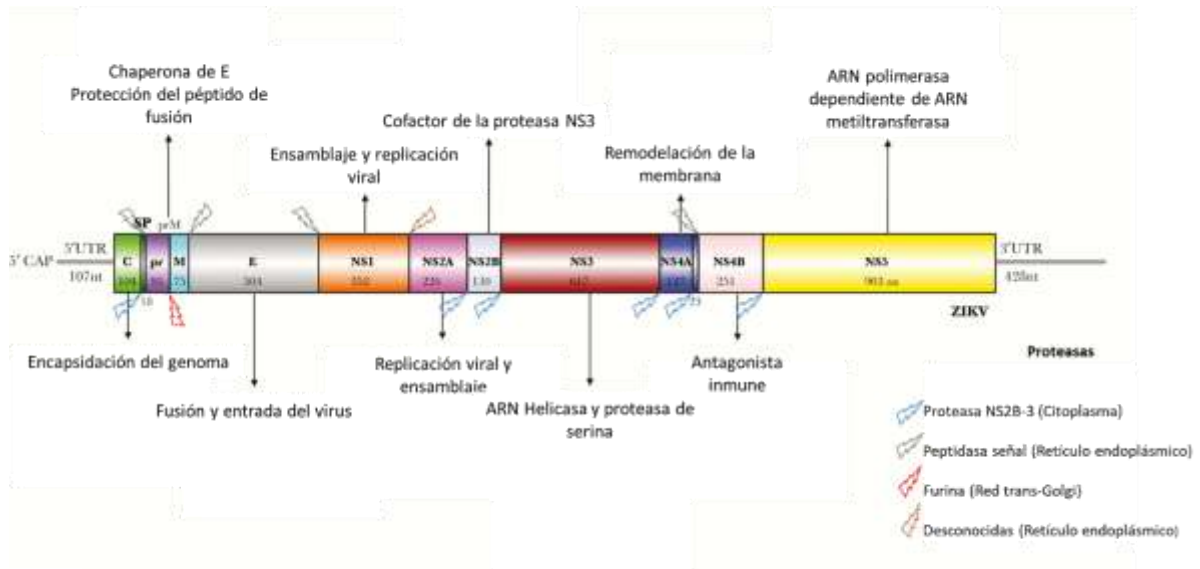
Ectodermo	Mesodermo	Endodermo	Otros	Células frecuentes para cultivo de ZIKA
ARPE19 - Línea celular epitelial pigmentada de retina humana	HEK-293 - Línea celular epitelial de riñón embrionario humano	A549 - Línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano	C6/36 - Línea celular derivada del mosquito <i>Aedes albopictus</i>	BHK-21 - Línea celular de fibroblastos de riñón de hámster bebé
HaCaT - Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados	COS7 - Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano	Caco-2 - Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano	MOS61 - Línea celular derivada del mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>	LLC- MK2 - Línea celular epitelial de riñón de mono Rhesus
JEG-3 - Línea celular de coriocarcinoma placentario humano	DF-1 - Línea celular de fibroblastos de embrión de pollo	Hep-2 - Línea celular de carcinoma epidermoide de laringe humano	AP-61 - Línea celular derivada del mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>	Vero E6 - Línea celular epitelial de riñón de mono verde africano
N29.1 - Línea celular de hipotálamo embrionario de ratón	HFL - Línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario humano	HepC2/C32A - Línea celular epitelial de carcinoma hepatocelular humano		
SF268 - Línea celular de astrocitoma anaplásico humano	PK-15 - Línea celular epitelial de riñón de cerdo	Huh7.5 - Línea celular de carcinoma hepatocelular humano		
SH-SY5Y - Línea celular de neuroblastoma de médula ósea humana	RD - Línea celular de rabdomiosarcoma humano	LNCaP - Línea celular de adenocarcinoma de próstata metastásico humano		

Tabla 1. Líneas celulares susceptibles a ZIKV. Independientemente del origen embrionario, el ZIKV es capaz de infectar distintos tipos de líneas celulares (Modificado de Shaily and Upadhya, 2019).

4. Características moleculares del virus del Zika

El genoma del ZIKV se caracteriza por ser un RNA monocatenario de 10.8 kb que se traduce en una sola poliproteína de 3423 aminoácidos de longitud (A. Wang et al., 2017). A partir de esta poliproteína se forman diferentes proteínas estructurales y no estructurales. Dentro de las proteínas estructurales se forman la proteína de la cápside (C), la proteína de membrana (M) generada a partir de su precursora de membrana (pr); y, por último, la proteína de envoltura (E). Dentro de las proteínas no estructurales se forman la NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 5a y b) (Shi & Gao, 2017).

a)



b)

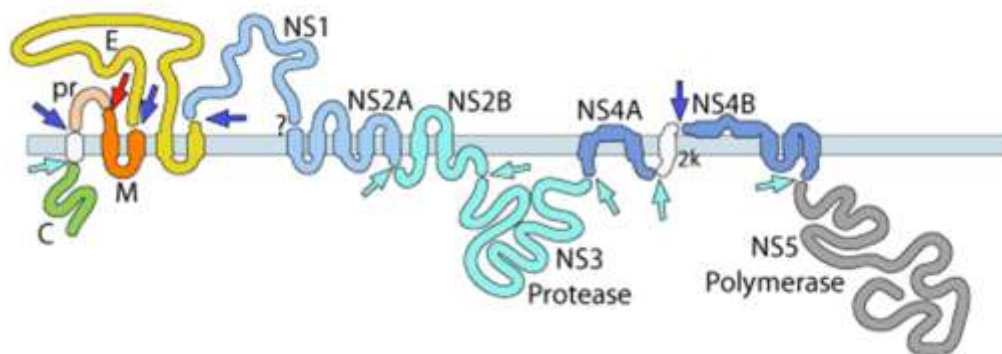


Figura 5. Estructura del genoma y poliproteína sintetizada del ZIKV. a) El RNA de cadena positiva contiene una secuencia de 10.8 kb que codifica una poliproteína de 3423 aa, esta se escinde en 10 proteínas individuales; de las cuales se generan las proteínas estructurales (C, pr, M y E), así como las no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) reguladas por proteasas del virus y del huésped. Las líneas grises muestran las regiones no traducidas del genoma viral (5' UTR y 3'UTR) (Modificado de Sirohi and Kuhn, 2017). b) Una vez sintetizada la poliproteína en el RE rugoso, esta se ancla a la membrana por sus diferentes dominios transmembranales para posteriormente ser escindida por las diferentes tipos de proteasas (Modificado de ViralZone, 2016).

Las proteínas estructurales, como su nombre lo indica, forman la estructura de la partícula viral. Mientras que las proteínas no estructurales participan en la replicación y el empaquetamiento del genoma (Figura 6). La generación de las proteínas estructurales, así como las no estructurales está regulada tanto por las proteasas virales, como del hospedero (Sirohi & Kuhn, 2017).

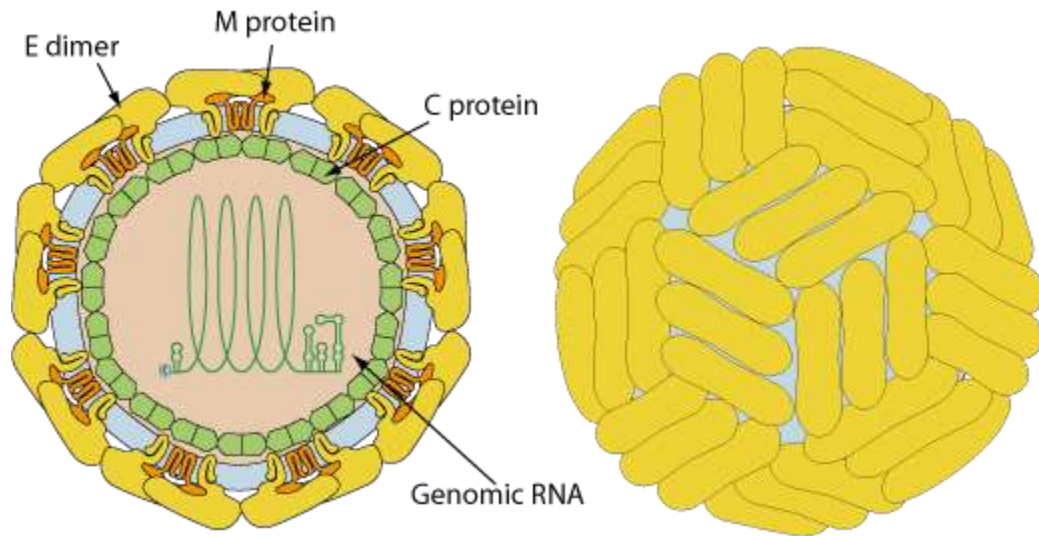


Figura 6. Estructura de la partícula viral. El ZIKV cuenta con una envoltura esférica de unos 50 nm, las proteínas de la superficie se encuentran en un arreglo icosaédrico, donde la proteína E de superficie se encuentra formando dímeros (Modificado de ViralZone, 2016).

5. Ciclo de vida del virus del Zika

El ZIKV como otros miembros de la familia flaviviridae entran a la célula por medio de endocitosis mediada por receptores. Evidencias recientes han mostrado que algunos de los candidatos de entrada para el ZIKV son los receptores de lectina de tipo C como DC-SIGN (del inglés dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), el receptor TIM-1 de la familia TIM (del inglés T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin) y los receptores TYRO3, AXL y MER de la familia TAM (de tipo tirosina-cinasa) (Lee & Shin, 2019). Una vez que el virus se encuentra dentro de los endosomas, el pH ácido desencadena la unión de la membrana viral con la del endosoma por medio de la trimerización de la proteína E, permitiendo así la liberación del material genómico al citoplasma (Hasan et al., 2018; Stiasny & Heinz, 2006). Cuando el RNA del virus se encuentra en el citoplasma, migra a las cercanías del RE para formar un complejo de bucle de replicación con ayuda de sus proteínas no estructurales, con ello comienza la replicación viral, y a su vez, el principio de la síntesis de las proteínas estructurales por el péptido señal, que terminaran en el interior del RE para el ensamblaje de la partícula viral, lo que conduce a la formación de partículas inmaduras no infecciosas con heterodímeros de la

chaperona prM unida a la proteína E en la envoltura de la partícula (Heinz & Stiasny, 2017; Mazeaud et al., 2018). Posteriormente, estas partículas inmaduras migran a través de la red trans-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés) hacia la superficie celular. Durante este trayecto, por el pH ácido presente en la red Golgi, la proteína E sufre un cambio conformacional de trímeros a dímeros de proteína E unidos a prM. Cuando alcanzan el espacio extracelular, el péptido pr es escindido de la proteína E por la endoproteasa furina celular, dejando a la proteína M anclada a la membrana, la cual permanece asociada al virión. De esta manera las partículas virales llegan a su estadio maduro con la capacidad de infectar nuevas células (Hasan et al., 2018; Yu et al., 2008, 2009) (Figura 7).

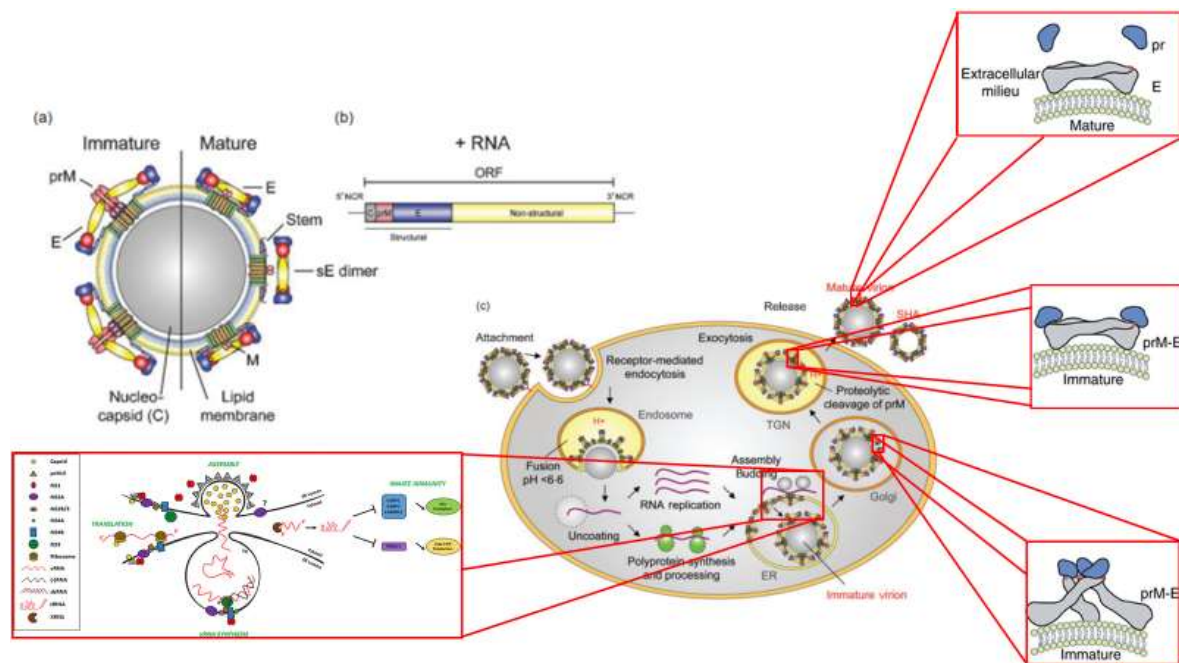


Figura 7. Ciclo viral del ZIKV. a) Estadios y cambios conformacionales del ZIKV durante su ciclo de vida. b) Genoma del ZIKV destacando con diferentes colores cada uno de sus componentes estructurales y no estructurales. c) Ciclo de vida del ZIKV (Modificado de Hasan et al., 2018; Mazeaud et al., 2018; Stiasny & Heinz, 2006).

6. Proteína E del virus del Zika

La proteína E del ZIKV es una glicoproteína de aproximadamente 55 kDa (kilodalton), compuesta por tres dominios. El dominio EDI tiene forma de barril β , se encuentra centralmente en el monómero proteico y actúa en procesos conformacionales durante el proceso de infección (Zhang et al., 2004). El dominio EDII tiene forma de dedo, permite la estabilidad de los dímeros y participa en la fusión de membranas y en la endocitosis en la infección a través del péptido de fusión, además de ser el dominio de unión a la chaperona prM (Dai et al., 2016; Sirohi & Kuhn, 2017). El dominio EDIII tiene forma de inmunoglobulina, la cual participa en el primer contacto entre el virus y la célula huésped (Valente & Moraes, s. f.; Watterson et al., 2012) (Figura 8).

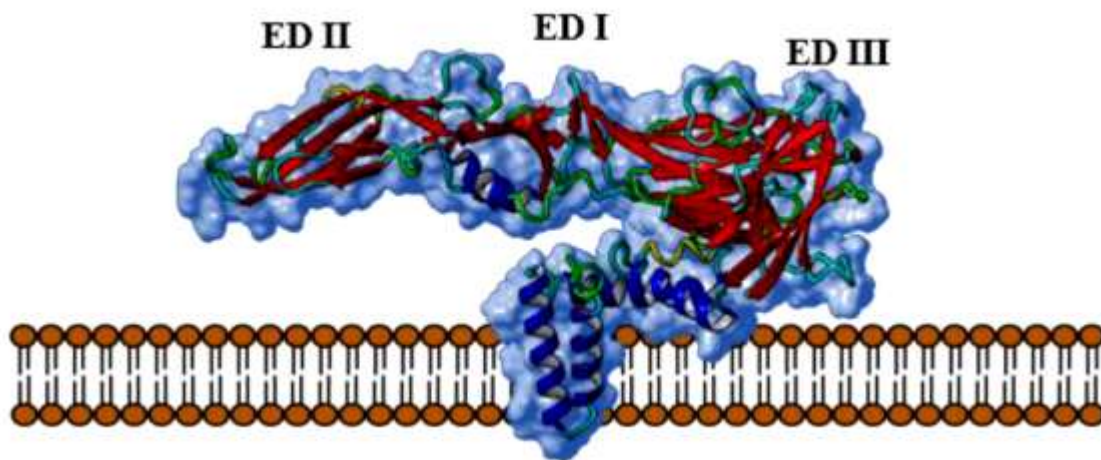


Figura 8. Proteína E del ZIKV. Cada monómero tiene tres dominios: el dominio amino terminal (EDI), que se encuentra centralmente en el monómero proteico, el dominio de dimerización (EDII) que contiene el péptido de fusión y el dominio similar a la inmunoglobulina carboxilo terminal (EDIII) (Quintero, 2019).

7. Receptores de entrada para el virus

Como se mencionó anteriormente en el ciclo de vida del virus, los receptores DC-SIGN, TIM-1, y los receptores TYRO3, AXL y MER de la familia TAM participan en la entrada del virus para distintos tipos de tejidos, como piel, sangre, placenta, retina testículos y cerebro (Tabla 2) (Lee and Shin, 2019).

