



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**EVALUACIÓN DE LAS IAPs EN UN MODELO DE CÉLULAS ENDOTELIALES  
HMEC-1 INFECTADAS CON EL VIRUS DENGUE**

**T E S I S**

**Que presenta**

**MARIANELA CELESTE RUIZ RUIZ**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**Directores de la tesis: DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN**

**DR. DAVID EDUARDO MEZA SÁNCHEZ**

**Ciudad de México**

**AGOSTO, 2019**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 18 (L-18) del **Departamento de Biomedicina Molecular** perteneciente al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**, bajo la asesoría de la **Dra. Leticia Cedillo Barrón** y la co-asesoría del **Dr. David Eduardo Meza Sánchez**.

# DEDICATORIA

A tí Dios.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de Agosto 2017-Agosto 2019. No. de becario 632437.



Agradezco al CINEVESTAV Unidad Zacatenco por el espacio y la formación académica durante el periodo de Agosto 2017-Agosto 2019.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ❖ Agradezco a la Doc Lety por haberme aceptado en su grupo de investigación, y una vez dentro, por su asesoría académica y por compartir su conocimiento durante este año. Le agradezco también por su infinita paciencia y comprensión. No hay palabras.
- ❖ Agradezco al Dr. Julio, gracias Juls por ayudarme con mis experimentos y tus asesorías en cuanto a mi proyecto, y por supuesto por darme ánimos. Gracias por la confianza.
- ❖ Agradezco a mis compañeros de laboratorio Alfred, Vero y Gio. Gracias chicos por su apoyo, por haberme enseñado, por sus comentarios y observaciones. Aprendí mucho, y también sobre mí. Gracias chicos, de verdad.
- ❖ Agradezco al Dr. Villegas, por sus comentarios, observaciones y por haber proporcionado las herramientas para llevar a cabo este trabajo. Agradezco a su grupo de trabajo Raúl, Rembert, Iván y Caro, gracias chicos por todo su apoyo.
- ❖ Agradezco a mis compañeros de generación, por hacer más amena esta estancia especialmente a Mike, Zuleyma, Roxana y Allin (vamos a por ello Allin). Gracias amigos por los buenos, malos e increíbles ratos.
- ❖ Y, por último, pero no menos importante, a mis padres, a Aldo y Abril mis hermanos. Son mi familia, pienso en ustedes. Gracias por llamarme de vez en cuando.

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 Generalidades del virus dengue.....	10
1.2 Características generales de las proteínas virales.....	10
1.2.1 Proteínas estructurales .....	10
1.2.2 Proteínas no estructurales .....	11
1.3 Relicación del virus dengue.....	12
1.4 Estrés celular inducido por la infección del virus dengue.....	13
1.4.1 Autofagia.....	14
1.5 Apoptosis.....	14
1.5.1 Vía intrínseca.....	15
1.5.2 Vía extrínseca.....	17
1.5.3 Regulación de la apoptosis.....	19
1.6 Familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).....	19
1.6.1 Estructura y dominios de las IAPs .....	20
1.6.2 Proteínas inhibidoras de la apoptosis .....	22
1.6.3 Regulación de las proteínas inhibidoras de la apoptosis .....	25
1.6.4 IAPs en infecciones virales .....	25
1.7 Mecanismos de muerte celular por el virus dengue.....	28
1.8 Participación de las proteínas virales de dengue en la apoptosis.....	29
<b>CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>CAPÍTULO III: HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>CAPÍTULO IV: OBJETIVOS</b> .....	32
<b>CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
5.1 Stock Viral.....	34
5.2 Titulación del virus en placa .....	34
5.3 Western blot.....	36
5.4 Inmunofluorescencia.....	36

5.5 Transfección con la NS2B .....	37
<b>CAPÍTULO VI: RESULTADOS</b> .....	38
6.1 Caracterización de la cinética de infección células HMEC-1 .....	38
6.2 Evaluación de la expresión de XIAP, survivina, Bcl-XL.....	39
6.3 Cinética de survivina 6-30 horas .....	40
6.4 Cinética de XIAP cinética de 6-30 horas .....	43
6.5 Cinética de Smac-DIABLO 6-30 horas.....	44
6.5 Transfección con la NS2B .....	47
6.6 Análisis de PARP durante la infección por DENV .....	49
<b>CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>CAPÍTULO IX: CONCLUSIÓN</b> .....	56
<b>CAPÍTULO X: PERSPECTIVAS</b> .....	57

## RESUMEN

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis. Sus funciones en este proceso son principalmente bloquear la señalización que induce el proceso de muerte por apoptosis. La mayor parte del estudio generado sobre las IAPs es en cáncer, dadas las implicaciones del control de la apoptosis. Ahora bien, algunos virus pueden originar cáncer como hepatitis B y C, VPH, el virus de Epstein-Barr, etc. Se ha visto que la transformación maligna de células por virus está asociada a la activación de las IAPs (survivina). Se ha descrito reiteradamente que varios virus son capaces de modular la apoptosis en favor de su replicación. Estos antecedentes han contribuido a que, varios grupos de investigación se esten dado a la tarea de evaluar el papel que tienen las IAPs durante infecciones virales. Una gran cantidad de trabajos científicos ha descrito que el virus dengue induce apoptosis en varios modelos celulares entre ellos, células endoteliales HMEC-1. Por otro lado, se ha descrito que algunas proteínas virales pueden estar implicadas en este proceso, tales como prM, NS3 y como las viroporinas NS2A y NS2B, donde ambas proteínas pueden estar asociadas a daño mitocondrial, e inducir apoptosis. Para entender algunos de los mecanismos, por los cuales el virus estaría modulando la apoptosis, un primer acercamiento sería el evaluar si hay cambios en la expresión de las IAPs durante la infección por el virus dengue. En el presente trabajo evaluamos la expresión de las IAPs, específicamente de survivina y XIAP, durante la infección por dengue, en un modelo de células endoteliales HMEC-1, así como de otras moléculas implicadas en el proceso de apoptosis. Para esto, cultivos de células HMEC-1 se infectaron y a diferentes horas post-infección, (6, 9, 12, 18, 20 y 30), posteriormente se realizaron extractos totales de proteínas y se analizó la expresión por Western Blot de Survivina, XIAP, Smac/DIABLO, así como el procesamiento de la Caspasa 3, Caspasa 9 y PARP. La cinética de expresión de survivina nos muestra que ésta disminuye de manera gradual en todas las condiciones (sin infectar, mock e infectados), sin embargo, la disminución de la survivina es más marcada en los cultivos infectados y esto se observa entre las 6 y 9 hpi.

**Palabras clave:** IAPs, survivina, XIAP, apoptosis, dengue.



## ABSTRACT

Apoptosis inhibitory proteins (IAPs) play an important role in the regulation of apoptosis. Its functions in this process are mainly to block the signaling that induces the process of death by apoptosis. Most of the study generated on IAPs is in cancer, given the implications of the control of apoptosis. However, some viruses can cause cancer such as hepatitis B and C, HPV, Epstein-Barr virus, etc. It has been shown that the malignant transformation of cells by virus is associated with the activation of IAPs (survivin). Under this premise, several research groups have been given the task of seeing what role IAPs play during viral infections, in the context of apoptosis. It has been described that several viruses are capable of modulating apoptosis in favor of their replication, the dengue virus is one of them. It is widely described that the dengue virus induces apoptosis in several cellular models including HMEC-1 endothelial cells. On the other hand, it has been seen that some viral proteins may be involved in this process, such as the viroporins NS3 and NS2B, both proteins may be associated with mitochondrial damage, and inducing apoptosis. An approach to understand how the virus would modulate apoptosis, studying how IAPs are expressed during infection with dengue virus would be one option. The present work is an approach in terms of the expression of IAPs, specifically survivin and XIAP, during dengue infection in a model of endothelial cells HMEC-1, as well as other molecules involved in the process of apoptosis. In order to do so, cultures of HMEC-1 cells ( $6 \times 10^5$ ) were infected (10 MOI) for 6, 12, 20 and 30 hours, then total protein extracts were made and the protein expression was analyzed by Western Blot of Survivin, XIAP, Smac / DIABLO, as well as the processing of Caspase 3, Caspase 9 and PARP. The kinetics of survivin expression shows us a gradually decrease in all conditions (non-infected, mock and infected), however, the decrease in survivin is more marked in infected cultures and this is observed between 6 and 9 hpi.

**Keywords:** IAPs, survivin, XIAP, apoptosis, dengue.

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades del virus dengue

El virus dengue es el agente causal de la fiebre del dengue que ocasiona, fiebre elevada (40°C), dolor de cabeza muy intenso, dolores musculares y articulares, y exantema. El dengue hemorrágico es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves y/o falla orgánica. El virus es transmitido por el mosquito hembra del género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) y está ampliamente distribuido en las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (WHO, 2008).

El virus dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus* y hasta el momento se han descrito cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Dengue tiene un tamaño aproximado de 50 nm, es un virus de RNA monocatenario de polaridad positiva y es traducido en el retículo endoplásmico en una sola poliproteína que da origen a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y 3 proteínas estructurales (cápside, pre-membrana y envoltura)(Guzman et al. 2016).

## 1.2 Características generales de las proteínas virales

### 1.2.1 Proteínas estructurales

**Proteína de envoltura (54 kDa).** La proteína de envoltura (E) es una glicoproteína cuya función es mediar la entrada del virus a la célula. Esta proteína interacciona con moléculas en la membrana celular, como los glucosaminoglicanos (GAGs) entre ellos heparan sulfato (Chen et al, 1997), moléculas de adhesión como DC-SING, entre otras.

**Proteína de cápside (12 kDa).** La proteína de cápside (C) es pequeña cargada positivamente, para enteraccionar con el genoma viral, esta proteína es crucial para la formación de la nucleocápside, el cual es el primer paso para el ensamble

del virus. La nucleocápside contiene una sola molécula de RNA y múltiples copias de la proteína de cápside asociadas a ésta (Byk and Gamarnik 2016).

**Proteína de membrana (PrM 21 kDa, M 8kDa).** Es una glicoproteína que se asocia a la proteína E viral, está embebido en la membrana del RE. Participa durante el ensamble del virus. La Pre-membrana es procesada por la furina una proteasa celular localizada en el transGlgI. Esta modificación es fundamental en la maduración de las partículas virales (Nemésio and José Villalaín, 2012).

### 1.2.2 Proteínas no estructurales

**NS5** (~100 kDa). Es la proteína no estructural más grande y conservada de los flavivirus. Posee un dominio de polimerasa dependiente de RNA en su extremo C-terminal el cual es fundamental para la replicación viral. Tiene actividad de metiltransferasa el cual está involucrado en el *capping* del RNA naciente (Liu et al. 2010).

**NS3** (~70 kDa). Es la segunda proteína no estructural de mayor tamaño. En la región N-terminal tiene actividad de serin-proteasa necesaria para el procesamiento de la poliproteína viral, junto con su co-factor la proteína NS2B. La actividad catalítica de proteasa requiere de un dominio central hidrofílico de 40 residuos apróx. para funcionar de forma eficiente (Yusof R, et al., 2000). La NS3 también tiene actividad de helicasa hacia el extremo C-terminal, el cual es requerido para prevenir la formación de estructuras secundarias del RNA viral al inicio o durante la síntesis de RNA (Norazharuddin and Lai 2018).

**NS2A** (~22 kDa). Proteína hidrofóbica transmembranal que forma parte del complejo de replicación, bloquea la señalización de IFN- $\alpha/\beta$ . Recientemente se le ha atribuido la función de probable viroporina (Shrivastava et al. 2017).

**NS2B** (14 kDa). Actúan como co-factor de la proteasa viral NS3 formando el complejo NS3-NS2B, además posee varios dominios hidrofóbicos que le permiten anclarse a la membrana del RE y de la mitocondria pudiendo actuar como viroporina (Leon-Juarez et al. 2016).

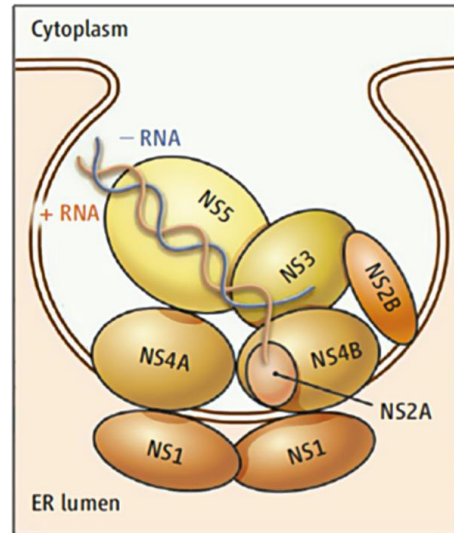
**NS4A, NS4B.** Estas proteínas transmembranales actúan como proteínas de andamiaje para la formación del complejo de replicación. NS4A induce la localización del complejo de replicación hacia la región perinuclear, debido a la necesidad de los virus de RNA de usar componentes celulares para la replicación. NS4A induce autofagia para provenir a muerte celular durante la infección lo que es vital para la replicación viral (McLean et al. 2011). Por otra parte, NS4B modula la replicación viral por su interacción con el dominio de helicasa de la NS3 para ayudar a su disociación del RNA viral (Umareddy et al. 2006), así como también modula respuesta inmune del hospedero suprimiendo la señalización de interferón  $\alpha/\beta$  (Munoz-Jordan et al. 2005).

**NS1** (46-55 kDa). Es una glicoproteína y su peso varía de acuerdo al número de glicosilaciones que tenga. La forma dimérica de NS1 juega un papel importante en la replicación del genoma viral, interacciona con la NS4A y NS4B. Participa en la defensa viral inhibiendo la activación del complemento Pero si se inhibe el  $C3$  del complemento podrías . NS1 es secretada como hexámero en forma de barril hacia la circulación periférica cargando con  $\sim 70$  moléculas de lípidos en su interior (Rastogi, Sharma, and Singh 2016).

### 1.3 Relicación del virus dengue

El ciclo viral comienza con el anclaje de la proteína E (envoltura) del virus a un receptor celular (heparan sulfato, DC-SING). La entrada del virus es por endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro del endosoma, la proteína de envoltura, sufre un cambio conformacional dependiente del pH, mediante el cual expone el péptido de fusión que le permite fusionar su membrana con la del endosoma liberando así el contenido genómico. El RNA viral es traducido en el citoplasma a una poliproteína que posteriormente es procesada por las proteasas virales NS3-NS2B y por proteasas celulares (Guzman et al. 2016). La replicación se realiza adosada a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y es llevada a cabo por el complejo de replicación (CR) conformado por las proteínas no estructurales del virus (Fig. 1.1). Brevemente, la proteína no estructural NS5, RNA-

polimerasa dependiente de RNA (RdRP) viral, es la encargada de llevar a cabo la polimerización y el *capping* del RNA, la actividad de helicasa de NS3-NS2B participa en la replicación evitando la formación de RNA dúplex y estructuras secundarias. Por otro lado, las proteínas NS4A y NS4B estabilizan el complejo de replicación, NS4A se asocia con la membrana a través de sus cuatro dominios transmembranales y tiene un “fragmento K” en el C-terminal que sirve como una secuencia señal para la traslocación de la proteína NS4B adyacente en el lumen del RE (Julien Lesca et al, 2018).



