

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“LA PROTEÍNA LC DEL CALICIVIRUS FELINO INDUCE LA REGULACIÓN
NEGATIVA DE SURVIVINA Y PARTICIPA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA
APOPTOSIS.

TESIS

Que presenta

M en C. OSCAR SALVADOR BARRERA VÁZQUEZ

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de la Tesis

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

México, Ciudad de México.

Noviembre, 2018

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 9 de Virología, bajo la tutoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, profesora e investigador titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y la asesoría de los Drs. Rosa María del Ángel y Cázares¹, Juan Ernesto Ludert León², Nicolás Villegas Sepúlveda³ y Martha Yocupicio Monroy⁴.

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

² Investigador Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN

³ Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN

⁴ Investigador Titular del Departamento de Ciencias Genómicas de la UACM

Agradezco al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)* beca No. 395845, y al *Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF)* por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al destino, mi fortaleza y mi perseverancia por haberme puesto y permitido consumir esta etapa de mi vida en esta institución llamada CINVESTAV.

A mis padres Martha y Alvaro por haberme dado la vida, y acompañarme en este largo camino llamado vida, además de apoyarme y estar siempre a mi lado en todos los momentos, los amo.

A mis hermanas Victoria y Katia por su cariño, amistad, paciencia y apoyo. Las amo.

A mi tía Lourdes por su apoyo económico y emocional cuando empecé este proyecto en lo que llegaba el apoyo de la beca de maestría y parte de doctorado.

A mi abuelita Zoila y mi abuelo Salvador Q.E.P.D, que aunque ya no me vio llegar a la meta, sé que en algún lugar él está presenciando dicho momento.

A Elizabeth por acompañarme en estos 10 años y ser parte de mi vida. Te amo.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por permitirme ser parte de su laboratorio, por su confianza y amistad, y principalmente por haberme dado la oportunidad de demostrar mi potencial cuando nadie más creyó en mí, así como sus palabras de aliento y motivación cuando me veía titubear, que en su momento me dieron esperanza y fortaleza para continuar.

A la Dra. Clotilde Cancio Lonches, por su apoyo como auxiliar del laboratorio al haberme proporcionado todos los materiales necesarios para la realización de este proyecto: líneas celulares, stocks virales, soluciones, anticuerpos, entre otros reactivos; por su paciencia, comprensión y trato amable durante este trabajo, así como también por compartir sus “tips” para realizar un buen proyecto, gracias.

A José Luis Chavarría Islas por su apoyo técnico, esterilización y lavado de material, así como preparación de este, su trato amable y sus bromas que hicieron el ambiente más ameno en mi estancia en este laboratorio para la realización de este trabajo.

A la M en C Patricia Espíritu por su apoyo en las imágenes de microscopía y su asesoría, además de resolver mis dudas sobre dicho tema.

INDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
ANTECEDENTES GENERALES	4
Gastroenteritis	4
Gastroenteritis virales	4
Calicivirus	5
Transmisión y Epidemiología	7
Biología de los Calicivirus	9
Proteínas virales	10
Proteínas no estructurales	11
Proteínas estructurales	14
Ciclo replicativo de los calicivirus	16
Unión a receptor	16
Entrada	16
Liberación del genoma viral	17
Traducción y replicación del genoma viral	17
Ensamblaje y Salida.	19
Apoptosis durante el ciclo replicativo de los calicivirus	19
Caspasas.	22
Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).	23
ANTECEDENTES DIRECTOS	24
JUSTIFICACIÓN.	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y METODOS	27
Virus y líneas celulares	27
Propagación viral	28
Anticuerpos	28
Extractos celulares	29
Western blot.	29
Inmunofluorescencias.	30
Tratamiento con lactacistina	30
Construcción de los plásmidos.	31