Origen	Células blanco	Receptores potenciales de entrada
Piel	Queratinocitos epidérmicos	AXL, TIM-1, TYRO3
Piel	Fibroblastos dérmicos	AXL, TIM-1, TYRO3
Sangre	Células dendríticas	DC-SIGN
Sangre	Monocitos	Desconocidos
Placenta	Células de Hofbauer	AXL, TYRO3, TIM1
Placenta	Trofoblastos	AXL, TYRO3, TIM1
Placenta	Células endoteliales	AXL, TYRO3, TIM1
Cerebro	Células troncales neurales	AXL, TLR3
Cerebro	Astroцитos y células de la glía	AXL
Retina	Pericitos retinales	AXL
Retina	Células endoteliales de la microvasculatura retinal	AXL, TYRO3
Testículos	Espermatozoides	TYRO3
Testículos	Células de Sertoli	AXL

Tabla 2. Afinidad celular por el ZIKV a través de receptor. El ZIKV tiene capacidad de infectar diferentes tipos de células, debido a la interacción de sus moléculas de envoltura con diferentes tipos de receptores (Modificado de Lee & Shin, 2019).

Se ha observado un tropismo específico del ZIKV por el receptor AXL en células de la glía (Meertens et al., 2017), y en células troncales neurales (Nowakowski et al., 2016). Asimismo, se ha visto que no solo AXL, sino que también el receptor TYRO3 participa en la infección de células troncales neurales (Wells et al., 2016).

Zhu y colaboradores demostraron que el ZIKV tiene tropismo hacia células troncales de glioblastoma dependiente del eje SOX2- integrina $\alpha\beta 5$. SOX2 (del inglés SRY-Box Transcription Factor 2) es un factor de transcripción altamente activo en el desarrollo neuronal, que permite

la pluripotencialidad en células troncales de glioblastoma. Ellos demostraron que SOX2 regula la expresión de la integrina αv y que al bloquear a la integrina $\alpha v\beta 5$ se disminuye el tropismo hacia las células troncales de glioblastoma (Figura 9). De manera contrastante, observaron que al silenciar la expresión de AXL no se afecta el tropismo hacia las células de troncales de glioblastoma y que la expresión de AXL en muestras tumorales quirúrgicas de glioblastoma coincide con células que expresan GFAP (del inglés Glial Fibrillary acidic protein) y no expresan SOX2; lo que sugiere que AXL y SOX2 se expresan en diferentes poblaciones celulares tumorales (Zhu et al., 2017, 2020). Todo lo anterior indica que el ZIKV tiene un alto potencial para ser utilizado como una estrategia específica y eficiente contra tumores cerebrales, actuando como un virus oncolítico contra las células troncales de glioblastoma.

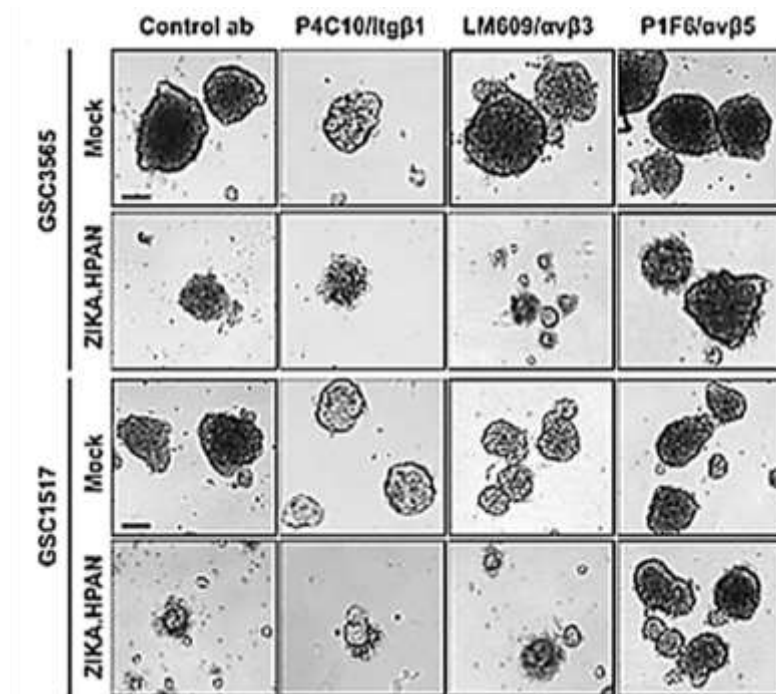


Figura 9. Modelo de interacción del ZIKV con el receptor integrina $\alpha v\beta 5$. 2 líneas de células troncales de glioblastoma tratados con inhibidores de las integrinas Itgβ1, αvβ3, αvβ5 y su control, además de infectados o no con ZIKA.HPAN (Zhu et al., 2020).

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que al transfectar células HEK-293 con un plásmido que codifica la proteína E del ZIKV de la cepa mexicana ZIKV/Homosapiens/MEX/2016/mex24, la proteína E es capaz de expresarse en la superficie de la membrana celular) (Quintero, 2019) (Figura 10).

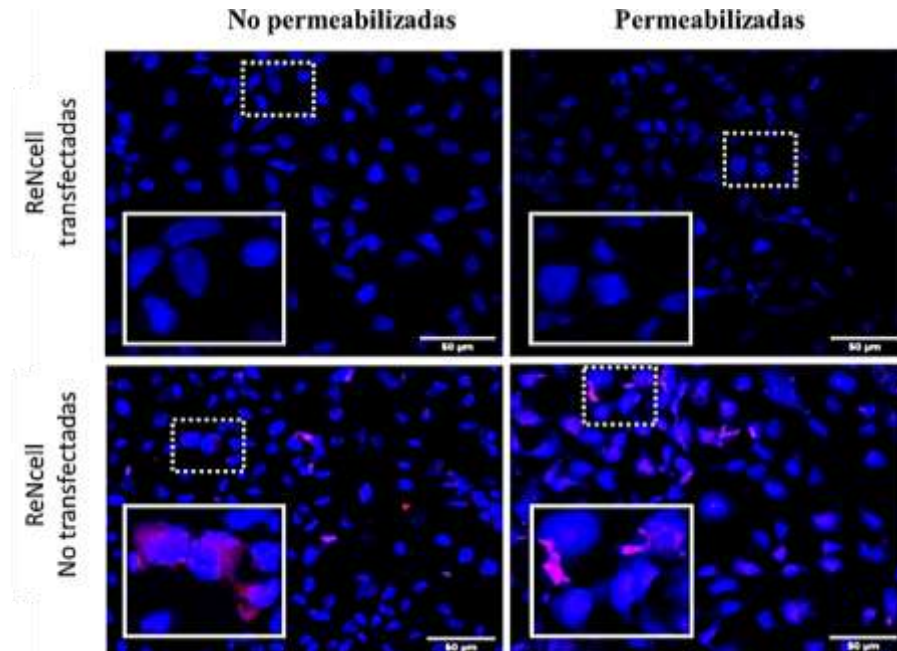


Figura 10. Expresión y localización subcelular de la proteína E del ZIKV. El plásmido que codifica la proteína E es capaz de expresarse en la superficie celular de ReN cells (Línea celular progenitora neural humana) transfectadas (Quintero, 2019).

Además, Floran en su tesis de maestría demostró que células HEK-293 transfectadas con dicho plásmido tienen la capacidad de unirse a células C6 (línea celular de glioma de rata) (Figura 11) (Floran, 2020). C6 es una línea celular de glioblastoma de rata la cual expresa el factor de transcripción SOX2 (Xu et al., 2019).

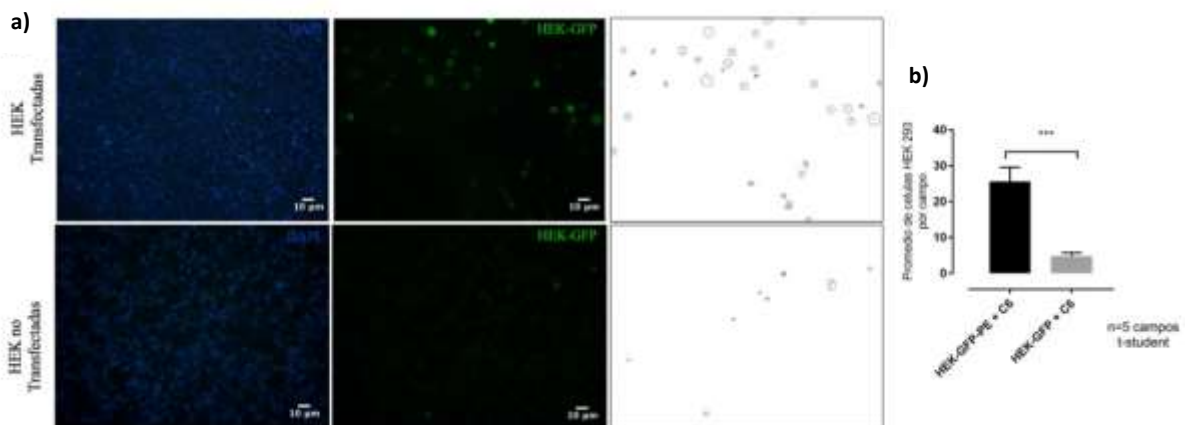


Figura 11. Capacidad de expresión y unión de la proteína E del ZIKV en modelos in vitro. a) y b) Células HEK-293 que expresan GFP (del inglés Green fluorescent protein) tienen la capacidad de unirse de manera significativa a la línea celular C6, a través de la transfección con la proteína E del ZIKV (Floran, 2020).

8. Retículo endoplásmico rugoso

El RE es un organelo de gran importancia para la célula, ya que participa en diferentes procesos como la respuesta inmunológica, la presentación de antígenos, actúa como reservorio de calcio en la célula, participa en la biosíntesis de lípidos y en él se lleva a cabo la síntesis de proteínas destinadas a la secreción y a otros organelos (J. Guan et al., 2017; Schwarz & Blower, 2016).

En este proyecto nos enfocamos en la síntesis y control de calidad de proteínas, por lo que es de gran importancia conocer los mecanismos involucrados en ella.

9. Síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico

La síntesis de proteínas en el RE comienza en el citoplasma; sin embargo, muchas de las proteínas que pasan por el RE para terminar en sus diferentes destinos inician en su extremo amino terminal con un péptido señal, el cual dirige la síntesis de la proteína a este organelo por medio de la unión a la partícula de reconocimiento de señal (SRP, por sus siglas en inglés). Para continuar con la translocación al lumen del RE se debe unir este complejo al translocon Sec61 (Karamyshev et al., 2020; Lange et al., 2016). Una vez dentro del lumen la síntesis de la proteína se termina, y en su caso ocurren los procesos necesarios para llevar a cabo el correcto plegamiento de las proteínas en su conformación tridimensional. Estos mecanismos pueden ser glicosilaciones llevadas a cabo por chaperonas como calnexina, calreticulina y oligosacaryltransferasas (Hirata & Kizuka, 2021; Schoberer et al., 2018), formación de enlaces disulfuro por las disulfuro isomerasas (Stevens & Argon, 1999) y la oligomerización de las proteínas para su activación, como la llevada a cabo por IRE1 α (del inglés inositol-requiring enzyme type 1 α) (Taouji et al., 2013).

10. Estrés del retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas

Existen diferentes factores que desestabilizan la proteostasis, la cual se caracteriza por mantener un equilibrio entre la síntesis de proteínas, su estructura, transporte y degradación (Wright & Plate, 2021). Entre estos factores se encuentran factores físicos, químicos y biológicos (Almanza et al., 2019; Koksai et al., 2021). Algunos ejemplos son las, los cambios bruscos de temperatura, la presencia de un ambiente oxidante (Almanza et al., 2019) o las infecciones virales (Choi & Song, 2020).

Todos estos factores son capaces de causar la presencia de proteínas mal plegadas, por mutaciones, o formación de enlaces aberrantes, a esto se le considera como el estrés de RE (Ghemrawi & Khair, 2020; Gould et al., 2007). Dependiendo de la exposición se puede clasificar como estrés agudo o crónico. El estrés agudo es relativamente breve, causando una desestabilización en la homeostasis proteica; por otro lado, el estrés crónico se considera como un factor permanente que causa la muerte celular sin embargo, la célula posee mecanismos capaces de resolver este problema (Ren et al., 2021; Wu & Kaufman, 2006).

Para reestablecer la homeostasis y permitir la sobrevivencia, las células han conservado evolutivamente un mecanismo denominado respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés). Este mecanismo consiste en tratar de reestablecer la homeostasis por medio de tres acciones: deteniendo la síntesis de proteínas (B.-J. Guan et al., 2014), sobreexpresando chaperonas encargadas de corregir el plegamiento incorrecto de las proteínas mal sintetizadas en el RE (Kwon et al., 2018) y si esto no es suficiente, lleva a cabo la degradación de proteínas mal plegadas (Chipurupalli et al., 2021).

La UPR está regulada principalmente por tres proteínas transmembranales del RE, ATF6 (del inglés activating transcription factor 6), PERK (del inglés protein kinase R (PKR) like endoplasmic reticulum kinase) e IRE1 α (Doultsinos et al., 2017). Cuando existe un mal plegamiento o

acumulación de proteínas en la luz de este organelo, la chaperona que lleva por nombre BIP/GRP78 (del inglés Binding immunoglobulin protein/Glucose regulated protein 78 kDa), llamada en este trabajo GRP78, se desprende de estas tres proteínas transmembranales para regular la homeostasis desbalanceada por estos fenómenos, corrigiendo el plegamiento o enviando a las proteínas a degradación (Ibrahim et al., 2019; Pinkaew et al., 2017).

PERK

Para reestablecer la homeostasis celular durante el estrés agudo, después del desprendimiento de GRP78, ocurre la auto-fosforilación y dimerización de PERK. A su vez, fosforila a eIF2 α (del inglés Eukaryotic translation initiation factor 2 α) en la serina 51 (S51) y con ello, se generan los gránulos de estrés (condensados de ribonucleoproteínas no envueltos de membrana, que contienen factores de iniciación de la traducción, mRNA (del inglés messenger RNA) no traducido, proteínas de unión al mRNA y componentes ribosómicos), generando la detención global de la síntesis de proteínas, inhibiendo el transporte ribosomal del iniciador de la traducción metionil-tRNA^{met} (Campos-Melo et al., 2021; Z. Liu et al., 2015).

Posteriormente, ocurre la activación y translocación al núcleo de ATF4 (del inglés Activating transcription factor 4) (Kusio-Kobialka et al., 2012), induciendo la sobreexpresión de GRP78, así mismo, la sobreexpresión de las proteínas que participan en la biosíntesis de aminoácidos, algunos moduladores metabólicos, antioxidantes, genes de la autofagia (C. M. Anderson & Macleod, 2019) y la sobreexpresión de CHOP (del inglés C/EBP homologous protein). Esta última induce el arresto celular y la muerte por apoptosis (Su & Kilberg, 2008).

IRE1 α

Como en el caso de PERK, la activación de IRE1 α ocurre por oligomerización, lo que causa la autofosforilación de la proteína. De esta manera IRE1 α actúa como una endoribonucleasa mediante el empalme no convencional del mRNA del factor de transcripción XBP1 (del inglés X-

Box Binding Protein 1) (Siwecka et al., 2021), generando un factor de transcripción activo que permite la síntesis de proteínas relacionadas con la membrana, lo cual aumenta la capacidad de plegamiento de proteínas por chaperonas y el aumento del tamaño del RE (Bartoszewska & Collawn, 2020). Durante esta última etapa, por medio del proceso llamado RIDD (del inglés regulated IRE1-dependent decay), se degrada el mRNA de las proteínas (Riaz et al., 2020). En el caso de estrés crónico, conduce a la muerte celular por apoptosis, ya sea degradando el mRNA de las proteínas clave en la UPR que mitigan el estrés (Gómora-García et al., 2021), o al interactuar con TRAF2 (del inglés TNF receptor associated factor 2), y con ASK1 (del inglés Apoptosis signal-regulating kinase 1). Una vez unidas, fosforilan a JNK (del inglés c-Jun N-terminal protein kinase), que regula a los miembros de la familia Bcl-2 (del inglés B-cell lymphoma 2) (Riaz et al., 2020).

ATF6

La tercera proteína transmembranal encargada de custodiar la homeostasis del RE es ATF6. Cuando GRP78 se desprende de ATF6, esta tiene un proceso de reducción monomérica, lo que permite el transporte del monómero del RE al aparato de Golgi. En el aparato de Golgi ocurre un proceso de escisión por medio de proteasas que liberan un fragmento citosólico denominado ATF6(N) (del inglés The cytosolic N-terminal domain of ATF6). Este actúa como un factor de transcripción que se transporta al núcleo para aumentar la síntesis de chaperonas y la expresión de genes implicados en la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD, por sus singlas en inglés). La respuesta ERAD permite corregir el estrés del RE, además de ayudar a la expansión del RE y, en su defecto, la expresión del gen proapoptótico CHOP (Kroeger et al., 2018, p. 6; Yang et al., 2020). Una proteína importante en todo este proceso es pXBP1(s) (del inglés, transcription factor protein (p) XBP1 spliced (S)), que actúa activando la transcripción de chaperonas que se dirigen al RE durante el estrés (Yoshida et al., 2006).