**Figura 1.1 Complejo de replicación del virus dengue.** El CR está conformado por las proteínas no estructurales del virus: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5.

El nuevo RNA viral se asocia con proteínas de cápside para formar la nucleocápside. La forma precursora de la proteína de membrana (PrM) y la proteína de envoltura (E) se encuentran embebidas dentro de la membrana del RE, es ahí donde se ensamblan el RNA viral recién sintetizado para formar partículas virales inmaduras. La partícula viral viaja a través del Golgi, llegando al trans-Golgi donde el pH bajo provoca un rearrreglo conformacional de la proteína PrM que le permite ser procesada por la proteasa celular furina, generando la forma madura de la proteína de membrana (M) sin que se desprenda la prM esto ocurre hasta su salida cuando en presencia del pH extracelular. Finalmente, el virión es liberado hacia el espacio extracelular (Guzman et al. 2016; Acosta, Kumar, and Bartenschlager 2014).

#### 1.4 Estrés celular inducido por la infección del virus dengue.

En general, los *flavivirus* regulan el metabolismo y la supervivencia de las células que infectan, asegurando su propia replicación y propagación. Una vez que el virus entra a la célula, este es capaz de alterar o inducir muchos de los procesos

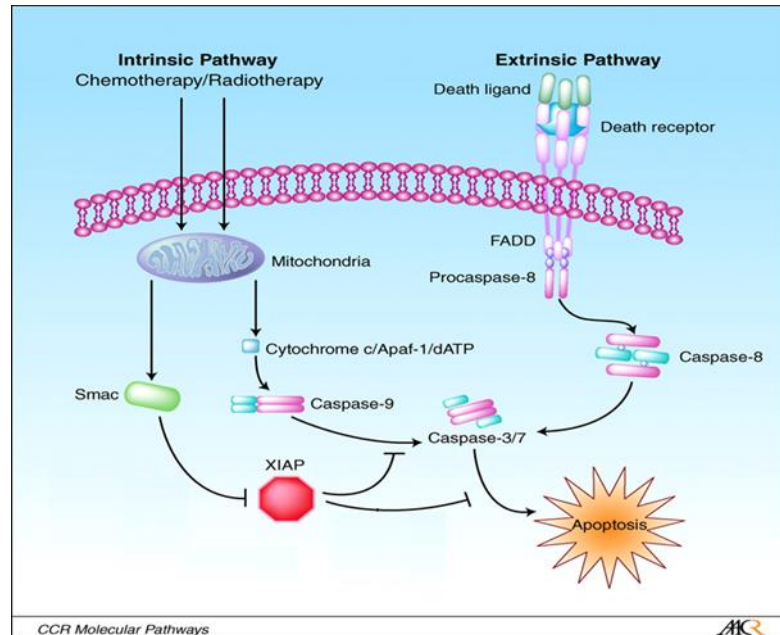
biológicos implicados en el funcionamiento normal de la misma, generando estrés celular (Okamoto et al. 2017).

#### 1.4.1 Autofagia.

La autofagia es un proceso de varias etapas que implica la degradación y el reciclaje de proteínas y orgánulos atrapados en autofagosomas dirigidos a fusionarse con lisosomas (Mehrbod et al. 2019). La autofagia es una respuesta celular contra el estrés el cual incluye infecciones por virus. Lee YR y colaboradores, observaron que dengue serotipo 2 (DENV-2) incrementa el proceso de autofagia en varias líneas celulares demostrado por la formación de puntos de GFP-LC3 y el incremento en la formación de LC3-II. Los títulos virales indicaron que la autofagia promueve la replicación viral (Lee et al. 2008). Posteriormente, E Datan et al. mostraron que dengue provoca autofagia por el estrés que causa en el retículo endoplásmico y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Datan et al. 2016).

#### 1.5 Apoptosis.

Los organismos multicelulares llevan a cabo diferentes procesos para poder mantener un balance homeostático entre el número de células que se generan (mitosis) y aquellas que mueren o se dañan. El mecanismo a través del cual se regula este recambio celular, se conoce como apoptosis (D'Arcy 2019). La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizado por diferentes cambios morfológicos en la célula, entre ellos reducción de su volumen, la membrana se altera y aparecen protuberancias ("blebbing"), el citoplasma y los orgánulos celulares se condensan y se liberan factores del interior de la mitocondria que promueven la muerte celular (Porrás y Marzo, 2010). Hasta el momento se han descrito dos vías diferentes: la intrínseca y la extrínseca (Fig. 1.2)



**Figura 1.2. Esquema general de la apoptosis.** Señales de estrés como quimioterapia y/o radioterapia provocan daño a la mitocondria lo que genera la liberación de factores pro-apoptóticos como Smac y citocromo C. Citocromo C forma el apoptosoma con Apaf1/Datp y procesa a la caspasa 9, ésta a su vez activa a caspasas efectoras 3/7 desencadenando la apoptosis. La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte. Una vez activados se unen moléculas adaptadoras (FADD) que facilitan el reclutamiento y procesamiento de la caspasa 8. La vía extrínseca converge con la intrínseca en la activación de caspasas efectoras 3/7. XIAP es una IAP que regula de manera negativa la apoptosis inhibiendo la actividad de las caspasas 9, 3 y 7. XIAP es regulada negativamente por Smac.

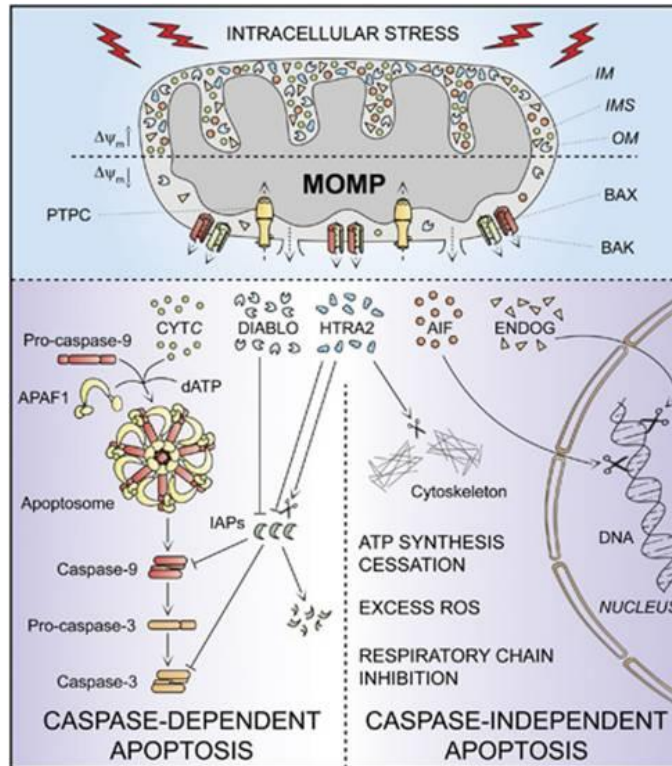
### 1.5.1 Vía intrínseca.

La vía intrínseca o mitocondrial puede ser iniciada por señales negativas o positivas que se originan en el interior de la célula. El daño por hipoxia, exposición a toxinas, radiación, especies reactivas de oxígeno (EROs), infecciones virales y particularmente algunas proteínas virales, entre otros, son estímulos que inducen la apoptosis por la vía intrínseca. Los estímulos negativos surgen de la ausencia de citocinas, hormonas y factores de crecimiento en el microambiente. Sin estas señales de sobrevivencia, moléculas pro-apoptóticas como PUMA, NOXA y BAX se activan e inician la apoptosis (D'Arcy 2019). Estas señales provocan

permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). MOMP es principalmente controlada por la **familia de Bcl-2** (B-cell lymphoma 2). Los miembros con tres dominios BH3 de la familia de Bcl-2, **BIM** (BCL-2-interacting mediator) y **BID** (BH3-interacting domain death agonist) pueden interaccionar transitoriamente con BAX (BCL-2-associated X protein) o con BAK (BCL-2 antagonist or killer) al momento de que se detectan las señales que inducen la vía intrínseca de la apoptosis, esto provoca cambios conformacionales que activan a BAX y BAK. La activación de BAX y BAK permite la formación de homooligómeros que se insertan en la membrana externa de la mitocondria formando poros y promoviendo de esta manera la permeabilización de la membrana mitocondrial (Zhou et al. 2017).

Durante el MOMP se liberan varios factores pro-apoptóticos como Smac/DIABLO, Endonucleasa G, Citocromo C, entre otros. El citocromo C liberado al citosol, forma un complejo con APAF-1/ATP (Apoptosis protease-activating factor-1) y la pro-caspasa 9 llamado apoptosoma. La función de este complejo molecular es procesar y activar a la caspasa 9. Una vez activada la caspasa 9, ésta es capaz de procesar caspasas efectoras como 3 y 7 las cuales se traslocan al núcleo donde llevan a cabo diversas funciones; entre ellas, la activación de nucleasas que posteriormente fragmentan la cromatina, así como también llevan a cabo el procesamiento de proteínas involucradas en la reparación del DNA como PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase (Fig. 1.3) (Galluzzi et al. 2012; D'Arcy 2019).



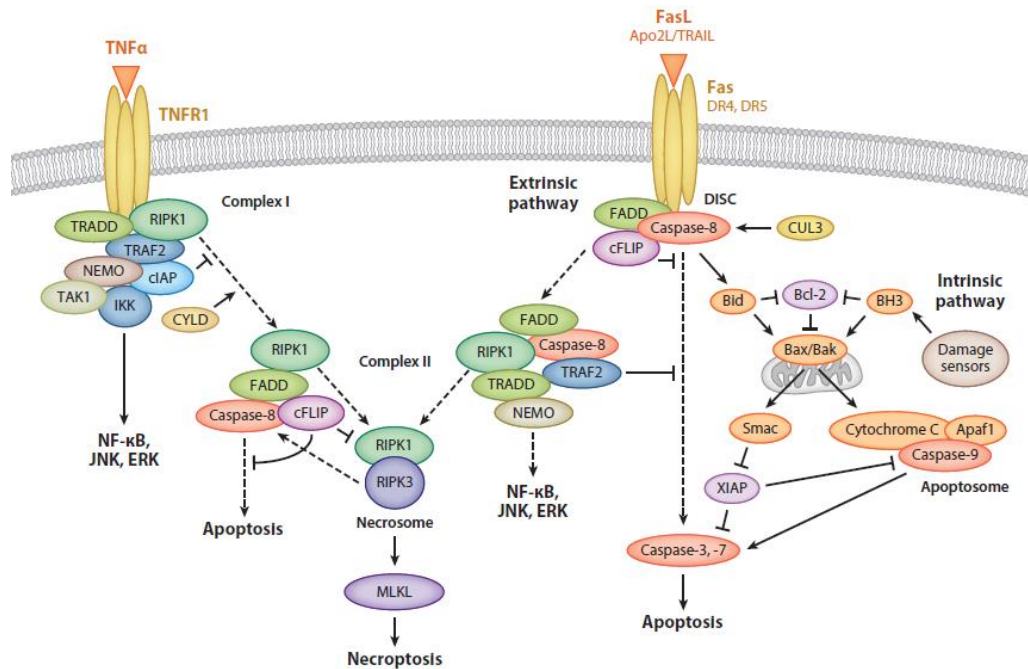


**Figura 1.3 Apoptosis intrínseca.** Durante el MOMP se liberan varios factores proapoptóticos (Cyt C, DIABLO, HTRA2, AIF, ENDOG) de la mitocondria. Smac/DIABLO, Cyt C participan en la ruta de apoptosis dependiente de caspasas inhibiendo la actividad de las IAPs permitiendo la activación de las caspasas y Cyt C con la formación del apoptosoma, respectivamente. Mientras que AIF (apoptosis inducing factor) y Endonucleasa G (ENDOG) participan en la apoptosis independiente de caspasas (Galluzzi et al. 2012).

### 1.5.2 Vía extrínseca.

La apoptosis extrínseca, está mediada por la activación de receptores de muerte, entre ellos se encuentran los receptores de la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), los receptores Fas (CD95), receptores TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), DR4 y DR5. Estos receptores, son activados con la unión de sus respectivos ligandos de muerte como TRAIL, FasL o TNF-alfa. Cuando estos receptores son activados por sus ligandos, estos sufren un cambio conformacional que les permite el reclutamiento de varias proteínas a los dominios de muerte (DD), éstas dan lugar a la formación de un complejo llamado complejo inductor de la señal de muerte o DISC (death-inducing signal complex) (D'Arcy

2019). Entre estas proteínas está RIPK1 o RIP1 (receptor-interacting protein kinase 1), FADD (FAS-associated protein with a DD); múltiples isoformas de c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein); proteínas inhibidoras de la apoptosis (c-IAP1/2); ubiquitin E3 ligasa, que también inhibe la apoptosis por su habilidad para interferir con la activación de las caspasas; y la pro-caspasa-8 (o 10). El complejo macromolecular resultante constituye una plataforma para la regulación de la actividad de la caspasa 8. Por otro lado, los receptores de TNF 1 y 2 requieren adicionalmente de otras moléculas adaptadoras como TRADD (TNFR-associated DD), TRAF2 (TNFR-associated factor 2) y TRAF. En la figura 1.4, se muestra como se lleva a cabo la señalización de los receptores de muerte. RIP1 es poliubiquitinilado por las cIAPs permitiendo el reclutamiento de TAK (transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-activated kinase 1), TAB2 (TAK1-binding protein 2) y TAB3; y juntos pueden estimular la activación canónica del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Ashkenazi and Salvesen 2014).



**Figura 1.4. Señalización de receptores de muerte.** La activación del receptor TNFR1/TNF $\alpha$  conduce a la formación del complejo I involucrado en señalización de NF $\kappa$ B, JNK, ERK. RIPK1 también puede formar el apoptosoma. En ausencia de la ubiquitinación de RIPK1 por cIAP1, RIPK1 forma el complejo II que induce necroptosis. La activación de Fas, DR4, DR5 desencadena la

apoptosis extrínseca por el procesamiento de la caspasa-8 que puede conectar con la apoptosis intrínseca mediada por Bid. Asimismo pueden formarse los complejos I y II que conducen a la necroptosis.

