



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la regulación de la expresión
de STAT3 por el *Calicivirus felino*”**

TESIS

Que presenta

ADRIANA LANDA CARDEÑA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de la tesis:

DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

Ciudad de México

noviembre, 2016

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 9 de Virología, bajo la tutoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, profesora e investigadora titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana¹ y de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres¹. Durante la realización de este proyecto fui becaria CONACYT de julio de 2014 a julio de 2016.

¹ Investigador Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV/IPN

Agradezco al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)* la beca No.6362587338860 por su apoyo para la realización de este proyecto de tesis.

Esta tesis fue realizada con el apoyo al proyecto de Ciencia Básica Conacyt- 250696 otorgado a la Dra. Gutiérrez Escolano.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de emprender este camino, para permitirme crecer tanto profesional como personalmente, por darme la sabiduría para poder salir adelante en los momentos difíciles y por permitirme conocer a gente maravillosa,

A mis padres Rosa y Roque, por su amor tan inmenso que me da energía para seguir adelante, por aconsejarme y apoyarme en mis decisiones, por confiar en mí y mantenerse siempre a mi lado para que yo pudiera concluir este proyecto.

A mis hermanos Isela y Roque, por su amor, por ser además mis amigos que me han brindado su confianza y apoyo para poder realizar mis estudios.

A José Luis Valencia y a mi sobrina Darlene, por apoyarme cuando necesitaba ayuda y siempre recibirme cálidamente en casa.

A Gustavo, por apoyarme y confiar en mí para que yo pudiera ingresar a la maestría, por escucharme, darme consejos académicos y por estar a mi lado a pesar de la distancia.

A Felipe, por ser un gran apoyo durante este camino, por ayudarme cada vez que necesitaba algo para poder continuar con mis experimentos y por ayudarme a levantarme en momentos difíciles.

A Belmar, por tu ayuda incondicional al final de esta etapa, por preocuparte por mí, por mi alimentación y por ayudarme al prestarme tu computadora.

A Óscar, por ser un gran amigo incondicional que estuvo a mi lado cuando tenía dudas, por estar siempre dispuesto a ayudar con trato amable y por motivarme en los momentos difíciles.

A Brenda por ser una amiga tan linda, dispuesta a ayudarme en el laboratorio cuando recurría a ti, por escucharme en lo personal, por confiar en mí y permitirme escucharte, y claro por ser la mejor compañera en el deporte.

A Ausencio por preocuparte por mí y darme consejos para no desanimarme y seguirme esforzando, gracias por permitirme conocer a tan maravillosa e inteligente persona.

A Hugo, Bilma, Paulina, Dulce, Suilma y Luis, por sus consejos tanto académicos como personales y ser tan geniales compañeros en esta etapa.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo en el laboratorio, por sus consejos, su tiempo y dedicación y por enseñarme que los errores son para aprender de ellos y tratar de mejorar.

A la Dra. Cleotilde Cancio Lonches, por la ayuda en el laboratorio para que yo pudiera llevar a cabo mis experimentos, por siempre estar dispuesta a escucharme, aconsejarme y ayudarme de la manera más amable, sin olvidar tu amistad que hizo más amena la estancia en el laboratorio.

A las Dras Patricia Talamás Rohana y Rosa María Núñez de Cáceres, por su asesoría, sus consejos, su tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES GENERALES	11
2.1 Clasificación	11
2.2 El <i>Calicivirus felino</i>	11
2.2.1 Biología del <i>Calicivirus felino</i>	12
2.2.1.1 Características generales	12
2.2.1.2 Genoma del FCV	12
2.2.1.3 Proteínas no estructurales	13
2.2.1.4 Proteínas estructurales	14
2.2.1.5 Ciclo replicativo del FCV	14
2.3 Apoptosis	16
2.3.1 Caspasas	18
2.3.2 Apoptosis y calicivirus	19
2.3.4 Proteínas celulares reguladoras de la apoptosis	20
2.4 El proteasoma en la apoptosis	21
2.4.1 Inhibidores del proteasoma	22
2.5 STAT	23
2.5.1 STAT3	23
2.5.1.1 Modificaciones postraduccionales de STAT3	24
2.6 Vía JAK/STAT	25
2.6.1 Proteínas regulatorias de STAT3	26
2.6.2 STAT3 y lipopolisacárido	27
2.6.3 STAT3 y el proteasoma	27
2.6.4 STAT3 durante las infecciones virales	28
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	29
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	32
6.1 Objetivo general	32

6.2	Objetivos particulares	32
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL	33
8.	METODOLOGÍA	34
8.1	Cultivo celular	34
8.2	Propagación viral	34
8.3	Extracción del RNA	34
8.4	Obtención del cDNA	35
8.5	Diseño de oligonucleótidos para PCR	35
8.6	RT-PCR	35
8.7	Extractos proteicos celulares	36
8.8	Anticuerpos para Western blot	36
8.9	Inmunodetección mediante Western blot	37
8.10	Fraccionamiento celular	37
8.11	Células tratadas con lactacistina	39
8.12	Células tratadas con lipopolisacárido	39
8.13	Inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal	39
8.14	Anticuerpos para inmunofluorescencia	40
8.15	Análisis densitométrico	40
8.16	Análisis estadístico	40
9.	RESULTADOS	41
9.1	La infección por el FCV regula negativamente la expresión del RNA de STAT3.	41
9.2	STAT3-pTyr es regulado negativamente durante la infección por FCV.	44
9.3	STAT3-pTyr se redistribuye en el citoplasma durante la infección por el FCV.	45
9.4	STAT3-pTyr 705 es regulada negativamente en el citoplasma.	49
9.5	La regulación negativa de STAT3-pTyr implica la vía de degradación proteasomal	52
10.	DISCUSIÓN	60
11.	CONCLUSIONES	65
12.	PERSPECTIVAS	66
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica del <i>Calicivirus humano</i> .	12
Figura 2. Estructura de la partícula viral del FCV.	12
Figura 3. Genoma del FCV.	13
Figura 4. Ciclo replicativo de los calicivirus.	15
Figura 5. Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca.	18
Figura 6. Dominios de unión de la proteína STAT3.	24
Figura 7. Vía de señalización de STAT3.	26
Figura 8. La infección por el FCV induce cambios en la densidad y morfología celular.	42
Figura 9. Regulación de la expresión del RNAm de STAT3 durante la infección con el FCV.	43
Figura 10. Expresión de STAT3 y STAT3-pTyr en extractos totales de células CrFK infectadas con el FCV.	45
Figura 11. Localización subcelular de STAT3-pTyr en células CrFK analizadas mediante microscopía confocal.	46
Figura 12. Localización subcelular de STAT3-pTyr durante la infección con el FCV.	48
Figura 13. Expresión de STAT3 y STAT3-pTyr y en extractos proteicos citoplásmicos de células CrFK infectadas con el FCV.	50
Figura 14. Expresión de STAT3 y STAT3-p-Tyr de extractos proteicos nucleares de células CrFK infectadas con el FCV.	51
Figura 15. Redistribución de STAT3-pTyr durante el tratamiento con lactacistina en células infectadas con FCV y analizadas mediante microscopía confocal.	55
Figura 16. Expresión de la proteína STAT3 y STAT3-p-Tyr705 en extractos totales de células CrFK infectadas con el FCV y tratadas con lactacistina.	57
Figura 17. Células CrFK tratadas con LPS para la inducción de la translocación de STAT3 al núcleo y analizadas mediante microscopía confocal.	59

RESUMEN

Los Norovirus humanos (NoV) constituyen una de las principales causas de brotes de gastroenteritis en la población mundial, con una alta tasa de morbilidad y de mortalidad en la población infantil. Debido a que su estudio se ha visto limitado por la dificultad para propagarlos en cultivo celular, el *Calicivirus felino* (FCV) representa un buen modelo para el estudio de su biología. Durante la infección por FCV se regulan mecanismos celulares como la inducción de la apoptosis para que las nuevas partículas virales puedan propagarse en su huésped. En este proceso, el FCV regula negativamente la expresión de las proteínas celulares inhibitorias de la apoptosis (IAP) XIAP y survivina. La proteína survivina es importante para la inducción de la apoptosis y su expresión es regulada positivamente por la proteína Transductora de Señal y Activadora de la Transcripción 3 (STAT3), la activación de STAT3 puede ocurrir mediante diversos estímulos, como citocinas, los cuales inducen su fosforilación en el residuo tirosina 705 favoreciendo su dimerización y translocación al núcleo en donde ejerce su actividad transcripcional de sus genes blanco, como el de la survivina. Por lo que en este trabajo estudiamos la expresión y localización subcelular de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV. Observamos que en células CrFK la proteína STAT3-pTyr se encuentra localizada en la región perinuclear y que durante la infección por el FCV la proteína es deslocalizada distribuyéndose hacia el citoplasma y que es regulada negativamente, lo que sugiere que la vía JAK-STAT está alterada. Dado que esta vía puede ser modulada por la vía proteasomal, utilizamos el inhibidor del proteasoma lactacistina durante la infección, observando que STAT3-pTyr presentaba una localización subcelular semejante a la de las células no infectadas, lo que sugiere que la vía proteasomal participa en la regulación y deslocalización de STAT3-pTyr durante la infección. La falta de activación transcripcional de STAT3-pTyr en el núcleo celular, así como la vida media corta de survivina podrían ser la causa de que ésta disminuya durante la infección y contribuya en la inducción de la apoptosis observada durante la infección por el FCV.

1. INTRODUCCIÓN

Las gastroenteritis virales representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afectando principalmente a la población infantil, causando aproximadamente 2.5 millones de muertes anuales (Cheun et al., 2010). Particularmente, los norovirus (NoV) son patógenos entéricos que constituyen actualmente una de las principales causas de brotes por enfermedad gastrointestinal en todo el mundo, y son responsables de aproximadamente el 12% de la hospitalización por gastroenteritis severa en niños menores de 5 años de edad; cada año, los NoV causan aproximadamente 900,000 casos de gastroenteritis en niños en las poblaciones industrializadas y 200,000 muertes en los países en desarrollo (Patel et al., 2008). Debido a que las vacunas contra el rotavirus han sido ampliamente distribuidas y la prevalencia de los casos graves de las infecciones por este virus han disminuido significativamente, los NoVs podrían llegar a ser el patógeno entérico más importante en la población pediátrica en todo el mundo (Koo et al., 2010).

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Clasificación

Los calicivirus son la causa de importantes enfermedades veterinarias y humanas, por ello se han realizado numerosos avances para el entendimiento de su biología molecular (Clarke y Lambden, 1997).

La familia *Caliciviridae* comprende a los géneros *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus* y *Vesivirus*. Los estudios de norovirus que infectan a humanos se han visto limitados debido a las dificultades para cultivarlos *in vitro*. Sin embargo, se ha logrado un progreso significativo en el estudio de los mecanismos de replicación de estos virus con el desarrollo de sistemas biológicos. Por ejemplo, el *Calicivirus felino* (FCV) es considerado un modelo para el estudio de su biología debido a: 1) su semejanza en la organización genética con los norovirus que infectan a humanos; 2) a la disponibilidad para ser propagado *in vitro* (Bhella et al., 2008; Fretz et al., 2003; Green, 2001), y 3) al desarrollo de un sistema de genética reversa (Clarke y Lambden, 1997).

2.2 El *Calicivirus felino*

El FCV es un virus que se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo y es el principal agente causal de la enfermedad respiratoria severa en gatos (Green et al., 2002), produce la formación de úlceras orales y linguales, estomatitis crónica y conjuntivitis (Clarke y Lambden, 1997). Sin embargo, a pesar de que las vacunas contra el FCV son eficaces en la protección a gatos, no inducen una inmunidad esterilizante pero sí reducen la severidad de los signos clínicos (Berger et al., 2015).

2.2.1 Biología del *Calicivirus felino*

2.2.1.1 Características generales

La partícula viral del FCV tiene un tamaño de 30-40 nm de diámetro y muestra una morfología de “estrella de David” (Figura 1).

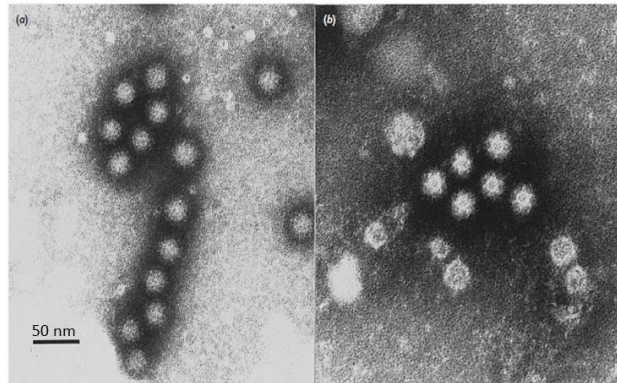


Figura 1. Micrografía electrónica de *Calicivirus humano*. a) *Calicivirus humano* y b) virus teñidos con ácido fosfotungsténico de potasio a pH de 6.5 mostrando una morfología de “estrella de David”.

Está compuesta de 90 dímeros de la proteína principal de la cápside VP1 y posee entre 1 y 2 copias de la proteína minoritaria de la cápside VP2 (Figura 2) (Clarke y Lambden, 1997).

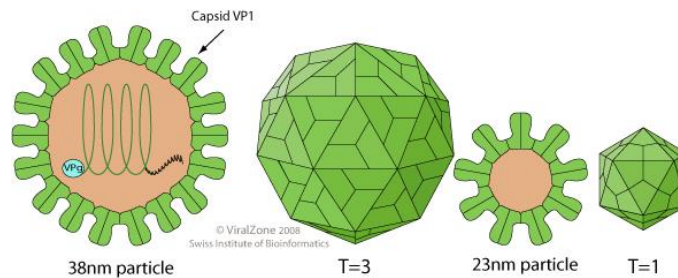


Figura 2. Estructura de la partícula viral del FCV. El FCV, como todos los calicivirus es un virus no envuelto, con una cápside de aproximadamente 30-40 nm de diámetro, con una simetría icosaédrica. La cápside está compuesta por 180 copias de la proteína VP1.

2.2.1.2 Genoma del FCV

El FCV posee un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva y de una longitud de 7.5 kb que está poliadenilado en su extremo 3' terminal, mientras que en su extremo 5' carece de una estructura cap típica de los RNAm eucarióticos; en su lugar posee unida covalentemente a la

proteína viral VPg (del inglés: Viral Protein genomic linked) (Hansman GS, 2010). Su genoma está organizado en tres marcos de lectura abiertos u ORF's (del inglés: Open Reading Frame). El ORF1 codifica para una poliproteína de aproximadamente 200 kDa que es procesada co- y post-traduccionalmente por la proteasa NS6 para dar lugar a 6 proteínas no estructurales (NS): NS1 a NS6/7. Los ORF2 y ORF3 codifican para las proteínas mayoritaria y minoritaria de la cápside respectivamente, a partir de un RNA precursor subgenómico. En sus extremos se encuentra flanqueada por las regiones no traducidas (RNT) 5' y 3' (Figura 3) (Clarke y Lambden, 2001; Hansman GS, 2010; Sosnovtsev et al., 2002).

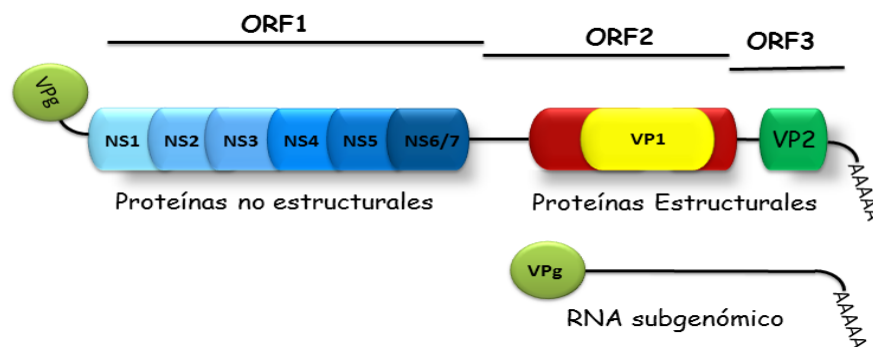


Figura 3. Genoma del FCV. El FCV cuenta con un genoma lineal de RNA cadena sencilla y polaridad positiva de 7.5 kb. El extremo 5' terminal está unido a una proteína VPg y el extremo 3' terminal tiene un tracto poliadenilado. Cuenta con tres ORF's: ORF1, ORF2 y ORF3 (tomado de Clarke y Lambden, 2001).

2.2.1.3 Proteínas no estructurales

El ORF1 codifica para una poliproteína que es procesada proteolíticamente a través de cinco sitios de corte identificados que producen la liberación de las 6 proteínas NS maduras: NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 y NS6/7. Las proteínas NS2, NS3 y NS4, tienen una función en la reorganización de membranas del retículo endoplásmico (RE) para dar lugar a los complejos replicativos. Particularmente, NS3 o p39 suprime la respuesta inmune innata al prevenir la activación del factor regulador del Interferón-3 (IRF-3, por sus siglas en inglés), el cual es inducido por RNA de doble cadena (dcRNA) (Yumiketa et al., 2016). NS4 o p30 forma parte de un precursor que

contiene a la proteína VPg y a la proteasa viral (Sosnovtsev et al., 2006). La proteína NS5 o VpG se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico y subgenómico, tiene la función de promover la traducción del RNA debido a su interacción con factores de inicio de la traducción eucariótica (eIF) como eIF4G y eIF3 (Daughenbaugh et al., 2006). La proteína NS6 o 3C tiene actividad proteínasa con su sitio activo en cisteína, su función principal es el procesamiento del precursor de las proteínas no estructurales y contribuye en el establecimiento de la infección; por último, la proteína NS7 es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) la cual sintetiza a los RNA virales (Belliot et al., 2005; Green, 2001).

2.2.1.4 Proteínas estructurales

VP1, es la proteína viral mayoritaria de la cápside y tiene un papel importante en la determinación antigénica y en la interacción del virus con la célula huésped. VP2, es la proteína viral minoritaria de la cápside porque está presente en una a dos copias por virión y su función es la de participar en el incremento de la eficiencia de la expresión de VP1 y en la estabilización de la cápside (Green, 2001).

2.2.1.5 Ciclo replicativo del FCV

La primera interacción del FCV con su célula blanco es a través de JAM1 (por sus siglas en inglés: Junctional Adhesion Molecule 1), su receptor celular, que es una molécula que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que está presente en las uniones estrechas (Bhella et al., 2008; Makino et al., 2006). La entrada del virus ocurre a través de la membrana plasmática, por endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina. La acidificación endosomal es importante para la liberación del genoma al citoplasma. Cabe mencionar, que su entrada en las células CrFK requiere de un bajo pH (Stuart and Brown, 2006).