11. Infección del virus del Zika y su relación con la respuesta a proteínas mal plegadas

Estudios recientes han mostrado que al igual que otros flavivirus el ZIKV tiene una asociación directa en la activación de la UPR ya que su infección inhibe la formación de gránulos de estrés, mejorando la replicación viral (P. Anderson & Kedersha, 2002; Hou et al., 2017; Lebeau et al., 2022).

En mamíferos, los estadios tempranos del desarrollo de neuronas de la corteza cerebral (corticogénesis) se dan por un proceso llamado neurogénesis directa. Durante este proceso, las células progenitoras apicales presentan niveles elevados de la UPR, dando origen directamente a nuevas neuronas. El estadio tardío de la corticogénesis, se da por un proceso de neurogénesis indirecta. En este, las células progenitoras apicales presentan una disminución en los niveles de la UPR, permitiendo el desarrollo de células progenitoras basales y con ello la formación de nuevas neuronas.

En una infección por el ZIKV en mamíferos, la UPR se mantiene elevada, inhibiendo indirectamente la corticogénesis tardía, provocando la microcefalia (Alfano et al., 2019) (Figura 12).

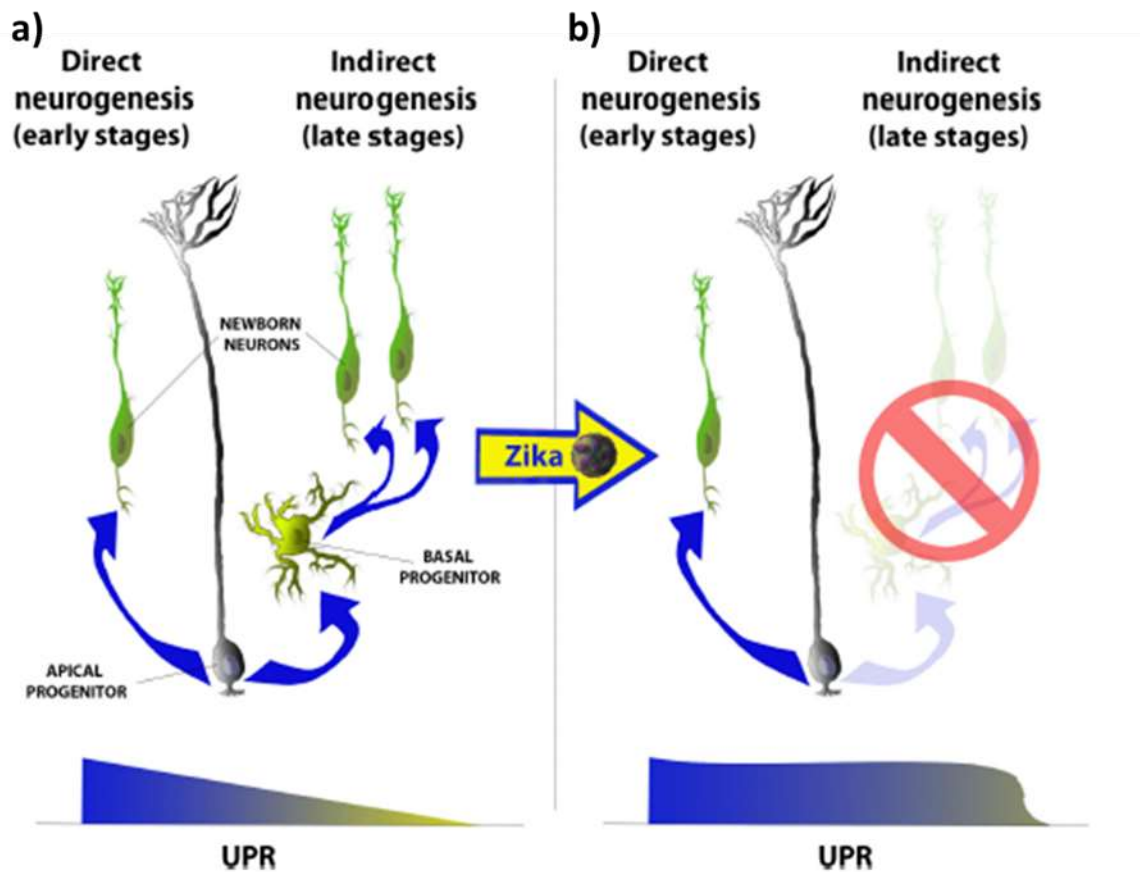


Figura 12. Neurogénesis directa e indirecta y la infección del ZIKV. a) Esquema representativo de la neurogénesis directa. En los mamíferos, la UPR se mantiene elevada en células progenitoras apicales, permitiendo así el desarrollo neuronal (lado izquierdo). Neurogénesis indirecta., En etapas posteriores del desarrollo embrionario la UPR disminuye en las células progenitoras apicales, permitiendo así el desarrollo de células progenitoras basales que darán lugar a células neuronales de la corteza cerebral (lado derecho). b) En presencia de la infección por el ZIKV, la UPR se mantiene elevada en las células progenitoras apicales, durante la neurogénesis indirecta, lo que lleva a la inhibición del desarrollo neuronal de la corteza cerebral, y con a la formación de microcefalia. (Modificado de Alfano et al., 2019).

12. La proteína E del virus del Zika y su papel en la inducción de estrés en RE

Durante la infección por el ZIKV, la proteína E del ZIKV interactúa con la chaperona GRP78, la cual tiene un papel en la internalización del virus, y la generación de partículas virales durante su replicación. Esto, incluso puede verse como un blanco antiviral, pues en la ausencia de esta chaperona disminuye la cantidad de partículas del ZIKV (Khongwichit et al., 2021; Royle et al., 2020).

En la actualidad, no existe evidencia de que la expresión aislada de la proteína E del ZIKV conduzca a la sobreexpresión de esta chaperona. Por lo tanto, es importante dilucidar el papel de las vías celulares implicadas en la síntesis y procesamiento de la proteína E del ZIKV, evaluar la homeostasis celular e identificar vectores apropiados para llevar a cabo estas terapias.

Debido al gran interés en el uso de la proteína E del ZIKV para dirigir diferentes terapias a células diana como a las células troncales de glioblastoma, este proyecto tiene como objetivo caracterizar la respuesta celular, en términos de estrés o muerte, derivadas de la expresión heteróloga de esta proteína *in vitro*. Esto se evaluó en las células HEK-293T, la cual se utiliza en la mayoría de estrategias terapéuticas y en la producción de proteínas recombinantes (Pulix et al., 2021). Además, también examinamos las respuestas de estrés en RE y apoptosis derivadas de la expresión de la proteína E del ZIKV en la línea U87-MG de glioblastoma humano.

VI) Justificación

El ZIKV es causante de la microcefalia, y posee tropismo específico a células troncales neurales.

Recientemente se ha observado que la infección con este virus causa estrés en RE, por lo que en este trabajo buscamos evaluar si la expresión heteróloga únicamente de la proteína E del ZIKV despierta esta respuesta en las células HEK-293T, las cuales son ampliamente utilizadas para la creación de vectores virales y terapia celular.

VII) Hipótesis

La expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV no induce la respuesta de estrés en RE ni muerte celular.

VIII) Objetivo General

Analizar la expresión, localización subcelular de la proteína E recombinante del ZIKV y la respuesta celular inducida por esta proteína en un modelo *in vitro*.

IX) Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar el plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV.
- 2.- Evaluar la inducción de muerte celular y su correlación con la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV.
- 3.- Analizar la regulación del estrés de RE tras la transfección del plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV.
- 4.- Analizar la localización subcelular de la proteína E del ZIKV.

X) Materiales y métodos

1. Vector de expresión

El ZIKV (ZIKV/Homosapiens/MEX/2016/mex24) se propagó en células de mosquito C6/36. El RNA viral genómico se purificó a partir de sobrenadantes de células C6/36 infectadas utilizando el kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, cat# 52906), siguiendo el protocolo del fabricante, en una campana de bioseguridad de tipo II. Posteriormente, el genoma purificado se trató con DNAasa I (desoxirribonucleasa I) (Invitrogen, cat# 18068015) y se sintetizó cDNA (del inglés complementary deoxyribonucleic acid) viral usando cebadores aleatorios (50 μ M) y transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, cat# 10777019) como se describió anteriormente (Lara-Lozano et al., 2023).

El gen que codifica la proteína del virus del Zika se amplificó mediante PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) de punto final. Se introdujo una secuencia Kozak con el codón de metionina en la región 5' con el primer 5': 5'-TACCACCATGATCAGGTGCATAGGAGTCAGC-3'. Se incorporaron un codón de paro y la secuencia de reconocimiento XhoI en la región 3' usando el primer 3': 5'-ACTCGAGCTAAGCAGAGACGGCTGTGGAT-3'. Brevemente, para la reacción de PCR, se utilizaron 0.6 μ L de polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, cat# 12344024), 5 μ L del buffer 10x, 5 μ L de DMSO (del inglés dimethyl sulfoxide), 0.8 μ L de cada primer (10 μ M), 2 μ L de cDNA viral y se utilizó agua grado biología molecular hasta alcanzar un volumen total de 50 μ L. Las condiciones del termociclador consistieron en un paso inicial a 94°C (grados Celsius) durante 5 min, seguido de 40 ciclos de tres pasos a 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 68°C durante 60 s, con un paso final a 68°C durante 5 min.

El amplicón de 1549 pb (pares de bases) resultante se clonó en el vector pCR4 usando tecnología TOPO-Blunt (Invitrogen, cat# 450031) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el transgén de la proteína E (E-ZIKA) se subclonó en el plásmido pcDNA 3.0 mediante restricción con EcoRI (NEB, cat# R0101S) y XhoI (NEB, cat# R0146S), seguido de la

ligación con ligasa T4 (ThermoFisher, cat# #15224017). El producto final se secuenció utilizando el método de Sanger y la secuencia resultante confirmó el 100% de identidad con el gen E del ZIKV del aislado de: ZIKV/Homosapiens/MEX/2016/mex24 (GenBank: MF801402). La proteína E del ZIKV clonada tiene una identidad de nucleótidos del 99,85% y una identidad de aminoácidos del 100% con la proteína E del ZIKV de la cepa brasileña (Paraiba 2015) KY558989.1, cepa directamente relacionada con casos de microcefalia en Brasil (Krow-Lucal et al., 2018; Melo et al., 2016). Se utilizó un plásmido pcDNA 3.0 vacío como control de transfección (EMPTY).

Las bacterias de la cepa STBL3 se transformaron con el plásmido E-ZIKA que se clonó en el vector pcDNA 3.0 y se cultivó en 200 ml del medio de cultivo Luria-Bertani, y de igual manera para el vector EMPTY. Los cultivos se incubaron durante la noche a 37 °C a 150 rpm (revoluciones por minuto). Para obtener los plásmidos de DNA (del inglés deoxyribonucleic acid) purificados, se utilizó el kit Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep (Invitrogen, cat# K210017) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el DNA purificado se cuantificó utilizando el NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, cat: ND-ONE) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

2. Líneas celulares

La línea celular HEK293T, derivada de riñón embrionario humano (ATCC, cat# CRL-3216), y la línea celular U-87 MG, una línea celular de glioma humano (ATCC, cat# HTB-14) se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, alto en glucosa) (GIBCO, cat# 12800-017) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco, cat# 16000-044), L-glutamina 1 mM (Sigma-Aldrich, cat# 35050061) y 100 U/mL de penicilina/100 µg (microgramos) de estreptomina (Gibco, cat# 15140-122). Se cultivaron células del mosquito *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC, cat# CRL-1660) en EMEM (del inglés Eagle's minimum essential medium modified), suplementado con SFB al 10 % y penicilina-estreptomina 100 U/mL. Los cultivos de

células de mamíferos y mosquitos se trabajaron en una campana de bioseguridad de tipo II, y se mantuvieron a 37°C y 28°C respectivamente, en una atmósfera con un 5% de CO₂.

3. Transfecciones celulares

Para optimizar la expresión heteróloga de la proteína de interés, se realizó una curva de transfección de DNA utilizando 4.5×10^5 células HEK-293T sembradas en placas de 6 pocillos con 0, 5, 1, 2, 3, 4 y 5 µg del plásmido E-ZIKA. En células U-87 MG se utilizaron 2, 3 y 4 µg del plásmido E-ZIKA a las 48 horas (h) o 3 y 4 µg durante 72 h. Posteriormente se utilizaron 2 µg de DNA para todos los experimentos. Se utilizaron células no transfectadas como control negativo (NEG). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen, cat# L3000-015) con una relación lipofectamina/DNA de 2:1 según las instrucciones del fabricante. Después de 48 h de incubación, las células se procesaron para su análisis.

4. Extracción de proteínas

Después de 48-72 h de incubación, las células se lisaron con 60 µl del buffer de lisis (Tris-Cl 50 mM, pH 8.0, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0.5 M, NP40 al 0.5 %, Tritón al 0.5 %, NaCl 150 mM), suplementado con el inhibidor de proteasas Complete (Roche, cat# 11697498001). Se utilizó el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (del inglés bicinchoninic acid) (Thermo Fisher Scientific Inc, cat# 23223) para la cuantificación de proteínas de los extractos celulares en el espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

5. Ensayos de Inmunotransferencia

Para el análisis de western blot, se administró Brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich, cat# B7651) a las células durante 24 h (3 µg/mL) para inducir el estrés de RE y ser utilizadas como control positivo. Después de la cuantificación de proteínas de los cultivos celulares tratados, se

cargaron 50 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 12% o al 15% para la detección de las proteínas de interés. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (del inglés Polyvinylidene fluoride) (Bio-Rad, cat# 1620177) y se bloquearon con leche descremada al 10%. Para la detección de las proteínas de interés, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-ZIKV E (1:1000, GeneTex, cat# GTX133314), anti-GRP78 (1:1000, R&D Systems, cat# MAB4846), anti-calreticulina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, cat# sc-373863), anti-caspasa 3 (1:200, Cell Signaling, cat# 9662), anti-LC3B (1:1000, GeneTex, cat# GTX82986) se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron usando buffer salino con Tris, Tween 1X (TBST) y se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón HRP (del inglés enzyme horseradish peroxidase) (1:2000, Life technologies, cat# 626520) o anti-conejo HRP (1:2000, Life technologies, cat# 626520). 2000, Invitrogen, cat# 629520) durante 1 h. Luego, las membranas se lavaron y revelaron con Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Inc, cat# NEL104001EA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó stripping y bloqueo para añadir el anticuerpo anti-β-actina conjugada con HRP (1:40000, Sigma Aldrich, cat# A3854) durante 10 minutos para posteriormente ser lavadas y reveladas. Las membranas se fotodocumentaron utilizando el instrumento FUSION SOLO S (Vilver) y el análisis de densitometría se realizó utilizando el software ImageJ® (NIH).

6. Inmunofluorescencia

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos, donde previamente se añadieron cinco cubreobjetos estériles por pozo. Para determinar la presencia de proteínas virales e intracelulares, las células se fijaron y permeabilizaron, mientras que para la detección de proteínas de la membrana celular se utilizaron células no permeabilizadas. Posteriormente, las células se lavaron entre cada paso con PBS (del inglés phosphate buffer saline) y se añadió una solución de bloqueo al 1% de BSA (del inglés bovine serum albumin) (Jackson ImmunoResearch, cat# 001-000-162) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se agregaron anticuerpos primarios contra las proteínas de interés durante la noche a 4°C. Para la detección de proteínas citoplasmáticas y de RE, se utilizaron paraformaldehído al 4% y Tritón X-100 al

0.2% para fijar y permeabilizar las células. Posteriormente, las células se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-14-3-3 (1-100, Abcam, cat# ab14121-250) y anti-ZIKV E (1-300, GeneTex, cat# GTX133314) para la detección citoplasmática, o anti-GRP78 conjugado con Alexa 488 (1-200, Thermo Fisher Scientific, AF488 C38) y anti-calreticulina (1-200, Santa Cruz Biotechnology, cat# sc-373863) para la detección en ER. Para la co-detección de β -actina y la proteína E del ZIKV, se usó metanol-acetona para fijar y se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0.2%. Luego, las células se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti- β -actina (1-100, Invitrogen, cat# MA5-15739) y anti-ZIKV E (1-300, GeneTex, cat# GTX133314).