### 1.5.3 Regulación de la apoptosis

La vía intrínseca está regulada por los miembros de la familia Bcl-2. Esta familia se clasifica en tres grupos: i) miembros pro-apoptóticos con un solo dominio BH3, Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf Bad; ii) miembros pro-apoptóticos efectoras, Bax y Bak (múltiples dominios BH3) y iii) proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 y Bcl-B. En condiciones homeostáticas, la actividad de Bax y Bak es inhibida por las moléculas anti-apoptóticas. En respuesta a un estímulo apoptótico, comienza un incremento en la actividad transcripcional o post-transcripcional los miembros BH3. Las proteínas BH3-only activadas actúan sobre las proteínas efectoras Bax y Bak, o bien antagonizan la actividad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2. Posteriormente, Bax y Bak estimulan la liberación de citocromo C de la mitocondria lo que conlleva a la formación del apoptosoma (Roufayel R., 2017). Otras proteínas que participan en la regulación de los eventos apoptóticos son las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).

### 1.6 Familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs)

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), suprimen de manera efectiva la apoptosis inducida por una variedad de estímulos, que incluyen la activación de receptores de muerte, ausencia de factores de crecimiento, radiación ionizante, infección viral, el estrés del retículo endoplásmico y daño genotóxico (Hunter, LaCasse, and Korneluk 2007) Las IAPs específicamente regulan la división celular, la actividad de las caspasas o las vías de supervivencia mediadas a través de la unión a sus dominios BIR, y / o a través de su actividad de ubiquitin-ligasa. del dominio RING (EC LaCasse et al, 2008).

Estas proteínas se han encontrado en levaduras, nemátodos, mosca y humano. Hasta el momento se han identificado 8 miembros de esta familia en el humano: c-

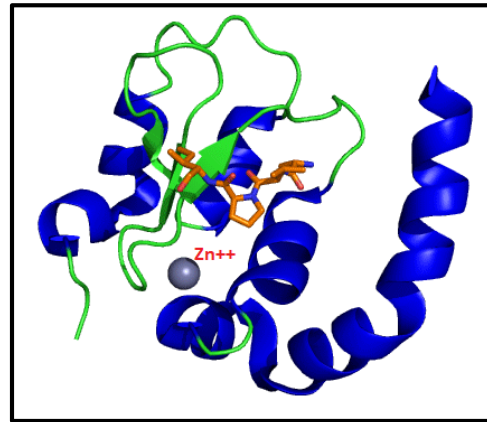
IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivina, XIAP, Bruce, ILP-2, y Livina (Nachmias, Ashhab, and Ben-Yehuda 2004).

### 1.6.1 Estructura y dominios de las IAPs

#### 1.6.1.1 Dominios BIR

Esta familia de proteínas se caracteriza por poseer uno o tres **dominios BIR** (baculovirus IAP repeat) que son repetidos de 70 aminoácidos localizados en el extremo N-terminal (Silke and Vucic 2014). A su vez, los dominios BIR se catalogan dentro de la familia de los dedos de zinc (Zn) ya que contienen la secuencia CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>HX<sub>6</sub>C (C, cisteína; H, histidina; y X, cualquier aminoácido) que los caracteriza y se mantienen estables con un átomo de zinc (Fig. 1.5) (Srinivasula and Ashwell 2008).

Los dominios BIR les confieren a las proteínas la capacidad de interactuar entre ellas mismas y con otras proteínas como Smac/DIABLO, caspasas, proteínas adaptadoras (FADD, TRADD) entre otras. Por ejemplo, c-IAP1/2 se unen a TRAF2 a través de BIR1, XIAP es capaz de unirse a las caspasas-3 y -7 a través de un link entre BIR1 y BIR2, el tercer dominio BIR de XIAP a la caspasa-9; XIAP así como el único dominio BIR de ML-IAP se unen fuertemente a **Smac** (second mitochondrial activator of caspases)/**DIABLO** (direct IAP-binding protein with low pl) y a otras proteínas como la serina proteasa HtrA2, ambas proteínas contenidas en la mitocondria y que son liberadas cuando hay daño mitocondrial (Silke and Vucic 2014).



**Figura 1.5 Estructura tridimensional del dominio BIR.** El dominio BIR típico está compuesto por seis hélices  $\alpha$ , una hoja  $\beta$  de tres cadenas y un átomo de zinc quelado por tres residuos Cys y uno His. Todos los miembros de la familia IAP contienen al menos un dominio BIR donde es crítico para la función IAP (© 2016 The Pawson Lab).

#### *1.6.1.2 Dominios RING*

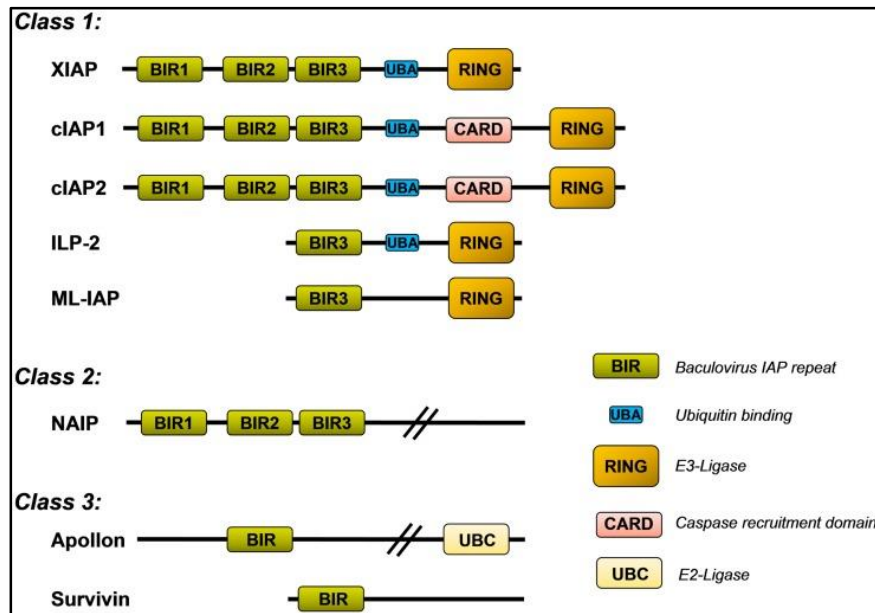
Otra característica estructural de las IAPs es que algunas tienen **dominios RING** (really interesting new gene) en el extremo C-terminal, entre ellas están XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y ML-IAP. Este dominio tiene actividad de E3 ligasa promoviendo la ubiquitilación de las proteínas con las que interaccionan (Silke and Vucic 2014). El proceso de autoubiquitilación, ejercido por los dominios RING, es un mecanismo por el cual las IAPs pueden también regular de manera negativa su propia actividad, tal es el caso de XIAP (Nachmias, Ashhab, and Ben-Yehuda 2004).

#### *1.6.1.3 Dominios CARD*

Otro dominio presente en las IAPs son los **dominios CARD** (caspase recruitment domain). Estos dominios se caracterizaron originalmente en función de su participación en la regulación de la activación de las caspasas y de otras proteínas (APAF-1, etc.) involucradas en la apoptosis (Hofmann K, Bucher P, Tschopp J, 1997). La presencia de estos dominios es única en el caso de c-IAP1 y c-IAP2, su papel es desconocido.

#### *1.6.1.4 Otros dominios presentes en las IAPs*

La proteína NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) es única entre las IAPs, ya que posee un **dominio NOD** (nucleotide-binding and oligomerization domain), así como **repetidos ricos en leucina** (leucine-rich repeat, LRR) que clasifican a esta IAP junto con otras proteínas involucradas en la inmunidad innata (Abadia-Molina et al. 2017). BRUCE, la más grande de las IAPs, carece de un dominio RING, pero en cambio posee un **dominio de conjugación de ubiquitina (UBC)** capaz de realizar una función similar. Survivina, la IAP más pequeña, posee un dominio de bobina enrollada requerido para su interacción con las proteínas pasajeras cromosómicas, INCENP y borealina, y para el mantenimiento de la residencia en el núcleo (Jeyaprakash et al. 2007).



**Figura 1.6. Dominios de las proteínas inhibidoras de apoptosis.** La familia de las IAPs la componen 8 miembros en humano: c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivina, XIAP, Bruce, ILP-2, y Livina. Cada una puede poseer de uno a tres dominios BIR. Los dominios BIR median la interacción de las IAPs con otras proteínas (caspasas, Smac, Omi, TRAF1, etc.). Los dominios CARD pueden mediar la interacción con las caspasas. Los dominios RING les confieren actividad de ubiquitín-E3-ligasa (Obexer and Ausserlechner 2014).

## 1.6.2 Proteínas inhibidoras de la apoptosis

### 1.6.2.1 Survivina

Survivina es la IAP más pequeña con un único dominio BIR en el extremo N-terminal y con un dominio Coiled Coil (CC) en el extremo C-terminal. Survivina tiene un papel crucial en la regulación de la división celular y la apoptosis. Sus niveles de expresión incrementan en la mayoría de los cánceres humanos, pero no en tejidos normales totalmente diferenciados (Garg et al. 2016).

Esta proteína se localiza predominantemente en el citosol de células tumorales. Sin embargo, también se ha reportado que hay una fracción nuclear más pequeña de survivina que se localiza en el cinetocoro de cromosomas en metafase en células tumorales y en proliferación. Se cree que la Survivina citosólica funciona

como supresor apoptótico, mientras que la Survivina nuclear regula la división celular (Li et al. 2005).

**Función de survivina en el ciclo celular.** Las células normales muestran síntesis, expresión y degradación de survivina dependientes del ciclo celular. Los niveles máximos de survivina durante el ciclo celular son en la transición G2 / M y disminuye rápidamente en la fase G1. Esto se controla en gran medida de forma transcripcional e involucra elementos dependientes del ciclo celular (CDE) y regiones de homología del ciclo celular (CHR) ubicadas en el promotor del gen de survivina (Praveen KJ, Apul G & R.D. Mittal 2015). Survivina forma un componente integral del complejo CPC (chromosomal passenger complex) que garantiza la correcta segregación de los cromosomas y la citocinesis durante la división celular (Kitagawa and Lee 2015).

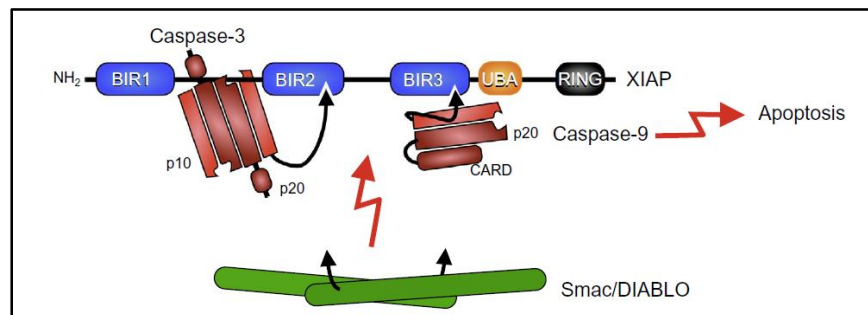
**Survivina como inhibidora de la apoptosis.** Los mecanismos por los cuales Survivina regula la apoptosis aún son desconocidos. Sin embargo, está reportado que la sobreexpresión de survivina inhibe las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, y su silenciamiento en células humanas induce defectos en la apoptosis y múltiples defectos en la división celular. Anteriormente se especulaba que survivina interactuaba directamente con las caspasas. Pero esta posibilidad se descartó debido a que survivina carece de los dominios estructurales de activación y reclutamiento de caspasa (CARD), concluyendo que survivina no se une directamente ni inhibe las caspasas (Li et al. 2008) En su lugar, interactúa con varias moléculas adaptadoras o cofactores, un ejemplo es la IAP XIAP (X-linked IAP). Al interactuar con XIAP, survivina mejora la estabilidad de XIAP. También puede actuar mediante el secuestro de SMAC / DIABLO, evitando la inhibición de XIAP. En cada caso, survivina aumenta la actividad inhibidora de XIAP sobre la caspasa-9 (Sun C., et al., 2005).

#### *1.6.2.2 X-linked IAP (XIAP)*

X-linked IAP (XIAP) es la IAP más estudiada de esta familia de proteínas en humanos, debido a que es una potente inhibidora de caspasas (Suzuki et al. 2001). En esta familia, XIAP es la única que inhibe a las caspasas por interacción

física directa. XIAP neutraliza directamente la caspasa-9 a través de su dominio BIR3 y a las caspasas efectoras 3 y 7 a través de su dominio BIR2 (Fig 1.6). XIAP puede incluso interactuar con la caspasa-9 que ya está formando el apoptosoma. El dominio BIR3 de XIAP interactúa con la holoenzima Apaf-1 / caspasa-9 mediante el secuestro del extremo N-terminal de la subunidad pequeña de la caspasa-9 procesada (Obexer and Ausserlechner 2014).

Otro mecanismo importante de la inhibición de caspasa por XIAP implica la actividad de la E3 ligasa del dominio RING. El dominio RING de XIAP es capaz de conjugar diferentes tipos de cadenas de ubiquitina a sus proteínas blanco. Schile et al. demostró que la eliminación del dominio RING *in vivo* aumenta la actividad de la caspasa-3 (Schile, Garcia-Fernandez, and Steller 2008). Este dominio RING también controla la estabilidad de la propia XIAP y también induce la degradación proteasomal de proteínas a las que se ha unido como la caspasa-3 o el inhibidor mitocondrial de XIAP, SMAC / Diablo (Suzuki et al. 2001). XIAP contiene un dominio UBA (ubiquitin-associated domains) y, por lo tanto, no solo conjuga polímeros de ubiquitina con sustratos, sino que también reconoce cadenas de ubiquitina y, por lo tanto, funciona como un receptor de ubiquitina (D'arcy, 2014)



**Figura 1.6. Interacción de XIAP con las caspasas y Smac/DIABLO.** XIAP se une por sus dominios BIR1 y BIR2 a la caspasa-3 y por su dominio BIR3 a la caspasa-9 e inhibe su procesamiento. Smac/DIABLO antagoniza esta función uniéndose a XIAP (Silke and Vucic 2014).



### 1.6.3 Regulación de las proteínas inhibidoras de la apoptosis

Hay varios inhibidores endógenos de las IAP. En la mitocondria de las células sanas, se encuentra Smac / Diablo, HtrA2 / Omi, los aminoácidos N-terminales de estas proteínas forman el IBM (motivo de unión a IAP). Estas proteínas son liberadas cuando las mitocondrias se permeabilizan durante la muerte e interfieren con la actividad que las IAPs tienen sobre las caspasas; resultando en la potenciación de la muerte celular. Otro inhibidor endógeno de las IAP es XAF1 (factor asociado a XIAP) (D'Arcy 2019). Originalmente identificado como un inhibidor específico de XIAP, se reportó que XAF1 también puede unirse a cIAP1 y cIAP2, sin embargo, su función sobre cIAP1 y cIAP2 no está del todo clara (Galluzzi et al. 2012).