Después de que el virión es internalizado y el genoma es desempaquetado, éste sirve como molde para la síntesis de las proteínas NS virales. La proteína VPg unida al genoma recluta a componentes de la

maquinaria de traducción celular como el complejo de inicio de la traducción eIF4F y a la subunidad ribosomal 40S para llevar a cabo la traducción de la poliproteína, la cual por medio del procesamiento co-traducciona libera a las proteínas NS. A partir del RNA genómico se sintetiza el RNA antigenómico que sirve como molde para la síntesis del RNA genómico y subgenómico que dará lugar a las proteínas estructurales. La VP1 del FCV es adicionalmente cortada por la proteasa viral (NS6) liberando a la región amino terminal conocida como proteína líder de la cápside (LC), implicada en el efecto citopático y asociada con la inducción de la apoptosis. La síntesis del RNA genómico permite principalmente que éste forme el genoma de la progenie viral, aunque también puede continuar traduciendo o ser nuevamente replicado. Finalmente, ocurre el empaquetamiento del RNA genómico de manera concomitante con el ensamblaje de 90 dímeros de la proteína VP1, lo cual permite la formación de los viriones maduros que son liberados por lisis celular mediante la apoptosis (Figura 4)(Rohayem et al., 2010).

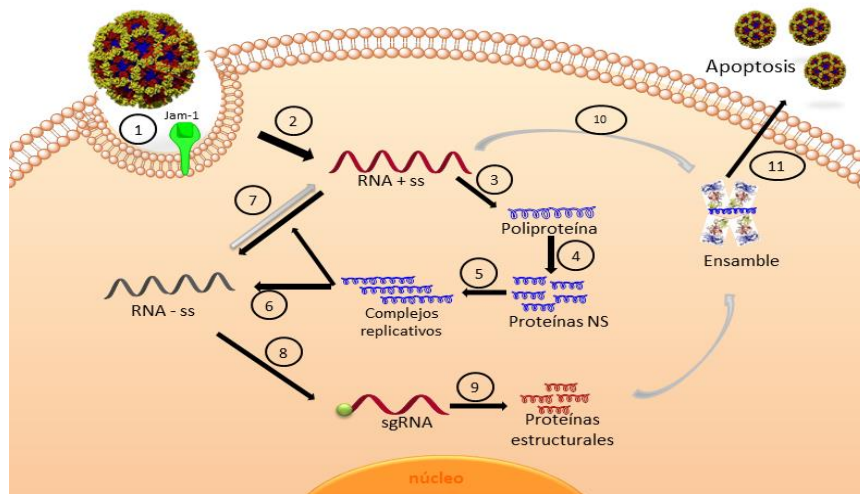


Figura 4. Ciclo replicativo de los calicivirus. Después de la interacción de la proteína de la cápside con el receptor celular, el virión es internalizado (1). El genoma viral es desenvuelto (2) y ocurre la traducción del precursor de la poliproteína (3), la cual al ser procesada co-traduccionalmente libera a las proteínas no-estructurales (4) que son ensambladas en los complejos de replicación (5) para sintetizar al RNA antigenómico (6), el cual servirá como molde para la síntesis del RNA genómico (7) que será o bien sintetizado como un precursor de la poliproteína (3) o usado para el empaquetamiento dentro de la cápside (10). El RNA antigenómico sirve también como molde para la síntesis del RNA subgenómico (8), que es traducido para dar lugar a las proteínas estructurales VP1 y VP2 (9) y por último ocurre la liberación de los viriones maduros desde la célula (11) (Rohayem et al., 2010).

A la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados en la liberación de las partículas virales del FCV, sin embargo, se ha observado que durante la infección ocurre un rápido efecto citopático que está relacionado con la aparición de la proteína LC en las células infectadas (Abente et al., 2013). Asimismo, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se reportó que la inducción de la expresión de la proteína HSP70, ejerce una función antiapoptótica durante la infección por el FCV, ya que es capaz de unirse a proteínas apoptóticas disminuyendo la liberación viral que correlaciona con la inhibición de la activación de caspasas, demostrando el papel de la apoptosis en la salida viral (Alvarez-Sanchez et al., 2015).

2.3 Apoptosis

La apoptosis es un proceso bioquímico de autodestrucción y defensa altamente regulado en organismos multicelulares cuya función es mantener la homeostasis en la embriogénesis o en células dañadas por factores externos como falta de oxígeno, radiación ultravioleta e infección por virus. La apoptosis se lleva a cabo a través de la activación de un grupo de cisteín proteasas dirigidas contra aspartato llamadas caspasas y una cascada de eventos que unen los estímulos para desencadenar en la muerte celular a partir de dos vías principales: la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Figura 5). En la vía extrínseca participan los receptores de muerte que son miembros de la familia de genes del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y que consisten de dos dominios, uno extracelular rico en cisteína y otro citoplásmico conocido como “dominio de muerte”. Cuando estos receptores interactúan con sus ligandos, reclutan a proteínas adaptadoras citoplásmicas y finalmente activan a las caspasas. Las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y en efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Una caspasa iniciadora tiene la función de activar a la caspasa efectora a través del corte en un residuo aspartato, una vez activadas, estas caspasas cortan proteolíticamente a blancos celulares para finalmente

desencadenar la muerte celular (Earnshaw et al., 1999; Elmore, 2007; Shi, 2002).

Por otro lado, en la vía intrínseca participan proteínas no receptoras que al detectar estímulos negativos como la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citocinas, o estímulos positivos como la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, radicales libres e infecciones virales, producen señales intracelulares que desencadenan la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT), la pérdida del potencial transmembrana y consecuentemente la liberación de proteínas proapoptóticas que normalmente se encontraban en el espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol, como el citocromo *c*, la serina proteasa HtrA2/Omi, el factor inductor de la apoptosis (AIF), la endonucleasa G y Smac/DIABLO (por sus siglas en inglés: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP Binding Protein with Low pI). El citocromo *c* se une y activa al factor activador de las proteasas de apoptosis o Apaf 1 (del inglés: Apoptosis protease-activating factor-1) y a la procaspasa 9, formando el apoptosoma y permitiendo el autoprosesamiento de la procaspasa 9 para dar lugar a su forma activa de caspasa 9 (Elmore, 2007). AIF y la endonucleasa G se translocan al núcleo y ocasionan la fragmentación del DNA. HtrA2/Omi y Smac/DIABLO promueven la apoptosis mediante la inhibición de la activación de las proteínas IAP. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca convergen en una misma vía terminal que se inicia por el corte o activación de la caspasa 3 y que resulta en la fragmentación del DNA, degradación del citoesqueleto y de proteínas nucleares, el entrecruzamiento de proteínas y la formación de cuerpos apoptóticos (Martinvalet et al., 2005). Asimismo, se producen otros cambios morfológicos celulares como la contracción, la disminución en tamaño, el citoplasma denso, los organelos más compactos y la picnosis como resultado de la condensación de la cromatina (Elmore, 2007; Sosnovtsev et al., 2003).

La apoptosis intrínseca puede ser inducida por la infección viral; por ejemplo, se sabe que durante la infección por reovirus, Smac/DIABLO se transloca desde la membrana mitocondrial al citoplasma bajo la activación de

caspasas mediante la inhibición de las proteínas IAPs (Kominsky et al., 2002). Mientras que durante la infección por el calicivirus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) se encontró que la muerte celular debido a la inducción de la apoptosis es un mecanismo clave en la patogénesis de la enfermedad (Alonso et al., 1998).

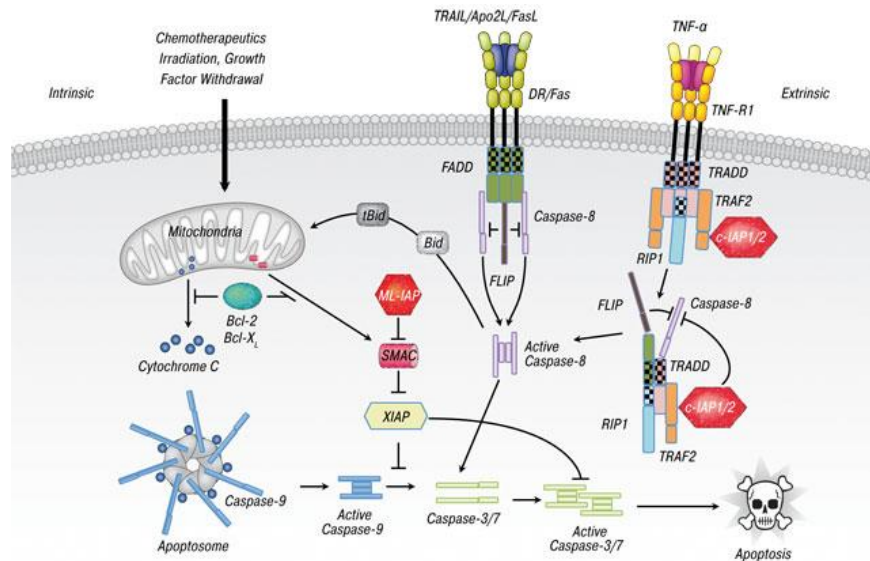


Figura 5. Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca (de Almagro and Vucic, 2012).

2.3.1 Caspasas

Las caspasas son un grupo de proteasas que tienen especificidad por el sitio de corte en el residuo aspartato (asp). La mayoría de las caspasas participan en la apoptosis y en la activación proteolítica de otras caspasas, lo que contribuye al progreso de la muerte celular. Algunas de las caspasas generan citocinas proinflamatorias maduras y regulan la respuesta inmune, incluyendo el control de la proliferación de las células T y la progresión del ciclo celular. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos que en el extremo N-terminal poseen un prodominio regulatorio de gran longitud. La proforma de caspasa es activada por un corte proteolítico en residuos aspartato específicos que separa una subunidad corta del extremo C-terminal del resto de la molécula, permitiendo el ensamble de una proteasa activa que autocatalíticamente corta su prodominio. Una vez activadas, algunas caspasas pueden propagar la activación de otros miembros de familias e

iniciar y formar una cascada de apoptosis proteolítica. De acuerdo a su estructura las caspasas pueden ser divididas en iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio largo y un papel regulatorio en la activación de caspasas efectoras, estas últimas poseen un prodominio pequeño y cortan a diversos sustratos celulares (Sadowski-Debbing et al., 2002). La vía intrínseca es iniciada por el corte de la caspasa 3 y resulta en la fragmentación del DNA, la degradación del citoesqueleto y de proteínas nucleares, entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y la atracción de células fagocíticas. Esta cascada proteolítica, en la cual una caspasa puede activar a otras caspasas, amplifica la vía de señal apoptótica y permite una rápida muerte celular (Elmore, 2007).

2.3.2 Apoptosis y calicivirus.

Se ha documentado ampliamente que durante la replicación de los miembros de la familia *Caliciviridae* se induce la apoptosis intrínseca, por ejemplo, durante la replicación por el norovirus murino MNV-1 se genera apoptosis en las células RAW 264.7 mostrando cambios morfológicos celulares, como por ejemplo, en la composición de la membrana celular externa, compactación y fragmentación de la cromatina, y cambios bioquímicos como la salida del citocromo c. Estos cambios están asociados con la activación de la cascada de señalización que incluye la activación de las caspasas 3 y 9 a través de la vía mitocondrial (Bok et al., 2009). La expresión de la poliproteína codificada por el ORF1 de MNV-1 es suficiente para la inducción de la apoptosis, que se caracteriza por la regulación negativa de survivina, así como la activación de caspasas (Herod et al., 2014).

Durante la infección por FCV también se induce la apoptosis para la liberación del virus y la diseminación de su progenie viral (Sosnovtsev et al., 2003). Se conoce que la proteína de la cápside VP1 del FCV puede ser cortada por las caspasas; sin embargo, se desconoce cuál es la función de los péptidos generados (Al-Molawi et al., 2003).

2.3.3 Proteínas celulares regulatorias de la apoptosis

La apoptosis también es regulada por otras proteínas celulares como las de la familia Bcl-2, que engloban a proteínas tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas dependiendo de si la célula requiere o no de la apoptosis. Entre las proteínas anti-apoptóticas se encuentra a la proteína Bcl-2 que cumple con la función de inhibir la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria y entre las proteínas pro-apoptóticas se encuentran principalmente Bad, Bax y Bid, que normalmente se encuentran en el citoplasma pero que son capaces de translocarse hacia la membrana mitocondrial para promover la liberación del citocromo *c* (Cory y Adams, 2002).

Existe una familia de proteínas reguladoras negativas conocidas como proteínas antiapoptóticas (IAPs), las cuales fueron identificadas originalmente en el genoma de baculovirus basado en su capacidad de suprimir la apoptosis en células infectadas. Las IAPs se caracterizan por la presencia de dominios repetidos baculovirales BIR (del inglés: *baculoviral IAP repeat*), de aproximadamente 80 residuos de dominios de unión a zinc que median las interacciones proteína-proteína (Silke y Meier, 2013). En mamíferos se han identificado ocho distintas IAPs, conocidas como IAP unida a X (XIAP), c-IAP1 y 2 y ML-IAP/Livin (Shi, 2002), las cuales cumplen con su función anti-apoptótica al unirse a proteínas proapoptóticas y a caspasas que se encuentran activadas proteolíticamente (Vasudevan y Don Ryoo, 2015). Sin embargo, Smac/DIABLO es capaz de unirse a las IAPs como XIAP, c-IAP1, c-IAP2, baculoviral OpiAP y survivina, evitando de esta manera la regulación negativa de la apoptosis y en cambio promover el progreso de la apoptosis (Shiozaki y Shi, 2004).

Survivina, el miembro más pequeño de la familia de las IAPs, está implicada en el control del ciclo celular y en la resistencia a la apoptosis, ya que interactúa como cofactor con otras moléculas como por ejemplo, XIAP y de esta manera inhibe la activación de la caspasa 9. La interferencia en la expresión de survivina causa la muerte celular dependiente de caspasas

durante la fase G2/M del ciclo celular que es la fase en donde se encuentra más expresada (Aoki et al., 2003). La survivina es expresada en células normales como en en tejidos fetales y en algunos tejidos de adulto pero ya no es expresada en células diferenciadas, sin embargo la expresión de survivina puede observarse de manera anormal en las neoplasias (Boidot et al., 2014), asimismo, se ha reportado que en células de cáncer de pulmón se induce la expresión de survivina durante la fase M a través de la regulación directa de su gen mediante la activación por la proteína STAT3, la cual se encuentra activada persistentemente en este tipo de células previniendo la apoptosis, siendo que en condiciones normales su activación ocurre de manera transitoria (Aoki et al., 2003; Gritsko et al., 2006). Por otro lado, se observó que al bloquear la expresión de STAT3, se incrementaba la expresión de otros genes, incluyendo al gen de la caspasa 4, que está involucrada en la apoptosis. Estos datos en conjunto sobre la expresión diferencial de survivina en células normales *versus* células tumorales identifica a survivina como un marcador potencial en el diagnóstico del cáncer así como un blanco atractivo terapéutico. Por lo tanto, se propone que la inhibición de survivina a través de la disrupción de la vía de señalización de STAT3 podría ser benéfica para inducir la apoptosis en células cancerosas (Gritsko et al., 2006). Esto, sugeriría que la regulación negativa de survivina en células infectadas por FCV es a través de la vía STAT3.

2.4 El proteasoma en la apoptosis

El proteasoma es un sistema que juega un papel importante en la degradación de proteínas en el citoplasma y en el núcleo de las células eucarióticas para la regulación de procesos como la proliferación, crecimiento, reparación del DNA, transcripción, respuesta inmune y apoptosis, entre muchos otros. El proteasoma 26S tiene una masa molecular de 2500 kDa y está conformado por la subunidad 20S y dos partículas 19S, siendo la subunidad 20S la clave del sistema ubiquitin-proteasoma, ya que contiene varios centros activos catalíticos (Guedes et al., 2016). El sistema ubiquitin-proteasoma media la degradación de proteínas regulatorias del ciclo celular.

Este proceso está relacionado estrechamente con el control de la apoptosis a través de la modulación de los niveles de los factores pro- y anti-apoptóticos, de manera que la inhibición de la actividad del proteasoma tiene un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico, que resulta en la sobreexpresión de factores apoptóticos como p53, Bax y NOXA, y se reducen los niveles de proteínas anti-apoptóticas como IAPs y Bcl-2. Por ello, la inhibición de la función del proteasoma es una estrategia para la terapia contra el cáncer (Crawford et al., 2011). El proteasoma también participa en la vía JAK-STAT degradando a las proteínas fosfatasa encargadas de defosforilar a las proteínas STAT, de esta manera regulan negativamente a la vía JAK/STAT (Yu and Burakoff, 1997).

2.4.1 Inhibidores del proteasoma

Se han desarrollado fármacos inhibidores del proteasoma 20S que pueden o no formar una unión covalente con la treonina 1 del sitio activo. Algunos ejemplos de inhibidores del proteasoma son: Bortezomib, Carfilzomib, NPI-0052, MLN9708, CEP-18770, ONX0912 (Crawford et al., 2011) delanzomib, epoximicina, fellutamida B, Marizomib, Oprozomib (Guedes et al., 2016), MG132, ALLN y lactacistina (Qiu et al., 2000). La lactacistina es una droga que induce la muerte celular mediada por la producción incrementada de especies reactivas de Oxígeno ROS (Por sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*). Este deterioro resulta en la translocación de Bax y la liberación del citocromo c desde la mitocondria debido a la formación de poros de transición permeable (Perez-Alvarez et al., 2009). El mecanismo de acción de lactacistina consiste en su unión irreversible a ciertas subunidades catalíticas del proteasoma 20S, estas subunidades son modificadas por lactacistina en la cadena hidroxilo de la treonina amino terminal. Lactacistina es el único componente conocido que inhibe específicamente al proteasoma sin inhibir a un amplio rango de proteasas (Fenteany and Schreiber, 1998).

2.5 STAT

Las proteínas de la familia STAT son transductoras de señales citoplásmicas y activadores transcripcionales, denominadas como STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B Y STAT6, las cuales cumplen con funciones distintas, por ejemplo, STAT1 y 2 son estimuladas por IFN para inducir a la célula huésped en un estado antiviral (Ignatius Irudayam et al., 2015), STAT5A y STAT5B están involucradas en la proliferación celular e inducción de apoptosis (Dalgic et al., 2015), STAT4 está relacionada en la vía de señalización de IL-12 y en el desarrollo de las células TH1 mientras que STAT6 en el desarrollo de las células TH2 (Kaplan et al., 1996; Shimoda et al., 1996).

2.5.1 STAT3

STAT3 es una proteína de 92 kDa que cumple su papel en la transcripción de genes involucrados en la sobrevivencia, proliferación, angiogénesis, apoptosis para mantener el equilibrio a través de su activación e inactivación (Brown et al., 2015). Estructuralmente se conforma por cinco dominios (Figura 6):

- ❖ **El dominio N-terminal** involucrado en las interacciones dímero-dímero y en la translocación al núcleo.
- ❖ **El dominio *coiled-coil*** que consiste de cuatro hélices alfa que favorecen las interacciones proteína-proteína y se ha relacionado con la regulación de la salida de STAT desde el núcleo (Levy y Darnell, 2002; Shuai, 2000; Zhang et al., 1998).
- ❖ **El dominio de unión a DNA** que forma complejos entre la proteína STAT y el DNA y también se ha relacionado con la regulación de la salida de STAT desde el núcleo. (Kisseleva et al., 2002; Levy y Darnell, 2002).
- ❖ **El dominio SH2 (*Src-Homology 2*)** de unión a fosfotirosinas, es un dominio altamente conservado que está involucrado en la unión de STAT al receptor de citosina fosforilado así como en la fosforilación en residuos tirosina por tirosina cinasas (Schindler, 2002).