Para la detección de proteínas de la membrana celular, se utilizó paraformaldehído al 4% como fijador y no se realizó ninguna etapa de permeabilización. Luego, las células se incubaron con anticuerpos primarios contra β -catenina (1-100, Invitrogen, cat# 138400) y contra la proteína E del ZIKV (1-300, GeneTex, cat# GTX133314). Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y posteriormente se añadieron anticuerpos secundarios, dependiendo de la combinación de anticuerpos y su origen. Se usaron ALEXA 488 (Invitrogen, cat # A11001) y ALEXA 594 (Invitrogen, cat # A21203) para la detección anti-ratón. Se usaron ALEXA 488 (Invitrogen, cat# A11008) y ALEXA 555 (Invitrogen, cat# A21428) para la detección anti-conejo. Todos los anticuerpos secundarios se dejaron incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron y se montaron con DAPI (del inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole) VECTASHIELD (Vector laboratories, cat# 94010) en portaobjetos para su posterior análisis utilizando un microscopio confocal láser Leica TCS SP8 con un objetivo de aceite Leica HC PL APO CS2 63x/1.40 con un tamaño de orificio de 1 AU, compensación inteligente del 0.2 % y tiempo de permanencia de píxeles de 600 ns. Las imágenes fueron procesadas usando el software ImageJ® (NIH) y analizadas usando el coeficiente de correlación de Pearson, por medio del plugin Coloc2, que mide la correlación de intensidad de píxeles, con los siguientes criterios: entre 0.5 y 1: correlación fuerte, entre 0.3 y 0.5: correlación moderada, entre 0.1 y 0.29: correlación débil, entre 0 y 0.1: correlación inexistente y entre -1 y 0: correlación negativa. También se realizó el método de line scan, que mide la fluorescencia relativa mediante el trazo lineal de una flecha a través de la distancia, en los diferentes canales.

7. Ensayo de azul de tripano

Después del tratamiento y las incubaciones de 24, 48 y 72 h, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Posteriormente, se agregaron 10 μ L de la muestra celular y se resuspendieron en 90 μ L de azul de tripano y se mezclaron suavemente. Se vertieron 10 μ L de la suspensión en una cámara de Neubauer (MarienFeld, cat# 0610030) por duplicado para realizar la cuantificación con la siguiente fórmula: $\# \text{células totales} / 8 = \# (100,000) = \# \text{células} / \text{mL}$. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de las células vivas (sin teñir) y de las células muertas (teñidas).

8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con los softwares GraphPad Prism versión 8.0.2 (263) e IBM SPSS versión 25. Se analizó la normalidad de todas las muestras con la prueba Shapiro-Wilk; además, aquellas muestras utilizadas para la prueba ANOVA pasaron la prueba de igualdad de varianzas (prueba de Levene, $p \geq 0.05$). Posteriormente se realizaron la prueba ANOVA de una vía, la prueba ANOVA de 2 vías, la prueba t no pareada y el análisis *post-hoc* de Tukey (para muestras paramétricas). Para el análisis no paramétrico se emplearon las pruebas de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p \leq 0.05$. Todos los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado.

XI) Resultados

1. El plásmido pcDNA 3.0 integró el gen que codifica a la proteína E del virus del Zika

A partir del vector pcDNA 3 con un tamaño de 5446 pb (Empty) (Figura 13a), se generó *in silico* el diseño del plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV con un tamaño total de 6950 pb (E-ZIKA) (Figura 13b). Posteriormente se caracterizó la construcción *in silico* e *in vitro*, por medio de digestión con las enzimas *Eco RI* y *XbaI*, confirmando la integración del gen que codifica a la proteína E del ZIKV, por medio de la liberación del fragmento de 1549 pb del gen que codifica la proteína E del ZIKV, observado en el primer carril del plásmido E-ZIKA; A su vez, se observa el DNA linealizado de Empty *in silico* e *in vivo*, y las conformaciones del DNA laxo y superenrollado en ausencia de las enzimas de restricción *in vitro* (Figura 13c y d).

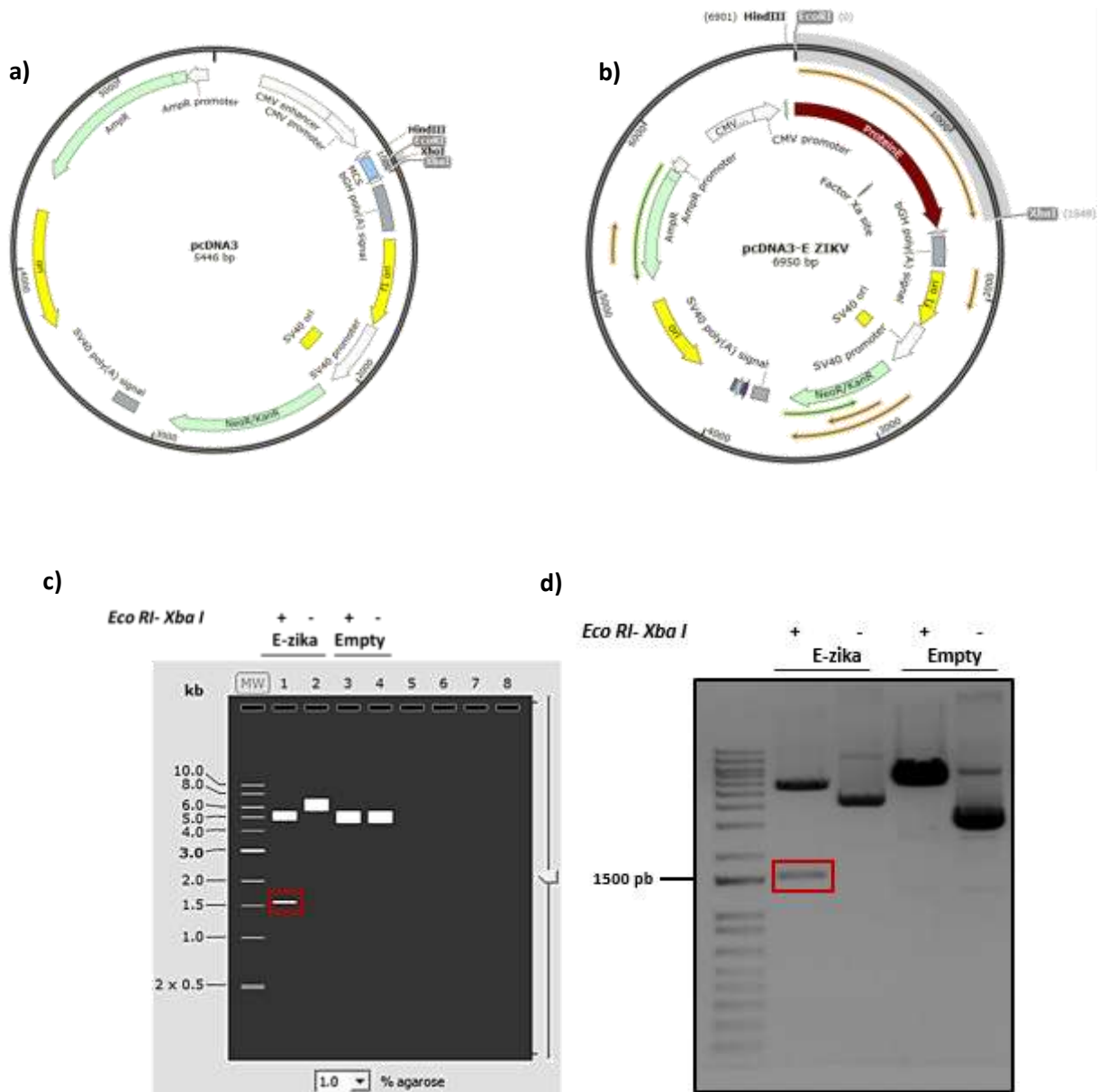


Figura 13. Caracterización del plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV. a) Mapa del plásmido pcDNA 3.0. b) Mapa del plásmido pcDNA 3.0-E ZIKV, el cual contiene el gen que codifica a la proteína E del ZIKV. c) Electroforesis in silico de los plásmidos E-ZIKA y Empty, en presencia y ausencia de las enzimas de restricción Eco RI y Xba I. d) Electroforesis in vitro de los plásmidos E-zika y Empty, en presencia y ausencia de las enzimas de restricción Eco RI y Xba I.

2. La proteína E del virus del Zika se expresa eficientemente en células transfectadas

Se generó una curva de concentración de DNA en células HEK-293T para determinar la concentración óptima para transfectar el vector plasmídico E-ZIKA. Los resultados mostraron una alta expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV usando 2, 3 o 4 μg de plásmido, según lo determinado mediante análisis de western blot (Figura 14a). Para optimizar la expresión de la proteína E del ZIKV en células U-87 MG, se transfectaron con 2, 3 y 4 μg de DNA y se incubaron por un período de 48 h; además también se utilizaron 3 y 4 μg con un tiempo de incubación de 72 h. Se utilizaron 2 μg de DNA para la inmunofluorescencia y los experimentos posteriores en ambas líneas celulares (Figura 14b y Figura suplementaria 1).

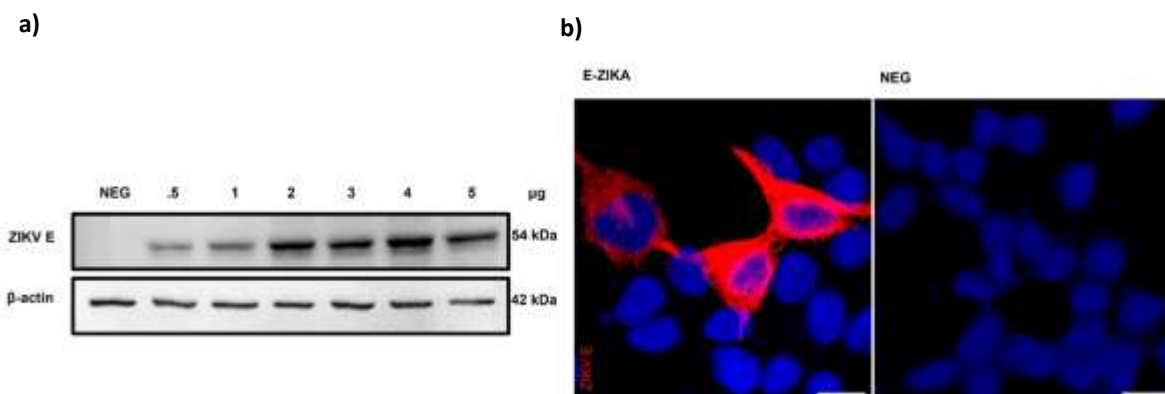


Figura 14. Caracterización de la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV en células transfectadas. a) análisis de western blot de la proteína E con diferentes concentraciones de DNA y células transfectadas como control negativo (NEG). La expresión de la proteína E del ZIKV se normalizó con β -actina como control de carga. b) La inmunofluorescencia contra la proteína E de ZIKV (detección en rojo) representa la eficiencia de transfección del número total de células por campo con DAPI (azul). Se utilizaron células no transfectadas (NEG) como control. Barra de escala de 15 μm .

3. La expresión heteróloga de la proteína E del virus del Zika no provoca muerte celular

Después de observar que la proteína E del ZIKV se expresaba en células transfectadas, se realizaron ensayos de viabilidad celular para detectar si la expresión de la proteína E del ZIKV inducía la muerte de las células HEK-293T. Las células se recolectaron en diferentes momentos después de la transfección con 2 μg de plásmido. Como control se utilizaron células tratadas

con BFA (un metabolito fúngico que en células de mamíferos bloquea el transporte vesicular del sistema ER-Golgi (Kano et al., 2000), estimulando el estrés celular y activando la UPR (Menu et al., 2012)). Los datos muestran que sólo las células tratadas con BFA presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular después del tratamiento, en comparación con las células transfectadas con el plásmido que codifica la proteína E del ZIKV. De hecho, no se observaron diferencias en la viabilidad celular entre las células transfectadas con el plásmido de la proteína E del ZIKV, el plásmido EMPTY, las células tratadas únicamente con Lipofectamina o las células sin tratamiento (NEG) en ningún momento posterior a la transfección (Figura 15). En nuestro grupo de trabajo, previamente se ha utilizado el plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV para las transfecciones transitorias, y se ha visto que las células transfectadas como HEK-293 y ReN cells, que expresan esta proteína, sobreviven adecuadamente (Floran, 2020; Quintero, 2019). Las transfecciones fueron estables ya que esas células se usaron para otros ensayos, incluyendo bindig. Por tanto, estos resultados indican que la expresión de la proteína ZIKV E no provoca la muerte celular.

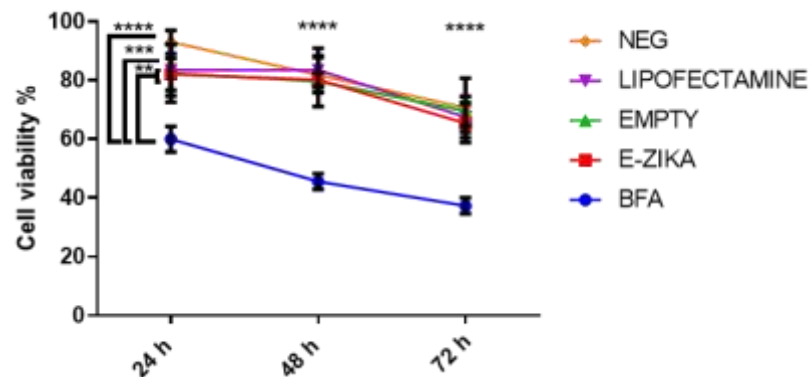


Figura 15. Viabilidad celular a lo largo del tiempo utilizando azul tripán. Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, ANOVA de 2 vías y post hoc de Tukey. a) BFA versus E-ZIKA, y EMPTY a 24 h (** $p \leq 0,01$). b) BFA versus LIPOFECTAMINE a 24 h (** $p \leq 0,005$). c) BFA versus NEG a 24 h y E-ZIKA, LIPOFECTAMINE y NEG a 48 y 72 h (**** $p \leq 0,001$).

4. La expresión heteróloga de la proteína E del virus del Zika no induce una respuesta al estrés del RE

Dado que la proteína E del ZIKV interactúa con GRP78 durante las infecciones virales y la respuesta UPR se desencadena en las células infectadas (Alfano et al., 2019; Khongwichit et al., 2021; Royle et al., 2020), a continuación examinamos si la expresión de la proteína E del ZIKV *per se*, sin el contexto de una infección viral, era capaz de inducir este tipo de respuesta. Para ello, se analizaron los niveles de GRP78 y calreticulina (CRT) mediante análisis de western blot en células transfectadas que expresan la proteína E del ZIKV, utilizando BFA como control positivo. GRP78 se utilizó como marcador del estrés de RE y la CRT se analizó como una proteína residente en el RE no asociada a estrés (H. Liu et al., 1997; Pieren et al., 2005; Uvarov & Mesaeli, 2008). Todos los datos se normalizaron con β -actina como control de carga (Figura 16a). Los resultados indicaron que la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV por sí misma no indujo la sobreexpresión de GRP78, mientras que se observó un claro aumento en la expresión de GRP78 solo en las células tratadas con BFA (Figura 16b). No se observaron cambios significativos en la expresión de CRT con ningún tratamiento (Figura 16c).

Una vez confirmado que el estrés de RE no es activado por la expresión de la proteína E, decidimos analizar si la proteína E del ZIKV activa la muerte celular analizando el patrón de expresión de caspasa 3 (Beroske et al., 2021). Estos resultados muestran que no hubo detección de la caspasa 3 escindida de 17 kDa (la forma activa) en células que expresan la proteína E del ZIKV. Los resultados sugieren que la proteína E del ZIKV no activa la vía de muerte celular apoptótica (Figura 16d). Finalmente, se determinó el patrón de expresión de LC3-II, el cual se utilizó como indicador de autofagia. La proteína LC3-I (del inglés Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) presente en citoplasma, se une con fosfatidiletanolamina, para formar la LC3-II, el cual se integra a las membranas autofagosomales. Después los autofagosomas se fusionan a los lisosomas para formar autolisosomas, degradando los componentes intra autofagosomales y con ello LC3-II. El ciclo de este marcador permite analizar la actividad autofágica (Tanida et al., 2008). Los resultados mostraron una activación significativa de la autofagia sólo en células tratadas con BFA en comparación con células no tratadas, resultados similares obtenidos en

otros trabajos (D. L. Chen et al., 2015; Runwal et al., 2019). Sin embargo, no se observó una activación de autofagia significativa en células transfectadas con plásmidos E-ZIKA o EMPTY, o tratadas únicamente con Lipofectamina (LP). Estos resultados indican que la expresión de la proteína E del ZIKV por sí sola no da como resultado la activación del estrés de RE, ni de las vías de apoptosis o autofagia (Figura 16a y e). Es de destacar que resultados similares indican que no se indujo el estrés de RE en las células de glioma U-87 MG que expresan la proteína E del ZIKV recombinante, a pesar de que estas células respondieron fácilmente cuando se trataron con BFA (Figura suplementaria 2).