### 1.6.4 IAPs en infecciones virales

La mayor proporción del conocimiento generado alrededor de las proteínas inhibidoras de la apoptosis es en cuanto al cáncer. La resistencia a la apoptosis es una marca distintiva de las células cancerosas, y las IAPs es una clase de reguladores clave de la apoptosis que provoca que las células cancerosas sean resistentes a la apoptosis, especialmente en el tratamiento del cáncer (Cong et al. 2019). Sobre modelos virales hay muy poco al respecto en relación a las IAPs, pero está ampliamente descrito que los virus pueden estar asociados con el desarrollo de cáncer y también con la inducción de apoptosis (Kvansakul 2017) (Branca et al. 2005) (Chang MH and Jeang KT, 2014). Por lo tanto, sería lógico pensar que las IAPs pueden estar involucradas en los mecanismos de apoptosis inducidos por virus.

En algunos modelos virales, las IAPs están sobreexpresadas, particularmente esto se le ha atribuido a aquellos virus que están relacionados con el desarrollo de cáncer, tal es el caso del virus de Epstein-Barr (EBV) (Mi Dan Ai, et al., 2005). Min Dan Ai y colaboradores (2005), asociaron una proteína de EBV, Latent membrane protein 1 (LMP1), con la sobreexpresión de survivina y esto era dosis dependiente de LMP, en una línea celular de carcinoma nasofaríngea. Normalmente survivina se expresa en la fase G2/M del ciclo celular, este mismo grupo reportó que la

LMP1 podría promover la expresión de survivina en las fases G0/G1, S t G2/M del ciclo celular. (Mi Dan Ai, et al., 2005). Por otro lado, Zhang X et al., analizaron la relación entre el virus de la hepatitis B (HBV) y las IAPs. Detectaron los niveles de expresión de los antígenos del VHB (HBsAg, HBcAg y HBxAg) y los miembros de la familia IAP (survivina, XIAP, cIAP-1 y cIAP-2) en los tejidos de hígado de pacientes con carcinoma hepatocelular y de pacientes con cirrosis, la mayor correlación la encontraron con survivina. Asimismo, reportaron que la proteína viral HBx regula la sobreexpresión de survivina en los tejidos del hepatoma (Zhang et al. 2005).

En el estudio de las IAPs en modelos virales no relacionados al cáncer, Piña-Oviedo S, et al., estudio los efectos de la infección por el virus John Cunningham (JCV), poliomavirus de DNA, sobre la survivina en pacientes con leucoencefalopatía multifocal progresiva. Este grupo reporta que hay sobreexpresión de survivina en cultivos oligodendrogiales y astrocíticos infectados con JCV (Piña-Oviedo et al. 2007). Este hallazgo fue interesante dado que survivina no se expresa en tejidos totalmente diferenciados como es el caso de células de linaje neuroectodérmico. Adicional a esto, observaron que aquellas células infectadas tenían un menor índice de apoptosis comparadas con no-infectadas (Piña-Oviedo et al. 2007).

Y. Zhu y colaboradores, en 2003, reportaron que el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) regula la expresión de survivina a través de la transactivación de su promotor. Vpr, una proteína accesoria del VIH-1 que induce la detención del ciclo celular en G2 / M, es necesaria y suficiente para este efecto. El bloqueo de la detención G2 / M inducida por Vpr conduce a la eliminación de la transactivación del promotor de survivina por Vpr (Y. Zhu, 2003).

Aurelia Busca y otros, estudiaron el papel de las c-IAP1/2 en la infección por VIH-1 en macrófagos humanos. Sus resultados sugieren que la resistencia a la apoptosis inducida por Vpr, proteína viral, está mediada específicamente por los genes cIAP1 / 2 y esto es independiente de Bcl-xL y Mcl-1. Ellos concluyeron que las IAP

protegen contra la apoptosis inducida por Vpr, y Bcl-xL y Mcl-1 mantienen la supervivencia en estado estable (Busca, Saxena, and Kumar 2012).

En 2009, un grupo evaluó cómo se modifica la expresión de la survivina durante la infección por norovirus, virus de RNA responsable de gastroenteritis en humanos. El estudio se realizó infectando macrófagos murinos con norovirus a 4 MOI y por RT-PCR cuantificaron el transcrito de survivina así como los niveles del genoma viral. Ellos encontraron que el mensajero de survivina comienza a disminuir (12 hpi), a medida que el RNA viral incrementaba a través del tiempo. Se analizó la expresión de la proteína durante la cinética y se observó el mismo patrón (Bok et al. 2009). Continuando con el estudio de los virus de la misma familia, en 2019, Barrera-Vázquez et al., reportaron un fenómeno similar. Se infectaron cultivos de células epiteliales de riñón de gato (Crfk) con Calicivirus felino y analizaron la expresión de la survivina y XIAP durante la infección. Ambas proteínas disminuían gradualmente a partir de las 5 horas post-infección. Posteriormente, analizaron la expresión de Smac/DIABLO, proteína pro-apoptótica recluida en el interior de la mitocondria la cual es liberada cuando hay daño mitocondrial (vía intrínseca de la apoptosis). No hubo cambios en la expresión de Smac/DIABLO en los extractos totales. Ahora bien, analizando fracciones mitocondriales y citoplásmicas y por inmunofluorescencia, encontraron que hay un enriquecimiento de Smac en la fracción citoplásmica en comparación con la mitocondrial durante la infección (5hpi) lo que sugiere que el virus causa daño mitocondrial promoviendo la liberación de factores pro-apoptóticos. Interesantemente encontraron que la proteína viral responsable de la disminución de survivina y XIAP era la fracción LC de la proteína de cápside (Barrera-Vazquez et al. 2019).

En relación al virus dengue, el único reporte que existe es de Limonta D en el 2014. Se midieron en plasma de pacientes con dengue tres mediadores proapoptóticos: Fas ligando (FasL), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Además, se determinó la presencia de survivina en plasma (ELISA) y en lisados de células mononucleares de plasma de sangre periférica (PBMC), la expresión de cIAP-1, cIAP-2, XIAP.

Hubo una tendencia de las IAPs a incrementar en PBMC de pacientes con dengue grave (Limonta et al. 2014).

### 1.7 Mecanismos de muerte celular por el virus dengue

El fenómeno de apoptosis ocasionado por el virus dengue se ha demostrado en varios modelos celulares (ver Tabla 1). De acuerdo a lo que han reportado varios grupos de investigación, el virus dengue puede inducir apoptosis por ambas vías; intrínseca y extrínseca.

Se ha observado que después de la infección con el virus, hay un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y pro-apoptóticas como TNF-alfa y TRAIL. Un perfil de genes reveló la activación de receptores de muerte como Fas/CD95 y TNFR1/TNF-alfa. El incremento en la expresión de receptores y ligandos de muerte pudieran ser utilizados por el virus para inducir apoptosis. Adicional a esto, la infección con el virus del dengue conduce a la expresión diferencial de varios genes inducidos por interferón, el más importante es el XAF1 (XIAP Associated Factor 1). XAF1 incrementa los niveles de caspasa-3 36 horas post-infección (Long et al. 2013). La activación de las caspasas efectoras conduce a la fragmentación nuclear característica y a la formación de cuerpos apoptóticos.

<b>Tipo de muerte</b>	<b>Tipo de células</b>	<b>Tiempo post infection (h)</b>	<b>Observaciones</b>
Apoptosis	Monocytes	6	High levels of TNF- $\alpha$
Apoptosis	Monocytes	48	High levels of TNF- $\alpha$
Apoptosis	Monocytes	72	High levels of sTRAIL
Apoptosis	SH-SY5Y	48	Blocking of TNF- $\alpha$ reverses the effect
Apoptosis	U937	72	ER stress triggers apoptosis

Apoptosis	HepG2	72	ER stress triggers apoptosis
Apoptosis	BHK-21	96	sgRNA modulates apoptosis
Apoptosis	Monocyte-derived dendritic cells	24–48	ROS production lead to apoptosis
Apoptosis	HUVEC and EA.hy926	48	Up-regulation of XAF1
Apoptosis	HMEC-1	Transfected cells with NS2B construct	Activation of NF-κB lead to apoptosis

**TABLA 1. Apoptosis inducida por el virus dengue en varios modelos celulares (Tomado de (Castillo and Urcuqui-Inchima 2018)).**

De manera particular, en 2009, nuestro grupo demostró que el virus dengue induce apoptosis en cultivos de células endoteliales humanas de la microvasculatura (HMEC-1) a las 36 horas post-infección, lo cual se comprobó por un ensayo de TUNEL. Tratando de dilucidar las proteínas responsables de este evento, se encontró que la expresión individual de las proteínas no estructurales del virus NS3, proteasa encargada de procesar la poliproteína que genera el virus, y la NS2B, cofactor de la NS3 son capaces de inducir apoptosis, así como el complejo NS3-NS2B (Vasquez Ochoa et al. 2009).

### 1.8 Participación de las proteínas virales de dengue en la apoptosis

En cuanto a las proteínas virales, se ha reportado que la proteína no estructural NS5 interactúa con Daxx (death protein 6, una proteína que participa en la señalización de JNK implicada en la muerte celular inducida por estrés), y ésta a

su vez interactúa con el receptor de muerte Fas para activar RANTES (CCL5), una citosina asociada a dengue hemorrágico (Khunchai et al. 2012).

Morchang A. y colaboradores reportaron que la proteína de cápside era capaz de inducir apoptosis y que RIPK2 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2) era necesario para dicho proceso. RIPK2 es un mediador crucial de múltiples respuestas al estrés que conduce a la activación de la caspasas, NF- $\kappa$ B, JNK entre otras. En la inhibición de RIPK2 en células transfectadas con la proteína de cápside de DENV se observó un decremento en la apoptosis (Morchang et al. 2011).

En general, las vioporinas son pequeñas proteínas hidrófobas capaces de oligomerizar en las membranas de la célula huésped, forman poros que alteran la fisiología de la célula (Shrivastava et al. 2017; Nieva, Madan, and Carrasco 2012). Shrivastava G. en 2017, caracterizó a la proteína viral NS2A como una posible vioporina, analizando el contenido de dominios hidrofóbicos, evaluando la capacidad de ésta proteína para oligomerizar y examinando su habilidad para permeabilizar membranas (en liposomas) (Shrivastava et al. 2017). En este mismo contexto, León-Juárez, reportó que la proteína viral NS2B altera la permeabilidad membranal en varios modelos de membrana, postulándose como una posible vioporina (Leon-Juarez et al. 2016). Lo anterior nos sugiere que ambas proteínas, NS2A y NS2B, podrían tener efectos sobre varios procesos celulares como la apoptosis, la autofagia y la modulación de la inmunidad innata como se ha visto con vioporinas codificadas por miembros de diversas familias de virus de ARN y ADN de interés clínico, incluyendo virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), virus del papiloma humano (VPH), virus de la influenza A (IAV), coronavirus, picornavirus (poliovirus) y togavirus (Shrivastava et al. 2017).

De acuerdo con lo anterior, León-Juárez encontró que la proteína NS2B colocaliza con retículo endoplásmico y sorprendentemente con mitocondria. Extractos mitocondriales de cultivos HMEC-1 infectados con el virus dengue a 10 MOI evidenciaron la presencia de la proteína NS2B, no así en las fracciones

citoplásmicas. Por otra parte, la expresión de la NS2B fue capaz de inducir apoptosis lo cual se demostró con un ensayo de TUNEL realizado a las 24 y 36 horas post-transfección. Adicional a esto, se analizaron moléculas presentes durante un proceso apoptótico tales como caspasa 3, caspasa 9 y PARP. Se encontró que hay procesamiento de éstas proteínas en los cultivos transfectados con la proteína NS2B (León- Juárez, en proceso).

## **CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN**

Las IAPs son proteínas clave en la regulación de la apoptosis. Se ha descrito que la apoptosis puede ser inducida por virus y que las IAPs pueden ser modificadas durante la infección.

El virus dengue induce apoptosis en varios modelos celulares y se ha visto que algunas proteínas virales pueden estar implicadas en este proceso tales como la NS2A y NS2B. Se ha observado que ambas proteínas pueden estar asociadas a daño mitocondrial ya que colocalizan con mitocondria (NS2B) y cumplen con varias características de viroporina. Por esta razón es importante evaluar los cambios en la expresión de las IAPs durante la infección por el virus dengue.

## **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS**

La infección de células HMEC-1 con el virus dengue modifica la expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs)

## **CAPÍTULO IV: OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de las IAPs durante la infección por el virus dengue en un modelo de células endoteliales HMEC-1.



## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar si hay cambios en la expresión de las IAPs en un modelo de células endoteliales (HMEC-1) infectadas con el virus dengue.
2. Evaluar si la expresión de las IAPs y de otras moléculas involucradas en la apoptosis varían en una cinética de infección: XIAP, survivina, Smac/DIABLO y PARP.
3. Evaluar si la proteína NS2B está involucrada en los cambios de expresión de las moléculas analizadas anteriormente durante la infección.

## CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Stock Viral

Se utilizó virus dengue serotipo 2. El virus se propagó en la línea celular C6/36 proveniente de la larva de *Aedes albopictus*. Las células se crecieron a 34°C en ausencia de CO<sub>2</sub>. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10%, vitaminas, antibiótico, aminoácidos, L-glutamina y piruvato (todos de GIBCO), 100 unidades/ml de cada uno y 10 unidades/ml de tirosina. Se infectó una caja T75 semilla con dos alícuotas de virus durante 2 horas a 34°C con agitación cada 30 minutos. Una vez que el efecto citopático es evidenciado por la formación de sincisios del 70%, se infectaron el resto de las cajas con el sobrenadante recuperado de la caja semilla (4ml). Después de la infección, se recuperaron los sobrenadantes de las botellas y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo Falcon de 50 mL y se concentró aproximadamente 10 veces con una columna de 100 kDa de cutoff Amicon Ultra 15 (UFC910024) Merck Millipore. Posteriormente, se filtraron con una pirinola de 0.22 µm. Se adicionó 1/10 del volumen de SPG y finalmente se alícuotaron a 30 o 50 µl e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Las alícuotas se almacenaron a -70°.