Transfección transitoria en CrFK	32
Ensayo de entrada por inmunofluorescencia	32
Microscopía electronica de transmisión (MET).....	33
RESULTADOS	34
El tratamiento con lactacistina evita la degradación de survivina	34
Survivina previene la apoptosis y afecta la salida del FCV en células CrFK.	36
La sobre-expresión de survivina tiene un efecto negativo en la producción del FCV.	39
La sobre-expresión de survivina causa una reducción en los pasos tempranos del ciclo replicativo durante la infección con el FCV.	40
La sobre-expresión de survivina no induce un cambio en el ciclo celular en ni afecta la síntesis de novo de las proteínas en las células CrFK. ..	42
La sobre-expresión de survivina tiene un efecto paracrino y autocrino contra la infección del FCV en células CrFK.	45
La sobre-expresión de survivina afecta la unión del FCV en las células CrFK.....	46
JAM-1 es internalizada durante la sobre-expresión de survivina en células CrFK.....	49
Las células CrFK que sobre-expresan survivina secretan factores al sobrenadante que protegen a las células CrFK de la infección por el FCV.....	52
El tratamiento con los sobrenadantes provenientes de células CrFK que sobre-expresan survivina afectan la unión del FCV a su célula blanco por medio de la internalización de la molécula JAM-1	54
Los sobrenadantes provenientes de las células que sobre-expresan a survivina protegen específicamente de la infección por el FCV.	57
La sobre-expresión de survivina en células RAW 264.7 no tuvo un efecto en la síntesis y o procesamiento de las proteínas no estructurales del MNV, pero si en la salida viral.	59
La expresión de NS6/7 está asociada con el efecto citopático de células CrFK.	61
La expresión de la proteína viral NS6/7 en células CrFK no está asociada con la inducción de la apoptosis.	64
La expresión de la proteína LC induce redondeamiento de las células CrFK, y colocaliza con el núcleo y la mitocondria asociada con la regulación negativa de XIAP y survivina en células CrFK transfectadas.	65
La proteína LC posiblemente se trasloca al núcleo e induce un re-arreglo en el retículo endoplasmático.....	68

Transfección de la proteína LC causa daño mitocondrial.....	71
La proteína LC está asociada con la regulación negativa de XIAP y survivina en células CrFK transfectadas.....	73
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
REFERENCIAS	83
ABREVIATURAS	92

ABSTRACT

Viral gastroenteritis is one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide, especially in developing countries. Noroviruses, members of the *Caliciviridae* family, are responsible for the 95% of the outbreaks of nonbacterial gastroenteritis worldwide (Green 1997). These viruses cannot be propagated in cell culture, a fact that has delayed their study, however, the mechanisms of replication and the role of viral and cellular components in the establishment of infection have been addressed through the use of surrogated cultivable models, such as feline calicivirus (FCV) and murine norovirus (MNV). FCV has been widely studied, and even though it causes vesicular and feline respiratory infections, it shares genomic organization similarities with the noroviruses that infect humans. The viral life cycle of caliciviruses is largely dependent on the recruitment of certain cellular factors involved in viral protein and RNA synthesis, as well as cellular processes such as apoptosis, which promotes viral particles release from infected cells. Some of the general steps involved in the establishment of the apoptosis induced by the calicivirus infection are already described; however, many others are still unknown. Since apoptosis is a crucial event during calicivirus replication, and little is known about regulatory factors of this process, we focus on studying the role of pro- and anti-apoptotic proteins during FCV infection. In this study, the downregulation of survivin during MNV infection, reported by others, was confirmed. Moreover, we demonstrated for the first time that X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is also downregulated from 12 to 24 hours postinfection (hpi). Both downregulation of survivin and XIAP expression was also demonstrated in FCV infected cells from 5 hpi. On the other hand, no changes in the expression of pro-apoptotic protein “second mitochondria-derived activator of caspases” or Smac/DIABLO were observed in both MNV and FCV infected cells, however, relocalization of this protein from the

mitochondrial membrane space to the cytoplasm during both viral infection was observed.

The results obtained in this study showed that FCV and MNV infection downregulates the expression of apoptosis inhibitor proteins and induces a change in the subcellular localization of pro-apoptotic proteins that act in the cytoplasm, to regulate the progression of apoptosis, moreover this work demonstrates that downregulation of survivin is important for a successful replicative cycle of the calicivirus and LC protein is the viral factor of FCV, responsible for the downregulation of survivin and the induction of apoptosis