- ❖ **El dominio C-terminal** es un dominio de transactivación, que permite la fosforilación en residuos serina localizados dentro de este dominio y favorecen la actividad transcripcional (Al Zaid Siddiquee y Turkson, 2008; Yang et al., 2005). El *splicing* alternativo puede dar lugar a variantes truncadas como STAT1 β y STAT3 β , que poseen deleciones en los dominios C-terminal y que funcionan como dominantes negativos (Levy y Darnell, 2002).

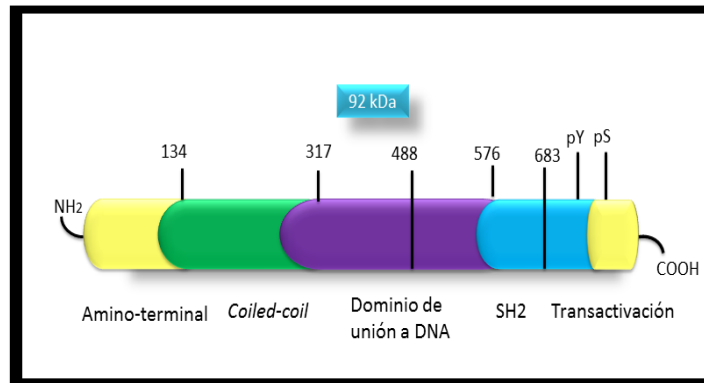


Figura 6. Dominios de unión de la proteína STAT. Amino terminal, *coiled coil*, de unión a DNA, SH2 y dominio de transactivación.

2.5.1.1 Modificaciones postraduccionales de STAT3

Las modificaciones postraduccionales de STAT3 afectan el manejo de la transcripción, por ejemplo, la metilación en arginina en el dominio amino terminal incrementa su efectividad transcripcional al bloquear la asociación de STAT3 con las proteínas inhibitorias de STAT3 activada (PIAS3), y la acetilación en lisina 685 por histonas acetiltransferasas sirve para potenciar su actividad transcripcional (Levy y Darnell, 2002).

Una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas es la fosforilación, debido a su importante función como transductor de señal y que al ser un proceso reversible modula la función de la proteína blanco a través de una red de transducción de señales. El proceso de fosforilación y defosforilación controla la función de la proteína, a través de un cambio conformacional que modifica su actividad, sus propiedades, su localización celular y su interacción con otras proteínas. Estos procesos ocurren a través del ataque covalente de grupos fosfato sobre residuos serina, treonina y

tirosina por proteínas cinasas y que son removidos por fosfatasas. La fosforilación, además funciona como un sitio de anclaje de proteínas y a través de cambios en la conformación de las proteínas puede modular directamente la actividad enzimática (Humphrey et al., 2015).

Normalmente, las proteínas STAT se encuentran no fosforiladas pero pueden ser fosforiladas tanto en los residuos serina 727 (ser727) como en el residuo tirosina 705 (Tyr705) que se encuentran en su dominio amino terminal. La fosforilación en serina se ha asociado con potenciar la transcripción y puede llevarse a cabo por serina cinasas como MAPK (p38, ERK, JNK), PKC y mTOR, mientras que la fosforilación en tirosina puede llevarse a cabo por tirosina cinasas (TK) de los receptores sobre el residuo tyr 705 de los receptores celulares (RTKs) como por ejemplo interferón, IL-5, IL-6 y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), o por tirosina cinasas citoplásmicas no receptores (NRTKs) como Src, cinasa Janus (JAK) o cinasa Abelson (Abl). Una vez fosforilada en tirosina se favorece su dimerización, translocación nuclear, unión a DNA y activación de la transcripción de genes (Kamran et al., 2013).

En condiciones normales su activación es rápida y transitoria, sin embargo, puede alterarse en células malignas donde los niveles de *p*-tyr-STAT3 se encuentran elevados (Sahu y Srivastava, 2009) y existe la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-xL/Bcl-2 y Mcl-1 (Al Zaid Siddiquee y Turkson, 2008). Finalmente se alteran los eventos como el crecimiento celular, se promueve la angiogénesis, invasión, metástasis y el desarrollo de resistencia a la apoptosis (Al Zaid Siddiquee y Turkson, 2008; Sahu y Srivastava, 2009).

2.6 Vía JAK-STAT

Uno de los principales mecanismos que favorecen la fosforilación de STAT3 en su residuo Tyr705 es la vía JAK/STAT. El mecanismo de esta vía consiste en que cuando los receptores dimerizan y reclutan a JAKs, son activados por auto o transfosforilación. Las JAKs activadas fosforilan sobre residuos tirosina de los dominios citoplásmicos de los receptores, y así

pueden reclutar a STAT sobre su dominio SH2 (Gu et al., 2007; Levy y Darnell, 2002).

Subsecuentemente, las proteínas STAT son fosforiladas en residuos específicos de tirosina en el dominio C-terminal y de esta manera son activadas, formando homodímeros o heterodímeros a través de la interacción de los dominios *p*-Tyr-SH2. A continuación, se translocan al núcleo en donde se unen a secuencias específicas sobre los promotores de genes blanco para regular la transcripción de genes involucrados en la sobrevivencia, la diferenciación, la inflamación, la respuesta inmune, la progresión del ciclo celular (como *fos*, *ciclina D1*, *myc* y *pim-1*)(Figura 7) (Al Zaid Siddiquee y Turkson, 2008; Xiong et al., 2014) y la activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL y survivina (Sahu y Srivastava, 2009).

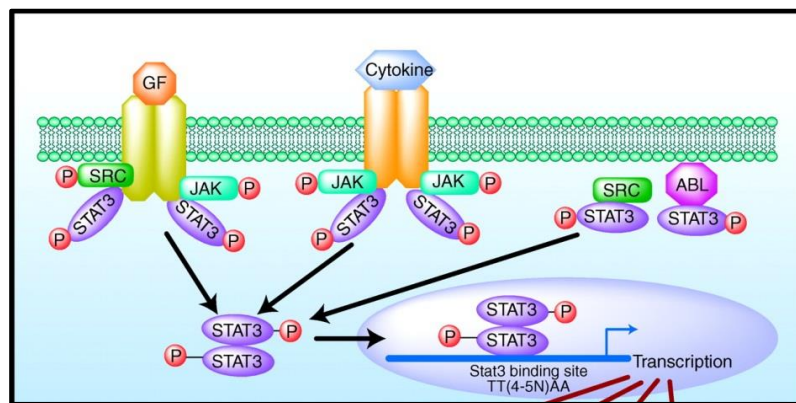


Figura 7. Vía de señalización de STAT3. En el citoplasma STAT3 llega a ser activado por el reclutamiento de fosfotirosinas en los receptores de los factores de crecimiento (EGF), receptores a citoquinas (IL-6) o cinasas tirosina no receptores (Src y Bcr-Abl) a través de sus dominios SH2. STAT3 es fosforilado sobre el residuo tirosina por tirosina cinasas y en esta forma fosforilada forma homodímeros o heterodímeros y se transloca al núcleo. En el núcleo, los dímeros de STAT3 se unen a un promotor específico de genes blanco para regular la expresión de diversos genes (Huang, 2007).

2.6.1 Proteínas reguladoras de STAT3

Existen reguladores positivos de la expresión del gen *stat3*, como por ejemplo el elemento de unión a STAT3 (SBE) de baja afinidad localizado en el promotor de STAT3. Esta activación del gen se da como respuesta a IL-6 a través del elemento respuesta a IL-6, o es posible que STAT3 pueda activar

por sí misma la expresión de su gen *stat3* a través de un sitio del SBE en el promotor (Narimatsu et al., 2001).

También existen reguladores negativos de los sitios de fosforilación de STAT3 y que se encuentran ya sea en el citoplasma o en el núcleo. En el citoplasma, la defosforilación en tirosina del receptor o en cinasas citoplásmicas es llevada a cabo por las proteínas SHP1, SHP2 o PTP1B, mientras que las proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) se unen a los sitios catalíticos fosforilados del receptor y/o de JAK, consecuentemente se bloquea la activación de STAT. En el núcleo, PIAS3, es una proteína inhibitoria de STAT3 que al unirse a STAT3 dimerizado en sus sitios de fosforilación tirosina bloquea su unión al DNA (Narimatsu et al., 2001). También en el núcleo puede ser defosforilada por la fosfatasa tirosina TC45, de esta manera, STAT3 será inactivada representando una señal para su exporte hacia el citoplasma (Levy y Darnell, 2002).

Es importante mencionar que STAT3 en su forma no fosforilada también activa transcripcionalmente a otros genes que se relacionan con la sobrevivencia celular, como *cdc-2*, *ciclina B1*, *e2f-1* y *mras*, sin embargo, esta expresión ocurre sobretodo en ciertos tipos de cáncer en donde no hay respuesta a los dímeros de STAT3 (Yang et al., 2005).

2.6.2 STAT3 y lipopolisacárido

La activación de STAT3 puede ser inducida por el lipopolisacárido (LPS), éste puede unirse al receptor tipo Toll 4 (TLR4) que se encuentra en fibroblastos, activa fuertemente la síntesis del RNAm de IL-6, el cual está relacionado con la activación de STAT3 (He et al., 2012; Prinz, 2010).

2.6.3 STAT3 y el proteasoma

STAT3 puede ser un blanco para la degradación proteasomal, para ello es marcada por la proteína TMF/ARAR 160 (factor modulador del elemento TATA/coactivador receptor andrógeno 160) que es un mediador clave de la ubiquitinación de STAT3 y de su translocación al proteasoma y se encuentra localizada en el aparato de Golgi (Murase, 2013). Esto resulta en una

disminución en la expresión de STAT3, STAT3-p y de proteínas río abajo como HIAP, Bcl-2, ciclina D1 y survivina (Nie et al., 2015).

2.6.4 STAT3 durante las infecciones virales

Varios virus promueven la apoptosis para poderse replicar y facilitar su diseminación. Por ejemplo, los virus de RNA como el virus de la Hepatitis C (HCV) afecta la proliferación de las células T e induce la apoptosis (Kondo et al., 2009); el virus de la estomatitis vesicular, del sarampión, Sindbis y vaccinia inducen la apoptosis involucrando a receptores de unión e internalización. Alternativamente, algunos virus de DNA como el virus Epstein Barr y el papilomavirus inhiben la muerte celular programada por inducción de la expresión de las proteínas IAP a través de la activación constitutiva de STAT3 por la fosforilación en su residuo tyr 705 (Ai et al., 2005; Borbely et al., 2007; Esolen et al., 1995; Gadaleta et al., 2002; Jan et al., 2000; Ramsey-Ewing y Moss, 1998).

Se ha descrito que una manera en la que los virus pueden regular la inducción de la apoptosis es a través de la inactivación de STAT3. Por ejemplo, el virus de las paperas produce a la proteína viral V que elimina a STAT3 y previene la respuesta de IL-6 y c-Src, mientras que el virus de la influenza H₅N₁ inhibe completamente la expresión basal de STAT3 en células de pollo infectadas, con lo cual se promueve la apoptosis (Kuchipudi et al., 2014; Ulane et al., 2003). El virus de la hepatitis D (HDV), el cual se ha relacionado con carcinoma hepatocelular (HCC) también disminuye la expresión de STAT3 (Abbas et al., 2015).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Existen evidencias de que la apoptosis es inducida por los calicivirus como una estrategia de salida y dispersión en el huésped, por ejemplo, durante la replicación del MNV-1 en células RAW 264.7 se genera apoptosis asociada con la activación de las caspasas 9 y 3 a través de la vía apoptótica mitocondrial y de la regulación negativa de survivina así como de la transcripción de su gen. Asimismo, MNV-1 regula los niveles transcripcionales de otros genes involucrados en la vía apoptótica (Bok et al., 2009).

En relación a cuál es el mecanismo de activación de la apoptosis durante la infección por MNV, se determinó que la activación de la caspasa 9 y la regulación negativa de survivina son inducidas por la expresión de la poliproteína completa a partir de la cual se producen las proteínas NS y sus precursores (Herod et al., 2014). En cuanto a la infección por FCV en cultivos celulares, se ha determinado que la inducción de la apoptosis requiere de una replicación activa, ya que la interacción del cultivo celular con virus inactivados por UV, los cuales tienen la capacidad de unirse y entrar a las células, no modifica la viabilidad celular (Sosnovtsev et al., 2003). Asimismo, se ha determinado que la proteína estructural LC se encuentra asociada con el efecto citopático y posiblemente con la inducción de la apoptosis (Abente et al., 2013), sin embargo, en este virus se desconoce el papel de las proteínas NS en la inducción de la apoptosis.

Recientemente en el laboratorio, el M. en C. Óscar Barrera determinó que durante la infección por el MNV y el FCV, se regulan negativamente las proteínas XIAP y survivina a partir de las cinco horas postinfección. Asimismo, se correlacionó este evento con la salida de la proteína Smac/DIABLO de la membrana de la mitocondria al citosol: ambos eventos, son producidos como consecuencia de la inducción de la apoptosis intrínseca o mitocondrial. Se sabe que STAT3 es un regulador importante de la expresión de proteínas involucradas en la inducción de la apoptosis, y que su activación e inactivación está involucrada en la regulación de respuestas antiapoptóticas. Específicamente cuando se encuentra en su estado no fosforilado es un

regulador negativo de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y survivina y es un regulador positivo de la expresión de la proteína proapoptótica Bax, lo cual resulta en un colapso de la membrana mitocondrial y finalmente en la inducción de apoptosis (Aoki et al., 2003; Nielsen et al., 1999). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados en la inducción de la apoptosis durante la infección por FCV, por lo que determinar cómo son reguladas las proteínas que intervienen en la apoptosis a través de la vía de señalización de STAT3 contribuirá en el conocimiento de los mecanismos de replicación del FCV.

4. JUSTIFICACIÓN

El FCV, es capaz de inducir apoptosis para favorecer su replicación, mediante la regulación negativa de la proteína survivina. Se sabe que el promotor del gen de survivina es regulado por la activación de STAT3-pTyr. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la disminución de la expresión de survivina y de la progresión de la apoptosis durante la infección por FCV son poco entendidos. Por lo cual, el conocer si FCV es capaz de modular a STAT3-PTyr y con ello regular la expresión negativa de survivina tendrá implicaciones en el conocimiento de los mecanismos de replicación de FCV y así poder establecer estrategias para controlar su infección.

5. HIPÓTESIS

La inhibición de la survivina y la promoción de la apoptosis son consecuencia de la regulación de STAT3-pTyr durante la infección por el *Calicivirus felino*.

6. OBJETIVOS

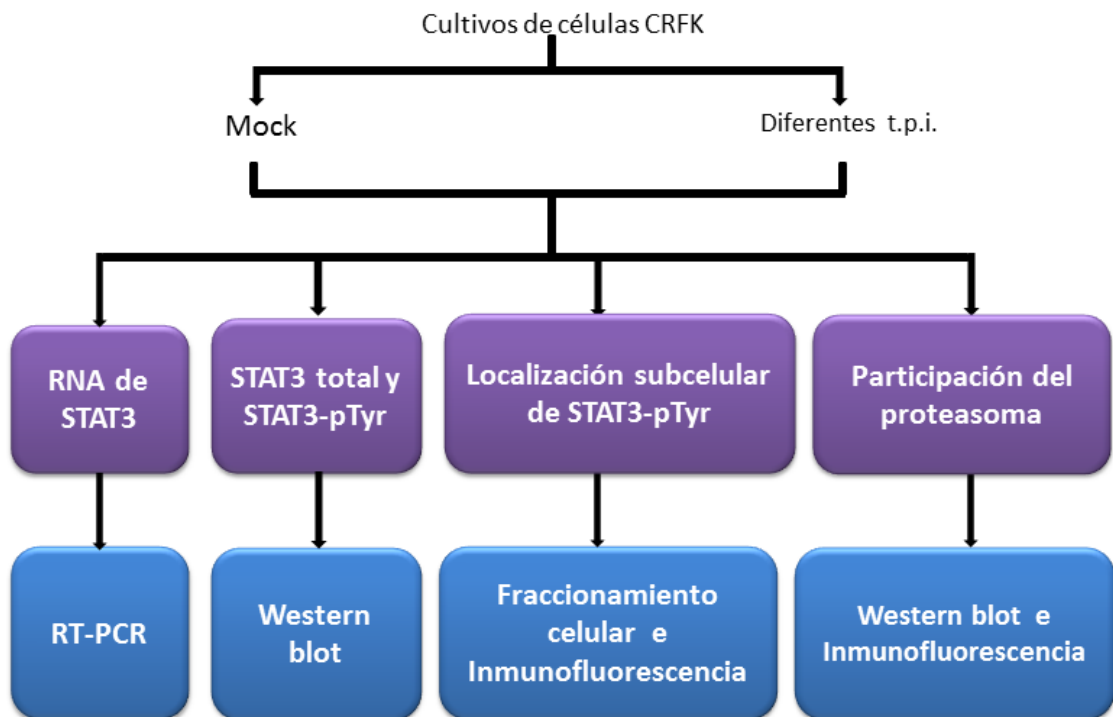
6.1 Objetivo general

Analizar la regulación de la expresión y la localización subcelular de la proteína STAT3-pTyr durante la infección por el *Calicivirus felino*.

6.2 Objetivos particulares

- 6.2.1 Determinar el nivel de expresión del RNA de STAT3 durante la infección con el FCV.
- 6.2.2 Analizar la expresión de la proteína STAT3 y STAT3-pTyr durante la infección con el FCV.
- 6.2.3 Analizar la localización subcelular de la proteína STAT3-pTyr durante la infección con el FCV.
- 6.2.4 Determinar el efecto de la inhibición del proteasoma en la expresión y localización subcelular de STAT3-PTyr durante la infección por FCV.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL



8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 (control positivo) y CrFK (*Crandell Rees Feline Kidney*, por sus siglas en inglés) que fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD). Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio DMEM Advanced (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Life Technologies), mientras que las células CrFK fueron cultivadas en medio MEM Advanced (Modified Eagle Medium) (Gibco, Life Technologies). Ambas líneas celulares fueron suplementadas con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 5,000 U of penicilina y 5 µg/ml de estreptomina. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire humidificada con 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 90%. Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos hasta tener una confluencia del 60%.

8.2 Propagación viral

Las células CrFK se infectaron con la cepa F9 de FCV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 en medio MEM libre de suero, durante 1 h a 37 °C, mientras que las células no infectadas (mock), se incubaron con medio MEM libre de suero y de virus a las mismas condiciones que las no infectadas. Después de una hora de absorción, se retiró el medio tanto de las células no infectadas como de las células infectadas y se reemplazó con medio MEM al 2% de suero y se dejó transcurrir la infección a 37°C recolectándose los extractos celulares a 1, 3, 5, 7 y 9 horas postinfección (h.p.i.).