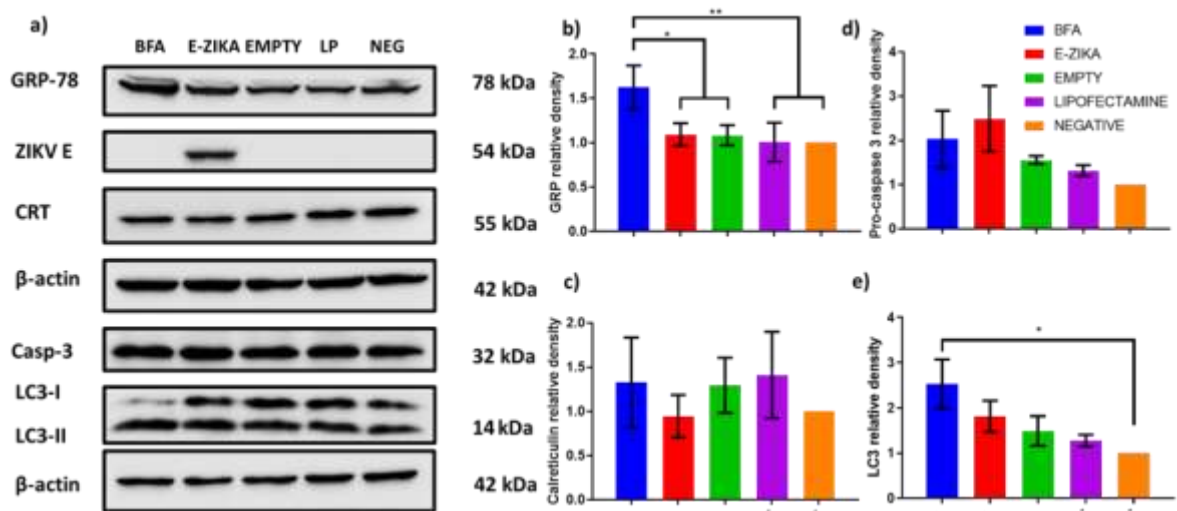


Figura 16. Detección de los biomarcadores del estrés en RE y su correlación con la proteína E del ZIKV. a) Análisis de la expresión representativa de los biomarcadores de interés. b) La expresión relativa de la proteína GRP78 depende del tratamiento de interés. BFA mostró una diferencia significativa en comparación con los otros tratamientos. c) Expresión relativa de CRT bajo los diferentes tratamientos de interés. CRT no mostró diferencias significativas entre los tratamientos de interés. d) Expresión relativa de pro-caspasa 3 (porque no hubo escisión de caspasa 3 en ninguno de los tratamientos de interés). No hubo diferencias significativas en la acumulación de caspasa inactiva (procaspasa 3). e) Expresión relativa de LC3-II. Las células tratadas con BFA mostraron una diferencia significativa en comparación con las células no tratadas (NEGATIVE). La expresión de β-actina se utilizó como control de referencia. Se realizaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, ANOVA unidireccional (no paramétrico o mixto), la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para LC3-II y el análisis post hoc de Tukey para GRP78, pro-caspasa 3 y CRT. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

5. La proteína E del virus del Zika se dirige al RE

Tras observar que la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV no afecta la homeostasis celular, decidimos analizar la localización subcelular de esta proteína. Con este fin, la co-detección de la proteína E del ZIKV con la chaperona CRT residente del RE se realizó mediante inmunofluorescencia en células sometidas a los diferentes tratamientos (Figura 17a). El análisis del coeficiente de correlación de Pearson indicó una fuerte co-localización de la proteína E del ZIKV y CRT (Figura 17b). Para complementar estos resultados, se realizó un análisis de line scan. Estos datos corroboran la localización subcelular de la proteína E del ZIKV en el RE, lo que muestra que las unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) de la expresión de la proteína E del ZIKV en toda la célula se superponen con la CRT (Figura 17c). Solo se observó la señal CRT en las células no transfectadas utilizadas como control (Figura 17d).

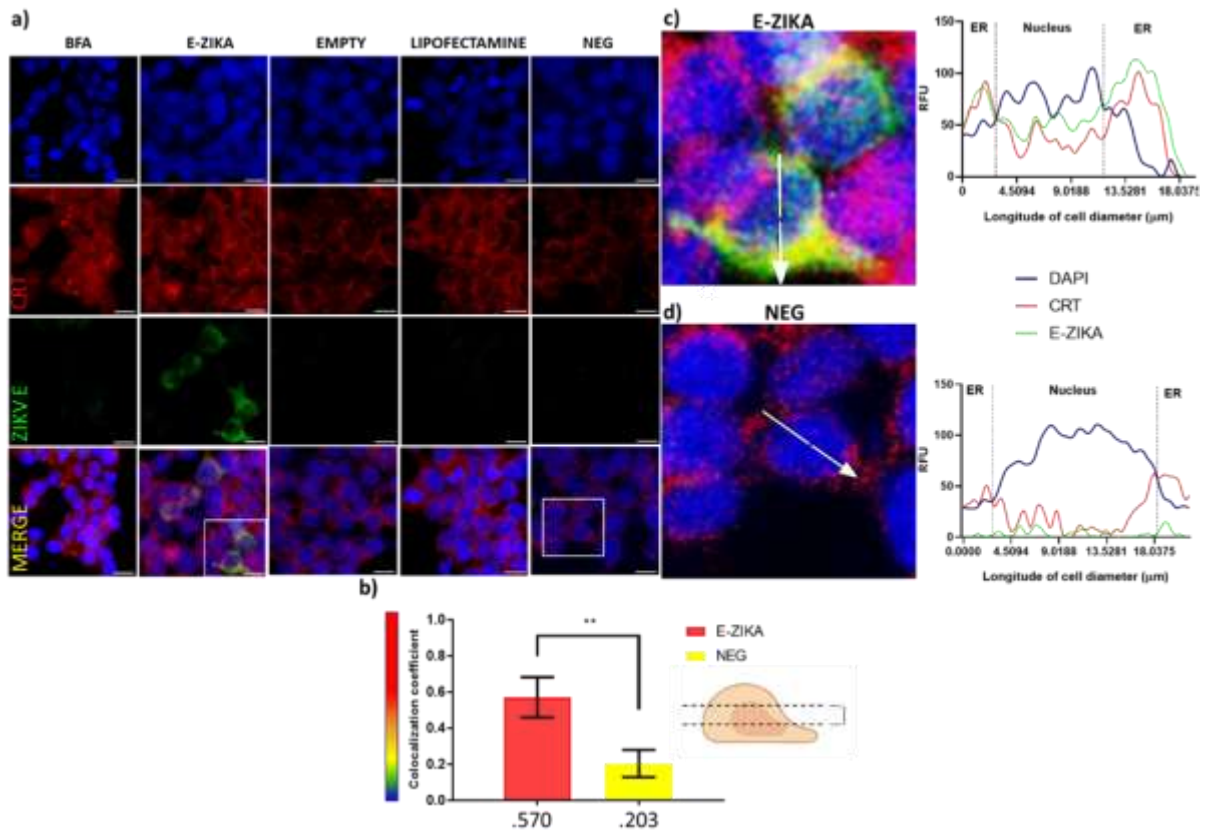


Figura 17. Localización subcelular de la proteína E del ZIKV en el ER y su correlación con CRT. a) Inmunofluorescencia para la co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en verde) y la chaperona CRT (detección en rojo) con los diferentes tratamientos de interés. Los núcleos se tiñeron de azul (DAPI). b) Coeficiente de correlación de Pearson para la colocalización de la proteína E del ZIKV versus CRT. Se utilizaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de t no pareada. $**p \leq 0.01$. c) Análisis de line scan de la ubicación subcelular de la proteína E del ZIKV versus CRT. d) Análisis de line scan del control negativo. La línea trazada indica el diámetro longitudinal de la célula en la imagen ampliada (flecha blanca). Las RFU de cada uno de los canales individuales se midieron utilizando el software ImageJ® (NIH). La inmunofluorescencia se realizó mediante microscopía confocal y se realizó una proyección de la parte medial de las células como se indica en las imágenes. Barra de escala de 15 μm.

Posteriormente analizamos si hubo co-localización de la proteína E del ZIKV con GRP78, dado que no se observaron cambios en la expresión de GRP78 mediante análisis de western blot (Figura 18a). El análisis del coeficiente de correlación de Pearson mostró una diferencia significativa entre las células transfectadas y no transfectadas con E-ZIKA (Figura 18b). También se realizó un análisis de line scan para corroborar estos datos. Los resultados mostraron un patrón de expresión para la proteína E del ZIKV similar al de GRP78. En las células transfectadas con el plásmido empty, tratadas con lipofectamina y en las células no transfectadas se observó

únicamente la expresión de GRP78. (Figura 18c y d). Estos datos sugieren que, al igual que en las células infectadas, la proteína E recombinante del ZIKV se encuentra en el RE y es posible que interactúe con GRP78.

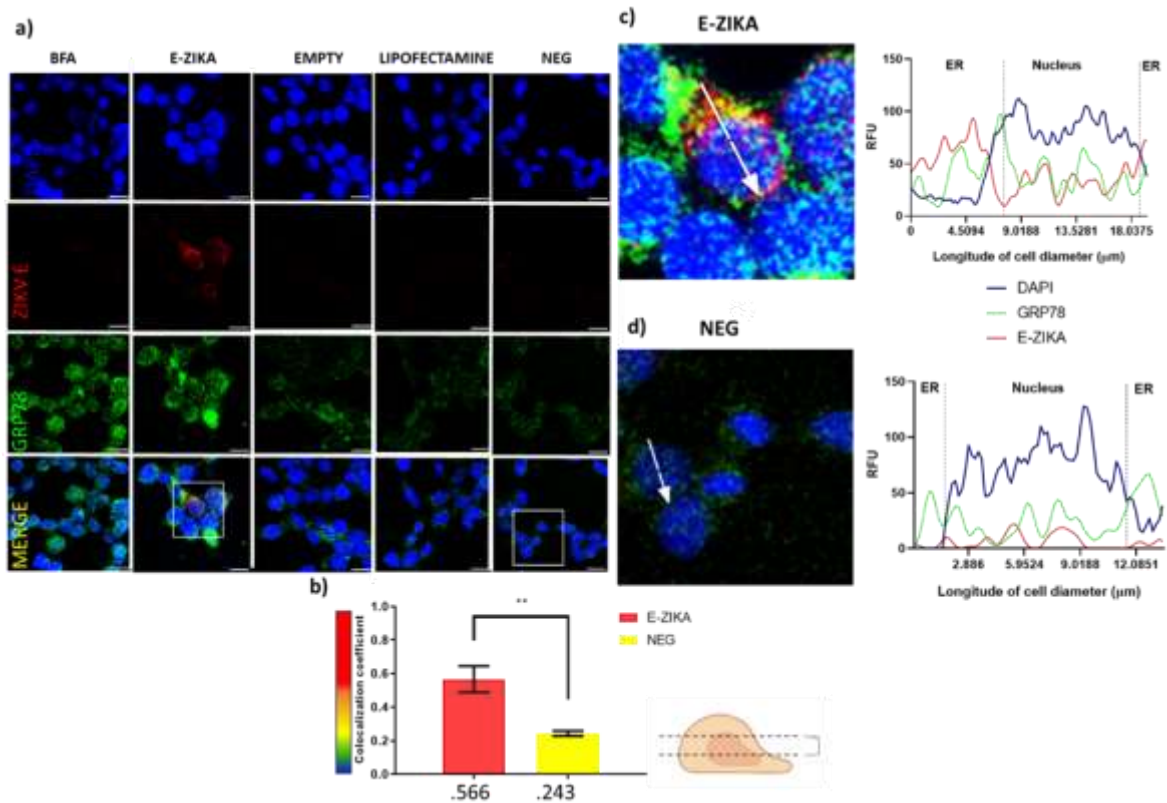


Figura 18. Co-localización de la proteína E del ZIKV y la chaperona GRP78. a) Inmunofluorescencia para la co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en rojo) y la chaperona GRP78 (detección en verde) con los diferentes tratamientos de interés. Los núcleos se tiñeron con azul (DAPI). b) Coeficiente de correlación de Pearson para la co-localización de la proteína E del ZIKV versus GRP78. Se utilizaron pruebas de t no pareadas. * $p \leq 0,05$. c) Análisis de line scan de la localización subcelular de la proteína E del ZIKV versus GRP78. d) Análisis de line scan del control negativo. La línea trazada indica el diámetro longitudinal de la célula en la imagen ampliada (flecha blanca). Las RFU de cada uno de los canales individuales se midieron utilizando el software ImageJ® (NIH). La inmunofluorescencia se realizó mediante microscopía confocal y se realizó una proyección de la parte medial de las células como se indica en las imágenes. Barra de escala de 15 μm .

6. La proteína E del virus del Zika se encuentra en el citoplasma

Para caracterizar mejor la ubicación intracelular de la proteína E del ZIKV recombinante, también se analizó su presencia en el citoplasma. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia en células transfectadas con el plásmido, y una co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en rojo) y 14-3-3 (detección en verde), la cual es una proteína reguladora que se une a diferentes proteínas de señalización presentes principalmente en el citoplasma (Fu et al., 2000). Estos análisis se realizaron en las secciones basales de la célula, ya que es donde encontramos el citoplasma más extendido. Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.356, lo que sugiere que una fracción de la proteína E del ZIKV recombinante puede alcanzar el citoplasma y co-localizarse con la proteína 14-3-3 (Figura 19a y b). El análisis de line scan corroboró estos resultados, mostrando una RFU más alta en el citoplasma para ambas proteínas. Las células no transfectadas utilizadas como control mostraron solo la señal de 14-3-3 (Figura 19c y d). Durante la infección por ZIKV, la proteína E del ZIKV se encuentra principalmente dentro de la luz del RE y presumiblemente ausente en el citoplasma (Shi & Gao, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017; A. Wang et al., 2017); sin embargo, parece que una pequeña fracción de la proteína E del ZIKV recombinante está llegando al citoplasma al no tener un péptido señal en su extremo amino terminal.

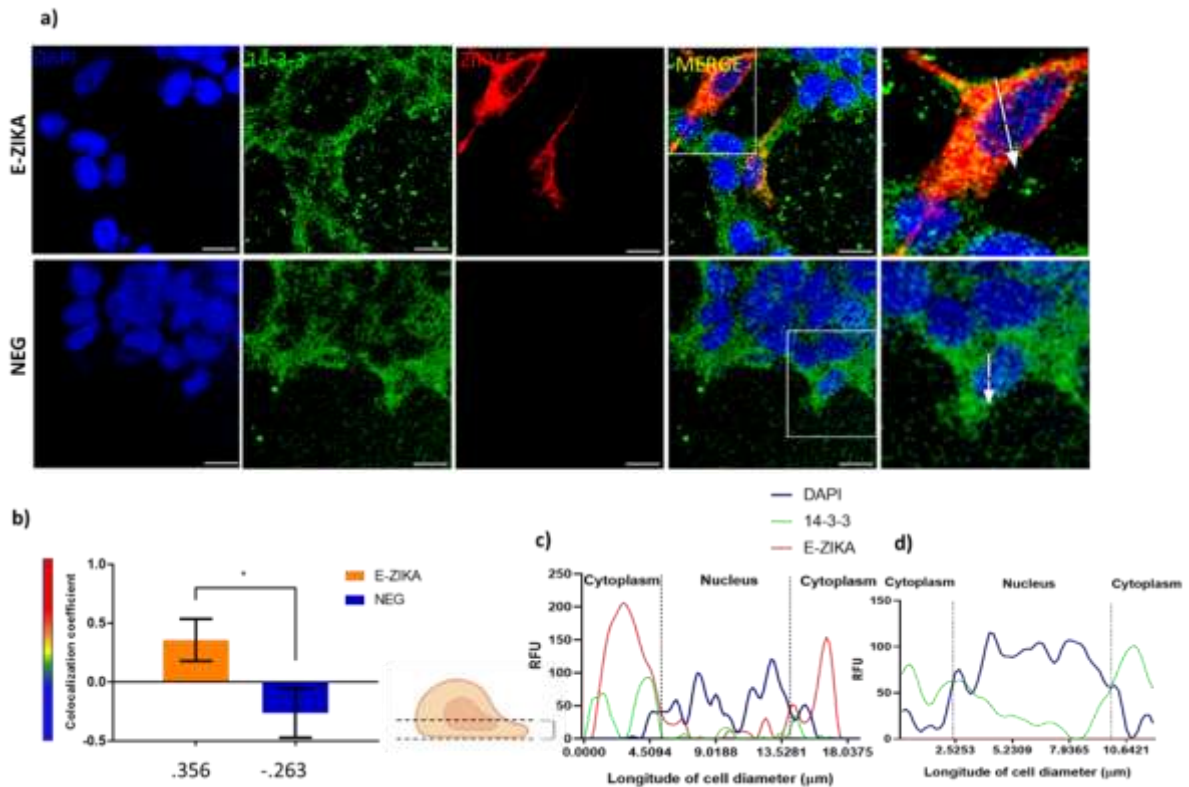


Figura 19. Localización subcelular de la proteína E del ZIKV en el citoplasma con la proteína 14-3-3. a) Análisis de inmunofluorescencia para la co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en rojo) y la proteína 14-3-3 (detección en verde); los núcleos se muestran en azul (DAPI). b) Coeficiente de correlación de Pearson entre células transfectadas y no transfectadas. Se utilizaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de t no pareada. * $p \leq 0.05$. c) Análisis de line scan de la localización subcelular de la proteína E del ZIKV versus la proteína 14-3-3. d) Análisis de line scan del control negativo. La línea trazada indica el diámetro longitudinal de la célula en la imagen ampliada (flecha blanca). Las RFU de cada uno de los canales individuales se midieron utilizando el software ImageJ® (NIH). Se realizó inmunofluorescencia mediante microscopía confocal y se realizó una proyección de la parte basal de las células como se indica en las imágenes. Barra de escala de 15 μm .