RESUMEN

Las gastroenteritis virales, son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el mundo, principalmente en países en desarrollo. Los *Norovirus*, clasificados en la familia *Caliciviridae*, son responsables del 95% de los brotes de gastroenteritis no bacteriana en el mundo. Estos virus no se propagan en cultivos celulares, lo cual ha retrasado su estudio, sin embargo, los mecanismos de su replicación así como el papel de los componentes virales y celulares en el establecimiento de la infección, se han abordado a través del uso de modelos surrogados cultivables, como lo son el *calicivirus felino* (FCV) y el norovirus murino (MNV). El FCV, ha sido ampliamente estudiado dado a que aunque causa infecciones vesiculares y respiratorias en felino, comparte similitudes en la organización genómica con los norovirus que infectan a humanos (2-4). El MNV es el único norovirus cultivable e infecta ratones a través de la ruta oral, por lo que se considera uno de los modelos más relevantes para el estudio de los que infectan a humanos (5). El ciclo replicativo de ambos virus depende en gran parte del reclutamiento de ciertos factores proteicos que participan en la síntesis de sus proteínas y RNA, y de procesos celulares como la apoptosis, la cual favorece eventos tardíos (1) como la liberación de las partículas virales de las células infectadas (6). Algunos de los aspectos generales implicados en la activación y represión de factores celulares implicados en la apoptosis inducida

por los calicivirus ya se han descrito, sin embargo, muchos otros aún son desconocidos.

Dado que la apoptosis es un evento crucial durante el ciclo replicativo de los calicivirus, y que es poco lo que se conoce a nivel de factores reguladores de este proceso, decidimos abordar en este trabajo el estudio de la participación de las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs), así como de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en la infección por el FCV y el MNV. En este estudio, se corroboró que durante la infección por el MNV, la proteína survivina se regula negativamente, y se demostró que la proteína inhibitoria de la apoptosis X (XIAP) también se regula negativamente a partir de las 12 hpi. Así mismo, se demostró la regulación negativa de la expresión de survivina y XIAP en células infectadas por el FCV a partir de las 5 horas postinfección (hpi). Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de la proteína pro apoptótica “activadora de caspasas derivada de la mitocondria” o Smac (del inglés: Second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO en extractos totales de células RAW 264.7 infectadas por el MNV y CrFK infectadas por el FCV, sin embargo se observa una deslocalización de esta proteína de las membranas mitocondriales hacia el citoplasma durante la infección por ambos virus.

Los resultados obtenidos en este trabajo tomando los antecedentes que demuestran que la infección por el MNV y FCV regula negativamente la expresión de las proteínas inhibitorias de la apoptosis e inducen el cambio de la localización subcelular de proteínas proapoptóticas, se encontró que la regulación negativa de survivina es importante para un ciclo replicativo eficiente para los calicivirus así como también, que se demuestra que la proteína viral LC es la responsable de la regulación negativa de las IAPs y de la inducción de la apoptosis.

ANTECEDENTES GENERALES

Gastroenteritis

La gastroenteritis es una causa común de morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades en cualquier parte del mundo. Esta enfermedad consiste en una inflamación del estómago y de los intestinos causada por algunos virus, bacterias o parásitos. Los síntomas de la gastroenteritis incluyen diarrea, dolor abdominal, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos, pero la mayoría de las personas se recupera sin tratamiento. El problema más común con la gastroenteritis es la deshidratación, la cual se presenta si no se ingieren suficientes líquidos para sustituir los que se pierden con los vómitos y la diarrea. La deshidratación es más grave en bebés, niños pequeños, ancianos y personas con un sistema inmunitario débil (7). La OMS estima que las diarreas son responsables de la mitad de la carga mundial de enfermedades transmitidas por alimentos, entre los agentes virales causales se encuentran los norovirus. Se calcula que de 550 000 personas que enferman de diarrea cada año, 230 000 mueren, estimándose 220 000 niños menores de 5 años, de los cuales 96 000 mueren al año (8).

Gastroenteritis virales

También conocidas como gripe de estómago, afectan a cualquier persona en todo el mundo. Esta enfermedad altamente contagiosa se adquiere por el consumo de alimentos contaminados y se propaga a través del contacto cercano con personas que están infectadas. Se puede propagar fácilmente en espacios cerrados, tales como guarderías, escuelas, hogares de ancianos, y cruceros. La principal complicación de la gastroenteritis viral es la deshidratación causada por la diarrea y el vómito, que puede ser muy grave en bebés y niños

pequeños (8, 9). Según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la gastroenteritis viral es la principal causa de diarrea grave en adultos y niños (NCBI, 2012). Los niños menores de cinco años y los ancianos son particularmente vulnerables a la diarrea severa. Diferentes virus pueden causar la enfermedad, siendo los más comunes rotavirus y norovirus, estos últimos clasificados en la familia *Caliciviridae*. Los calicivirus humanos, principalmente del género *Norovirus* son responsables en gran parte de los casos esporádicos y de la mayoría de brotes virales de gastroenteritis que ocurren en el mundo. La OMS recientemente emitió un informe exhaustivo que estima que en la carga global de las enfermedades transmitidas por alimentos, los norovirus se ubican como la causa número 1, y el número 4 de las muertes de origen alimenticio (8, 9).