8.3 Extracción del RNA

Para determinar la regulación del RNAm de STAT3 durante la infección por el FCV, las células CrFK fueron infectadas y procesadas a diferentes tiempos postinfección (1, 3, 5, 7 y 9 h), posteriormente se extrajo el RNA total de los cultivos celulares mediante trizol. Para ello, las células CrFK se

cultivaron en placas de Petri de 100 mm² a una confluencia del 80-90% y se infectaron o no con FCV a una MOI de 5. A cada p100 se añadió 1 ml de trizol, se homogenizó y se incubó por 5 minutos a Temperatura Ambiente (TA), después se agregaron 200 µl de cloroformo agitando suavemente los tubos por 15 minutos e incubando por 3 minutos a TA y se centrifugaron a 12 mil x g por 15 minutos a 4°C. Después, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron 500 µl de isopropanol homogenizando suavemente por 15 segundos e incubando por 10 minutos a TA y se centrifugaron a 12 mil x g por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, dejando secar el botón por 15 minutos. Se resuspendió en 30 µl de DEPC (dietilpirocarbonato), se cuantificaron las muestras y se conservaron a -70 °C.

8.4 Obtención del cDNA

Antes de realizar la PCR, se procedió a sintetizar el cDNA a partir del RNA obtenido, para ello, primeramente el RNA fue tratado con DNasa (Jena Bioscience) a una concentración final de 1 µl / 50 ng de RNA, se incubó a 37 °C por 10 minutos y después la enzima fue inactivada a 65 °C por 10 minutos. Finalmente, se sintetizó el cDNA utilizando el kit Script cDNA Synthesis (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.5 Diseño de oligonucleótidos para PCR

Para determinar la cantidad de RNA de STAT3 de células infectadas se utilizó el programa ROCHE para diseñar el par de primers para amplificar el gen de STAT3 a un tamaño del amplicon de 100 nucleótidos utilizando la secuencia AGACGCTCAGGATGAAGAG para el oligonucleótido sentido y CAGTTTTCTAGGCGGTCGAG para el oligonucleótido antisentido. Posteriormente, se realizó un blast con ambos primers, obteniéndose un 100% de identidad.

8.6 RT-PCR

Se realizó PCR punto final en la cual se utilizó un par de primers extra para amplificar un segmento del gen GADPH de un tamaño de 500 nt,

mediante el kit de Jena Bioscience. Las condiciones para la reacción utilizadas fueron las siguientes: un inicio de 95 °C por 5 minutos, seguidos por 25 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y finalmente una extensión a 72 °C por 7 minutos. Las muestras fueron separadas electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% en búffer TBE 1X (Tris/ borato/ EDTA) a 100 Volts, utilizando un marcador de 100-1000 pb (BIORAD). Finalmente las bandas se cuantificaron mediante densitometría utilizando el software ImageJ y se expresaron como unidades arbitrarias.

8.7 Extractos proteicos celulares

Para la obtención de los extractos totales de proteínas, las células CrFK se cultivaron en placas de Petri de 100 mm² a una confluencia del 80-90% y se infectaron o no con el FCV a una MOI de 5. Transcurrido el tiempo de infección, las células se lavaron dos veces con PBS (Búffer salino de fosfatos) 1X frío. Se centrifugaron a 3,000 RPM durante 5 minutos para cada lavado y un tercer lavado a 14,000 RPM durante 10 minutos, se añadió inhibidor de proteasas (Complete mini EDTA, free protease inhibitor cocktail, Roche) y buffer conteniendo detergente no iónico Nonidet P40 (NP40). La composición del búffer fue de 500 mM de Tris HCl, 10 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 200 M de NP40, más ortovanadato de sodio como inhibidor de fosfatasas. La incubación se realizó a 4 °C durante media hora, se agitó en un vórtex por 3 minutos con un descanso de 1 minuto en hielo, repitiendo este paso por 3 veces, después de este tiempo se centrifugaron a 14,000 RPM durante 10 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes para finalmente cuantificar las proteínas con el reactivo para el ensayo de proteínas de Coomasie (Thermo Scientific). Las concentraciones de los extractos fueron determinadas mediante el ensayo de Bradford, finalmente los extractos se separaron en alícuotas y se almacenaron a -70°C.

8.8 Anticuerpos para Western blot

Para los ensayos de Western Blot se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-STAT3 total (Becton Dickinson) 1:1,000, anti-STAT3-PTyr

(Biolegend) 1:800, anti-survivina (Cell Signaling) 1:500, anti-p39 1:7,500, y como controles de carga anti-actina 1:3,000 (amablemente donado por el Dr. Manuel Hernández, departamento de Biología celular, CINVESTAV) y anti-tubulina (Santa Cruz) 1:1,000. Los anticuerpos secundarios usados para su detección fueron anti-HRP conejo 1:3,000 (Invitrogen), anti-HRP ratón (Invitrogen) 1:5,000. Todos ellos fueron diluidos en TBS (Tris-HCl 10mM pH 7.5, NaCl 100mM) suplementado con Tween20 al 1% y los lavados se realizaron también con TBS-T.

8.9 Inmunodetección mediante Western blot

Las muestras proteicas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 y 15% en un sistema Mini-Protean Tetra cell (BIO-RAD) con búffer de corrida Tris-Glicina-SDS 1X y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (BIO-RAD) con el sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) a 12 volts.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS 1X-Tween 20 durante dos horas a TA. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en leche al 1% en TBS-T durante toda la noche y en agitación constante. Posteriormente se eliminó el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2h a TA y en agitación constante. Se eliminó el exceso de anticuerpo secundario mediante 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia (Super Signal West Femto Chemiluminiscent Substrate Kit, Thermo Scientific). Estos ensayos fueron realizados por triplicado y las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría con el software ImageJ y finalmente se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Dunnet.

8.10 Fraccionamiento celular

Para obtener las fracciones del núcleo y del citoplasma, se cultivaron células CrFK en placas de 100 mm², las cuales fueron o no infectadas con FCV a una MOI de 5 durante 1, 3, 5, 7 y 9 horas y se utilizó el kit de

fraccionamiento de proteínas subcelulares (Thermo Scientific). Brevemente, se recolectaron las células y se centrifugaron a 500 x g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó Búffer de Extracto Citoplásmico (CEB) helado conteniendo inhibidor de proteasas y ortovanadato de sodio como inhibidor de fosfatasas, se incubó a 4°C por 10 minutos en agitación suave. Se centrifugó a 500 x g por 5 minutos y el sobrenadante (extracto citoplásmico) se colectó en un microtubo preenfriado.

Al botón se le añadió Búffer de Extracto de Membrana (MEB) frío conteniendo inhibidor de proteasas y ortovanadato de sodio, se agitó en un vórtex por 5 segundos, se incubó 4°C por 10 minutos en agitación suave y se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos. Después, se transfirió el sobrenadante (extracto membranal) a un tubo preenfriado.

Al botón se le añadió Búffer de Extracto Nuclear (NEB) frío conteniendo inhibidor de proteasas y ortovanadato de sodio, se agitó con en un vórtex por 15 segundos a la velocidad más alta y se incubó a 4°C por 30 minutos en agitación suave, se centrifugó a 5000 x g por 5 minutos. Al final se transfirió el sobrenadante (extracto soluble nuclear) a un tubo preenfriado en hielo.

Todos los extractos fueron cuantificados con Coomassie (Thermo Scientific). Al final, las muestras fueron lisadas con búffer Laemmli 2X y fueron sometidas a electroforesis en un gel al 10 o 15% de concentración. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios para detectar a las proteínas STAT3-total y STAT3-Ptyr, utilizando actina, tubulina e histona-3 como control de carga total, control de la fracción citoplásmica y control de la fracción nuclear respectivamente. Asimismo se incubó con anti-p39 para determinar la infección y survivina como control positivo de la apoptosis. Finalmente se incubaron con anti-ratón HRP en dilución 1:5,000 y anti-conejo HRP en dilución 1:10,000, ambos anticuerpos diluidos en TBS-T con leche al 1%. Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia (Super Signal West Femto Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific; ChemiDoc MP Imaging System).

8.11 Células tratadas con lactacistina

Las células fueron infectadas y después de una hora de absorción, se retiró el virus no absorbido y se adicionó el medio de mantenimiento DMEM suplementado con 2% de SFB y adicionado con 25 μ M de lactacistina. Los extractos proteicos se obtuvieron a los tiempos de 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.

8.12 Células tratadas con lipopolisacárido

Las células pretratadas por 24 horas con 1 μ M de lipopolisacárido (LPS), fueron infectadas y después de una hora de absorción, se retiró el virus no absorbido y se adicionó medio de mantenimiento DMEM suplementado con 2% de SFB y adicionado con 1 μ M de LPS, los extractos proteicos se obtuvieron a las 7 h.p.i.

8.13 Inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal

Para el análisis de la localización subcelular de STAT3-pTyr705, las células CrFK fueron sembradas a un 60% de confluencia sobre cubreobjetos e infectadas con FCV a una MOI de 5 e incubadas a 37°C por 6 h.p.i. Los cubreobjetos fueron lavados con búffer de citoesqueleto (CB) por 5 minutos, permeabilizados en una solución de para-formaldehído al 4% con Tritón X-100 al 0.2% por 5 minutos a TA. Después, se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Las células se fijaron en una solución de para-formaldehído al 4% por 20 minutos a TA, y después se lavaron 3 veces con PBS. Enseguida, las células se bloquearon con una solución de gelatina al 0.5% en PBS por 40 minutos a TA, y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Se incubó el anticuerpo primario (STAT3-pTyr) durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo fue removido por 3 lavados con PBS por 5 minutos, después se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (Alexa 594) por 1 h a TA. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y para detectar la presencia de la proteína viral se incubó con el anticuerpo primario para detectar dcRNA por 1 h a 37°C en PBS durante toda la noche a 4 °C.

Las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Alexa 488) por 1 h a TA. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y un último lavado con agua bidestilada. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando vectashield-DAPI y se almacenaron a 4°C. Las imágenes fueron observadas utilizando microscopía confocal (Zeiss).

8.14 Anticuerpos para inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-STAT3-pTyr705 (SantaCruz) 1:200, anti-dcRNA (Cell Signaling) 1:1,200. Los anticuerpos secundarios usados para su detección fueron anti-conejo Alexa 594 1:200 (Invitrogen) y anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen) 1:300. Todos ellos fueron diluidos en PBS 1X.

8.15 Análisis densitométrico.

Para la cuantificación de los niveles de las proteínas de interés, se obtuvieron las intensidades de cada una de las bandas obtenidas en las imágenes de las placas fotográficas obtenidas mediante WB, utilizando el software ImageJ y se expresaron como unidades arbitrarias.

8.16 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando la prueba ANOVA de una vía. La diferencia significativa fue asumida con un valor de $p < 0.05$. Las barras de error se muestran para al menos 3 experimentos diferentes.

9. RESULTADOS

Se sabe que durante la infección por FCV se desencadenan una serie de eventos para favorecer su replicación y también se regula la actividad de proteínas involucradas en la sobrevivencia, en el ciclo celular y en la apoptosis, como por ejemplo, Bcl-2, Bcl-XL y la proteína survivina (Aoki et al., 2003; Gritsko et al., 2006) (Barrera Vásquez, 2014). La expresión de survivina está regulada por la proteína STAT3, la cual es activada en respuesta a la unión de ligandos como IL-6, GF y TNF a los receptores tirosina cinasa de membrana o como la tirosina cinasa citoplásmica Src. STAT3 también es activada por LPS, que al unirse al TLR4 desencadena en la activación y translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo (He et al., 2012); (Prinz, 2010). La unión ligando-receptor permite la activación de la vía de señalización JAK-STAT y finalmente desencadena en la activación de STAT3 a través de la fosforilación en su residuo tirosina 705, permitiendo su translocación al núcleo en donde ejerce su función de activador transcripcional de genes blanco como survivina (Huang, 2007).

En estudios anteriores se observó que durante la infección por FCV la expresión de la proteína survivina es regulada negativamente, sin embargo, se desconoce el mecanismo implicado. En este trabajo analizamos si la proteína STAT3 es regulada durante la infección viral y si este proceso favorece su replicación.

9.1 La infección por el FCV regula negativamente la expresión del RNA de STAT3

Primeramente se realizó una cinética de infección para el FCV sobre cultivos celulares CrFK a los tiempos de 1, 3, 5 y 7 h.p.i. y mediante microscopía de campo claro se observó el redondeamiento de las células, el rompimiento de la continuidad de la monocapa y la refringencia celular que caracterizan la infección (Sosnovtsev et al., 2003), a diferencia de las células

no infectadas a los tiempos de 1 y 9 horas en donde no se observan cambios aparentes en la monocapa (Figura 8).

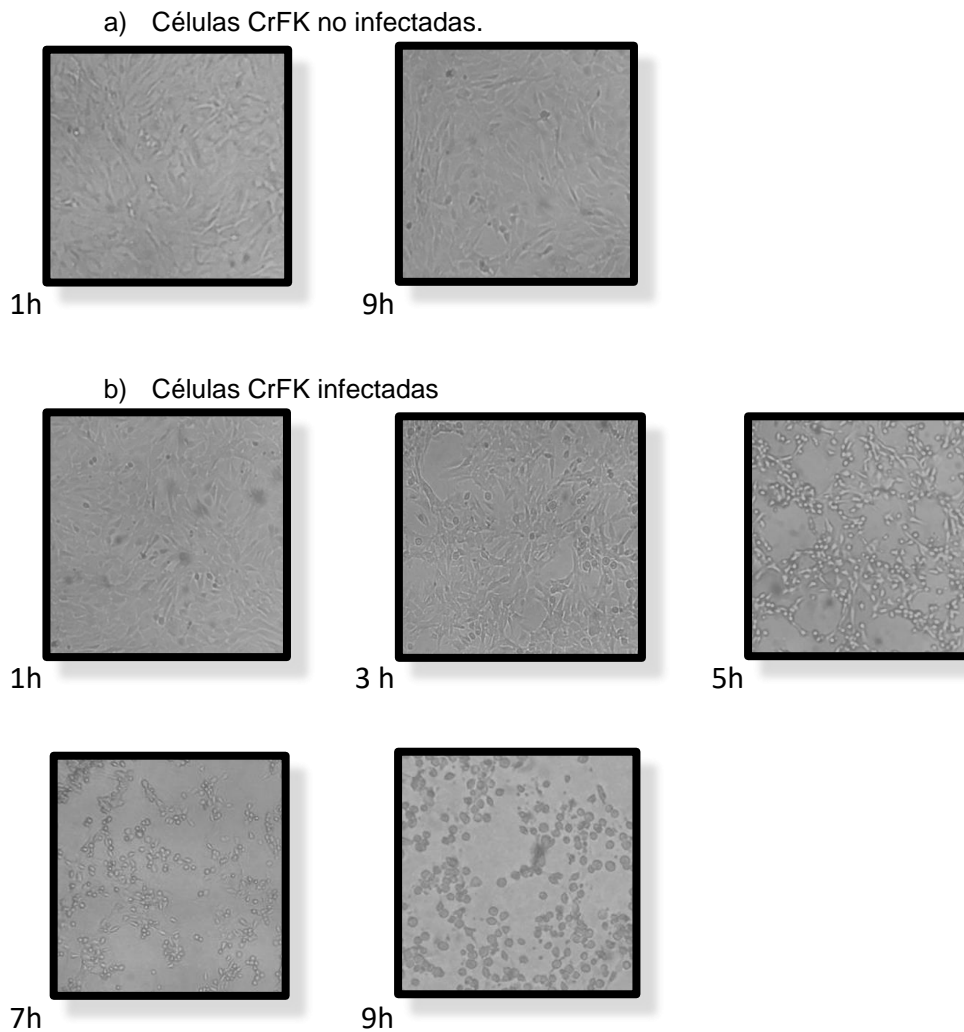
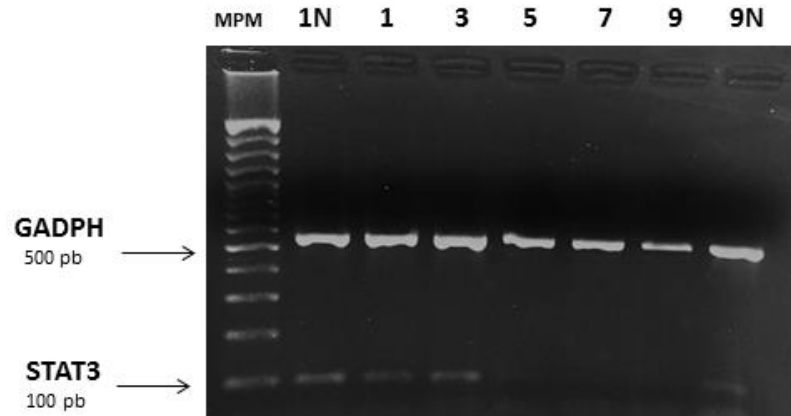


Figura 8. La infección por el FCV induce cambios en la densidad y morfología celular. a) Células CrFK no infectadas a los tiempos de 1 y 9 horas. b) Células CrFK infectadas durante 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i. la morfología celular se analizó mediante su observación por microscopía de campo claro.

Dado que el gen de survivina es un blanco de la actividad de STAT3 (Boidot et al., 2014) quisimos saber cómo estaba expresado el RNA de STAT3. Para ello, realizamos un ensayo de RT-PCR punto final en el que se observó una disminución en la cantidad del RNAm de STAT3 a partir de las 5

h.p.i. con respecto al control (Figura 9A). El análisis densitométrico de las bandas apuntan a que la diferencia es significativa, sin embargo se requiere confirmar este resultado mediante PCR tiempo real (Figura 9B).

A)



B)

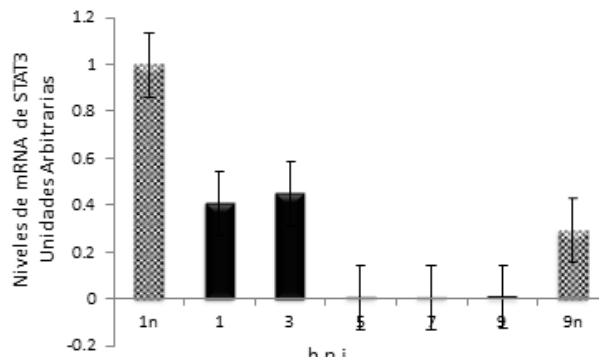


Figura 9. Regulación de la expresión del RNAm de STAT3 durante la infección con el FCV. A) Se obtuvo el RNA total de células no infectadas (N) e infectadas a 1, 3, 5, 7 y 9 h con el FCV, y el RNAm de STAT3 (100pb) y de GADPH (500 pb) se obtuvieron mediante RT-PCR. B) Gráfico obtenido a partir de la densitometría de las bandas de geles de dos experimentos independientes.