### 5.2 Titulación del virus en placa

La titulación del stock viral se realizó en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde). Las células fueron crecidas en medio RMPI suplementado con SFB al 10%, antibiótico, vitaminas, aminoácidos, L-glutamina y piruvato, 100 unidades/ml de cada uno a 37°C en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>. Se prepararon tubos Eppendorf estériles; se marcaron desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se adicionaron 225 µl de medio Hanks (GIBCO) a cada tubo y se mantuvo en hielo. El virus se descongeló directamente de -70°C a 4°C y se colocó en hielo. Fueron transferidos 25 µl del inóculo al primer tubo y se mezclaron vigorosamente en el agitador. Posteriormente, con una punta nueva se

añadieron 25 µl de esta dilución al siguiente tubo y así sucesivamente hasta completar 6 diluciones. El ensayo se realizó por triplicado. Se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos, donde cada pozo fue inoculado con 100 µl de las diferentes diluciones del virus; como controles se utilizaron células no infectadas y células a las que se les adicionó el virus sin diluir. Se incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> y después añadieron 500 µl/pozo de medio Overlay (medio MEM 2X (GIBCO) suplementado con L-glutamina a 2 nM, suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de antibiótico, carboximetilcelulosa (CMC de SIGMA) al 3% estéril. Finalmente, las células fueron incubadas a 37°C durante 5 días.

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

(Log) (Promedio de placas x 10<sup>x+1</sup>)

### 5.3 Western blot

6X10<sup>5</sup> células HMEC-1 se infectaron con DENV-2 a una MOI de 10. Se realizaron cinéticas de infección de 3, 6, 9 y 18 horas. Como control negativo se utilizaron células HMEC-1 sin infectar y tratadas con virus inactivado por calor a 56°C (MOCK). Posteriormente las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas 1X (Complete 50X, Invitrogen). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE cargando 20-30 µg/µl por pozo y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD), las cuales se bloquearon con PBS-Tween- leche al 5% durante una hora y después se lavaron tres veces con PBS- Tween durante 10 minutos cada lavado. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Después, las membranas se lavaron de nuevo y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (Invitrogen) durante una hora. Se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween-Leche. Las membranas se revelaron con Supersignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, las fotografías fueron tomadas utilizando el equipo ChemiDoc (BIO-RAD).

### 5.4 Inmunofluorescencia

Se sembraron 100 000 células HMEC-1 por pozo en placas de 24 pozos. Cada pozo contiene un cubreobjetos estéril. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se infectaron a una multiplicidad de 10 con virus purificado. Como control se utilizaron células HMEC-1 sin infectar o tratadas con virus inactivado por calor. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se permeabilizaron con PBS 1X+Tritón al 0.1% + gelatina al 0.02% durante 30 minutos. Se bloquearon las monocapas con solución PBS 1x + Tritón 0.1% + suero de cabra (10%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-Tritón 0.1%. Después se dejaron en

presencia de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces con PBS 1X-Tritón 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando 3  $\mu$ l Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5).

### 5.5 Transfección con la NS2B

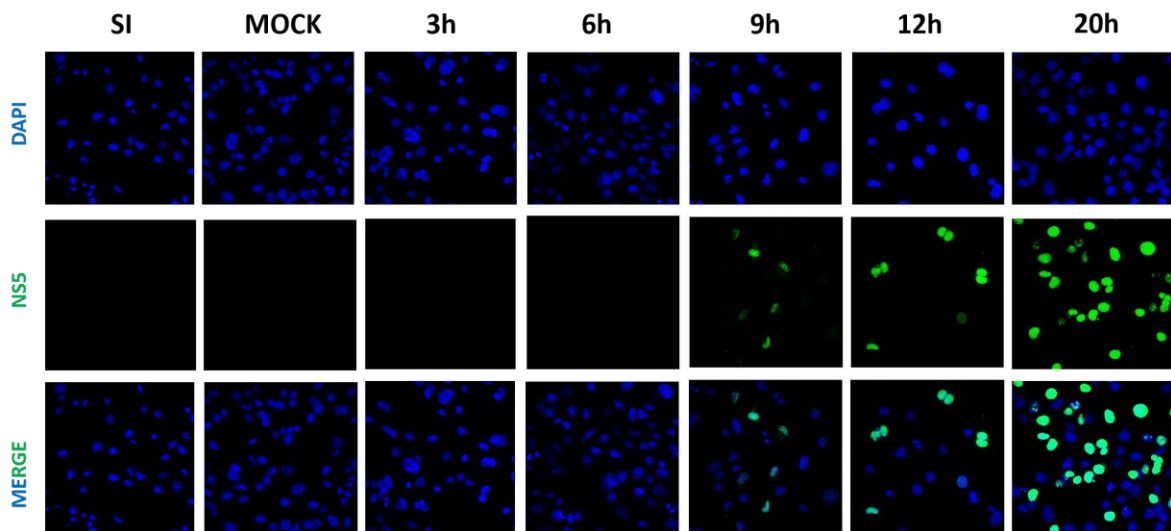
Un día previo a la transfección se cultivaron células HMEC-1 en placas de 6 pozos ( $6 \times 10^5$ ). Posteriormente en un tubo eppendorf, se agregaron 99  $\mu$ L de medio optimen (o medio base) más 1  $\mu$ g del plásmido NS2B-GFP y en otro tubo (no.2) se agregan 99  $\mu$ L de medio optimen más 1  $\mu$ L de lipofectamina 2000, se deja incubando durante 5 minutos. Después se mezcla el contenido de ambos tubos, pasando el contenido del tubo 1 al tubo 2 y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de la placa y lava con PBS 1X dos veces. Pasados los 30 minutos de incubación, se agregan los 200  $\mu$ L de la mezcla a la placa y se agita la placa suavemente para homogenizar. Finalmente se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 4-6 horas. Se lavaron las células con PBS 1X y se agrega 5 mL de medio base más 2% de suero.

## CAPÍTULO VI: RESULTADOS

### 6.1 Caracterización de la cinética de infección células HMEC-1

Antes de iniciar con cualquiera de los experimentos, se produjo un abasto viral del virus dengue serotipo 2 (cepa Nueva Guinea) en células C6/36, una línea celular de larva de *Aedes albopictus* utilizada para la replicación de *flavivirus*. Se ha reportado que se pueden producir altos títulos del virus dengue en estas células ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). El stock viral producido se tituló por un ensayo de formación de placas en células Vero. El título obtenido fue de 11 millones de partículas virales/ml.

Para demostrar que el virus producido es capaz de infectar células HMEC-1, se realizó una cinética de infección y se analizó por inmunofluorescencia (6.1). Para evaluar la infección productiva, se evaluó la presencia de la proteína no estructural NS5, (polimerasa viral dependiente de RNA). Los cultivos de células HMEC-1 se infectaron a una multiplicidad de 10 (10 MOI), como control de la infección se pusieron cultivos falsamente infectados (MOCK, virus inactivo por calor a 56°C) y células sin infectar incubadas solamente con medio.

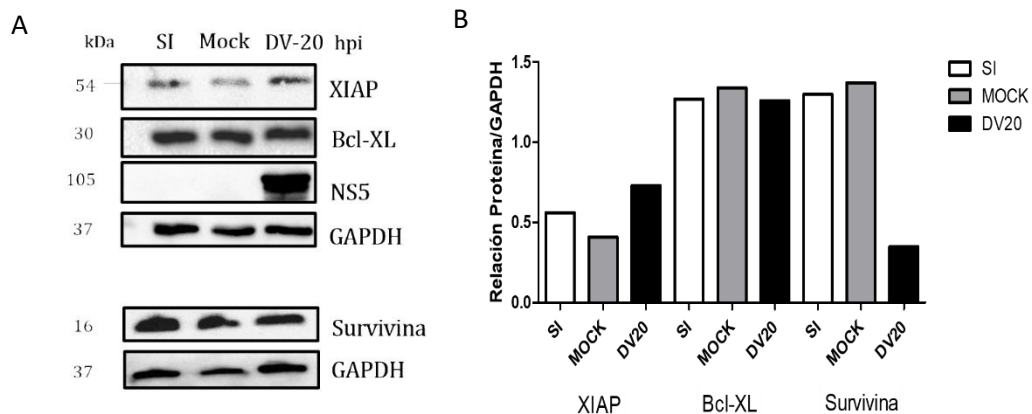


**Figura 6.1. Cinética de infección con el virus dengue serotipo 2.** Células HMEC-1 infectadas a 10 MOI con DENV-2 a 3, 6, 9, 12 y 20 post-infección. Controles: Sin infectar (SI), Mock (virus inactivado por calor). DAPI: núcleo (azul), NS5: RNA polimerasa viral, DENV-2 (verde).

El virus producido es capaz de infectar a las células HMEC-1, esto se puede evidenciar por la presencia de la proteína no estructural NS5 dentro del núcleo (en verde). Como se observa en la figura 1, se detectó señal de la NS5 a partir de las 9 horas post-infección y a las 20 horas se alcanzó hasta un 50% de infección aproximadamente.

### 6.2 Evaluación de la expresión de XIAP, survivina, Bcl-XL.

Se ha reportado en varios modelos de infección con virus de RNA que las IAPs pueden modificarse durante la infección. Con la finalidad de evaluar si la infección con el virus DEN es capaz de modificar la expresión de las IAPs survivina y XIAP, así como de proteínas relacionadas con la regulación de la apoptosis intrínseca, Bcl-XL. Se infectaron cultivos de células HMEC-1 a 10 MOI durante 20 horas, se realizaron extractos totales de proteínas y por western blot se analizó la expresión de las proteínas. Los controles consistieron en células sin infectar y células falsamente infectadas con virus inactivado a 56°C durante 30 minutos. En la figura 6.2 se muestra el resultado.



**Figura 6.2. Análisis de la expresión de XIAP, survivina y Bcl-XL 20 horas post-infección.** **A.** Western blot de XIAP, survivina y Bcl-XL en células HMEC-1 sin infectar (SI), falsamente infectadas (Mock) e infectadas a 10 MOI por 20 horas. Control de carga: GAPDH. Control de infección: NS5. **B.** Análisis densitométrico de XIAP, survivina y Bcl-XL. SI=sin infectar (solo con medio de cultivo). MOCK: Virus inactivado por calor. DV=Células HMEC-1 infectadas con el virus dengue a 10 MOI.

Como control de carga se detectó la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un peso de 37 kDa aproximadamente, y como control de infección se detectó la presencia de la proteína no estructural NS5, con un peso aproximado de 105 kDa. El análisis densitométrico se realizó con respecto a GAPDH (Figura 6.2B).

La expresión de XIAP (54 kDa) en los cultivos infectados con el virus dengue a las 20 horas nos muestran un ligero incremento en comparación con los controles sin infectar y mock. En cuanto a la expresión de Bcl-XL (30 kDa), el western blot y el análisis densitométrico nos indican que no hay cambios en ninguna condición. El análisis de la expresión de survivina (16 kDa) muestra una disminución importante en los cultivos infectados en contraste con los controles.

Se concluyó que si hay cambios en la expresión de XIAP y de survivina mientras que la expresión de Bcl-XL no cambió en ninguna condición.

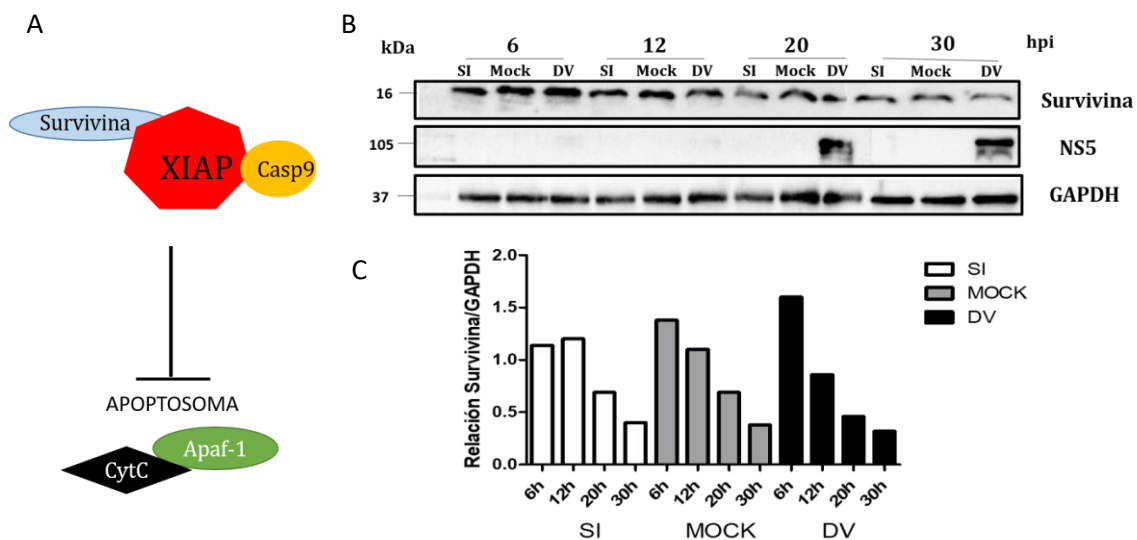
### 6.3 Cinética de survivina 6-30 horas

Una vez demostrado cambios en la expresión de las IAPs analizadas XIAP y survivina, se procedió a realizar una cinética de expresión para evaluar los tiempos en donde se observan estos cambios durante el transcurso de la infección con el virus dengue. La survivina es una proteína que interactúa con XIAP para estabilizarla e impedir que sea degradada, de esta forma, XIAP es capaz de secuestrar a la Caspasa 9 y/o su forma procesada impidiendo que se lleve a cabo



la formación del apoptosoma, y consecuentemente, el procesamiento de caspasas efectoras 3 y 7 (Figura 6.3A).

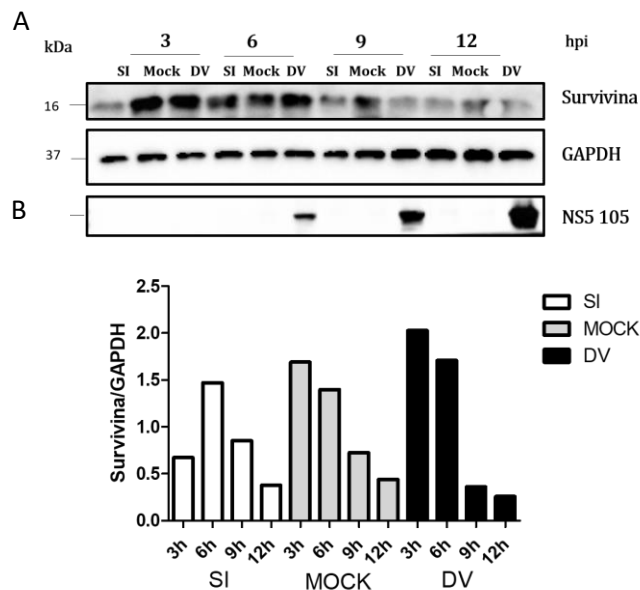
Para esto, se infectaron cultivos de células endoteliales HMEC-1 a una multiplicidad de infección de 10 y se analizaron a las 6, 12, 20 y 30 horas post-infección. Se usaron como controles cultivos sin infectar y cultivos falsamente infectados con virus inactivado por calor para cada tiempo. Los resultados de la cinética de expresión de survivina se muestran en la figura 6.3.