Calicivirus

La familia *Caliciviridae* está conformada por virus pequeños (27-40 nm de diámetro) no envueltos, cuyo genoma está constituido por una molécula de RNA (RNA monocatenario), de polaridad positiva, poliadenilada en el extremo 3', de un tamaño de 7-8 kb, que infectan a una gran variedad de mamíferos incluyendo al humano (10). Esta familia de virus está formada por 5 géneros bien establecidos: *Vesivirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus* (11) y cinco géneros propuestos aun no clasificados (Atlantic salmon calicivirus, Bavovirus, Nacovirus, Recovirus, y Valovirus) (Fig. 1). Además un nuevo calicivirus, "Secalivirus" que recientemente ha sido parcialmente secuenciado (12-17) (<http://www.caliciviridae.com/>). Los calicivirus tienen la capacidad de infectar a una gran variedad de hospederos. En animales, el sapovirus porcino y el norovirus bovino causan brotes epidémicos de gastroenteritis en lechones y terneros, respectivamente (18); otros causan enfermedad fatal del hígado en conejos, como el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) perteneciente al género *Lagovirus* (19), la enfermedad del tracto respiratorio superior en gatos causada por el calicivirus felino (FCV) del género *Vesivirus* (20), y la diarrea asociada con el calicivirus porcino entérico (PEC), un miembro del

género *Sapovirus*, entre otros (21). Las cepas de Norovirus que infectan a humanos (HuNoV) del genogrupo GII genotipo 4 (GI.4), son responsables de la mayoría de los brotes, incluyendo pandémicos. Mientras que los síntomas son agudos y se resuelven a los pocos días sin tratamiento, la infección por los HuNoV puede resultar en una enfermedad inflamatoria intestinal o enterocolitis neonatal (22-24). Además se ha reportado que causan infecciones persistentes en poblaciones jóvenes y ancianas (25, 26).

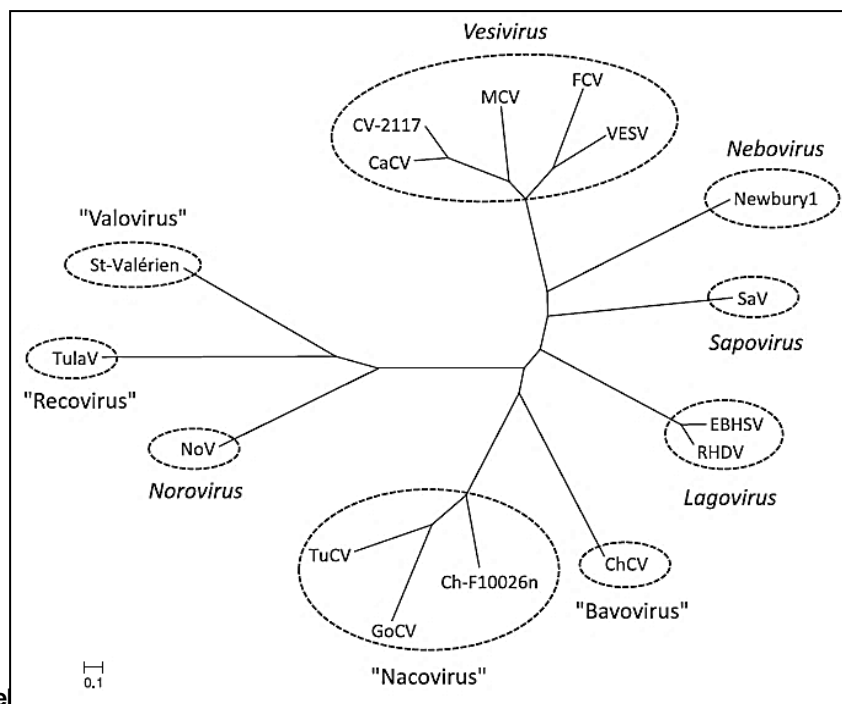


Figura 1. Re El análisis se basó en la longitud total de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 (17).