Para confirmar la presencia citoplásmica de la proteína E recombinante del ZIKV, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para la proteína E del ZIKV (detección en rojo) y β -actina (detección en verde), otra proteína citoplasmática (Dugina et al., 2022) (Figura 20a). Al igual que 14-3-3, la proteína E del ZIKV mostró un coeficiente de correlación de Pearson moderado de 0.413 con β -actina, con una diferencia significativa en comparación con las células no transfectadas, que solo mostraron señal para β -actina (Figura 20b). El análisis de line scan reveló una relación entre las RFU de cada proteína en el citoplasma (Figura 20c y d). Estos datos corroboran la presencia de la proteína E del ZIKV recombinante en el citosol de las células transfectadas.

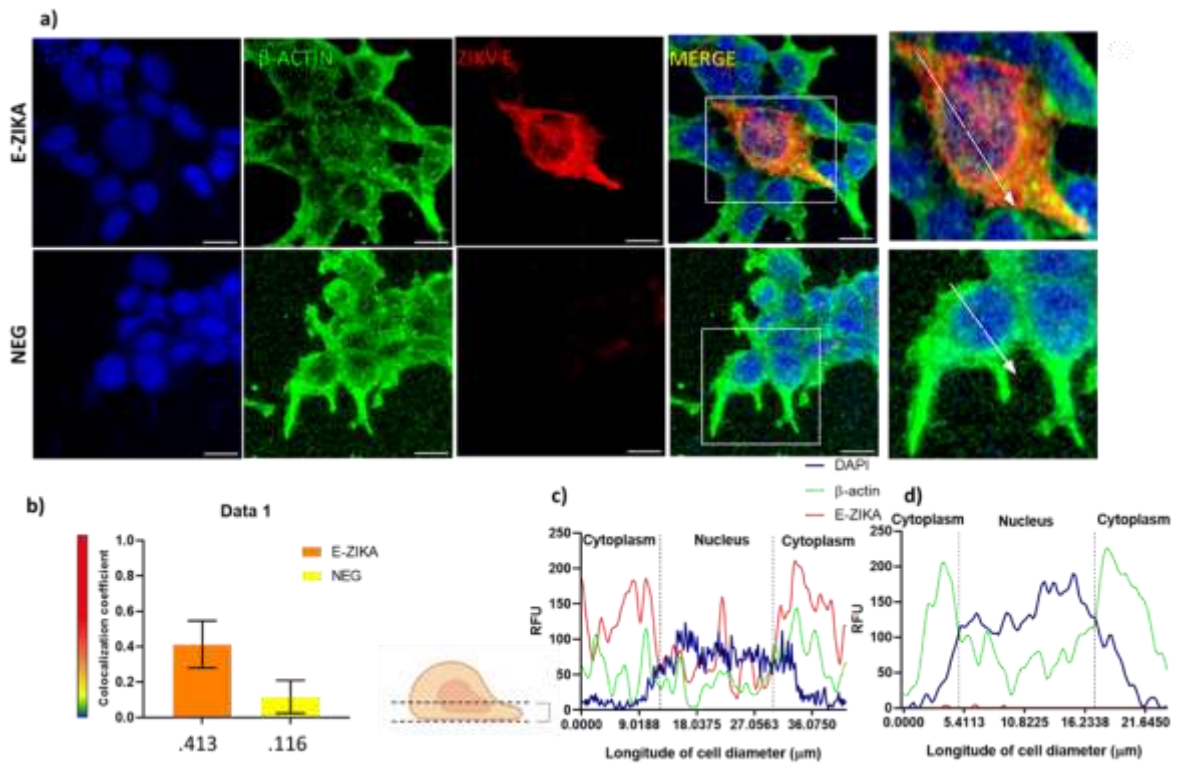


Figura 20. Localización subcelular de la proteína E del ZIKV en el citoplasma con la proteína β -actina. a) Análisis de inmunofluorescencia para la co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en rojo) y la proteína β -actina (detección en verde), los núcleos se muestran en azul (DAPI). b) Coeficiente de correlación de Pearson entre células transfectadas y no transfectadas. Se utilizaron pruebas de t no pareadas. $*p \leq 0,05$. c) Análisis de line scan de la localización subcelular de la proteína E del ZIKV versus β -actina. d) Análisis de line scan del control negativo. La línea trazada indica el diámetro longitudinal de la célula en la imagen ampliada (flecha blanca). Las RFU de cada uno de los canales individuales se midieron utilizando el software ImageJ® (NIH). Se realizó inmunofluorescencia mediante microscopía confocal y se realizó una proyección de la parte basal de las células como se indica en las imágenes. Barra de escala de 15 μ m.

7. La proteína E del ZIKV se expresa en la membrana celular

Una vez que observamos que la proteína E del ZIKV se encontraba en la luz del RE y en el citoplasma de las células transfectadas, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para determinar si podía transportarse a la membrana celular. Para ello se llevó a cabo la co-detección de la proteína E del ZIKV con la β -catenina, proteína fundamental en la dinámica del citoesqueleto y la membrana celular junto con la N-cadherina en células HEK-293T (Inada et al., 2016; C. W. Tan et al., 2014; Valenta et al., 2012). Estas células fueron transfectadas y fijadas,

pero no permeabilizadas. Se realizó el coeficiente de correlación de Pearson para detectar el nivel de co-localización en la membrana celular. Curiosamente, en las células transfectadas, se observó una fuerte co-localización de la proteína E del ZIKV y la β -catenina (Figura 21a), con una diferencia significativa en relación con las células no transfectadas (Figura 21b). Los resultados fueron corroborados mediante análisis de line scan, que demostró una RFU para ambas proteínas en la membrana plasmática (Figura 21c y d). Estos experimentos demuestran que la proteína E del ZIKV recombinante se transporta a la membrana plasmática.

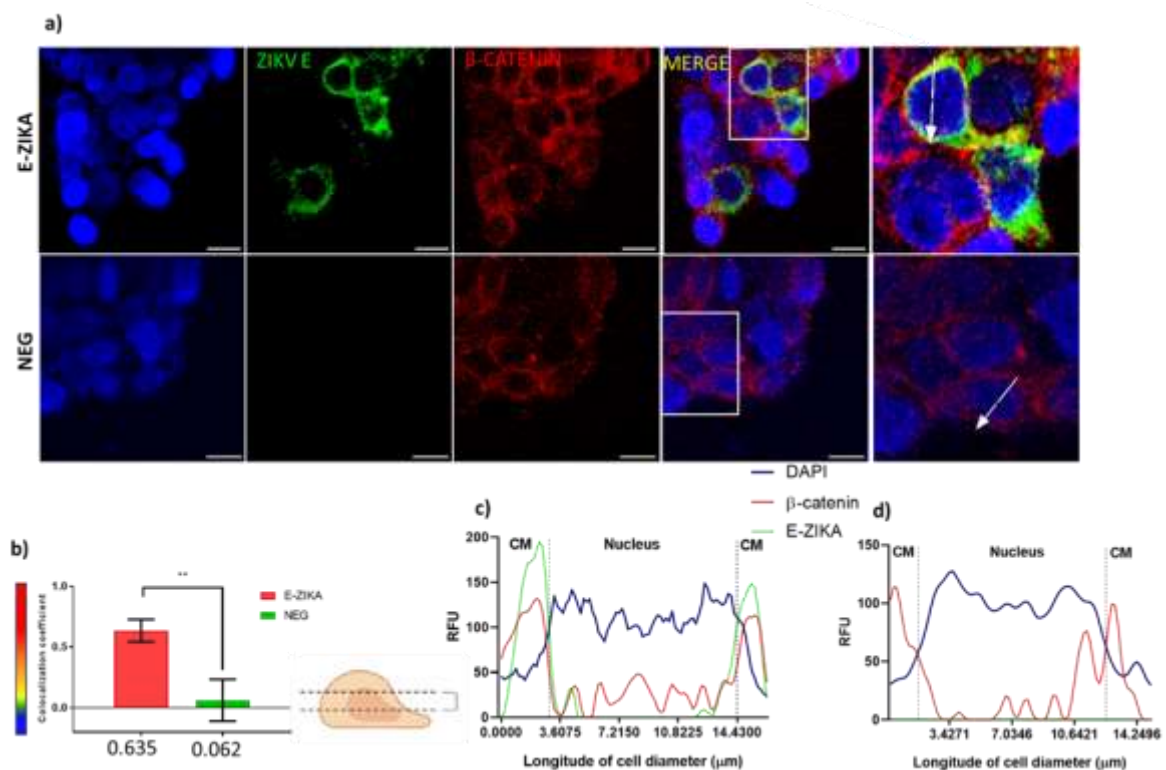


Figura 21. Localización subcelular de la proteína E del ZIKV en la membrana celular. a) Análisis de inmunofluorescencia para la co-detección de la proteína E del ZIKV (detección en verde) y la proteína β -catenina (detección en rojo); los núcleos se muestran en azul (DAPI). b) Coeficiente de correlación de Pearson entre células transfectadas y no transfectadas. Se utilizaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de t no pareada. $**p \leq 0,01$. c) Análisis de line scan de la localización subcelular de la proteína E del ZIKV versus la proteína β -catenina. d) Análisis de line scan del control negativo. La línea trazada indica el diámetro longitudinal de la célula en la imagen ampliada (flecha blanca). Las RFU de cada uno de los canales individuales se midieron utilizando el software ImageJ® (NIH). Barra de escala de 15 μ m.

XII) Discusión

El tropismo del ZIKV por las células troncales neurales se debe a la proteína ZIKV E (Annamalai et al., 2017). El virus también presenta tropismo por las células iniciadoras de glioblastoma (Zhu et al., 2017) las cuales poseen receptores específicos como la integrina $\alpha\beta 5$ que permiten la unión y entrada del virión a la célula, provocando la muerte celular (S. Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020). Durante la infección el ZIKV libera un RNA monocatenario que codifica una poliproteína que contiene tres proteínas estructurales, la proteína C de la cápside (de localización citoplasmática), mientras que pr, M y E, así como proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) son dirigidas al RE por el péptido señal, que se encuentra río abajo de la secuencia de la cápside (Sirohi & Kuhn, 2017). El direccionamiento al RE permite la formación y ensamblaje de partículas virales después de la síntesis del genoma en bucles de replicación formados por la luz citoplasmática, rodeada por la cara externa del RE, por lo que al cerrar el bucle se genera la partícula viral en el interior del RE, y su membrana, procede del RE (Hasan et al., 2018; Stiasny & Heinz, 2006).

Debido a la importancia de la proteína E del ZIKV en el tropismo celular y su potencial uso en el direccionamiento a células iniciadoras de glioblastoma, decidimos explorar qué sucede en las células HEK-293T al expresar de manera heteróloga la proteína E del ZIKV sin el contexto de otras proteínas del virus. Estas células se utilizaron debido a su facilidad de transfección (Figura 14) y también porque se usan ampliamente para la fabricación de productos de terapia celular y génica (Aydin et al., 2012; Ferreira et al., 2020; Perpiñá et al., 2020; E. Tan et al., 2021); además muestran algunas características neuronales (Chiang et al., 2021; He & Soderlund, 2010). Dado que el ZIKV tiene tropismo por las células troncales neurales y de glioma, confirmamos que la proteína E del ZIKV no induce el estrés de RE en células de glioma humano U-87 MG (Figura suplementaria 2), lo que sugiere que, independientemente del tipo celular, la expresión de la proteína E del ZIKV por sí sola no induce el estrés de RE ni la apoptosis, según lo evaluado por la actividad de caspasa 3.

Los análisis de viabilidad celular en HEK-293T, demuestran que la proteína E del ZIKV no induce la muerte de las células transfectadas (Figura 15). Estos resultados coinciden con un informe anterior que muestra que la expresión heteróloga de la proteína E del ZIKV, en ausencia de otras proteínas virales, no indujo la muerte celular (Hou et al., 2017). Tampoco, se encontraron disminuciones de la viabilidad celular después de la expresión de la proteína E del ZIKV, resultados similares se han visto en nuestro grupo de trabajo, donde Florán y Quintero, en sus respectivas tesis de maestría, observaron estabilidad celular en las líneas celulares HEK-293, y ReN cells al ser transfectadas con el plásmido que codifica a la proteína E del ZIKV (Florán, 2020; Quintero, 2019), mientras que durante la infección viral, la expresión del genoma viral completo desencadena la muerte de las células troncales neurales que presenta la microcefalia (Alfano et al., 2019; Cugola et al., 2016; de Oliveira et al., 2020).

Tras analizar mediante western blot si la proteína E del ZIKV puede activar biomarcadores del estrés del RE como GRP78 (Osowski & Urano, 2011), y de las vías de rescate como LC3-II para la autofagia (Tanida et al., 2004), además de caspasa 3 para la muerte celular apoptótica (Asadi et al., 2022), nuestros resultados muestran que la proteína E del ZIKV no induce estrés de RE, porque no hay aumento en la expresión de GRP78, en comparación con los controles negativos, mientras que las células tratadas con BFA demostraron la inducción de estrés (Figura 16a, b, c y Figura suplementaria 2). Además, observamos que la proteína E del ZIKV no induce apoptosis (Figura 16d y Figura suplementaria 2). Los flavivirus pueden inducir autofagia dependiente de NS4A (McLean et al., 2011), sin embargo, no observamos que la expresión de la proteína E del ZIKV *per se* indujera la autofagia (Figura 16e y Figura suplementaria 2). De manera interesante, nuestros resultados indican que la proteína E del ZIKV sin un péptido señal puede dirigirse a la membrana celular transitando por el RE como lo demuestra su co-localización con CRT (Figuras 17a, b y c), una chaperona residente de este organelo (Houen et al., 2021). Lo cual indica que no se requiere un péptido señal amino terminal descrita en otras investigaciones (Sirohi & Kuhn, 2017). Otros estudios han demostrado que ciertas proteínas pueden insertarse en el RE postraduccionalmente mediante una secuencia hidrofóbica cerca del extremo carboxilo terminal (Johnson et al., 2013; Sun & Mariappan, 2020), similar a la de la proteína E del ZIKV (Stiasny et al., 2023).

Por otra parte, otros trabajos han reportado que el ZIKV induce estrés de RE para mejorar la replicación viral, aumentando la actividad de genes como p-PKR, p-eIF2 α , IRE1/XBP1s y detiene la síntesis de proteínas celulares mediante un mecanismo dependiente de genes no estructurales como NS3 y NS4A (Hou et al., 2017). En las infecciones por el virus del dengue (DENV), las proteínas E, NS1, NS2A, NS2B y NS4B inducen la activación de XBP1, aliviando el estrés del RE a través de la vía ERAD, pero también inhiben a los mediadores de la apoptosis, permitiendo la supervivencia y la replicación celular y viral (Viettri et al., 2022). Sin embargo, no hay informes que demuestren que la proteína E del ZIKV induzca alguno de estos efectos. Se ha reportado que la proteína E del ZIKV interactúa con GRP78 (Khongwichit et al., 2021; Royle et al., 2020). Sin embargo, existen reportes contradictorios respecto a la alteración en la expresión de GRP78 en células infectadas con el ZIKV, ya que algunos señalan su sobreexpresión (Khongwichit et al., 2021), mientras que otros reportan su regulación a la baja (Turpin et al., 2020). Curiosamente, hasta donde hemos investigado no hay informes sobre el efecto en la expresión de GRP78 inducida por la proteína E del ZIKV. En este trabajo demostramos que la proteína E del ZIKV no tiene efecto en los niveles de GRP78 (Figura 16a y b). Sin embargo, observamos que existe una co-localización de la proteína E del ZIKV y GRP78 en el RE, lo que es consistente con los estudios de interacción en la literatura (Figura 18b y c). La sobreexpresión de GRP78 induce la inhibición de la síntesis de proteínas. Sin embargo, nuestros resultados coinciden indirectamente con el estudio de Hou y colaboradores donde observaron que la expresión de la proteína E del ZIKV por sí sola no inhibía la síntesis de proteínas (Hou et al., 2017).