**Figura 6.3. Cinética de expresión de survivina.** **A.** Esquema de la actividad de survivina en la apoptosis. Survivina se une a XIAP para estabilizarla, de manera que XIAP puede secuestrar a la Cas-9 e inhibir la formación del apoptosoma. **B.** Western blot de survivina (16kDa) a diferentes tiempos 6, 12, 20 y 30 horas. Condiciones: SI=sin infectar, Mock=virus inactivado por calor a 56°C/30 min. DV=Células HMEC-1 infectadas a 10MOI. Control de carga: GAPDH; control de infección: polimerasa viral dependiente de RNA, NS5. **C.** Análisis densitométrico, relación survivina/GAPDH.

Los resultados nos muestran que hay una disminución gradual de la expresión de survivina en los cultivos sin infectar y en los falsamente infectados (mock) desde las 6 hasta las 30 horas. Ahora bien, en los cultivos que están infectados con el virus dengue se puede apreciar que survivina tiene una mayor tendencia a disminuir su expresión que los controles, esto se aprecia mejor a las 12 y 20 horas después de la infección.

Con la finalidad de saber cómo se comportaba la expresión de la survivina a tiempos más tempranos, se llevó a cabo una cinética a partir de las 3 horas hasta las 12 horas (Figura 6.4).



**Figura 6.4. Cinética de expresión de survivina de 3-12 horas post-infección. A.** Western blot de survivina (16 kDa) a diferentes tiempos 3, 6, 9 y 12 horas. Condiciones: SI=sin infectar, Mock=virus inactivado por calor a 56°C/30 min. DV=Células HMEC-1 infectadas a 10MOI. Control de carga: GAPDH; control de infección: polimerasa viral dependiente de RNA, NS5. **B.** Análisis densitométrico, relación survivina/GAPDH.

Podemos observar en la nueva cinética (figura 6.4) un patrón similar a la cinética anterior. En general, hay una disminución gradual en la expresión de la survivina en todas las condiciones, aún así, la disminución está muchísimo más acentuada en los cultivos infectados con el virus a partir de las 9 horas hasta las 12 horas. Este dato coincide con lo observado en la primera cinética, en donde a partir de

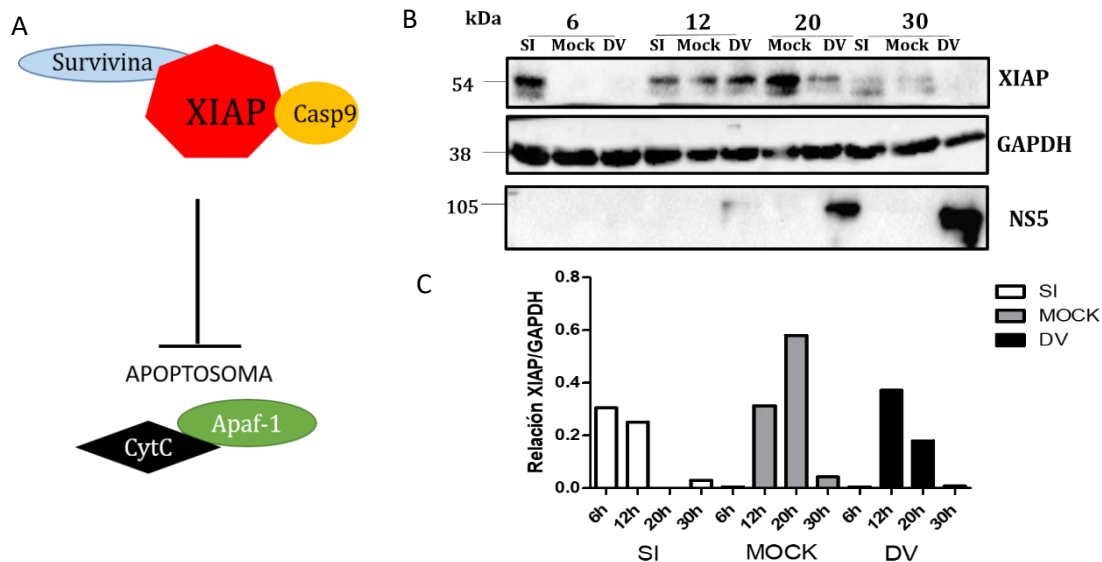
las 12 horas comenzamos a observar el decremento de la survivina, ahora sabemos que este proceso puede iniciar a partir de las 9 horas. Asimismo, este dato coincide también con la cinética de infección (Figura 6.1) en donde es partir de las 9 horas que comienza a detectarse células infectadas.

Aparentemente, el virus si podría estar teniendo un efecto sobre la expresión de survivina.

#### 6.4 Cinética de XIAP cinética de 6-30 horas

Otra molécula IAP importante que se ha reportado se modifica durante infecciones virales, y de la cual mostró diferencias en el primer acercamiento (Figura 6.5), es XIAP. Esta molécula, es una ubiquitín E3 ligasa, tiene la capacidad de unirse directamente con las caspasas como, caspasa 9, 3, 6 y 7 e inhibir su actividad llevandolas a degradación vía proteasoma.

Para analizar la expresión de XIAP durante la infección con el virus dengue, se infectaron células HMEC-1 a 10 MOI y como controles se utilizaron cultivos con el medio solo (sin infectar) y cultivos infectados con un mock (virus inactivado por calor).



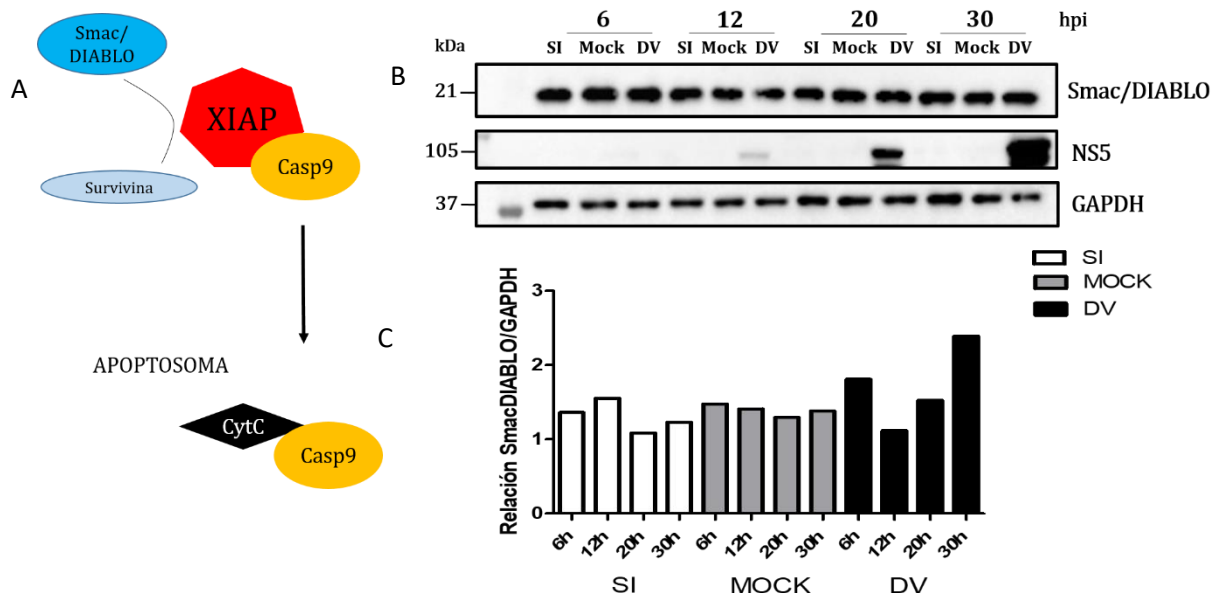
**Figura 6.5. Expresión de XIAP durante la infección por el virus dengue.** **A.** Esquema de la actividad de XIAP. XIAP secuestra a la caspasa 9, por consiguiente se inhibe la formación del apoptosoma. **B.** Cinética de expresión de XIAP. **C.** Análisis densitométrico de XIAP con relación a GAPDH, control de carga.

Los resultados de la cinética de expresión de XIAP mostraron problemas para detectar la presencia de la proteína en el mock y en el infectado a las 6 horas. A las 30 horas de infección, si se esperaría una disminución de la expresión de la proteína, pero no la ausencia total. Ahora bien, enfocándonos en los cultivos infectados, se puede apreciar una disminución gradual en los cultivos infectados (omitiendo el infectado a las 6 horas, ya que, por alguna razón desconocida, no se detectó señal). Sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para poder concluir. Al igual que con survivina, se puede observar una tendencia de XIAP a disminuir en los cultivos infectados con el virus dengue.

#### 6.5 Cinética de Smac-DIABLO 6-30 horas

Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial y una de sus funciones es antagonizar la actividad de las IAPs, como por ejemplo, de survivina. Smac/DIABLO se libera de la mitocondria al ser dañada; una vez que Smac sale al citosol, inmediatamente desplaza a la survivina que se encuentra unida a XIAP. De esta forma, XIAP se desestabiliza y se degrada. Como consecuencia de esto, la caspasa-9 puede formar parte del apoptosoma y dar paso al procesamiento de caspasas efectoras (Figura 6.6A).

La cinética de Smac/DIABLO se realizó bajo las mismas condiciones que en las cinéticas anteriores. Brevemente, se infectaron células HMEC-1 a 10 MOI durante 6, 12, 20 y 30 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.6.

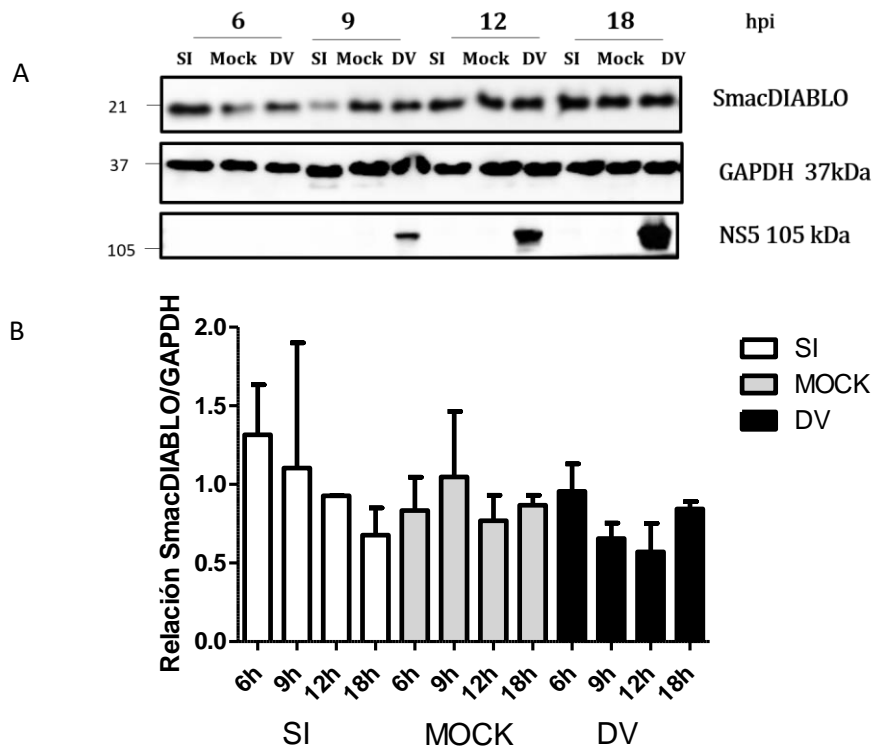


**Figura 6.6. Esquema y cinética de expresión de Smac/DIABLO.** **A.** La actividad de Smac/DIABLO, al ser liberado de la mitocondria desplaza a survivina, XIAP se degrada liberando la caspasa 9 para formar el apoptosoma. **B.** Western Blot de la cinética de expresión de Smac/DIABLO (21kDa). Condiciones: sin infectar (SI), falsamente infectadas (mock), infectadas con DENV a 10 MOI analisis a las , 6, 12, 20, 30 horas post-infección. GAPD, (control de carga). NS5, control de infección. **C.** Análisis densitométrico de la expresión de Smac/DIABLO con respecto a GAPDH.

Los resultados nos muestran que en los cultivos sin infectar y en el mock no hay cambio, esto se puede observar en el western blot de Smac/DIABLO (figura 6.6B) así como en el análisis densitométrico (figura 6C). Por otro lado, pese a que la densitometría de los cultivos infectados con el virus dengue indican que hay un incremento gradual en la expresión de la proteína, cuando se observa el western blot de Smac/DIABLO (21 kDa) no hay cambios aparentes con respecto a los controles. Por lo que concluimos que Smac/DIABLO no sufre cambios importantes durante la infección por el virus dengue.

Se realizó otra cinética de infección a tiempos más tempranos para evaluar si Smac/DIABLO se modifica durante la infección (, sin embargo, y como podemos

apreciar en la figura 6.7, no mostró cambios en la expresión, al igual que en la cinética anterior.



**Figura 6.7. Cinética de expresión de Smac/DIABLO (6-18h).** **A.** Western Blot de la cinética de expresión de Smac/DIABLO (21kDa). Condiciones: sin infectar (SI), falsamente infectadas (mock), infectadas con DENV a 10 MOI análisis a las , 6, 12, 20, 30 horas post-infección. GAPD, (control de carga). NS5, control de infección. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de Smac/DIABLO con respecto a GAPDH. n=2.

Los datos de ambas cinéticas de Smac/DIABLO coinciden con lo reportado en otros modelos virales de RNA (Gutiérrez, et al, 2019). La cinética de Smac/DIABLO no presenta cambios importantes analizando extractos totales de proteínas en ninguna de las condiciones.