Los HuNoV, son el principal agente etiológico de gastroenteritis epidémica no bacteriana (27, 28). El virus Norwalk, prototipo de la familia, identificado en 1972, fue el primer norovirus descrito como causa de gastroenteritis en humanos (Fig. 2), pero la epidemiología y la importancia de este patógeno en la salud humana era desconocida, debido a la falta de métodos de cultivo y de diagnóstico eficientes. Durante el inicio de la década de los 90s otros virus semejantes fueron identificados en especímenes fecales por microscopía electrónica, y por su forma

y similitud al agente Norwalk se clasificaron como virus parecidos a Norwalk (Norwalk like viruses) y posteriormente fueron clasificados como norovirus (29).

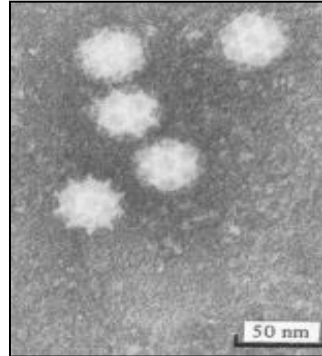


Figura 2. Microscopía electrónica de partículas de virus Calicivirus-like en muestras fecales de humano (30).

Transmisión y Epidemiología

Los norovirus y sapovirus son virus genéticamente y antigénicamente diversos y comúnmente son referidos como calicivirus humanos (HuCVs) (31). Particularmente, los HuNoV pueden causar infección del tracto gastrointestinal, son altamente infecciosos y muy pocas partículas virales son necesarias para causar la infección. El curso de la infección por norovirus es rápido, con un periodo de incubación de 24-48 hrs. Los síntomas comienzan después de 24 hrs de haber ingerido al virus y generalmente la enfermedad se manifiesta con vómito y diarrea con o sin náuseas y dolor abdominal; típicamente la infección por norovirus causa gastroenteritis aguda que se resuelve con los días (32). El HuNoV se puede contraer por comer o beber agua que ha sido contaminada por vómito o heces de gente infectada, también puede propagarse por contacto directo con la persona infectada o a través de superficies contaminadas. El consumo de mariscos crudos o poco cocidos, como las ostras también han sido una fuente de infección (32).

En todo el mundo, aproximadamente uno de cada cinco casos de gastroenteritis aguda (diarrea y vómitos) es causado por norovirus. Mundialmente, se estima que

éstos virus son la causa más común de gastroenteritis aguda, siendo el responsable de 685 millones de casos cada año, 200 millones de los cuales afectan a niños menores de 5 años de edad. Esto lleva a una estimación de 50 000 muertes infantiles cada año, la mayoría de los cuales ocurren en los países en desarrollo. Aunque la mayoría de las muertes ocurren en los países desarrollados, el norovirus es un problema tanto en los países con bajos como con altos estándares de higiene. Cada año se estima que el norovirus causa pérdidas de hasta 60 mil millones de dólares, principalmente debido a los costos de la atención médica (dinero gastado para tratar las complicaciones de norovirus) y a la pérdida de productividad laboral. La cepa de HuNoV más común pertenece al genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) y es la que circula más comúnmente en el mundo, y representa una de las principales causas de brotes; sin embargo, nuevas cepas de norovirus emergen aproximadamente cada 2 a 4 años. A menudo, pero no siempre, estas nuevas cepas conllevan a un aumento de brotes en todo el mundo (8, 32).

Actualmente la División de Enfermedades Virales del Centro de Control de enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (CDC, del inglés: Center of Disease Control) trabaja para identificar alguna manifestación de gastroenteritis aguda causada por norovirus y prevenir brotes de estos virus en todo el mundo (8, 32)

A pesar de su importancia como generadores de enfermedad y de la pérdida económica como consecuencia de los elevados costos hospitalarios y la falta de días laborables generada, los norovirus no han podido ser propagados convenientemente en cultivos celulares, por lo que se han utilizado modelos animales para el estudio de su biología y patogenicidad. Un ejemplo de modelo de estudio es el calicivirus Felino (FCV), que puede propagarse en cultivos celulares y para el cual existen sistemas de genética reversa, lo cual ha permitido generar mucha de la información sobre la biología molecular de esta familia de virus.