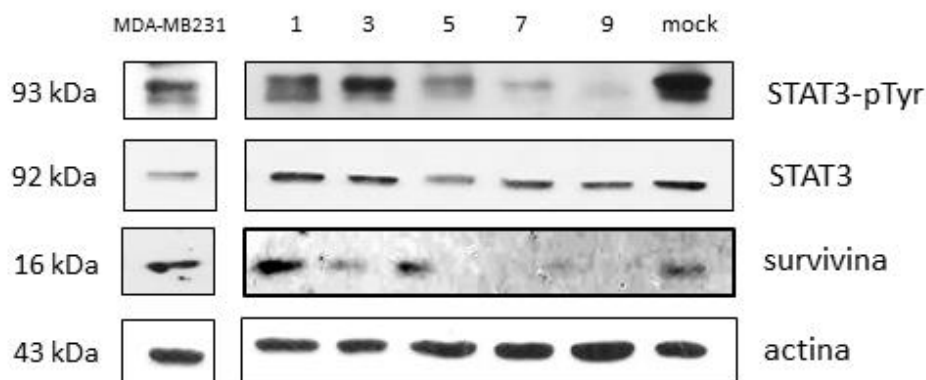
9.2 STAT3-pTyr es regulado negativamente durante la infección por FCV.

A los mismos tiempos postinfección analizamos la expresión de survivina mediante Western blot y determinamos que se regula negativamente a partir de las 5 h.p.i. como ya había sido descrito anteriormente en el laboratorio (Barrera Vásquez, 2014)(Fig. 10). Una vez corroborado que durante la infección, survivina es degradada, procedimos a analizar la expresión de STAT3 y de STAT3-pTyr, mediante Western blot utilizando como control positivo de STAT3-pTyr a la línea celular MDA-MB-231, debido a que éstas células epiteliales provenientes de adenocarcinoma de mama se encuentran activadas constitutivamente en STAT3-pTyr705 (Lieblein et al., 2008).

Se observó que STAT3 se mantuvo constante durante la infección mientras que STAT3-pTyr mostró una regulación negativa a partir de las 5 h.p.i. que coincide con la expresión disminuida de survivina (Figura 10A). Las diferencias en la disminución de STAT3-pTyr para los tiempos de 7 y 9 h.p.i. son significativas respecto a los controles (Figura 10B).

Este resultado sugiere que durante la infección por FCV ocurre una regulación negativa de STAT3-pTyr y posiblemente como consecuencia de ello, disminuye la cantidad de la proteína survivina.

A) Expresión de STAT3 y STAT3-pTyr en extractos totales de células CrFK infectadas con el FCV.



B) Gráfica del análisis densitométrico de las bandas obtenidas por WB.

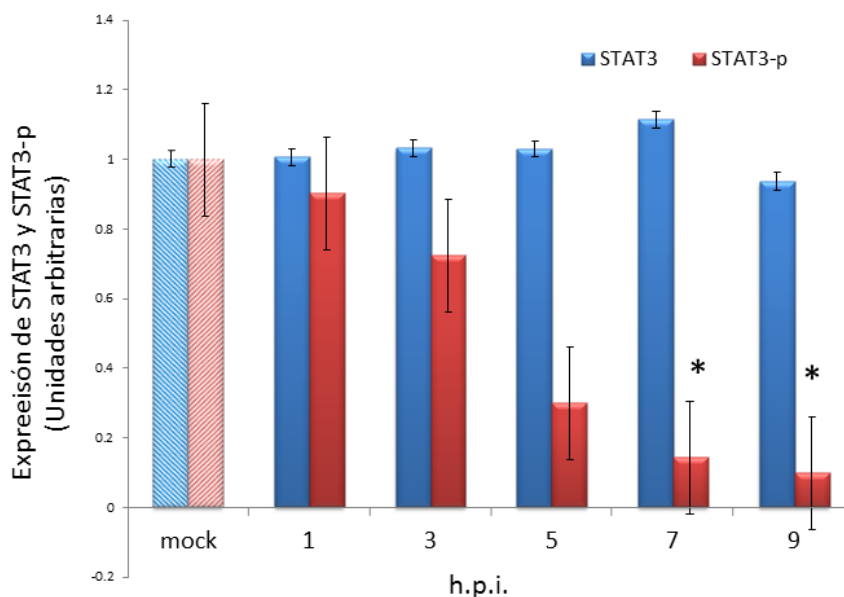


Figura 10. Expresión de STAT3 y STAT3-pTyr en extractos totales de células CrFK infectadas con el FCV. A) Expresión de las proteínas STAT3 y STAT3-pTyr a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i con el FCV. Las células MDA-MB231 se utilizaron como control positivo de la expresión de STAT3-pTyr y células no infectadas como control negativo. Se usó β -actina como control de carga. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. B) Los niveles de expresión se obtuvieron a través de un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas de la expresión de STAT3 y STAT3-pTyr, utilizando el software ImageJ, ajustando los valores de acuerdo a los niveles de expresión de β -actina. El valor de P se calculó utilizando el programa SigmaPlot12 y la prueba estadística de Dunnet, se obtuvieron diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

9.3 STAT3-pTyr se redistribuye en el citoplasma durante la infección por el FCV.

La regulación negativa de STAT3-pTyr que se observó mediante Western blot puede deberse a dos condiciones: a que la proteína esté siendo defosforilada o a que esté siendo degradada. Pero debido a que sólo observamos la regulación negativa de la proteína STAT3-pTyr y no de STAT3 nos hacía pensar más en la posibilidad de que la proteína estuviera siendo defosforilada durante la infección, sin embargo debido a que STAT3 posee una vida media de 8 h (Schust et al., 2006; Zhang et al., 2009) y dado que el

ciclo de replicación del FCV es de 9 horas existe la posibilidad de que los tiempos sean tan cortos que no nos estén permitiendo detectar la degradación de STAT3.

Para que las condiciones de defosforilación o degradación se lleven a cabo es necesario que la proteína STAT3-pTyr se encuentre accesible para que las fosfatasas actúen defosforilándola o para que el proteasoma pueda degradarlo.

Debido a que la localización de STAT3-pTyr varía entre diferentes líneas celulares, decidimos determinar donde se encuentra localizado STAT3-pTyr en la línea celular CrFK y si esta localización se altera con la infección por el FCV. Mediante ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal, pudimos determinar que la proteína STAT3-pTyr se encuentra localizada mayoritariamente en la región perinuclear (Figura 11).

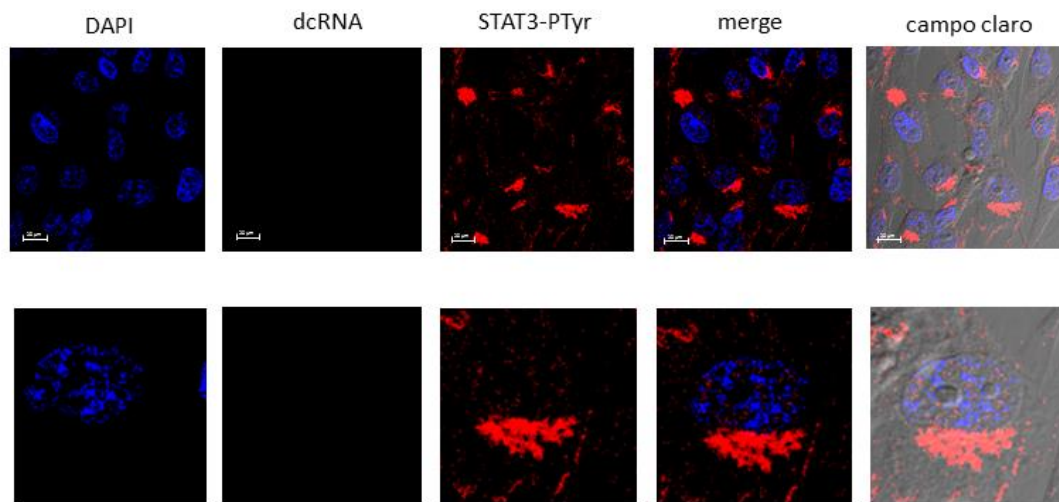
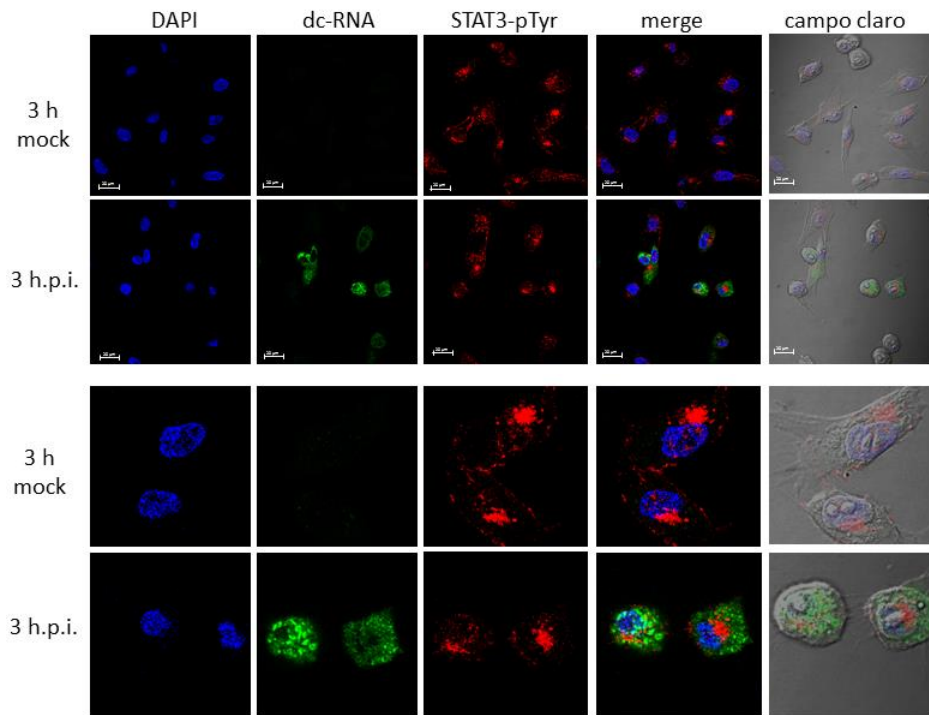


Figura 11. Localización subcelular de STAT3-pTyr en células CrFK analizadas mediante microscopía confocal. Células CrFK cultivadas en placas de 6 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas. Se incubaron con anticuerpo para detectar a STAT3-PTyr (rojo) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En el panel inferior se muestra un aumento de cada imagen.

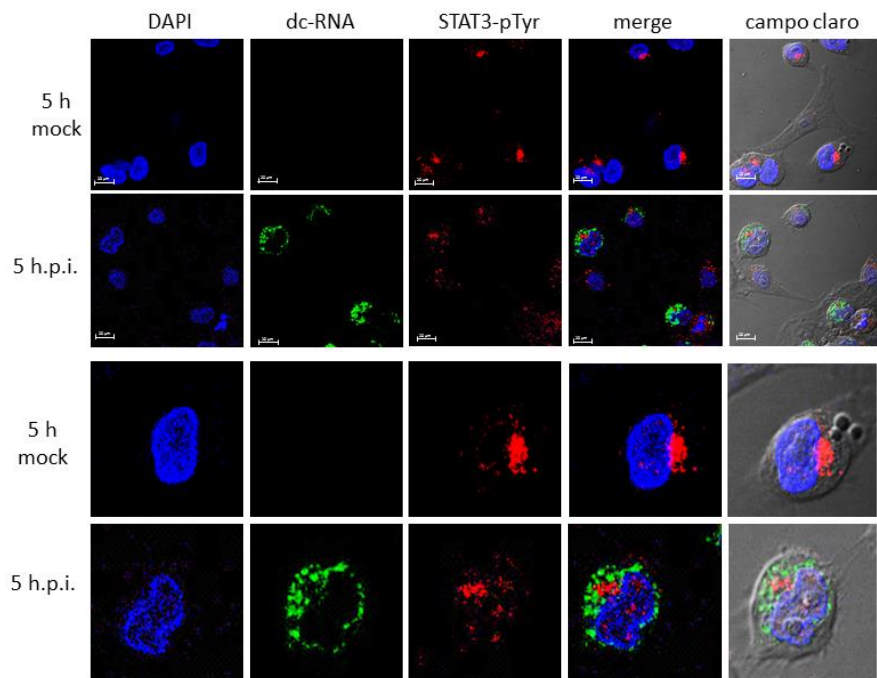
Una vez identificado el patrón de distribución de STAT3-pTyr en una célula no infectada procedimos a determinar si existían cambios en su localización tras la infección con el FCV mediante inmunofluorescencia

usando microscopía confocal. Para ello se cultivaron células CrFK no infectadas o infectadas a una MOI de 5 y la localización de STAT3-pTyr se determinó a las 3, 5 y 7 h.p.i. En las células infectadas a las 3 h.p.i., STAT3-pTyr se encuentra localizada mayoritariamente en la región perinuclear y en menor concentración en el núcleo, de manera semejante a la localización observada en las células no infectadas (Figura 12A). Sin embargo, conforme avanza la infección ocurre una redistribución de la proteína hacia el citoplasma con un patrón difuso que comienza a partir de las 5 h.p.i. (Figura 12B) y se evidencia a las 7 h.p.i. (Figura 12C). Además de ser deslocalizada, se observa una disminución en la intensidad de STAT3-pTyr, lo que coincide con los resultados obtenidos por Western blot en donde se observó una regulación negativa de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV,

A) 3 horas



B) 5 horas



C) 7 horas

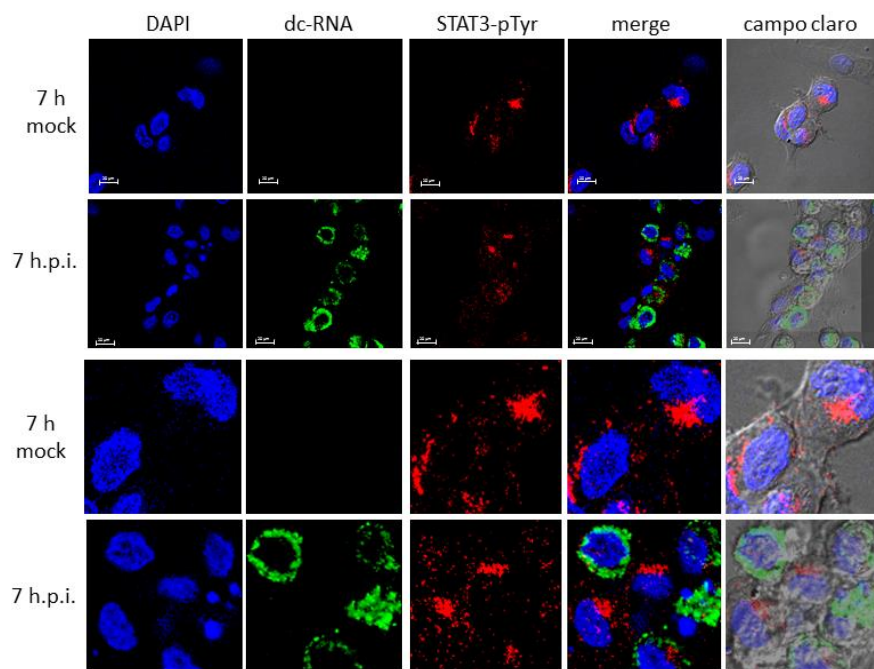


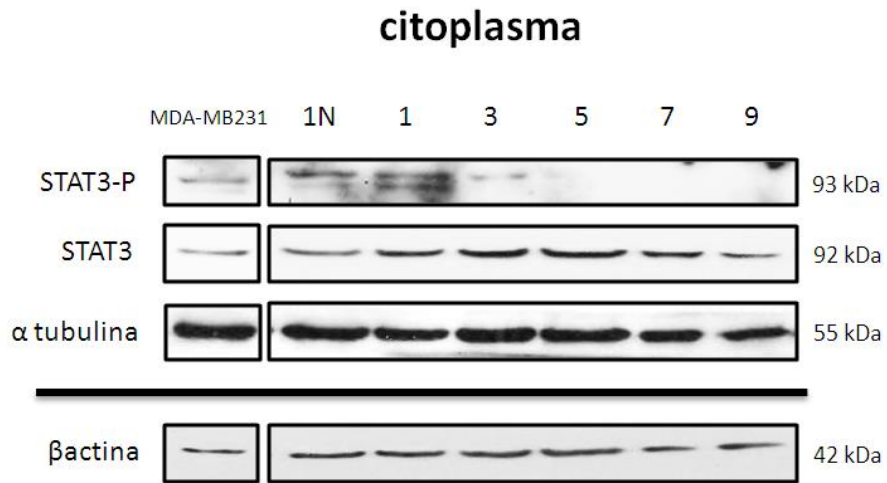
Figura 12. Localización subcelular de STAT3-pTyr durante la infección con el FCV. Células CrFK cultivadas en placas de 6 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas. Se incubaron con anticuerpo para detectar a STAT3-pTyr (rojo), dcRNA (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En los paneles inferiores se muestran acercamientos de las imágenes.

Estos resultados indican que el FCV regula negativamente a STAT3-pTyr deslocalizándolo hacia el citoplasma de manera tiempo dependiente en donde podría ser blanco para ser degradada o defosforilada, además no se observó su translocación hacia el núcleo.

9.4 STAT3-pTyr 705 es regulada negativamente en el citoplasma.

Debido a que en los resultados obtenidos por inmunofluorescencia además de observar una deslocalización de la proteína STAT3-pTyr hacia el citoplasma también hubo una menor intensidad de la fluorescencia de la proteína en las células infectadas, quisimos corroborar tanto su localización subcelularmente a partir de extractos citoplásmicos y nucleares como determinar si efectivamente había una regulación negativa de la expresión de STAT3-pTyr. Para ello, realizamos un fraccionamiento celular de una cinética de infección con el FCV y a partir de los lisados citoplásmicos y nucleares analizamos la presencia de STAT3 y STAT3-pTyr mediante ensayos de WB. La expresión de la proteína STAT3 no se alteró en ninguna de las dos fracciones (Figuras 13 y 14). Por otro lado, al analizar la presencia de STAT3-pTyr, observamos una disminución en la cantidad de la proteína en ambas fracciones subcelulares (Figuras 13 y 14). Sin embargo, dado que la fracción nuclear contiene membranas del retículo endoplásmico y a que en los resultados de inmunofluorescencia no observamos a la proteína localizada en el núcleo, no nos fue suficiente corroborar mediante estos ensayos que este marcaje corresponda a la proteína STAT3-pTyr presente en el núcleo (Figura 14). Los resultados fueron comparados con actina, que se usó como control de carga para ambas fracciones. Adicionalmente, se detectó a la proteína tubulina como control específico de la fracción citoplásmica.

A) Extractos proteicos citoplásmicos de células CrFK infectadas con el FCV.



B) Gráfica del análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot para los extractos citoplásmicos.