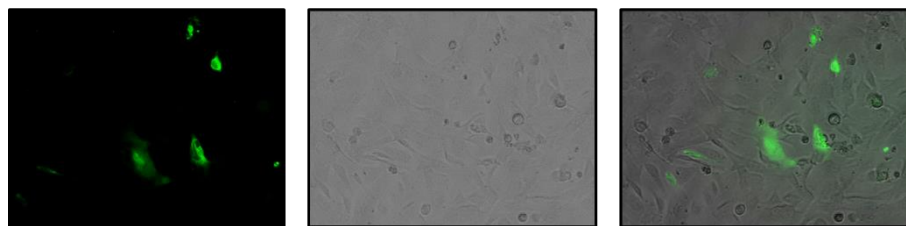
Ahora bien, la función de Smac/DIABLO está muy restringida a su localización celular. Esta proteína está localizada en la mitocondria y su función como inhibidora de la actividad de las IAPs se ejerce al momento de que ésta se libera

de la mitocondria durante el MOMP. El hecho de que no haya cambios en los extractos totales de proteínas no descarta totalmente la participación de Smac/DIABLO durante la infección con DENV. Para evaluar esto, es necesario analizar la localización subcelular de esta proteína durante la infección, lo cual se puede hacer por inmunofluorescencia detectando la presencia de Smac/DIABLO y utilizando un marcador de mitocondria (Tom23), o bien, realizando fraccionamiento celular (mitocondria, citoplasma) y analizar por western blot el enriquecimiento de Smac/DIABLO en cada fracción.

### 6.5 Transfección con la NS2B

Se ha descrito que la expresión individual de proteínas virales puede estar asociada al cambio en la expresión de las IAPs. Considerando que la proteína NS2B posee características de viroporina, y es capaz de inducir apoptosis, además de que resultados preliminares muestran que esta proteína colocaliza con mitocondria (León-Juárez, en proceso). Existe la posibilidad de que la proteína NS2B pueda ser una candidata para inducir los cambios en la expresión de las IAPs. Para esto, células HMEC-1 se transfectaron con un plásmido NS2B/eGFPN1, como control se transfectaron células solo con el plásmido eGFPN1. La transfección se monitoreó por microscopia confocal con la detección de la proteína verde fluorescente (GFP). A las 18 horas después de la transfección se verificó la presencia de la proteína. La eficiencia de la transfección a este tiempo fue del 10%. En la figura 6.8 se puede observar la presencia de la proteína recombinante por microscopia confocal.

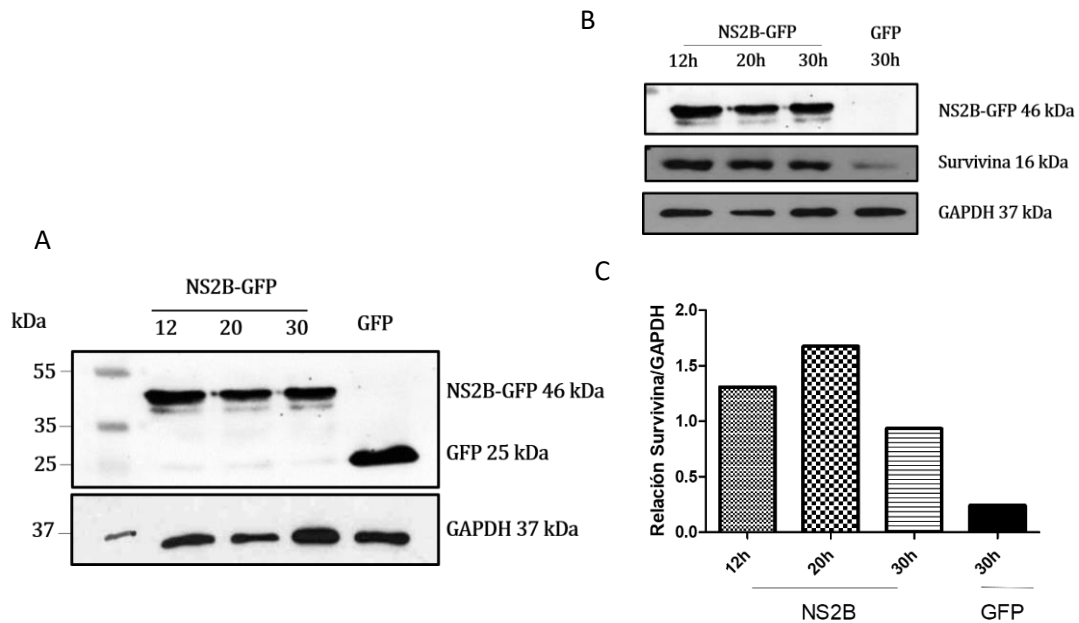
NS2B-GFP 18 hpt



**Figura 6.8. Transfección con la NS2B-GFP.** Fotografía tomada directamente de los cultivos transfectados con un microscopio confocal a las 18 horas después de la transfección.

Adicional a esto, la expresión de la proteína también se evaluó por western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra GFP (Figura 6.9A). La NS2B-eGFP tiene un peso aproximado de 46 kDa mientras que la eGFP de 25 kDa. Ambas proteínas se lograron detectar en el western blot en los pesos esperados. Cabe mencionar que hay buena cantidad de proteína NS2B-GFP a pesar de que el porcentaje de transfección calculado a las 18 horas fue bajo.

Para analizar la expresión de las IAPs, se realizó una extracción total de proteínas a las 12, 20 y 30 horas de los cultivos transfectados con la NS2B-GFP, así como del cultivo transfectado únicamente con el plásmido eGFP. Posteriormente, se analizó la expresión de survivina en los extractos totales por western blot. Los resultados se muestran en la figura 6B así como su respectivo análisis densitométrico (6.9C).



**Figura 6.9. Cinética de transfección y análisis de la expresión de survivina con la NS2B-GFP.** **A.** Western blot de la cinética de transfección con la NS2B-GFP (46 kDa) a las 12, 20 y 30 hpt. Control:GFP (25kDa). **B.** Western blot de la expresión de NS2B-GFP,



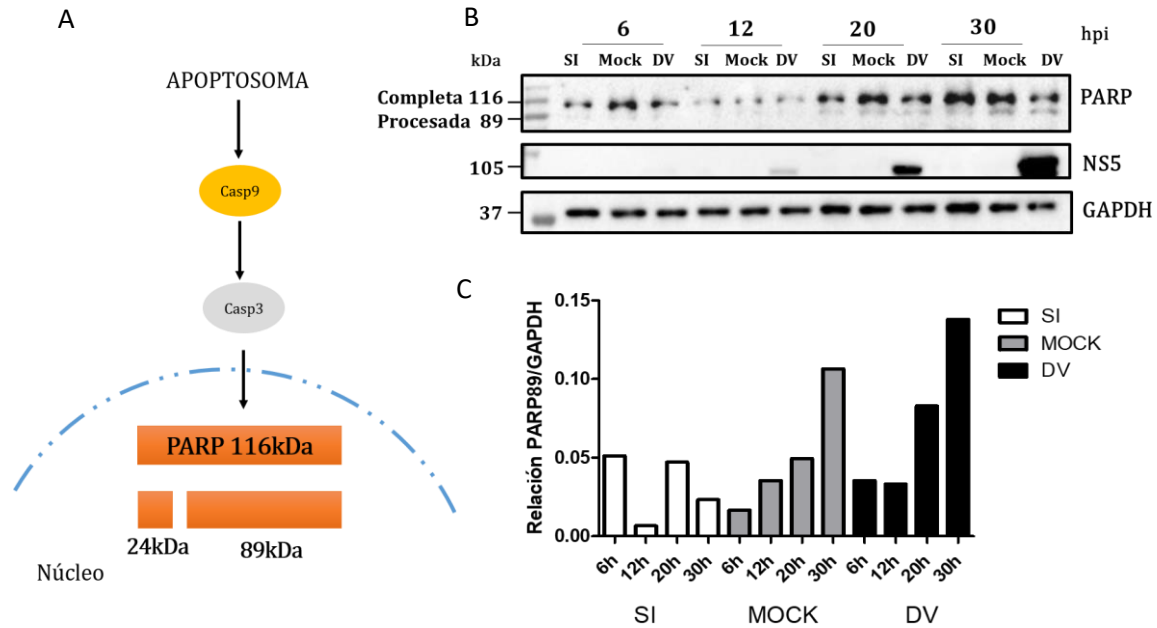
survivina (16 kDa) durante la transfección con la NS2B-GFP. Control de carga: GAPDH. **C.**  
Análisis densitométrico de la expresión de survivina en relación a GAPDH.

El análisis densitométrico nos indica que hay una ligera disminución de survivina a las 30 horas pos-transfección, comparada con la expresión de survivina a las 12 horas.

#### 6.6 Análisis de PARP durante la infección por DENV

Está descrito que DENV induce apoptosis en varios modelos celulares. Una manera de evaluar apoptosis es mediante la detección del procesamiento de caspasas así como de otras moléculas relacionadas con la activación de caspasas, entre ellas, PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerases). PARP es una proteínas nuclear involucrada en la reparación del DNA. Cuando ocurren los eventos de apoptosis, PARP es escindida por la caspasa-3 dando origen a dos fragmentos, uno de 24kDa y otro de 89 kDa (Figura 6.10A).

El procesamiento de PARP se evaluó en la misma cinética de infección en la que se analizaron las IAPs inicialmente (6, 12, 20, 30 horas). El anticuerpo que se utilizó únicamente reconoce a PARP completa (116 kDa) y el fragmento de 89 kDa.



**Figura 10. Procesamiento de PARP durante la cinética de infección.** **A.** Esquema del procesamiento de PARP. El apoptosoma procesa y activa a la caspasa-9, ésta a su vez, procesa a la caspasa-3 quien se trasloca al núcleo y escinde a PARP completa (116 kDa) en dos fragmentos en uno de 24 kDa y otro de 89 kDa. **B.** Western blot de PARP en una cinética de infección de 6-30 horas. Se detecta la presencia de PARP completa y la procesada (89 kDa). Control de infección: NS5; Control de carga: GAPDH. **C.** Análisis densitométrico de PARP 89 kDa en relación con GAPDH.

En la figura 6.10B se muestra el western blot de PARP durante la infección. Observamos a PARP completa presente en todas las condiciones, un poco disminuida a las 12 horas. Comenzamos a ver el fragmento de 89 kDa a partir de las 20 horas en todas las condiciones. Se hizo un análisis densitométrico de PARP procesada (89 kDa) con respecto a GAPDH para ver en que condiciones había mayor procesamiento de la proteína. Este análisis nos indica que hay mayor procesamiento en los cultivos infectados a las 30 horas.

## CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN

Es bien sabido que la mayoría de los virus son capaces de modificar la biología de la célula que infectan. Esto es debido a que los virus carecen de los elementos necesarios para multiplicarse por sí mismos. Por lo que requieren de la maquinaria celular para su replicación exitosa.

Una vez dentro de la célula, los virus toman control de muchos de los procesos biológicos involucrados en el mantenimiento y funcionamiento normal de una célula, alterando así la homeostasis celular. Muchos de estos procesos que los virus alteran resultan vitales para la supervivencia del huésped, algunos de ellos, ciclo celular, transcripción de genes, síntesis de proteínas, autofagia, metabolismo, apoptosis, procesos inmunológicos, entre muchos otros. Todo esto con la finalidad de replicarse y propagarse.

De los mecanismos que más se ha descrito que son manipulados por la presencia de un virus es la muerte celular programada. La muerte celular programada se considera como una señal de alarma ante diversos estímulos, entre ellos las infecciones virales, sin embargo, en la mayoría de los casos, esta respuesta antiviral no es exitosa, ya que los virus, a su vez, han desarrollado estrategias que les permite modularla, evadirla o contrarrestarla. Existen dos tipos de muerte celular programada: la muerte por autofagia, independiente de caspasas; y la muerte por apoptosis, dependiente de caspasas. La mayoría de los virus inducen la activación de las caspasas para promover la apoptosis y de esta manera evitar ser detectados por el sistema inmune. Este mecanismo puede ser inducido directamente por el virus, o bien, puede ser un efecto de la célula en respuesta al estrés provocado por la infección, sin embargo, se ha reportado que los virus pueden retrasar la apoptosis temprana inducida por la célula infectada con la finalidad de completar su ciclo de replicación.

Las consecuencias de los efectos apoptóticos durante infecciones causadas por virus permanece aún poco clara. Aun así, se conoce que virus de DNA, ejemplo de ellos, sarcoma de Kaposi (KSHV), Epstein-Barr virus (EBV), y herpes-gamma

murino 68 ( $\gamma$ HV68), codifican para proteínas homólogas de Bcl-2, estos homólogos promueven la supervivencia inhibiendo la activación de BAX y BAK (Yee J., 2011). El virus de Epstein-Barr codifica para un microRNA que se dirige a proteínas BH-3, incluyendo al modulador sobre-regulado de apoptosis p53 (PUMA) (Choy, 2008; Okatomo T, 2017).

Con respecto a los virus de RNA, está reportado que infecciones causadas por flavivirus como el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del este del Nilo (WNV) y dengue (DENV) regulan la apoptosis en varios modelos celulares (Okatomo T, 2017). Particularmente, nuestro grupo también reportó en 2009 que el virus dengue induce apoptosis en un modelo de células endoteliales HMEC-1 (Ochoa-Vázquez, 2009).

Es importante mencionar que la apoptosis está regulada principalmente por dos familias: la familia de Bcl-2 y la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Actualmente, el estudio de las IAPs está muy enfocado al diagnóstico, tratamiento, pronóstico y progresión del cáncer dadas las funciones que desempeñan durante el ciclo celular y apoptosis, tal es el caso de survivina. Sin embargo es claro que estas moléculas podrían estar modificadas a lo largo de las infecciones por virus responsables de la inducción de apoptosis. Por lo que recientemente se le ha dado otro enfoque al estudio de las IAPs en el contexto de infecciones virales.

El estudio de las IAPs en modelos de infecciones virales cobra importancia al haber artículos que demuestran que la expresión de proteínas como survivina, XIAP se modifican durante el curso de la infección (Bok, 2009; Gutiérrez, 2019).

En 2009, Bok y colaboradores, reportaron en la infección por norovirus, virus de RNA causante de gastroenteritis en humanos, que el transcrito de survivina disminuye mientras que el genoma viral incrementaba y esto se observó también a nivel de proteína. Posteriormente, analizaron si alguna proteína viral podía ser responsable de este cambio, sin embargo, no observaron el mismo comportamiento con la transfección de ninguna de las proteínas virales (Bok, 2009). Por otro lado, Gutiérrez y colaboradores analizaron la expresión de

survivina en extractos totales de proteínas de cultivos infectados con un virus de la misma familia, Calicivirus felino. Ellos observaron el mismo fenómeno que había reportado Bok et al., en los cultivos infectados con el virus: una disminución gradual de la survivina.

Cabe destacar que tanto norovirus como calicivirus felino inducen la apoptosis durante la infección. En norovirus se demostró por la activación de la caspasa 3 y en calicivirus felino por daño mitocondrial, donde por inmunofluorescencia se demostró que había liberación de factores pro-apoptóticos entre ellos Smac/DIABLO.