Biología de los Calicivirus

Los calicivirus poseen un genoma de RNA lineal de cadena sencilla de 7.4-7.7 kb (7642 nucleótidos) el cual está típicamente organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORFs 1-3) (Figura 3). El genoma de los calicivirus carece de la estructura Cap en su extremo 5' que es característica de los RNA mensajeros eucarióticos; en vez de esto, el RNA viral tiene unido covalentemente a una proteína viral llamada VPg que ha sido considerada como un cap proteináceo debido a que es capaz de reclutar a factores del inicio de la traducción y promover la síntesis de proteínas tanto del RNA genómico como del subgenómico. En seguida a esta, se encuentra la región no traducida (RNT) 5' corta compuesta de los primeros 5 y hasta los 21 nucleótidos según el genoma de cada miembro de la familia, seguida de los tres ORF's. La región 5' proximal del genoma de norovirus codifica a todas las proteínas no estructurales en un solo ORF (ORF 1), mientras que la región 3' proximal se transcribe en un mensajero sub-genómico que codifica a las proteínas estructurales mayoritaria y minoritaria de la cápside (VP1 y VP2) a partir de dos ORFs separados (ORF2 y ORF3 respectivamente), seguidos de una RNT 3' de entre 66-80 nucleótidos y una cola de poli A.

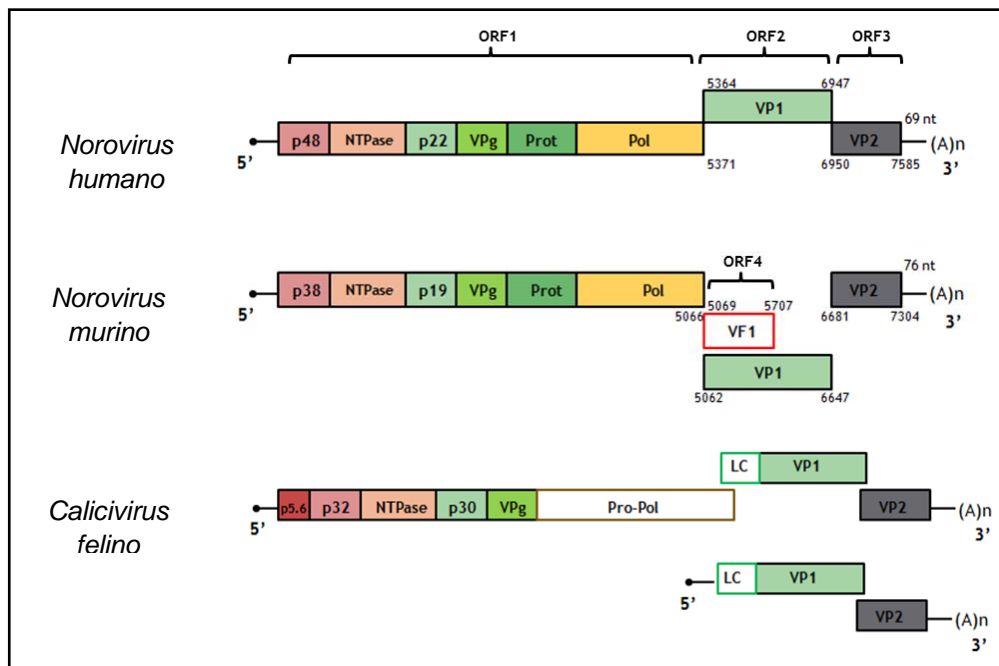


Figura 3. Organización genómica de tres miembros de la familia Caliciviridae. Representación esquemática que muestra el arreglo del genoma y subgenoma viral, mostrándose las proteínas para las que codifica cada RNA (33, 34)

En el caso del genoma del norovirus murino (MNV), que al igual que los HuNoV se clasifica dentro del género *Norovirus*, se ha identificado la presencia de un ORF4 que codifica para una proteína denominada factor de virulencia 1 (VF1), la cual se ha propuesto que participa en la regulación de la respuesta inmune innata (35). Por otro lado, en el caso del FCV el ORF2 produce a una proteína inmadura que es procesada en dos péptidos: la proteína mayoritaria de la cápside VP1 y la proteína líder de la cápside (LC), la cual se encontró asociada al efecto citopático (CPE) (1) (Fig. 3).