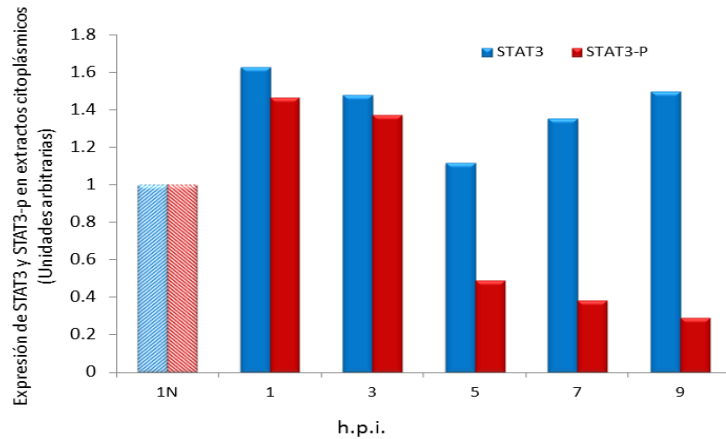
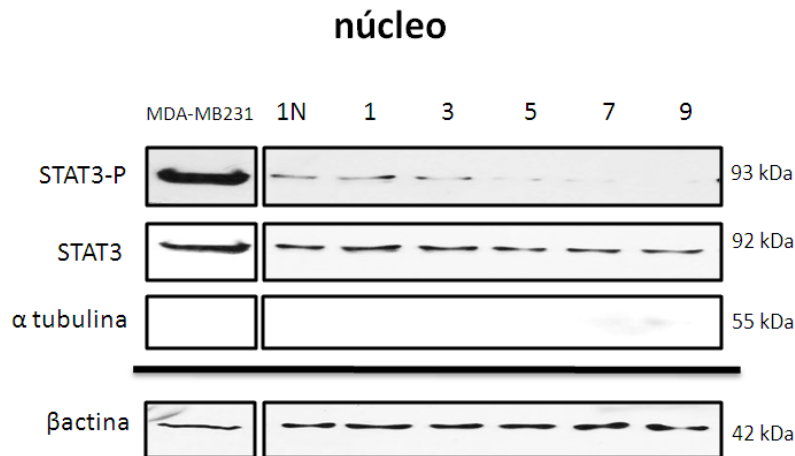


Figura 13. Expresión de STAT3 y STAT3-pTyr y en extractos proteicos citoplásmicos de células CrFK infectadas con el FCV. A) Expresión de la proteína STAT3 y STAT3-p-Tyr705 durante una cinética de infección a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i. Las células MDA-MB231 se utilizaron como control positivo de la expresión de STAT3-pTyr y células no infectadas como control negativo. Se usaron β -actina y tubulina como controles de carga. B) Los niveles de expresión de STAT3-pTyr y STAT3 total se analizaron mediante densitometría utilizando el software ImageJ y ajustando los valores con los niveles de expresión de β -actina y finalmente los valores fueron graficados.

A) Extractos proteicos nucleares de células CrFK infectadas con el FCV.



B) Gráfica del análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot.

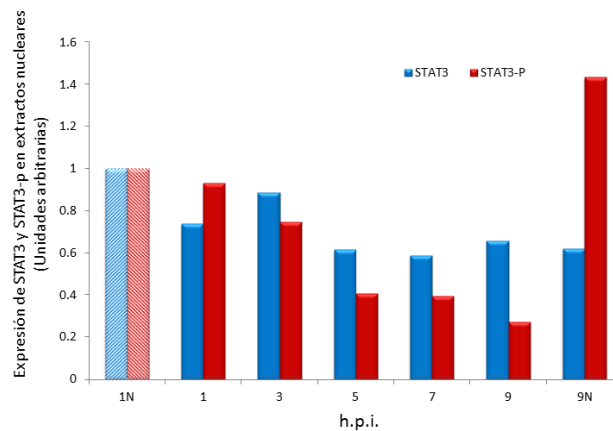


Figura 14. Expresión de STAT3 y STAT3-p-Tyr de extractos proteicos nucleares de células CrFK infectadas con el FCV. A) La expresión de la proteína STAT3 y STAT3-pTyr705 durante una cinética de infección a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i. se analizó mediante Western blot. Las células MDA-MB231 se utilizaron como control positivo de la expresión de STAT3-pTyr y células no infectadas como control negativo. Se usaron β -actina y tubulina como controles de carga. B) Los niveles de expresión de STAT3-pTyr y STAT3 se analizaron mediante densitometría utilizando el software ImageJ y ajustando los valores con los niveles de expresión de β -actina y finalmente los valores fueron graficados.

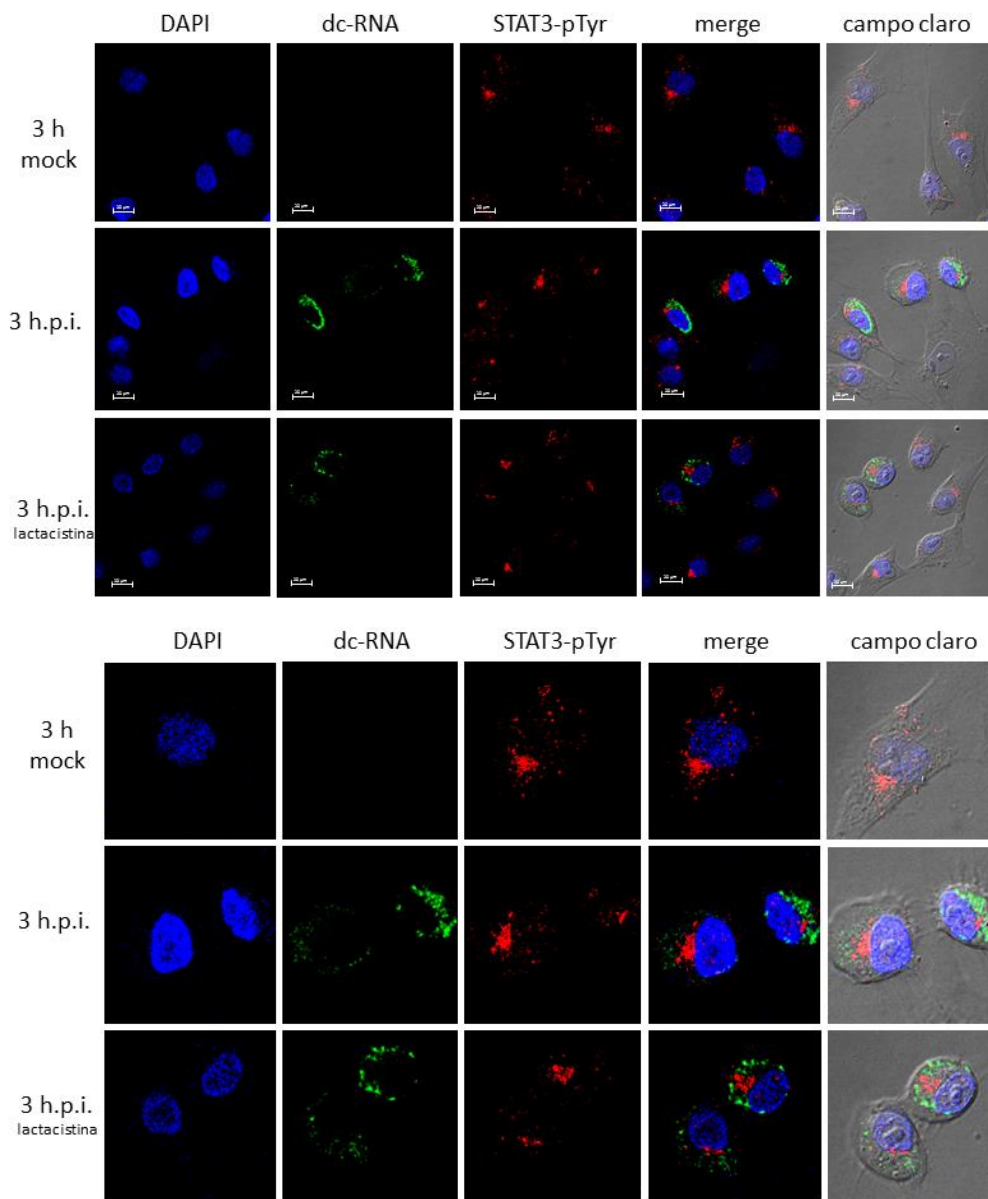
9.5 La regulación negativa de STAT3-pTyr implica la vía de degradación proteasomal.

Partiendo de los resultados de inmunofluorescencia donde observamos una deslocalización de STAT3-pTyr desde la región perinuclear hacia el citoplasma, y a que en los resultados de Western blot se observó una disminución en la expresión de STAT3-pTyr en la fracción citoplásmica durante la infección por el FCV, nos preguntamos cuál era el mecanismo para que STAT3-pTyr pudiera ser deslocalizado y regulado negativamente. Una posibilidad es que debido a que el citoplasma es rico en fosfatasas, STAT3-pTyr podría ser más accesible en este sitio para su regulación (Yarden Y y Gabi T, 2013) y otra posibilidad es que la degradación de cinasas relacionadas con su fosforilación estén siendo degradadas a través de la vía proteasomal, como por ejemplo, las cinasas JAK 1 y 2 que a través de la vía JAK-STAT fosforilan al residuo tirosina 705 de STAT3 en el citoplasma promoviendo su activación, sin embargo, esta vía es modulada a través de la vía proteasomal, el cual actúa como un regulador negativo de STAT3-pTyr, por lo que al inhibir el sistema ubiquitin-proteasoma se estabiliza a esta proteína fosforilada (Kim y Maniatis, 1996), por ello, nos enfocamos en estudiar la participación del proteasoma en la modulación de STAT3-pTyr durante la infección. Para lo cual, decidimos usar lactacistina, un inhibidor de la actividad del proteasoma, para determinar si la regulación negativa de STAT3-pTyr en un contexto de infección es mediada por el proteasoma. Para ello, realizamos una cinética de infección con el FCV en presencia del inhibidor lactacistina, y determinamos la presencia y localización subcelular de STAT3-pTyr.

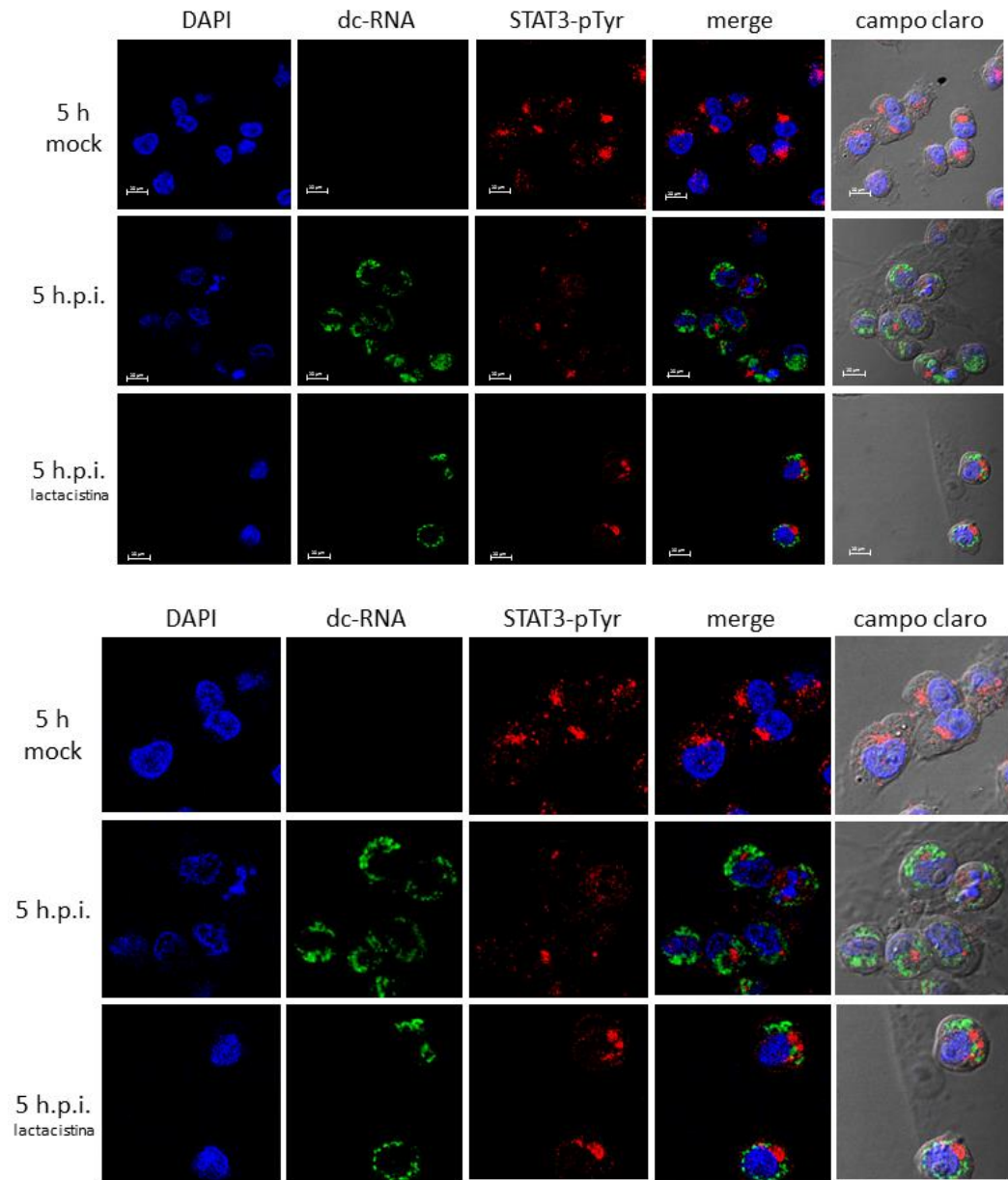
Primeramente, se analizó por microscopía confocal para determinar la integridad de la proteína STAT3-pTyr a las 3, 5 y 7 h.p.i. en células CrFK tratadas y no tratadas con lactacistina (Figura 15). En estos ensayos corroboramos que durante la infección con FCV, ocurre un cambio en la localización de STAT3-pTyr desde la región perinuclear hacia el citoplasma, en donde se observa una señal reducida y difusa respecto a las células no

infectadas como ya había sido observado en los ensayos mostrados anteriormente, mientras que cuando las células son tratadas con lactacistina esta redistribución de STAT3-pTyr se observa de manera similar que las células no infectadas. Además, durante el tratamiento con lactacistina se observó una reducción considerable en la cantidad del dcRNA y que es más evidente a las 7 h.p.i (Figura 15C). Esto podría estar sugiriendo que el proteasoma está implicado en la deslocalización y estabilización de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV y que esta vía es importante para la adecuada replicación viral.

A) 3 horas



B) 5 horas



C) 7 horas

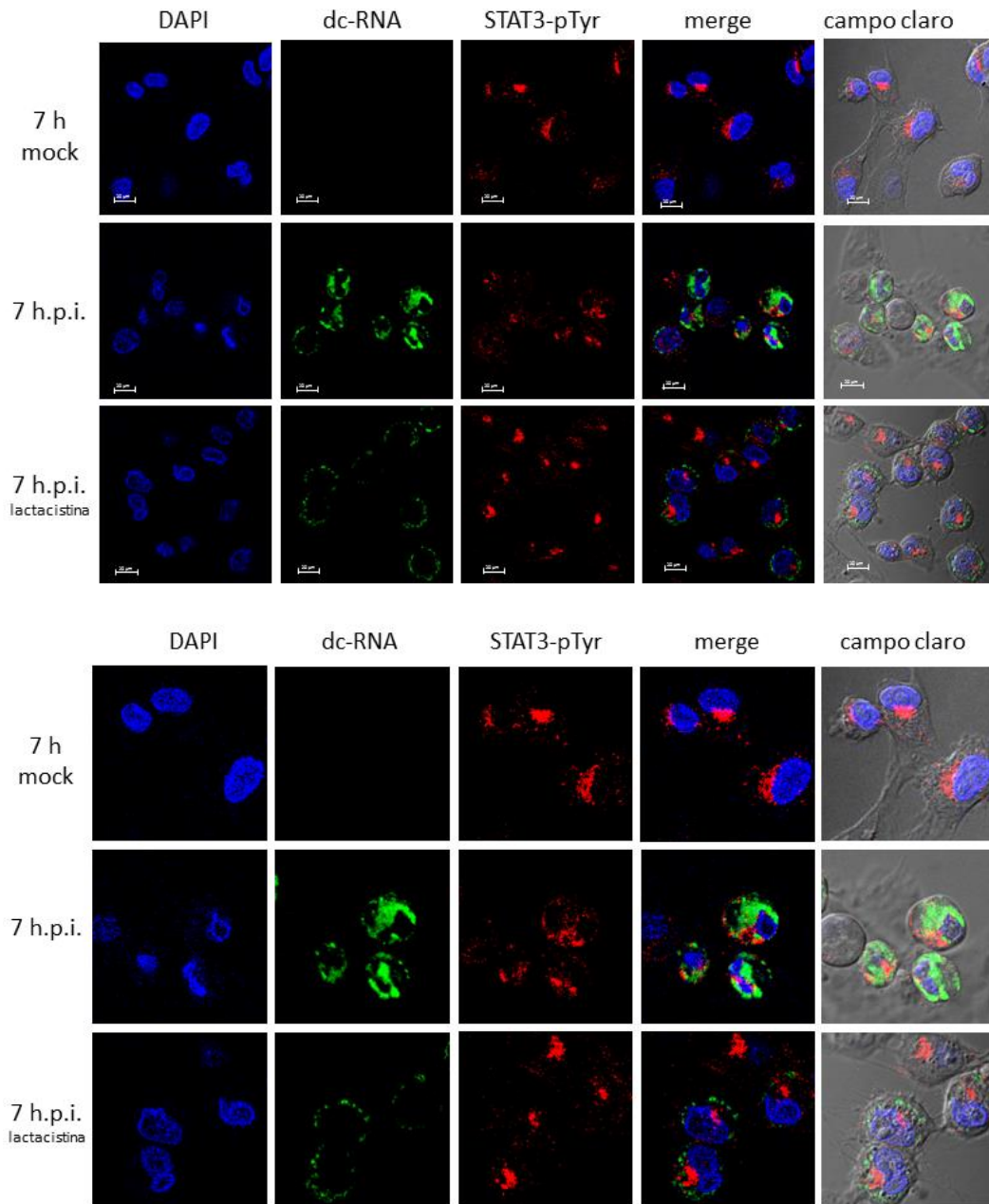
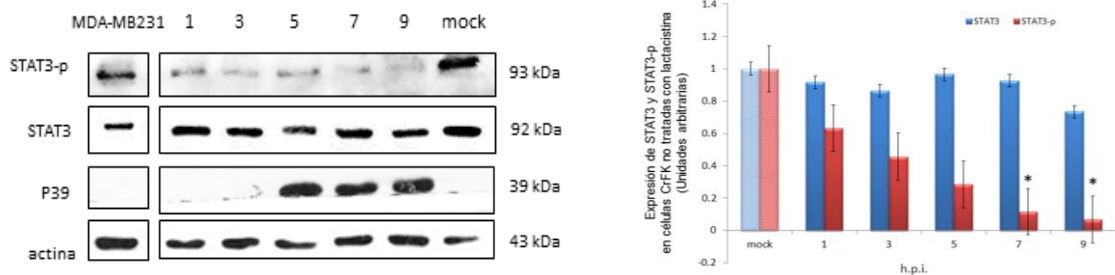


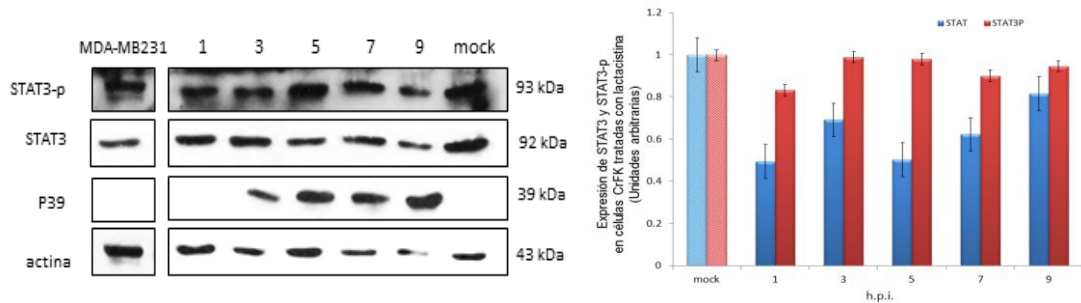
Figura 15. Redistribución de STAT3-pTyr durante el tratamiento con lactacistina en células infectadas con FCV y analizadas mediante microscopía confocal. Células CrFK cultivadas en placas de 6 pozos fueron infectadas a una MOI de 5 a diferentes tiempos, 3 (A), 5 (B) y 7 (C) h.p.i, las cuales fueron tratadas o no con lactacistina, se utilizaron células mock a los mismos tiempos de infección. Se observa a STAT3-pTyr (rojo), dcRNA (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En los paneles inferiores se muestran acercamientos de las imágenes.