Ahora bien, con respecto al virus dengue sería importante evaluar si las IAPs sufren modificaciones durante la infección, con la finalidad de dilucidar un poco más sobre los mecanismos por los cuales el virus podría estar induciendo apoptosis. Por otro lado, se han relacionado las IAPs con la patogénesis del dengue (Limonta et al. 2014).

Este trabajo es un primer acercamiento para evaluar la expresión de las IAPs durante la infección con el virus dengue en un modelo de células endoteliales HMEC-1.

Se partió con el conocimiento de que el virus dengue induce apoptosis en células endoteliales HMEC-1, demostrado por nuestro grupo de investigación; con ensayos de TUNEL los cuales dieron positivos a las 20 y 36 horas después de la infección. Asimismo, se detectó el procesamiento de PARP como una señal que sugiere apoptosis (Vasquez Ochoa et al. 2009).

En primer lugar se caracterizó la cinética de infección con el virus dengue por inmunofluorescencia. La cinética siguió el patrón ya conocido donde se comienza a ver infección a partir de las 12 horas y a las 20 horas hay hasta un 50% de infección. Con esto también se comprobó que el abasto viral producido es capaz de infectar.

Como primer abordaje, se evaluó si existía un cambio en las IAPs durante la infección, para lo cual se infectó a un solo tiempo y se analizó la expresión de

survivina, XIAP y Bcl-XL. Se observó que las proteínas que se modificaban durante la infección eran survivina, con una disminución drástica comparada con los controles, y un ligero incremento en XIAP. En cambio, con Bcl-XL no se observaron cambios en ninguna condición.

Se procedió a evaluar a survivina en una cinética de infección para ver en qué tiempos se comenzaban a ver los cambios en los cultivos infectados y compararlos con los controles (no infectados y mock). La primera cinética se realizó a 6, 12, 20, 30 horas, con el argumento de que el virus comienza a replicar a partir de las 12 horas y por lo tanto se esperaba que los cambios se comiencen a observar en esos tiempos. Lo que se observó en un primer ensayo, fue que la survivina comienza a disminuir en todas las condiciones (no infectado, mock e infectado). Esto no se esperaba puesto que en los reportes con otros virus de RNA, únicamente se observa disminución en los cultivos infectados (Barrera-Vazquez et al. 2019; Bok et al. 2009). Sin embargo, el abordaje experimental es diferente ya que ellos únicamente hacen la cinética para la infección pero no para el no infectado. Esto llama mucho la atención.

Ahora bien, la survivina está regulada por el ciclo celular, esto podría explicar la disminución que observamos en todas las condiciones. Sin embargo, podemos observar que la disminución es más pronunciada en los cultivos infectados. Decidimos hacer una nueva cinética a tiempos más tempranos para poder evaluar el fenómeno de apoptosis y la infección. Se observó el mismo patrón que en la cinética anterior, e incluso pudimos observar que desde las 9 horas ya se presenta un efecto en la expresión de survivina. Es necesario realizar más ensayos para poder corroborar este dato.

Otra proteína que evaluamos fue la expresión de XIAP. A pesar de que no se detectó señal en algunas condiciones, los cultivos infectados nos muestran también una tendencia a disminuir. Sin embargo, con estos resultados no se puede concluir al respecto. Es necesario realizar más ensayos.

Otra proteína ligada al proceso de apoptosis es Smac/DIABLO, una proteína pro-apoptótica que se localiza en la mitocondria y es liberada cuando hay daño a la

membrana mitocondrial (MOMP). En los ensayos que se realizó paara analizar su expresión, se observó que no hay cambios en ninguna condición. Sin embargo, dicho lo anterior, la función de Smac está muy vinculada con su localización, habría que evaluar donde se encuentra esta proteína durante la infección.

Como observamos una tendencia de survivina a disminuir, decidimos evaluar si la proteína NS2B podría estar involucrada en este cambio. Los resultados son poco claros puesto que no hay un patrón uniforme como se había observado en las cinéticas anteriores de survivina. Se tienen que realizar más ensayos al respecto.

Por último, evaluamos la expresión de PARP, una proteína involucrada en la reparación de DNA. Los resultados no indican que hay mayor procesamiento en los cultivos infectados, indicio de que está ocurriendo un fenómeno de apoptosis.

En resumen, observamos que si existe una tendencia de la survivina a disminuir en los cultivos infectados con el virus. En cuanto a Smac/DAIBLO habría que analizar la localización de esta molécula durante la infección. XIAP habría que realizar más ensayos para poder concluir, y el procesamiento de PARP nos indica que está ocurriendo un fenómeno de apoptosis.

## CAPÍTULO IX: CONCLUSIÓN

- La expresión de survivina tiene una tendencia a disminuir más marcada en los cultivos infectados con el virus dengue y esto comienza entre las 9 y 12 horas después de la infección.
- No hay cambios aparentes en la expresión de Smac/DIABLO en extractos totales en ninguna condición.
- Hay mayor procesamiento de PARP en los cultivos infectados con el virus dengue a partir de las 20 horas, lo que es señal de apoptosis.



## CAPÍTULO X: PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar más experimentos con respecto a la expresión de survivina y XIAP para poder tener un dato más claro en el contexto de la infección.
- Evaluar la localización celular de Smac/DIABLO.
- Realizar más experimentos para evaluar el efecto de la NS2B sobre la expresión de survivina y XIAP.
- Evaluar si la proteína viral NS2A podría estar involucrada en la modificación de la expresión de survivina durante la infección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadia-Molina, F., V. Moron-Calvente, S. D. Baird, F. Shamim, F. Martin, and A. MacKenzie. 2017. 'Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) localizes to the cytokinetic machinery during cell division', *Sci Rep*, 7: 39981.
- Acosta, E. G., A. Kumar, and R. Bartenschlager. 2014. 'Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology', *Adv Virus Res*, 88: 1-109.
- Ashkenazi, A., and G. Salvesen. 2014. 'Regulated cell death: signaling and mechanisms', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30: 337-56.
- Barrera-Vazquez, O. S., C. Cancio-Lonches, O. Hernandez-Gonzalez, B. Chavez-Munguia, N. Villegas-Sepulveda, and A. L. Gutierrez-Escolano. 2019. 'The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downregulation and apoptosis', *Virology*, 527: 146-58.
- 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', *J Virol*, 83: 3647-56.
- Branca, M., C. Giorgi, D. Santini, L. Di Bonito, M. Ciotti, S. Costa, A. Benedetto, E. A. Casolati, C. Favalli, P. Paba, P. Di Bonito, L. Mariani, S. Syrjanen, D. Bonifacio, L. Accardi, F. Zanconati, K. Syrjanen, and H. PV-Pathogen ISS Study Group. 2005. 'Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer', *Am J Clin Pathol*, 124: 113-21.
- Busca, A., M. Saxena, and A. Kumar. 2012. 'Critical role for antiapoptotic Bcl-xL and Mcl-1 in human macrophage survival and cellular IAP1/2 (cIAP1/2) in resistance to HIV-Vpr-induced apoptosis', *J Biol Chem*, 287: 15118-33.
- Byk, L. A., and A. V. Gamarnik. 2016. 'Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein', *Annu Rev Virol*, 3: 263-81.
- Castillo, J. A., and S. Urcuqui-Inchima. 2018. 'Mechanisms of monocyte cell death triggered by dengue virus infection', *Apoptosis*, 23: 576-86.
- Cong, H., L. Xu, Y. Wu, Z. Qu, T. Bian, W. Zhang, C. Xing, and C. Zhuang. 2019. 'Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives', *J Med Chem*, 62: 5750-72.
- D'Arcy, M. S. 2019. 'Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy', *Cell Biol Int*, 43: 582-92.
- Datan, E., S. G. Roy, G. Germain, N. Zali, J. E. McLean, G. Golshan, S. Harbajan, R. A. Lockshin, and Z. Zakeri. 2016. 'Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation', *Cell Death Dis*, 7: e2127.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. 'Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012', *Cell Death Differ*, 19: 107-20.
- Garg, H., P. Suri, J. C. Gupta, G. P. Talwar, and S. Dubey. 2016. 'Survivin: a unique target for tumor therapy', *Cancer Cell Int*, 16: 49.

- Guzman, M. G., D. J. Gubler, A. Izquierdo, E. Martinez, and S. B. Halstead. 2016. 'Dengue infection', *Nat Rev Dis Primers*, 2: 16055.
- Hunter, A. M., E. C. LaCasse, and R. G. Korneluk. 2007. 'The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets', *Apoptosis*, 12: 1543-68.
- Jeyapragash, A. A., U. R. Klein, D. Lindner, J. Ebert, E. A. Nigg, and E. Conti. 2007. 'Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together', *Cell*, 131: 271-85.
- Khunchai, S., M. Junking, A. Suttitheptumrong, U. Yasamut, N. Sawasdee, J. Netsawang, A. Morchang, P. Chaowalit, S. Noisakran, P. T. Yenchitsomanus, and T. Limjindaporn. 2012. 'Interaction of dengue virus nonstructural protein 5 with Daxx modulates RANTES production', *Biochem Biophys Res Commun*, 423: 398-403.
- Kitagawa, M., and S. H. Lee. 2015. 'The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis', *Front Cell Dev Biol*, 3: 14.
- Kvansakul, M. 2017. 'Viral Infection and Apoptosis', *Viruses*, 9.
- Lee, Y. R., H. Y. Lei, M. T. Liu, J. R. Wang, S. H. Chen, Y. F. Jiang-Shieh, Y. S. Lin, T. M. Yeh, C. C. Liu, and H. S. Liu. 2008. 'Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication', *Virology*, 374: 240-8.
- Leon-Juarez, M., M. Martinez-Castillo, G. Shrivastava, J. Garcia-Cordero, N. Villegas-Sepulveda, M. Mondragon-Castelan, R. Mondragon-Flores, and L. Cedillo-Barron. 2016. 'Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models', *Viol J*, 13: 1.
- Li, C., Z. Wu, M. Liu, M. Pazgier, and W. Lu. 2008. 'Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3', *Protein Sci*, 17: 1624-9.
- Li, F., J. Yang, N. Ramnath, M. M. Javle, and D. Tan. 2005. 'Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?', *Int J Cancer*, 114: 509-12.
- Limonta, D., A. Torrentes-Carvalho, C. F. Marinho, E. L. de Azeredo, L. J. de Souza, A. R. Motta-Castro, R. V. da Cunha, C. F. Kubelka, R. M. Nogueira, and L. M. de-Oliveira-Pinto. 2014. 'Apoptotic mediators in patients with severe and non-severe dengue from Brazil', *J Med Virol*, 86: 1437-47.
- Liu, L., H. Dong, H. Chen, J. Zhang, H. Ling, Z. Li, P. Y. Shi, and H. Li. 2010. 'Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition', *Front Biol (Beijing)*, 5: 286-303.
- Long, X., Y. Li, Y. Qi, J. Xu, Z. Wang, X. Zhang, D. Zhang, L. Zhang, and J. Huang. 2013. 'XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells', *FASEB J*, 27: 1062-73.
- McLean, J. E., A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino, and Z. Zakeri. 2011. 'Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication', *J Biol Chem*, 286: 22147-59.
- Mehrbod, P., S. R. Ande, J. Alizadeh, S. Rahimizadeh, A. Shariati, H. Malek, M. Hashemi, K. K. M. Glover, A. A. Sher, K. M. Coombs, and S. Ghavami. 2019. 'The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections', *Virulence*, 10: 376-413.
- Morchang, A., U. Yasamut, J. Netsawang, S. Noisakran, W. Wongwiwat, P. Songprakhon, C. Srisawat, C. Puttikhunt, W. Kasinrerak, P. Malasit, P. T. Yenchitsomanus, and T. Limjindaporn. 2011. 'Cell death gene expression profile: role of RIPK2 in dengue virus-mediated apoptosis', *Virus Res*, 156: 25-34.
- Munoz-Jordan, J. L., M. Laurent-Rolle, J. Ashour, L. Martinez-Sobrido, M. Ashok, W. I. Lipkin, and A. Garcia-Sastre. 2005. 'Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses', *J Virol*, 79: 8004-13.

- Nachmias, B., Y. Ashhab, and D. Ben-Yehuda. 2004. 'The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer', *Semin Cancer Biol*, 14: 231-43.
- Nieva, J. L., V. Madan, and L. Carrasco. 2012. 'Viroporins: structure and biological functions', *Nat Rev Microbiol*, 10: 563-74.
- Norazharuddin, H., and N. S. Lai. 2018. 'Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest', *Malays J Med Sci*, 25: 6-15.
- Obexer, P., and M. J. Ausserlechner. 2014. 'X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy', *Front Oncol*, 4: 197.
- Okamoto, T., T. Suzuki, S. Kusakabe, M. Tokunaga, J. Hirano, Y. Miyata, and Y. Matsuura. 2017. 'Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection', *Viruses*, 9.
- Piña-Oviedo, Sergio, Katarzyna Urbanska, Sujatha Radhakrishnan, Thersa Sweet, Krzysztof Reiss, Kamel Khalili, and Luis Del Valle. 2007. 'Effects of JC Virus Infection on Anti-Apoptotic Protein Survivin in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy', *The American Journal of Pathology*, 170: 1291-304.
- Rastogi, M., N. Sharma, and S. K. Singh. 2016. 'Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein', *Virology*, 13: 131.
- Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez, and H. Steller. 2008. 'Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity', *Genes Dev*, 22: 2256-66.
- Shrivastava, G., J. Garcia-Cordero, M. Leon-Juarez, G. Oza, J. Tapia-Ramirez, N. Villegas-Sepulveda, and L. Cedillo-Barron. 2017. 'NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2', *Virulence*, 8: 1450-56.
- Silke, J., and D. Vucic. 2014. 'IAP family of cell death and signaling regulators', *Methods Enzymol*, 545: 35-65.
- Srinivasula, S. M., and J. D. Ashwell. 2008. 'IAPs: what's in a name?', *Mol Cell*, 30: 123-35.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, K. Nakata, J. C. Reed, and R. Takahashi. 2001. 'X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes', *J Biol Chem*, 276: 27058-63.
- Umareddy, I., A. Chao, A. Sampath, F. Gu, and S. G. Vasudevan. 2006. 'Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA', *J Gen Virol*, 87: 2605-14.
- Vasquez Ochoa, M., J. Garcia Cordero, B. Gutierrez Castaneda, L. Santos Argumedo, N. Villegas Sepulveda, and L. Cedillo Barron. 2009. 'A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis', *Arch Virol*, 154: 919-28.
- Zhang, X., N. Dong, L. Yin, N. Cai, H. Ma, J. You, H. Zhang, H. Wang, R. He, and L. Ye. 2005. 'Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues', *J Med Virol*, 77: 374-81.
- Zhou, X., W. Jiang, Z. Liu, S. Liu, and X. Liang. 2017. 'Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis', *Viruses*, 9.