Análisis bioinformáticos recientes de los genomas de calicivirus han identificado estructuras secundarias conservadas que incluyen: dos o más estructuras de tallo y burbuja en el extremo 5'; una estructura de horquilla en el extremo 3'; una estructura de tallo y burbuja río arriba de la unión ORF1/2 en la cadena anti-genómica propuesto como un componente del promotor sub-genómico; y una estructura de tallo y burbuja en el extremo 5' de la región codificante de la polimerasa. Todas estas estructuras han sido determinadas como críticas para la replicación (36).

Proteínas virales

Los calicivirus producen una poliproteína a partir del ORF1 que es procesada por la proteasa viral para generar a las proteínas no estructurales maduras y un número de proteínas precursoras. Para el FCV el procesamiento co-traducciona l de la poliproteína produce 6 proteínas no estructurales: p5.6 (NS1), p32 (NS2), p39 (NS3), p30 (NS4), p13 (NS5) y p76 (NS6/7), además de proteínas precursoras (37). En el caso del MNV, el procesamiento de la poliproteína también produce 6 proteínas no estructurales pero con dos principales

diferencias: p5.6 y p32 están fusionadas en NS1/2, mientras que NS6/7 se procesan en NS6 (proteasa viral) y NS7 (RNA polimerasa viral dependiente de RNA) (38). Las proteínas estructurales VP1 y VP2, son generadas a partir de un RNA sub-genómico de aproximadamente 2.3 kb, conformado por los ORF2 y 3 (39).

Proteínas no estructurales

NS1 y NS2. Los primeros péptidos no estructurales codificados en el ORF1 del FCV son p5.6 y p32. La proteína de 23 kDa se cree es análogo de p32 de FCV y con similitud funcional con la proteína 2B de los picornavirus. La proteína p32 del FCV se ha encontrado en complejos de replicación membranosos (40), mientras que el análogo p48 de NV el cual posee un dominio hidrofóbico cerca del C-terminal llamado dominio trans-membrana (TM), interactúa con el regulador SNARE (acrónimo derivado del Inglés **SNAP REceptor**) de las vesículas asociadas a proteínas de membrana asociadas a la proteína A (VAP-A) jugando un papel importante en la fusión de vesículas mediadas por SNARE (41, 42). El hecho de que la replicación de los virus de RNA ocurra sobre membranas intracelulares, hace probable que 2B se coordine con las propiedades de localización de VAP-A (de las siglas en Inglés: Vesicle-associated membrane protein-A) para anclar los complejos de replicación a membranas (42).

NS3 o NTPasa. La proteína p39 de la superfamilia 3 de las RNA helicasas, es capaz de unirse al ATP *in vitro* (43). Esta proteína posee un dominio de unión a NTP similar a la 2C-NTPasa de los picornavirus. Se ha observado que la proteína 2C-like en el RHDV hidroliza nucleósidos trifosfato *in vitro*. En el FCV la colocalización de p39 con los complejos de replicación viral es también indicativa de un posible papel en la replicación (44). Recientemente se identificó que p39 del FCV suprime la respuesta inmune innata del hospedero, evitando la activación de IRF-3 (45).

NS4. La proteína p30 del FCV posee una hélice anfipática, la cual tiene propiedades de asociación a membranas (44). Esta proteína ocupa una posición

en el genoma de los calicivirus similar a la posición de la proteína 3A en los genomas de los picornavirus. La proteína 3A de poliovirus es importante para la localización en membrana de los complejos replicativos (46, 47). De acuerdo a las propiedades asociadas a replicación de 3A, la p30 de FCV se localiza en complejos de membrana con la polimerasa competente en aislados de células infectadas con FCV (40).