Para corroborar estos resultados realizamos ensayos de WB y observamos que la regulación negativa de STAT3-pTyr que normalmente ocurre en la infección por el FCV (Figura 16A), ya no se observa en células que son tratadas con lactacistina, ya que no hay diferencias significativas en la cantidad de STAT3-pTyr durante la infección (Figura 16B). A pesar de que se inhibió el proteasoma, no se observó una reducción en los niveles de expresión de la proteína viral p39, a diferencia de la inmunofluorescencia en donde se observó una gran disminución en la cantidad de dcRNA durante la inhibición del proteasoma respecto a las células infectadas al mismo tiempo postinfección y no tratadas con lactacistina, por lo que no podríamos decir un resultado concluyente ya que en ambas se detectó la presencia viral utilizando marcadores diferentes. Estos resultados confirman lo que se observó mediante inmunofluorescencia, es decir, que el proteasoma está implicado en la estabilización de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV.

A) Extractos totales de células CrFK no tratadas con lactacistina.



B) Extractos totales de células CrFK tratadas con lactacistina.



C) Gráfica comparativa de STAT3-P de extractos celulares totales tratados y no tratados con lactacistina.

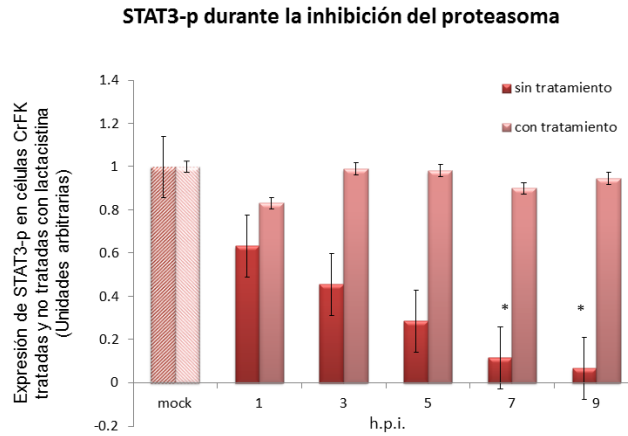
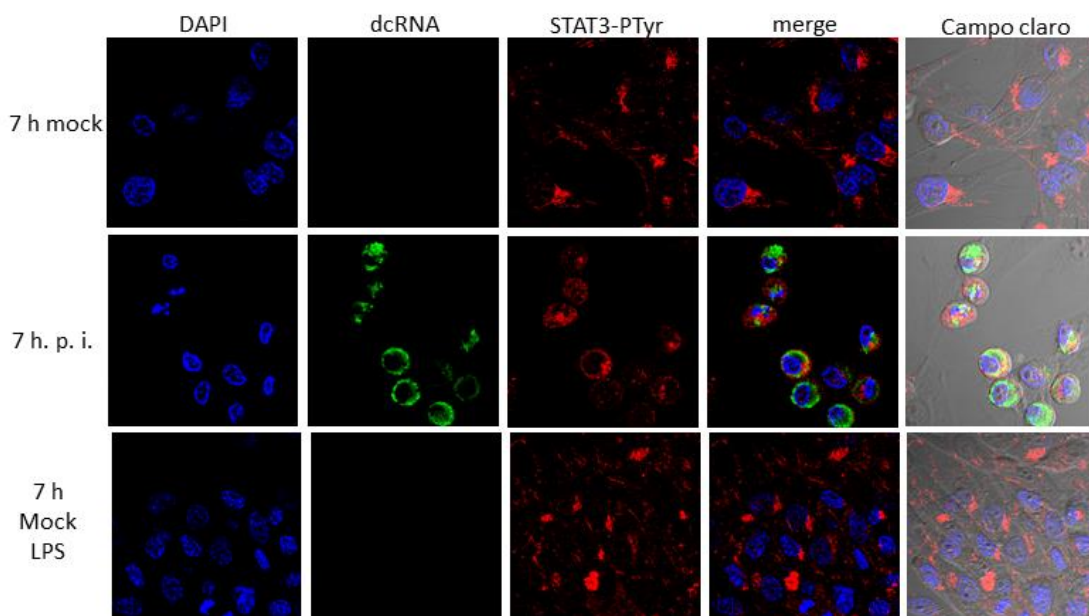


Figura 16. Expresión de la proteína STAT3 y STAT3-p-Tyr705 en extractos totales de células CrFK infectadas con el FCV y tratadas con lactacistina. Expresión de la proteína STAT3 y STAT3-pTyr durante una cinética de infección a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i en ausencia (A) o en presencia (B) de lactacistina se realizó mediante Western blot. Se usó p39 para demostrar la infección viral. Las células MDA-MB231 se utilizaron como control positivo de la expresión de STAT3-pTyr y células CrFK no infectadas se usaron como control negativo. Se usó β -actina como control de carga. Los niveles de expresión de STAT3-pTyr y STAT3 se analizaron mediante densitometría utilizando el software ImageJ y ajustando los valores con los niveles de expresión de β -actina y finalmente los valores fueron graficados. C) Gráfico comparativo de STAT3-pTyr en una cinética de infección sin tratamiento y en una cinética de infección en células tratadas con lactacistina.

Debido a que en condiciones normales no observamos a STAT3-pTyr en el núcleo de la línea celular CrFK y a que teníamos la duda de si el FCV inhibe la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo debido a un arresto de la vía JAK-STAT, decidimos tratar a las células con lipopolisacárido (LPS), un compuesto que actúa a través de la activación del receptor tipo Toll4 e induce la translocación de STAT3-pTyr desde el citoplasma hacia el núcleo. Para ello, las células CrFK se trataron con LPS a la misma concentración reportada anteriormente para esta misma línea celular (He et al., 2012) y la localización de STAT3-pTyr fue analizada por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal, sin embargo, en las células tratadas con LPS no se logró observar la translocación de STAT3-pTyr al núcleo (Figura 17). Y como era de esperarse, en las células infectadas y tratadas con LPS no se observó a STAT3-pTyr en el núcleo, por lo cual hasta el momento no podemos saber si el FCV inhibe la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo de la célula que correlacione con la disminución de survivina y la inducción de la apoptotís. Se requiere realizar más experimentos utilizando diferentes concentraciones de LPS así como otros inductores de la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo.



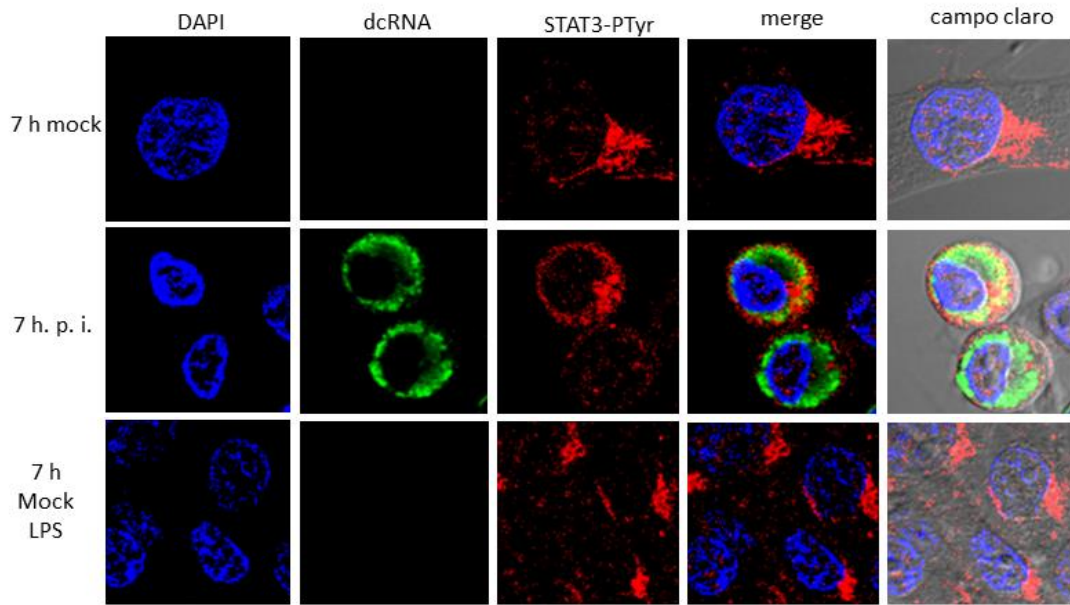


Figura 17. Células CrFK tratadas con LPS para la inducción de la translocación de STAT3 al núcleo y analizadas mediante microscopía confocal. Células CrFK cultivadas en placas de 6 pozos fueron infectadas a una MOI de 5 a las 7 h.p.i, las cuales fueron tratadas o no con LPS. Se observa a STAT3-pTyr (rojo), dcRNA (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En los paneles inferiores se muestran acercamientos de las imágenes.

10. DISCUSIÓN

La infección por los norovirus que infectan a humanos es una de las principales causas de gastroenteritis en toda la población a nivel mundial, y representan un problema de salud pública. Sin embargo, debido a que el estudio de los norovirus humanos se ha visto limitado por las dificultades para cultivarlos, el FCV, otro miembro de los Calicivirus, representa uno de los mejores modelos para conocer la biología de esta familia de virus.

En el ciclo de infección del FCV hay inducción de la apoptosis intrínseca y la activación de caspasas para favorecer su replicación y propagación en el huésped (Al-Molawi et al., 2003; Sosnovtsev et al., 2003); entre los cambios que sucedan para el establecimiento de la apoptosis, se presenta una regulación negativa de la proteína antiapoptótica survivina (Barrera Vásquez, 2014). Se sabe que survivina es regulada por la activación de la proteína STAT3 a través de su fosforilación. STAT3-pTyr es capaz de translocarse desde el citoplasma hacia el núcleo en donde promueve la transcripción de genes blanco para la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, ciclina D1 y survivina (Nie et al., 2015). En este trabajo se estudió a STAT3-pTyr, analizando si ocurrían cambios a nivel de la expresión como en su localización subcelular durante el proceso de infección por el FCV.

Durante la infección por el FCV se identificaron cambios morfológicos como redondeamiento celular, apertura de la monocapa y presencia de células refringentes mediante el uso de microscopía de luz; mediante PCR punto final se observó la regulación negativa del RNAm de STAT3 y mediante Western blot se corroboró que tanto la expresión de survivina como la de su activador STAT3-pTyr que está relacionado con su síntesis fueron regulados negativamente. Estos datos en conjunto demuestran la inducción de la apoptosis relacionada con la disminución de la expresión de survivina que al igual que otras proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL son reguladas por STAT3-pTyr (Timofeeva et al., 2012), en cambio, no se detectó afectada la expresión de la proteína STAT3 debido a que es muy estable con una vida media larga de 8 horas (Schust et al., 2006) y a que el ciclo replicativo para

FCV es de 9 horas por lo cual no fue posible saber si STAT3 también sea regulada. Además se sabe que sólo STAT3 en su forma fosforilada es necesaria para la expresión de genes implicados en el crecimiento, sobrevivencia y proliferación celular, entre ellos survivina (Nie et al., 2015).

STAT3 puede ser un blanco para virus que regulan su actividad y expresión como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, por ejemplo el virus varicela zóster activa a STAT3 fosforilándolo, consecuentemente se activa la expresión de survivina y finalmente se inhibe la apoptosis (Sen et al., 2012) mientras que el virus de las paperas regula negativamente la expresión de STAT3 y finalmente hay inducción de la apoptosis (Ulane et al., 2003).

Cuando STAT3 está fosforilada, se encuentra activada y tiene la capacidad de translocarse al núcleo para efectuar su actividad transcripcional, mientras que cuando es defosforilada se localiza en el citoplasma (Yarden Y y Gabi T, 2013), por lo cual procedimos a analizar su expresión y localización subcelular durante el proceso replicativo mediante inmunofluorescencia por microscopía confocal, fraccionamiento subcelular y WB. Por inmunofluorescencia se observó a la proteína STAT3-pTyr localizada en la región perinuclear en células no infectadas y que durante la infección se deslocaliza hacia el citoplasma con una intensidad menor a las 7 h.p.i., por Western blot se observó una regulación negativa de su expresión tanto en extractos totales como en la fracción citoplásmica. La detección aparente de STAT3-pTyr en las fracciones nucleares se debe a que ésta se encuentra adosada en la región perinuclear, por lo que muy probablemente ésta fue la causa de que la hallamos detectado en esta fracción. Se sabe que cuando STAT3 está en citoplasma colocaliza con los complejos ligando-receptor de factores de crecimiento en vesículas endocíticas y que los utiliza como maquinaria de transporte para localizarse en tres lugares diferentes de la célula de manera tiempo dependiente: la membrana plasmática, el citoplasma y la región perinuclear. En la zona perinuclear está frecuentemente en su forma activada, después es liberada de los complejos ligando-receptor para ser importado hacia el núcleo (Bild et al., 2002), pero si la activación de

STAT3 es elevada, su internalización mediante endocitosis es inhibida a través de su difusión hacia el citoplasma que es rico en fosfatasa, de esta manera se previene tanto su activación significativa como su acumulación nuclear (Yarden y Gabi, 2013), Se ha reportado que STAT6, otro miembro de la familia STAT, cuando está fosforilado se localiza en la zona perinuclear y se relocaliza hacia el citoplasma en donde será defosforilado debido a que las proteínas involucradas en su fosforilación son degradadas por la vía proteasomal (Hanson et al., 2003). También se sabe que el proteasoma está involucrado en mantener el equilibrio en la vía JAK/STAT a través de la regulación negativa de proteínas cinasas que favorecen la fosforilación de STAT (Kim y Maniatis, 1996), de modo que la inhibición del proteasoma incrementa la expresión de STAT3 y STAT3-pTyr (Yu y Burakoff, 1997).

Como nosotros observamos por inmunofluorescencia la deslocalización de la proteína STAT3-pTyr hacia el citoplasma y de manera difusa con una intensidad disminuida y por Western blot se confirmó que esta disminución en la intensidad es porque la proteína es regulada negativamente, analizamos si la vía JAK-STAT estaba siendo alterada durante la infección, evaluamos el efecto de la inhibición del proteasoma con lactacistina en la regulación negativa y la localización de STAT3-pTyr durante el proceso infeccioso del FCV. El tratamiento con lactacistina disminuyó la regulación negativa de STAT3-pTyr observado mediante WB y disminuyó su relocalización hacia el citoplasma manteniéndose en la región perinuclear como se observó en los ensayos de inmunofluorescencia. En estudios previos se determinó que la inhibición de la función y actividad de STAT3 resulta beneficiosa para algunos virus, como es el caso del virus de las paperas, el cual a través de su proteína V se une y marca a STAT3 para que sea degradada por la vía proteasomal, mediante este mecanismo el virus modula la respuesta antiviral celular y promueve la apoptosis (Ulane et al., 2003). De igual manera, el virus de parainfluenza-2 PIV-2 a través de su proteína viral V marca a STAT2 mediante ubiquitinación para su degradación proteasomal y como consecuencia hay una disminución en la respuesta de IFN-I, que está involucrado en la respuesta antiviral (Parisien et al., 2001).

Debido a que nosotros observamos la regulación negativa de STAT3-pTyr y su relocalización desde la región perinuclear hacia el citoplasma, posiblemente esta vía sea un blanco por el FCV para disminuir los niveles de STAT3-pTyr, evitar su translocación hacia el núcleo y finalmente favorecer las condiciones para el establecimiento de la apoptosis a través de falta de recambio de survivina, ya que su vida media es de 30 minutos. Por otra parte, se sabe que la entrada del FCV se da por endocitosis mediada por receptor en vesículas recubiertas de clatrina (Stuart y Brown, 2006) y dado que STAT3-pTyr también se ha localizado en endosomas asociados a clatrina (Bild et al., 2002), una explicación del mecanismo de infección podría consistir en que el FCV module a la vía JAK-STAT regulando negativamente a STAT3-pTyr a través de la vía proteasomal, esto favorecería la internalización del virus a la célula a través de los endosomas y después STAT3-pTyr sería liberado hacia el citoplasma, evitando su ingreso al núcleo y su papel transcripcional induciéndose la apoptosis. Por lo que al inhibir al proteasoma se evita la regulación negativa de STAT3-pTyr y como consecuencia hay una deficiente replicación viral debido a que el virus no pueda ser internalizado eficientemente, ya que en los resultados por inmunofluorescencia se observó una deficiencia en la cantidad del dcRNA durante la inhibición del proteasoma, lo que confirma la importancia del papel del proteasoma en la regulación negativa de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV.

Sin embargo, es importante mencionar la posibilidad de que durante la infección por el FCV además de que se estén modulando cinasas de la vía JAK-STAT también podrían estar implicadas cinasas de otras vías de señalización, como por ejemplo en la vía de las MAPK, PI3K/Akt y Src, las cuales involucran la fosforilación de STAT3 (Garcia et al., 2001). Por tanto, es conveniente realizar más estudios para determinar si la regulación negativa de STAT3-pTyr ocurre como consecuencia de la unión directa de alguna proteína viral con STAT3, o de manera indirecta río arriba como consecuencia de la degradación de cinasas o por la acción de fosfatasas que regulan la fosforilación de STAT3.

Como no sabíamos si la ausencia de STAT3-pTyr en el núcleo era una característica particular de las células CrFK, ya que por inmunofluorescencia nosotros no observamos en ningún tiempo la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo. Se ha reportado la distribución de STAT3 en la región perinuclear en fibroblastos embrionicos de ratón (Shaiken y Opekun, 2014) o si era consecuencia de la infección por FCV, utilizamos al LPS como activador de IL-6 y para favorecer la translocación de STAT3-pTyr al núcleo de la célula (He et al., 2012). Sin embargo, no observamos esta translocación, por lo que se sugiere analizar otras concentraciones de la droga o utilizar otro inductor de la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo, y para corroborar su actividad transcripcional evaluar la expresión de otras proteínas que normalmente son activadas por STAT3-pTyr y que nos permitan evaluar si en un contexto de infección estas proteínas no estén siendo activadas ante la inducción de la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo. Además estos resultados nos permitirían identificar si la falta de la activación de la vía JAK-STAT pudiera ser una estrategia específica del virus para evitar la expresión de genes blanco antiapoptóticos como la survivina, y con ello favorecer la activación de la apoptosis.