Dado que durante la infección por el ZIKV, la proteína E del ZIKV es dirigida al RE mediante el péptido señal de la poliproteína (Sirohi & Kuhn, 2017; T. Y. Tan et al., 2020), nos preguntamos si la proteína E del ZIKV *per se* podía encontrarse en el citoplasma y nuestros resultados mostraron niveles moderados de co-localización con la proteína 14-3-3 y β -actina, proteínas ampliamente distribuidas en citoplasma (Abdrabou et al., 2020; Dugina et al., 2022). Sin embargo, el análisis de correlación de Pearson indicó que los niveles de expresión de la proteína E del ZIKV son menores en el citoplasma en comparación con el RE, lo que sugiere que una vez sintetizada la proteína es rápidamente dirigida al RE (Figura 19 y 20).

Tras observar que la proteína E del ZIKV está en el citoplasma y que se dirige al RE, analizamos si se encontraba en la membrana celular. En las células no permeabilizadas se esperaba detectar exclusivamente la proteína E del ZIKV y que no se detectara la señal de β -catenina, ya que esta proteína se encuentra en el lado interno de la membrana (C. W. Tan et al., 2014). Sin embargo, ambas proteínas fueron detectadas en esta condición en los ensayos de inmunofluorescencia. Anteriormente se ha demostrado que el uso de aldehídos como fijadores puede semipermeabilizar la membrana celular (Cheng et al., 2019); por lo tanto, el anticuerpo puede atravesar parcialmente la membrana celular (Fulton & Briggman, 2021). Estos resultados demuestran la localización de la proteína E del ZIKV en la membrana plasmática (Figura 21); sin embargo, se necesitarán más estudios para determinar la localización precisa de la proteína E del ZIKV debido a su dominio transmembrana. De igual manera, se requieren más experimentos para la elucidación de la ruta de tránsito utilizada por la proteína E del ZIKV para llegar a la membrana plasmática y corroborar si involucra el tránsito por la vía de secreción constitutiva a través del complejo de Golgi, como se ha observado para los viriones inmaduros durante la infección (Shi & Gao, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017; A. Wang et al., 2017).

Los presentes resultados demuestran que la proteína E del ZIKV llega a la membrana celular, pasando a través del RE, sin causar estrés de RE o muerte celular, lo que hace que la expresión de la proteína E del ZIKV por sí sola sea una herramienta prometedora para guiar vectores terapéuticos como células o partículas virales pseudotipadas hacia las células troncales de glioblastoma. Sin embargo, la expresión de esta proteína viral en la superficie del vector puede representar un obstáculo para su uso, debido a la posible presencia de células de memoria o de anticuerpos contra el virus, inducida por infecciones pasadas por ZIKV (X. Chen et al., 2021). Comprender la vía por la que se procesa la proteína E del ZIKV en la línea celular HEK-293T y otras líneas celulares que sirven como plataforma para la producción de partículas virales pseudotipadas o terapia celular, podría permitirnos desarrollar nuevos enfoques biotecnológicos más seguros para el tratamiento de gliomas (Grunwald et al., 2023; Kretschmer et al., 2020; Pöhlking et al., 2023) y otros tipos de enfermedades (J. Liu et al., 2022). También puede aplicarse para la producción de otro tipo de vectores para terapia génica, o incluso para

generar proteínas recombinantes (Lara-Lozano et al., 2023) y vacunas (Boigard et al., 2017; Grunwald et al., 2023; Ku et al., 2020) más seguras y eficaces.

XIII) Conclusiones

- La proteína E del ZIKV no requiere un péptido señal en el extremo amino terminal para dirigirse al RE.
- La proteína E del ZIKV no induce estrés de RE.
- La proteína E del ZIKV no induce muerte celular.
- La proteína E del ZIKV se expresa finalmente en la membrana celular.

XIV) Perspectivas

- Analizar otros biomarcadores de las vías de degradación como la autofagia y el ERAD.
- Elucidar la ruta de tránsito utilizada por la proteína E del ZIKV para llegar a la membrana plasmática.
- Realizar una evaluación completa del efecto celular de la expresión de la proteína E del virus del zika en líneas celulares derivadas de glioblastoma.
- Evaluación antitumoral por medio de terapia celular y lentiviral que expresen en su superficie la proteína E del virus del zika, como vectores terapéuticos contra células troncales de glioblastoma.

XV) Figuras suplementarias

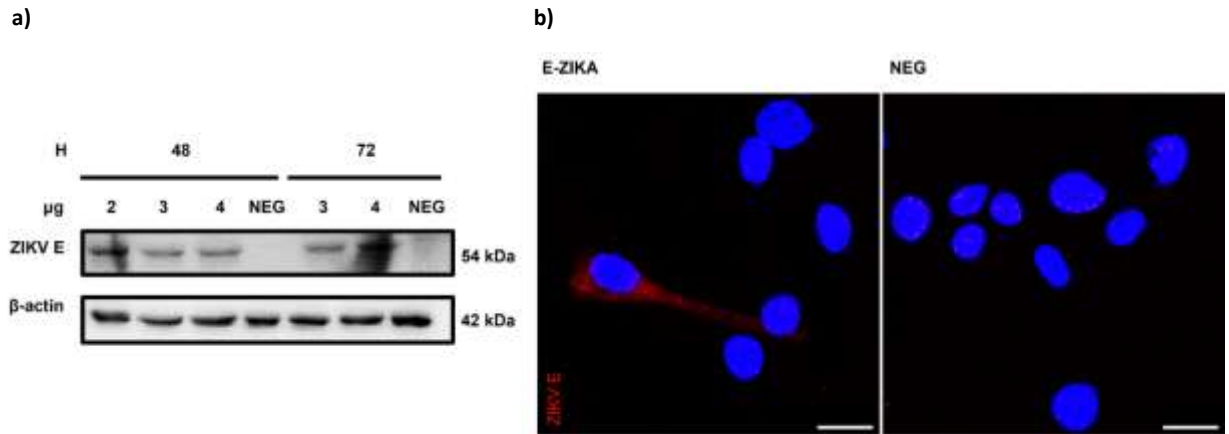


Figura suplementaria 1. Caracterización de la expresión de la proteína ZIKV E en células U-87 MG. a) Análisis de western blot de la proteína E del ZIKV con diferentes concentraciones de DNA y células no tratadas como control negativo (NEG). Se utilizó β -actina como control de carga. b) La inmunofluorescencia contra la proteína E del ZIKV (detección en rojo) representa la transfección con 2 μ g de plásmido; DAPI (azul). Se utilizaron células no transfectadas (NEG) como control. Barra de escala 15 μ m.

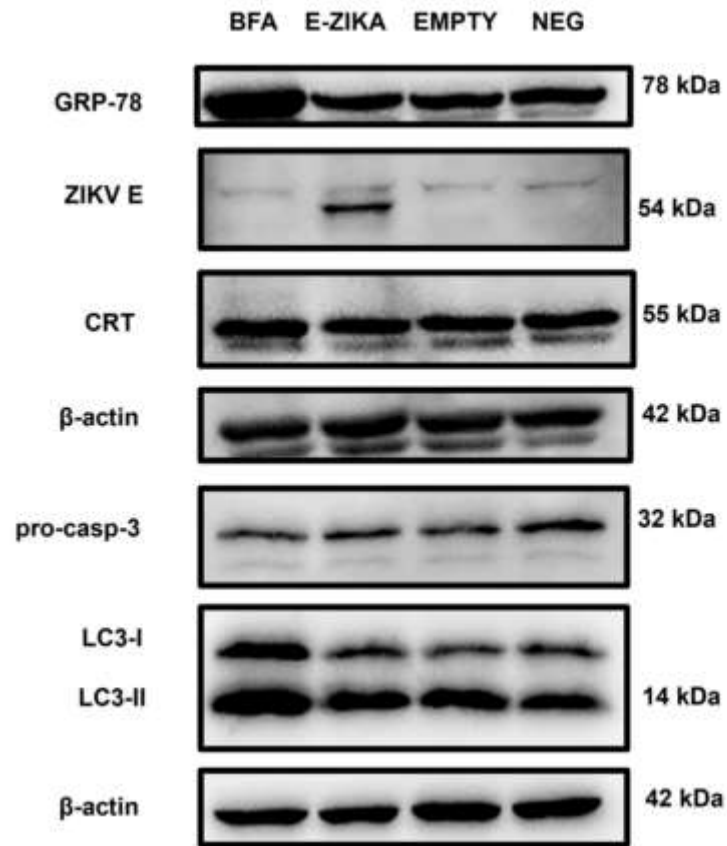


Figura suplementaria 2. Detección de biomarcadores UPR en células U-87 MG. Análisis representativo de western blot de los biomarcadores de interés. Las células tratadas con BFA demuestran una expresión elevada de GRP78 y LC3-II. Se utilizó β-actina como control de carga.

XVI) Literatura citada

- Abdrabou, A., Brandwein, D., & Wang, Z. (2020). Differential Subcellular Distribution and Translocation of Seven 14-3-3 Isoforms in Response to EGF and During the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 318. <https://doi.org/10.3390/ijms21010318>
- Alfano, C., Gladwyn-Ng, I., Couderc, T., Lecuit, M., & Nguyen, L. (2019). The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(94), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00094>
- Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241-278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Anderson, C. M., & Macleod, K. F. (2019). Chapter Five—Autophagy and cancer cell metabolism. En D. C. Montrose & L. Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 347, pp. 145-190). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.06.002>
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *Journal of Cell Science*, 115(16), 3227-3234. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.16.3227>
- Annamalai, A. S., Pattnaik, A., Sahoo, B. R., Muthukrishnan, E., Natarajan, S. K., Steffen, D., Vu, H. L. X., Delhon, G., Osorio, F. A., Petro, T. M., Xiang, S.-H., & Pattnaik, A. K. (2017). Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of Virology*, 91(23), e01348-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01348-17>
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>

- Aydin, H., Azimi, F. C., Cook, J. D., & Lee, J. E. (2012). A Convenient and General Expression Platform for the Production of Secreted Proteins from Human Cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 65, 4041. <https://doi.org/10.3791/4041>
- Barbelanne, M., & Tsang, W. Y. (2014). Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *BioMed Research International*, 2014, 547986. <https://doi.org/10.1155/2014/547986>
- Bartoszewska, S., & Collawn, J. F. (2020). Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 25(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00212-1>
- Beroske, L., Van den Wyngaert, T., Stroobants, S., Van der Veken, P., & Elvas, F. (2021). Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms22083948>
- Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P., & Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005608. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005608>
- Campos-Melo, D., Hawley, Z. C. E., Droppelmann, C. A., & Strong, M. J. (2021). The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 621779. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621779>
- Chappell, J. D., & Dermody, T. S. (2015). 134—Biology of Viruses and Viral Diseases. En J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* (pp. 1681-1693.e4). Content Repository Only! <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00134-X>
- Chen, D. L., Engle, J. T., Griffin, E. A., Miller, J. P., Chu, W., Zhou, D., & Mach, R. H. (2015). Imaging Caspase-3 Activation as a Marker of Apoptosis-Targeted Treatment Response in Cancer.

Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging, 17(3), 384-393. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0802-8>

- Chen, X., Anderson, L. J., Rostad, C. A., Ding, L., Lai, L., Mulligan, M., Roupheal, N., Natrajan, M. S., McCracken, C., & Anderson, E. J. (2021). Development and optimization of a Zika virus antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assay. *Journal of Immunological Methods*, 488, 112900. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112900>
- Cheng, R., Zhang, F., Li, M., Wo, X., Su, Y.-W., & Wang, W. (2019). Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Frontiers in Chemistry*, 7, 588. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00588>
- Chiang, C.-W., Shu, W.-C., Wan, J., Weaver, B. A., & Jackson, M. B. (2021). Recordings from neuron–HEK cell cocultures reveal the determinants of miniature excitatory postsynaptic currents. *The Journal of General Physiology*, 153(5), e202012849. <https://doi.org/10.1085/jgp.202012849>
- Chipurupalli, S., Samavedam, U., & Robinson, N. (2021). Crosstalk Between ER Stress, Autophagy and Inflammation. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.758311>
- Choi, J.-A., & Song, C.-H. (2020). Insights Into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 3147. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03147>
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G. C., Romero, S., Polonio, C. M., Cunha, I., Freitas, C. L., Brandão, W. N., Rossato, C., Andrade, D. G., Faria, D. de P., Garcez, A. T., Buchpiguel, C. A., ... Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267-271. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., Xiao, H., Yan, J., Shi, Y., Qin, C.-F., Qi, J., & Gao, G. F. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope

- Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 696-704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>
- de Oliveira, C. S., de Matos, H. J., Ramos, F. L. de P., Pinto, A. Y. das N., Graim, P. N. dos S., Guimarães, V. de P. R., Gomes, L. T. S., Serra, E. M. F., Cruz, A. C., Leal, A., Henriques, D. F., Lima, J. A., Anjos, M. V., Pinto, E. V., de Souza, A. W., & Vasconcelos, P. F. da C. (2020). Risk of Zika virus-associated birth defects in congenital confirmed cases in the Brazilian Amazon. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44, e116. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.116>
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509-520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Doultinos, D., Avril, T., Lhomond, S., Dejeans, N., Guédât, P., & Chevet, E. (2017). Control of the Unfolded Protein Response in Health and Disease. *SLAS Discovery*, 22(7), 787-800. <https://doi.org/10.1177/2472555217701685>
- Dugina, V. B., Shagieva, G. S., & Kopnin, P. B. (2022). Cytoplasmic Beta and Gamma Actin Isoforms Reorganization and Regulation in Tumor Cells in Culture and Tissue. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 895703. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.895703>
- Ferreira, C. B., Sumner, R. P., Rodriguez-Plata, M. T., Rasaiyaah, J., Milne, R. S., Thrasher, A. J., Qasim, W., & Towers, G. J. (2020). Lentiviral Vector Production Titer Is Not Limited in HEK293T by Induced Intracellular Innate Immunity. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 17, 209-219. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.11.021>
- Floran, C. (2020). *Reconocimiento de células iniciadoras de glioma a través de la expresión de la proteína E del virus del Zika en células HEK-293*.
- Fu, H., Subramanian, R. R., & Masters, S. C. (2000). 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1), 617-647. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617>

- Fulton, K. A., & Briggman, K. L. (2021). Permeabilization-free en bloc immunohistochemistry for correlative microscopy. *eLife*, *10*, e63392. <https://doi.org/10.7554/eLife.63392>
- Ghemrawi, R., & Khair, M. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176127>
- Gómora-García, J. C., Gerónimo-Olvera, C., Pérez-Martínez, X., & Massieu, L. (2021). IRE1 α RIDD activity induced under ER stress drives neuronal death by the degradation of 14-3-3 θ mRNA in cortical neurons during glucose deprivation. *Cell Death Discovery*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00518-9>
- Gould, D. B., Marchant, J. K., Savinova, O. V., Smith, R. S., & John, S. W. M. (2007). Col4a1 mutation causes endoplasmic reticulum stress and genetically modifiable ocular dysgenesis. *Human Molecular Genetics*, *16*(7), 798-807. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm024>
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., & Leroy, E. M. (2014). Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
- Grunwald, V., Ngo, H. D., Formanski, J. P., Jonas, J. S., Pöhlking, C., Schwalbe, B., & Schreiber, M. (2023). Development of Zika Virus E Variants for Pseudotyping Retroviral Vectors Targeting Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms241914487>
- Guan, B.-J., Krokowski, D., Majumder, M., Schmotzer, C. L., Kimball, S. R., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., & Hatzoglou, M. (2014). Translational Control during Endoplasmic Reticulum Stress beyond Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α . *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(18), 12593-12611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543215>

- Guan, J., Yang, S. J., Gonzalez, F., Yin, Y., & Shastri, N. (2017). Antigen Processing in the Endoplasmic Reticulum Is Monitored by Semi-Invariant $\alpha\beta$ TCRs Specific for a Conserved Peptide-Qa-1b MHC Class Ib Ligand. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 198(5), 2017-2027. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600764>
- 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, B., & Soderlund, D. M. (2010). Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells Express Endogenous Voltage-Gated Sodium Currents and Nav1.7 Sodium Channels. *Neuroscience letters*, 469(2), 268. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.012>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(1). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>
- Hills, S. L., & Fischer, M. (2018). 218—Flaviviruses. En S. S. Long, C. G. Prober, & M. Fischer (Eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)* (pp. 1128-1132.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00218-8>
- Hirata, T., & Kizuka, Y. (2021). N-Glycosylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1325, 3-24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-70115-4_1
- Hou, S., Kumar, A., Xu, Z., Airo, A. M., Stryapunina, I., Wong, C. P., Branton, W., Tchesnokov, E., Götte, M., Power, C., & Hobman, T. C. (2017). Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *Journal of Virology*, 91(16), e00474-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00474-17>
- Houen, G., Højrup, P., Ciplys, E., Gaboriaud, C., & Slibinskas, R. (2021). Structural Analysis of Calreticulin, an Endoplasmic Reticulum-Resident Molecular Chaperone. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 59, 13-25. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67696-4_2

- Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences*, 226, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022>
- INADA, M., IZAWA, G., KOBAYASHI, W., & OZAWA, M. (2016). 293 cells express both epithelial as well as mesenchymal cell adhesion molecules. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(6), 1521-1527. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2568>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2019). *Flaviviridae—Flaviviridae—Positive-sense RNA Viruses*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae
- Johnson, N., Powis, K., & High, S. (2013). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2403-2409. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.008>
- Kano, F., Sako, Y., Tagaya, M., Yanagida, T., & Murata, M. (2000). Reconstitution of Brefeldin A-induced Golgi Tubulation and Fusion with the Endoplasmic Reticulum in Semi-Intact Chinese Hamster Ovary Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(9), 3073-3087. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3073>
- Karamyshev, A. L., Tikhonova, E. B., & Karamysheva, Z. N. (2020). Translational Control of Secretory Proteins in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms21072538>
- Khongwichit, S., Sornjai, W., Jitobaom, K., Greenwood, M., Greenwood, M. P., Hitakarun, A., Wikan, N., Murphy, D., & Smith, D. R. (2021). A functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79803-z>

- Koksal, A. R., Verne, G. N., & Zhou, Q. (2021). Endoplasmic reticulum stress in biological processing and disease. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 69(2), 309-315. <https://doi.org/10.1136/jim-2020-001570>
- Kretschmer, M., Kadlubowska, P., Hoffmann, D., Schwalbe, B., Auerswald, H., & Schreiber, M. (2020). Zikavirus prME Envelope Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus Type-1 as a Novel Tool for Glioblastoma-Directed Virotherapy. *Cancers*, 12(4), 1000. <https://doi.org/10.3390/cancers12041000>
- Kroeger, H., Grimsey, N., Paxman, R., Chiang, W.-C., Plate, L., Jones, Y., Shaw, P. X., Trejo, J., Tsang, S. H., Powers, E., Kelly, J. W., Wiseman, R. L., & Lin, J. H. (2018). The unfolded protein response regulator ATF6 promotes mesodermal differentiation. *Science signaling*, 11(517), ean5785. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan5785>
- Krow-Lucal, E. R., Andrade, M. R. de, Cananéa, J. N. A., Moore, C. A., Leite, P. L., Biggerstaff, B. J., Cabral, C. M., Itoh, M., Percio, J., Wada, M. Y., Powers, A. M., Barbosa, A., Abath, R. B., Staples, J. E., Coelho, G. E., Araújo, E., Medeiros, E. L. A., Brant, J., Cerroni, M., ... Arena, J. F. (2018). Association and birth prevalence of microcephaly attributable to Zika virus infection among infants in Paraíba, Brazil, in 2015–16: A case-control study. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 2(3), 205-213. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(18\)30020-8](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(18)30020-8)
- Ku, M. W., Anna, F., Souque, P., Petres, S., Prot, M., Simon-Loriere, E., Charneau, P., & Bourguin, M. (2020). A Single Dose of NILV-Based Vaccine Provides Rapid and Durable Protection against Zika Virus. *Molecular Therapy*, 28(8), 1772-1782. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.05.016>
- Kusio-Kobialka, M., Podszycalowa-Bartnicka, P., Peidis, P., Glodkowska-Mrowka, E., Wolanin, K., Leszak, G., Seferynska, I., Stoklosa, T., Koromilas, A. E., & Piwocka, K. (2012). The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Cycle*, 11(21), 4069-4078. <https://doi.org/10.4161/cc.22387>

- Kwon, D., Koh, J., Kim, S., Go, H., Min, H. S., Kim, Y. A., Kim, D. K., Jeon, Y. K., & Chung, D. H. (2018). Overexpression of endoplasmic reticulum stress-related proteins, XBP1s and GRP78, predicts poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *122*, 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.06.005>
- Lange, S., Franks, W. T., Rajagopalan, N., Döring, K., Geiger, M. A., Linden, A., van Rossum, B.-J., Kramer, G., Bukau, B., & Oschkinat, H. (2016). Structural analysis of a signal peptide inside the ribosome tunnel by DNP MAS NMR. *Science Advances*, *2*(8), e1600379. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600379>
- Lara-Lozano, M., Flores de los Ángeles, C., Pérez-Silva, N. B., Piña-Leyva, C., Bautista-Rodriguez, E., Gonzalez, R. O., Gonzalez-Barrios, J. A., & Segovia, J. (2023). Low-scale production and purification of a biologically active optimized form of the antitumor protein growth arrest specific 1 (GAS1) in a mammalian system for post-translational analysis. *Biochemical Engineering Journal*, *193*, 108858. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108858>
- Lebeau, G., Turpin, J., Frumence, E., El Safadi, D., Harrabi, W., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P., & Viranaïcken, W. (2022). Evidence of RedOX Imbalance during Zika Virus Infection Promoting the Formation of Disulfide-Bond-Dependent Oligomers of the Envelope Protein. *Viruses*, *14*(6), 1131. <https://doi.org/10.3390/v14061131>
- Lee, J. K., & Shin, O. S. (2019). Advances in Zika Virus–Host Cell Interaction: Current Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051101>
- Liu, H., Bowes, R. C., Water, B. van de, Sillence, C., Nagelkerke, J. F., & Stevens, J. L. (1997). Endoplasmic Reticulum Chaperones GRP78 and Calreticulin Prevent Oxidative Stress, Ca²⁺ Disturbances, and Cell Death in Renal Epithelial Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(35), 21751-21759. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.21751>

- Liu, J., Mao, Y., Li, Q., Qiu, Z., Li, J., Li, X., Liang, W., Xu, M., Li, A., Cai, X., Wu, W., Chen, H., Yan, R., Li, J., Gu, W., & Li, H. (2022). Efficient Gene Transfer to Kidney Using a Lentiviral Vector Pseudotyped with Zika Virus Envelope Glycoprotein. *Human Gene Therapy*, 33(23-24), 1269-1278. <https://doi.org/10.1089/hum.2022.053>
- Liu, Z., Lv, Y., Zhao, N., Guan, G., & Wang, J. (2015). Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death & Disease*, 6(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.183>
- Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00595>
- McFadden, G., Mohamed, M. R., Rahman, M. M., & Bartee, E. (2009). Cytokine determinants of viral tropism. *Nature Reviews Immunology*, 9(9), 645-655. <https://doi.org/10.1038/nri2623>
- McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22147-22159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500>
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Charpentier, T. L., Hafirassou, M. L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., Couplier, M., Missé, D., Jouvenet, N., Tabibiazar, R., Gressens, P., Schwartz, O., & Amara, A. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, 18(2), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>
- Melo, A. S. de O., Aguiar, R. S., Amorim, M. M. R., Arruda, M. B., Melo, F. de O., Ribeiro, S. T. C., Batista, A. G. M., Ferreira, T., dos Santos, M. P., Sampaio, V. V., Moura, S. R. M., Rabello, L. P., Gonzaga, C. E., Malinger, G., Ximenes, R., de Oliveira-Szejnfeld, P. S., Tovar-Moll, F., Chimelli, L., Silveira, P. P., ... Tanuri, A. (2016). Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurology*, 73(12), 1407-1416. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3720>

- Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., & Tschopp, J. (2012). ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death & Disease*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.132>
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2009). *Embriologia Clinica*. Elsevier España.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 359-361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
- Mysorekar, I. U., & Diamond, M. S. (2016). Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 481-484. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1605445>
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 591-596. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012>
- Osowski, C. M., & Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*, 490, 71-92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>
- Perpiñá, U., Herranz, C., Martín-Ibáñez, R., Boronat, A., Chiappe, F., Monforte, V., Orpella-Aceret, G., González, E., Olivé, M., Castella, M., Suñé, G., Urbano-Ispizua, Á., Delgado, J., Juan, M., & Canals, J. M. (2020). Cell Banking of HEK293T cell line for clinical-grade lentiviral particles manufacturing. *Translational Medicine Communications*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s41231-020-00075-w>
- Pieren, M., Galli, C., Denzel, A., & Molinari, M. (2005). The Use of Calnexin and Calreticulin by Cellular and Viral Glycoproteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28265-28271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501020200>
- Pinkaew, D., Chattopadhyay, A., King, M. D., Chunhacha, P., Liu, Z., Stevenson, H. L., Chen, Y., Sinthujaroen, P., McDougal, O. M., & Fujise, K. (2017). Fortilin binds IRE1 α and prevents ER stress

- from signaling apoptotic cell death. *Nature Communications*, 8(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00029-1>
- Pöhlking, C., Beier, S., Formanski, J. P., Friese, M., Schreiber, M., & Schwalbe, B. (2023). Isolation of Cells from Glioblastoma Multiforme Grade 4 Tumors for Infection with Zika Virus prME and ME Pseudotyped HIV-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), Article 5.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054467>
- Pulix, M., Lukashchuk, V., Smith, D. C., & Dickson, A. J. (2021). Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 71, 18-24.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.05.001>
- Quintero, J. C. (2019). *Expresión de la proteína E del virus del Zika en las células troncales neurales para generar un modelo de reconocimiento de las células iniciadoras de glioma*. Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Raghunath, P. (2018). Does Zika Virus Really Causes Microcephaly in Children Whose Mothers Became Infected with the Virus during Their Pregnancy? *Iranian Journal of Public Health*, 47(4), 613-614.
- Rawal, G., Yadav, S., & Kumar, R. (2016). Zika virus: An overview. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 5(3), 523-527. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.197256>
- Ren, J., Bi, Y., Sowers, J. R., Hetz, C., & Zhang, Y. (2021). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology*, 18(7), Article 7.
<https://doi.org/10.1038/s41569-021-00511-w>
- Reproducción Asistida ORG. (2024). *Gastrulación y desarrollo de los órganos del bebé*. Reproducción Asistida ORG. <https://www.reproduccionasistida.org/el-segundo-mes-de-embarazo/gastrulacion-y-desarrollo-de-organos-del-bebe/>
- Riaz, T. A., Junjappa, R. P., Handigund, M., Ferdous, J., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2020). Role of Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 α in Cellular Physiology, Calcium, ROS Signaling, and Metaflammation. *Cells*, 9(5), 1160. <https://doi.org/10.3390/cells9051160>

- Royle, J., Ramírez-Santana, C., Akpunarlieva, S., Donald, C. L., Gestuveo, R. J., Anaya, J.-M., Merits, A., Burchmore, R., Kohl, A., & Varjak, M. (2020). Glucose-Regulated Protein 78 Interacts with Zika Virus Envelope Protein and Contributes to a Productive Infection. *Viruses*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/v12050524>
- Runwal, G., Stamatakou, E., Siddiqi, F. H., Puri, C., Zhu, Y., & Rubinsztein, D. C. (2019). LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46657-z>
- Ryu, W.-S. (2017). Chapter 12—Flaviviruses. En W.-S. Ryu (Ed.), *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 165-175). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00012-6>
- Schoberer, J., Shin, Y.-J., Vavra, U., Veit, C., & Strasser, R. (2018). Protein glycosylation in the ER. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1691, 205-222. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_16
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Shaily, S., & Upadhyaya, A. (2019). Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Reviews in Medical Virology*, 29(4), e2050. <https://doi.org/10.1002/rmv.2050>
- Shi, Y., & Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), 443-456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>
- Sikka, V., Chattu, V. K., Popli, R. K., Galwankar, S. C., Kelkar, D., Sawicki, S. G., Stawicki, S. P., & Papadimos, T. J. (2016). The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *Journal of Global Infectious Diseases*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.176140>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S935-S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>

- Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Wawrzynkiewicz, A., Pytel, D., Diehl, J. A., & Majsterek, I. (2021). The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate. *Biomedicines*, *9*(2), 156. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020156>
- Stevens, F. J., & Argon, Y. (1999). Protein folding in the ER. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *10*(5), 443-454. <https://doi.org/10.1006/scdb.1999.0315>
- Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *The Journal of General Virology*, *87*(Pt 10), 2755-2766. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82210-0>
- Stiasny, K., Medits, I., Roßbacher, L., & Heinz, F. X. (2023). Impact of structural dynamics on biological functions of flaviviruses. *The FEBS Journal*, *290*(8), 1973-1985. <https://doi.org/10.1111/febs.16419>
- Su, N., & Kilberg, M. S. (2008). C/EBP Homology Protein (CHOP) Interacts with Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Negatively Regulates the Stress-dependent Induction of the Asparagine Synthetase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(50), 35106-35117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806874200>
- Sun, S., & Mariappan, M. (2020). C-terminal tail length guides insertion and assembly of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(46), 15498-15510. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012992>
- Tan, C. W., Gardiner, B. S., Hirokawa, Y., Smith, D. W., & Burgess, A. W. (2014). Analysis of Wnt signaling β -catenin spatial dynamics in HEK293T cells. *BMC Systems Biology*, *8*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-44>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T.-S., Lim, X.-X., Zhang, S., Lim, X.-N., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C., Corti, D., & Lok, S.-M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the

- flavivirus assembly process. *Nature Communications*, 11(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503-2518.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 445, 77-88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4
- Taouji, S., Wolf, S., & Chevet, E. (2013). Chapter Seventeen—Oligomerization in Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. En J. Giraldo & F. Ciruela (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 117, pp. 465-484). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00017-9>
- Turpin, J., Frumence, E., Harrabi, W., Haddad, J. G., El Kalamouni, C., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P., & Viranaïcken, W. (2020). Zika virus subversion of chaperone GRP78/BiP expression in A549 cells during UPR activation. *Biochimie*, 175, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.011>
- Uvarov, A. V., & Mesaeli, N. (2008). Enhanced ubiquitin-proteasome activity in calreticulin deficient cells: A compensatory mechanism for cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(6), 1237-1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.004>
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714-2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Valente, A. P., & Moraes, A. H. (s. f.). Zika virus proteins at an atomic scale: How does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 25. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0013>

- Viettri, M., León, F. R., Zambrano, J. L., & Ludert, J. E. (2022). La replicación del virus del dengue induce respuestas de estrés en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi, tanto en células de vertebrados como de invertebrados (mosquitos). *Universitas Medica*, 63(3), 1-11.
- ViralZone. (2016). *Zika virus*. ~ *ViralZone*
[page/https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species).
https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species
- Wang, A., Thurmond, S., Islas, L., Hui, K., & Hai, R. (2017). Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1-6. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.141>
- Wang, S., Zhang, Q., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Yau, E. H., Hui, H., Li, W., Furnari, F., & Rana, T. M. (2020). Integrin $\alpha\beta 5$ Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. *Cell Reports*, 30(4), 969-983.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.020>
- Watterson, D., Kobe, B., & Young, P. R. (2012). Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 1), 72-82. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037317-0>
- Wells, M. F., Salick, M. R., Wiskow, O., Ho, D. J., Worringer, K. A., Ihry, R. J., Kommineni, S., Bilican, B., Klim, J. R., Hill, E. J., Kane, L. T., Ye, C., Kaykas, A., & Eggen, K. (2016). Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell*, 19(6), 703-708. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.011>
- Wen, Z., Song, H., & Ming, G. (2017). How does Zika virus cause microcephaly? *Genes & Development*, 31(9), 849-861. <https://doi.org/10.1101/gad.298216.117>
- Wright, M. T., & Plate, L. (2021). Revealing functional insights into ER proteostasis through proteomics and interactomics. *Experimental Cell Research*, 399(1), 112417. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112417>

- Wu, J., & Kaufman, R. J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death and Differentiation*, 13(3), 374-384. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401840>
- Xu, Y., Yang, X., Mei, S., Sun, Y., & Li, J. (2019). Acquisition of temozolomide resistance by the rat C6 glioma cell line increases cell migration and side population phenotype. *Oncology Reports*, 42(6), 2355-2362. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7350>
- Yang, H., Niemeijer, M., van de Water, B., & Beltman, J. B. (2020). ATF6 Is a Critical Determinant of CHOP Dynamics during the Unfolded Protein Response. *iScience*, 23(2), 100860. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100860>
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, 172(4), 565-575. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508145>
- Yu, I.-M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of Virology*, 83(23), 12101-12107. <https://doi.org/10.1128/JVI.01637-09>
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1834-1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J. H., Baker, T. S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure (London, England: 1993)*, 12(9), 1607-1618. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.019>
- Zhu, Z., Gorman, M. J., McKenzie, L. D., Chai, J. N., Hubert, C. G., Prager, B. C., Fernandez, E., Richner, J. M., Zhang, R., Shan, C., Tycksen, E., Wang, X., Shi, P.-Y., Diamond, M. S., Rich, J. N., & Chheda,

M. G. (2017). Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(10), 2843-2857. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>

Zhu, Z., Mesci, P., Bernatchez, J. A., Gimple, R. C., Wang, X., Schafer, S. T., Wettersten, H. I., Beck, S., Clark, A. E., Wu, Q., Prager, B. C., Kim, L. J., Dhanwani, R., Sharma, S., Garancher, A., Weis, S. M., Mack, S. C., Negraes, P. D., Trujillo, C. A., ... Rich, J. N. (2020). Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha\beta 5$ Axis. *Cell Stem Cell*, 26(2), 187-204.e10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.016>