Hasta el momento, no hay reportes que muestren que durante la infección por FCV haya una regulación negativa de STAT3-pTyr. Los resultados aquí mostrados permitieron identificar que durante la infección por FCV hay una modulación negativa del RNAm de STAT3, asimismo la proteína STAT3-pTyr sufre una relocalización subcelular desde la región perinuclear hacia el citoplasma y su defosforilación podría deberse a la inactivación de la vía JAK-STAT a través de la vía proteosomal. Todo esto correlaciona con la disminución de la expresión de survivina y finalmente se favorece la inducción de la apoptosis como una estrategia antiviral específica para promover la replicación eficaz del virus. El conocer a profundidad los mecanismos involucrados en la regulación de STAT3 durante la infección por FCV tendrá implicaciones importantes para entender sus mecanismos de propagación e infección.

11. CONCLUSIONES

- La proteína STAT3-pTyr se encuentra localizada subcelularmente en la región perinuclear en las células CrFK y es deslocalizada hacia el citoplasma durante la infección por el FCV.
- La vía proteasomal está implicada en la regulación negativa de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV.

12. PERSPECTIVAS

- Confirmar la regulación negativa de la expresión del RNA de STAT3 mediante PCR tiempo real.
- Analizar si la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo es inhibida por el FCV mediante el uso de inductores de la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo.
- Evaluar la expresión de otras proteínas blanco de STAT3-pTyr para confirmar el evento de la translocación de STAT3-pTyr hacia el núcleo.
- Analizar si otras proteínas celulares como Src y Akt que participan en otras vías de señalización y que converjen en la fosforilación de STAT3, son reguladas durante la infección por el FCV.
- Determinar si la vía proteasomal participa en la degradación de proteínas tirosina cinasa que fosforilan a STAT3 en Tyr705 durante la infección por el FCV.
- Determinar si fosfatatas específicas participan en la regulación negativa de STAT3-pTyr durante la infección por el FCV.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Z., M. Abbas, S. Abbas, and L. Shazi. 2015. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*. 7:777-786.
- Abente, E.J., S.V. Sosnovtsev, C. Sandoval-Jaime, G.I. Parra, K. Bok, and K.Y. Green. 2013. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of Virology*. 87:3003-3017.
- Ai, M.D., L.L. Li, X.R. Zhao, Y. Wu, J.P. Gong, and Y. Cao. 2005. Regulation of survivin and CDK4 by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Cell Research*. 15:777-784.
- Al-Molawi, N., V.A. Beardmore, M.J. Carter, G.E. Kass, and L.O. Roberts. 2003. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *The Journal of General Virology*. 84:1237-1244.
- Al Zaid Siddiquee, K., and J. Turkson. 2008. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Research*. 18:254-267.
- Alonso, C., J.M. Oviedo, J.M. Martin-Alonso, E. Diaz, J.A. Boga, and F. Parra. 1998. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Archives of Virology*. 143:321-332.
- Alvarez-Sanchez, C., C. Cancio-Lonches, J.E. Mora-Heredia, J.C. Santos-Valencia, O.S. Barrera-Vazquez, M. Yocupicio-Monroy, and A.L. Gutierrez-Escolano. 2015. Negative effect of heat shock on feline calicivirus release from infected cells is associated with the control of apoptosis. *Virus Research*. 198:44-52.
- Aoki, Y., G.M. Feldman, and G. Tosato. 2003. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 101:1535-1542.
- Barrera Vásquez, Ó.S. 2014. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis durante la infección por el *Norovirus murino* y el *Calicivirus felino*. In *Infectómica Y Patogénesis Molecular CINVESTAV IPN*. 75.
- Belliot, G., S.V. Sosnovtsev, K.O. Chang, V. Babu, U. Uche, J.J. Arnold, C.E. Cameron, and K.Y. Green. 2005. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*. 79:2393-2403.
- Berger, A., B. Willi, M.L. Meli, F.S. Boretti, S. Hartnack, A. Dreyfus, H. Lutz, and R. Hofmann-Lehmann. 2015. Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland. *BMC Veterinary Research*. 11:282.
- Bhella, D., D. Gatherer, Y. Chaudhry, R. Pink, and I.G. Goodfellow. 2008. Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *Journal of Virology*. 82:8051-8058.
- Bild, A.H., J. Turkson, and R. Jove. 2002. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*. 21:3255-3263.

- Boidot, R., F. Vegran, and S. Lizard-Nacol. 2014. Transcriptional regulation of the survivin gene. *Molecular Biology Reports*. 41:233-240.
- Bok, K., V.G. Prikhodko, K.Y. Green, and S.V. Sosnovtsev. 2009. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *Journal of Virology*. 83:3647-3656.
- Borbely, A.A., M. Murvai, K. Szarka, J. Konya, L. Gergely, Z. Hernadi, and G. Veress. 2007. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology*. 60:303-306.
- Brown, M.E., M.D. Bear, T.J. Rosol, C. Premanandan, W.C. Kisseberth, and C.A. London. 2015. Characterization of STAT3 expression, signaling and inhibition in feline oral squamous cell carcinoma. *BMC Veterinary Research*. 11:206.
- Clarke, I.N., and P.R. Lambden. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *The Journal of General Virology*. 78 (Pt 2):291-301.
- Clarke, I.N., and P.R. Lambden. 2001. The molecular biology of human caliciviruses. *Novartis Foundation Symposium*. 238:180-191; discussion 191-186.
- Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Cancer*. 2:647-656.
- Crawford, L.J., B. Walker, and A.E. Irvine. 2011. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 5:101-110.
- Cheun, H.I., S.H. Cho, J.H. Lee, Y.Y. Lim, J.H. Jeon, J.R. Yu, T.S. Kim, W.J. Lee, S.H. Cho, D.Y. Lee, M.S. Park, H.S. Jeong, D.S. Chen, Y.M. Ji, and M.H. Kwon. 2010. Infection status of hospitalized diarrheal patients with gastrointestinal protozoa, bacteria, and viruses in the Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*. 48:113-120.
- Dalgic, C.T., B.T. Kaymaz, M.C. Ozkan, A. Dalmizrak, F. Sahin, and G. Saydam. 2015. Investigating the Role of JAK/STAT Pathway on Dasatinib-Induced Apoptosis for CML Cell Model K562. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 15 Suppl:S161-166.
- Daughenbaugh, K.F., C.E. Wobus, and M.E. Hardy. 2006. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology Journal*. 3:33.
- de Almagro, M.C., and D. Vucic. 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology*. 34:200-211.
- Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*. 68:383-424.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35:495-516.
- Esolen, L.M., S.W. Park, J.M. Hardwick, and D.E. Griffin. 1995. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *Journal of Virology*. 69:3955-3958.

- Fenteany, G., and S.L. Schreiber. 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:8545-8548.
- Fretz, R., H. Schmid, U. Kayser, P. Svoboda, M. Tanner, and A. Baumgartner. 2003. Rapid propagation of norovirus gastrointestinal illness through multiple nursing homes following a pilgrimage. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 22:625-627.
- Gadaleta, P., M. Vacotto, and F. Coulombie. 2002. Vesicular stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication. *Virus Research*. 86:87-92.
- Garcia, R., T.L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C.A. Muro-Cacho, C.E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker, and R. Jove. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 20:2499-2513.
- Green, K.Y. 2001. Human Caliciviruses. *Fields Virology*. 1:841-874.
- Green, K.Y., A. Mory, M.H. Fogg, A. Weisberg, G. Belliot, M. Wagner, T. Mitra, E. Ehrenfeld, C.E. Cameron, and S.V. Sosnovtsev. 2002. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *Journal of Virology*. 76:8582-8595.
- Gritsko, T., A. Williams, J. Turkson, S. Kaneko, T. Bowman, M. Huang, S. Nam, I. Eweis, N. Diaz, D. Sullivan, S. Yoder, S. Enkemann, S. Eschrich, J.H. Lee, C.A. Beam, J. Cheng, S. Minton, C.A. Muro-Cacho, and R. Jove. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 12:11-19.
- Gu, L., K.Y. Chiang, N. Zhu, H.W. Findley, and M. Zhou. 2007. Contribution of STAT3 to the activation of survivin by GM-CSF in CD34+ cell lines. *Experimental Hematology*. 35:957-966.
- Guedes, R.A., P. Serra, J.A. Salvador, and R.C. Guedes. 2016. Computational Approaches for the Discovery of Human Proteasome Inhibitors: An Overview. *Molecules*. 21.
- Hansman GS, Jiang XJ y Green KY. 2010. Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology.
- Hanson, E.M., H. Dickensheets, C.K. Qu, R.P. Donnelly, and A.D. Keegan. 2003. Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:3903-3911.
- He, Z., Y. Gao, Y. Deng, W. Li, Y. Chen, S. Xing, X. Zhao, J. Ding, and X. Wang. 2012. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway. *PLoS One*. 7:e35926.

- Herod, M.R., O. Salim, R.J. Skilton, C.A. Prince, V.K. Ward, P.R. Lambden, and I.N. Clarke. 2014. Expression of the murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PLoS One*. 9:e90679.
- Huang, S. 2007. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clinical Cancer Research*. 13:1362-1366.
- Humphrey, S.J., D.E. James, and M. Mann. 2015. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 26:676-687.
- Ignatius Irudayam, J., D. Contreras, L. Spurka, A. Subramanian, J. Allen, S. Ren, V. Kanagavel, Q. Nguyen, A. Ramaiah, K. Ramamoorthy, S.W. French, A.S. Klein, V. Funari, and V. Arumugaswami. 2015. Characterization of type I interferon pathway during hepatic differentiation of human pluripotent stem cells and hepatitis C virus infection. *Stem Cell Research*. 15:354-364.
- Jan, J.T., S. Chatterjee, and D.E. Griffin. 2000. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. *Journal of Virology*. 74:6425-6432.
- Kamran, M.Z., P. Patil, and R.P. Gude. 2013. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed Research International*. 2013:421821.
- Kaplan, M.H., Y.L. Sun, T. Hoey, and M.J. Grusby. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*. 382:174-177.
- Kim, T.K., and T. Maniatis. 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*. 273:1717-1719.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C.W. Schindler. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 285:1-24.
- Kominsky, D.J., R.J. Bickel, and K.L. Tyler. 2002. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. *Journal of Virology*. 76:11414-11424.
- Kondo, Y., K. Machida, H.M. Liu, Y. Ueno, K. Kobayashi, T. Wakita, T. Shimosegawa, and M.M. Lai. 2009. Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances fas-mediated apoptosis by down-regulating the expression of CD44 splicing variant 6. *The Journal of Infectious Diseases*. 199:726-736.
- Koo, H.L., N. Ajami, R.L. Atmar, and H.L. DuPont. 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discovery Medicine*. 10:61-70.
- Kuchipudi, S.V., M. Tellabati, S. Sebastian, B.Z. Londt, C. Jansen, L. Vervelde, S.M. Brookes, I.H. Brown, S.P. Dunham, and K.C. Chang. 2014. Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Veterinary Research*. 45:118.

- Levy, D.E., and J.E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 3:651-662.
- Lieblein, J.C., S. Ball, B. Hutzen, A.K. Sasser, H.J. Lin, T.H. Huang, B.M. Hall, and J. Lin. 2008. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer*. 8:302.
- Makino, A., M. Shimojima, T. Miyazawa, K. Kato, Y. Tohya, and H. Akashi. 2006. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *Journal of Virology*. 80:4482-4490.
- Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 22:355-370.
- Murase, S. 2013. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) degradation by proteasome controls a developmental switch in neurotrophin dependence. *The Journal of Biological Chemistry*. 288:20151-20161.
- Narimatsu, M., H. Maeda, S. Itoh, T. Atsumi, T. Ohtani, K. Nishida, M. Itoh, D. Kamimura, S.J. Park, K. Mizuno, J. Miyazaki, M. Hibi, K. Ishihara, K. Nakajima, and T. Hirano. 2001. Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Molecular and Cellular Biology*. 21:6615-6625.
- Nie, X.H., J. Ou-yang, Y. Xing, D.Y. Li, X.Y. Dong, R.E. Liu, and R.X. Xu. 2015. Paeoniflorin inhibits human glioma cells via STAT3 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 9:5611-5622.
- Nielsen, M., C.G. Kaestel, K.W. Eriksen, A. Woetmann, T. Stokkedal, K. Kalsoft, C. Geisler, C. Ropke, and N. Odum. 1999. Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*. 13:735-738.
- Parisien, J.P., J.F. Lau, J.J. Rodriguez, B.M. Sullivan, A. Moscona, G.D. Parks, R.A. Lamb, and C.M. Horvath. 2001. The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology*. 283:230-239.
- Patel, M.M., M.A. Widdowson, R.I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje, and U.D. Parashar. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 14:1224-1231.
- Perez-Alvarez, S., M.E. Solesio, J. Manzanares, J. Jordan, and M.F. Galindo. 2009. Lactacystin requires reactive oxygen species and Bax redistribution to induce mitochondria-mediated cell death. *British Journal of Pharmacology*. 158:1121-1130.
- Prinz, K. 2010. Felid herpesvirus-1 infection: influence on proinflammatory cytokine and toll like receptor expression in vitro. *Zurich Open Repository and Archive*:1-45.

- Qiu, J.H., A. Asai, S. Chi, N. Saito, H. Hamada, and T. Kirino. 2000. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*. 20:259-265.
- Ramsey-Ewing, A., and B. Moss. 1998. Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology*. 242:138-149.
- Rohayem, J., M. Bergmann, J. Gebhardt, E. Gould, P. Tucker, A. Mattevi, T. Unge, R. Hilgenfeld, and J. Neyts. 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research*. 87:162-178.
- Sadowski-Debbing, K., J.F. Coy, W. Mier, H. Hug, and M. Los. 2002. Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 50:19-34.
- Sahu, R.P., and S.K. Srivastava. 2009. The role of STAT-3 in the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by benzyl isothiocyanate. *Journal of the National Cancer Institute*. 101:176-193.
- Schindler, C.W. 2002. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 109:1133-1137.
- Schust, J., B. Sperl, A. Hollis, T.U. Mayer, and T. Berg. 2006. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chemistry & Biology*. 13:1235-1242.
- Sen, N., X. Che, J. Rajamani, L. Zerboni, P. Sung, J. Ptacek, and A.M. Arvin. 2012. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:600-605.
- Shaiken, T.E., and A.R. Opekun. 2014. Dissecting the cell to nucleus, perinucleus and cytosol. *Scientific Reports*. 4:4923.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*. 9:459-470.
- Shimoda, K., J. van Deursen, M.Y. Sangster, S.R. Sarawar, R.T. Carson, R.A. Tripp, C. Chu, F.W. Quelle, T. Nosaka, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G. Grosveld, W.E. Paul, and J.N. Ihle. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*. 380:630-633.
- Shiozaki, E.N., and Y. Shi. 2004. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*. 29:486-494.
- Shuai, K. 2000. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*. 19:2638-2644.
- Silke, J., and P. Meier. 2013. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5.
- Sosnovtsev, S.V., G. Belliot, K.O. Chang, V.G. Prikhodko, L.B. Thackray, C.E. Wobus, S.M. Karst, H.W. Virgin, and K.Y. Green. 2006. Cleavage map and proteolytic processing of

- the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *Journal of Virology*. 80:7816-7831.
- Sosnovtsev, S.V., M. Garfield, and K.Y. Green. 2002. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *Journal of Virology*. 76:7060-7072.
- Sosnovtsev, S.V., E.A. Prikhod'ko, G. Belliot, J.I. Cohen, and K.Y. Green. 2003. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus research*. 94:1-10.
- Stuart, A.D., and T.D. Brown. 2006. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *Journal of Virology*. 80:7500-7509.
- Timofeeva, O.A., S. Chasovskikh, I. Lonskaya, N.I. Tarasova, L. Khavrutskii, S.G. Tarasov, X. Zhang, V.R. Korostyshevskiy, A. Cheema, L. Zhang, S. Dakshanamurthy, M.L. Brown, and A. Dritschilo. 2012. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 287:14192-14200.
- Ulane, C.M., J.J. Rodriguez, J.P. Parisien, and C.M. Horvath. 2003. STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *Journal of Virology*. 77:6385-6393.
- Vasudevan, D., and H. Don Ryoo. 2015. Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Current topics in Developmental Biology*. 114:185-208.
- Xiong, A., Z. Yang, Y. Shen, J. Zhou, and Q. Shen. 2014. Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. *Cancers*. 6:926-957.
- Yang, J., M. Chatterjee-Kishore, S.M. Staugaitis, H. Nguyen, K. Schlessinger, D.E. Levy, and G.R. Stark. 2005. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Research*. 65:939-947.
- Yarden Y y Gabi T. 2013. Vesicle Trafficking in Cancer. 14: 393.
- Yu, C.L., and S.J. Burakoff. 1997. Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:14017-14020.
- Yumiketa, Y., T. Narita, Y. Inoue, G. Sato, W. Kamitani, T. Oka, K. Katayama, T. Sakaguchi, and Y. Tohya. 2016. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology*. 185:62-67.
- Zhang, J.J., Y. Zhao, B.T. Chait, W.W. Lathem, M. Ritzi, R. Knippers, and J.E. Darnell, Jr. 1998. Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *The EMBO Journal*. 17:6963-6971.
- Zhang, X., P. Yin, D. Di, G. Luo, L. Zheng, J. Wei, J. Zhang, Y. Shi, J. Zhang, and N. Xu. 2009. IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Research*. 29:4497-4501.

ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
FCV	<i>Calicivirus felino</i>
°C	grados Celsius
pH	potencial de Hidrógeno
h.p.i.	horas post-infección
dNTPs	deoxinucleótidostrifosfato
Kb	kilo bases
kDa	kilo daltones
ORF	marco de lectura abierto
TA	temperatura ambiente
µg	microgramos
µl	microlitros
mg	miligramos
ml	mililitros
hr	horas
min	minutos
ng	nanogramos
nm	nanómetros
pb	pares de bases
RNT	región no traducida
WB	western blot
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IAP	Proteína Inhibitoria de la Apoptosis
VP	Proteína Viral
NS	No estructural
STAT	Transductor de Señal y Activador Transcripcional
Coiled coil	Suprenenrollamiento
IL	Interleucina
JAK	Cinasa Activada Janus
UV	Ultravioleta
mM	milimolar
U	Unidades
ug/ml	microgramos/ mililitro
CO ₂	Dióxido de Carbono
MOI	Multiplicidad de Infección
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNasa	endonucleasa del DNA
TBE	Tris/Borato/EDTA
RPM	Revoluciones por minuto
HRP	Horseradishperoxidase
TBS-T	Búffer salino Tris-Tween20
CrFK	Crandell Ress feline kidney