NS5 o VPg. La proteína p13 del FCV es una proteína de 15 kDa que se encuentra unida covalentemente a los RNA mensajeros genómicos y subgenómicos en sus extremos 5' (48). VPg desempeña varias funciones en los ciclos replicativos virales (48-50). En el caso de los calicivirus, la VPg recluta a la maquinaria de traducción mediante la interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4E para el FCV, y eIF4G para el MNV, además de su interacción con la subunidad ribosomal 40S. Asimismo, se ha determinado que la separación de VPg del genoma viral causa una inhibición de la síntesis de proteínas. Además de la participación de la proteína VPg en la traducción, VPg actúa como primer para la replicación del genoma viral (152), al igual que en el caso de la replicación del genoma de otras familias de virus como *Picornaviridae* y *Potyviridae* (51-54).

NS6. La proteína 3C o NS6, es la única proteasa de los calicivirus. La NS6 posee una diada catalítica funcional compuesta de His30 y Cys139, similar a la 3CLpro del virus de la hepatitis A. Esta proteasa se ha clasificado como una serina proteasa relacionada con la proteasa 3C de los picornavirus (50). En la mayoría de los miembros de la familia *Caliciviridae*, ésta puede encontrarse como un precursor asociado con VPg, o con la polimerasa viral (NS7), aunque la forma más comúnmente encontrada en células infectadas es como un péptido independiente. Sin embargo, en el caso del FCV la proteína proteasa-polimerasa no es procesada y el bipéptido mantiene las dos funciones de proteasa y de polimerasa (NS6/7) (50, 51, 52). La proteasa viral de los calicivirus es la responsable del procesamiento de la poliproteína producida del ORF1, para dar lugar a las diferentes proteínas virales; para el caso del FCV, la proteasa viral también es responsable del procesamiento de la proteína precursora generada

por el ORF2, para así dar lugar a las proteínas VP1 y LC (55). NS6 es uno de los componentes virales principales para el establecimiento de la infección, entre las diferentes moléculas blanco que podría tener la proteasa de los calicivirus durante la infección, se identificó recientemente a G3BP1, una proteína citoplasmática importante para la formación de los gránulos de estrés citoplásmicos (SGs). El ensamblaje de los SGs se promueve como parte de la respuesta hacia el estrés celular, por lo que, se sugiere que el corte de la proteína G3BP1 por la proteasa del FCV, es una estrategia que el virus utiliza para manipular las vías de respuesta a estrés y posiblemente la respuesta antiviral innata. Sin embargo, el corte de la proteína G3BP1 no ocurre durante la infección por el MNV, lo cual indica que los calicivirus tienen distintos efectos sobre las vías de respuesta a estrés (56).

NS7 ó replicasa viral (RdRp del inglés: RNA dependent RNA polymerase). La NS7 es la RNA polimerasa dependiente del RNA viral (RdRp), esta proteína se encarga de la síntesis de los RNAs genómico y subgenómico viral (57). Son pocos los estudios de cristalografía de las proteínas de los virus de esta familia; sin embargo, se ha reportado que la RdRp de los norovirus presenta elementos estructurales y catalíticos característicos de las RdRp de otros virus de RNA de polaridad positiva como los dominios de dedos, palma y pulgar comunes para todas las polimerasas (58).

VF1 o factor de virulencia. Proteína conocida como factor de virulencia 1, identificada en el genoma del MNV. La identificación de VF1 representa la primera caracterización de una proteína de marco de lectura abierto alternativa para la familia de los calicivirus. Este ORF4 se identificó sobrelapado con el ORF2, pero con un codón de inicio distinto. Su función reguladora de la respuesta inmune y de la apoptosis en las células infectadas, ha proporcionado perspectivas importantes para futuras investigaciones sobre la biología y la patogénesis de los norovirus (35).

LC o proteína líder de a capsid. Recientes ensayos con el FCV, identificaron que el precursor de la cápside codificado por el ORF2 es procesado post-traduccionalmente por la propia proteasa viral para producir dos proteínas maduras: la proteína mayoritaria de la cápside VP1, y una proteína pequeña (124 aminoácidos) llamada proteína líder de la cápside (LC), la cual se ha asociado con el efecto citopático (CPE), y a la activación de caspasas (1).

Proteínas estructurales

Los viriones de norovirus están compuestos de 90 dímeros de la proteína mayoritaria de la cápside VP1, y por una o dos copias de la proteína minoritaria estructural VP2. Ambas proteínas son sintetizadas a partir de un RNA subgenómico que contiene tanto el ORF2 como el ORF3 (59).

VP1. Comprende un rango de 530-555 aminoácidos con un peso molecular calculado de 50-60 kDa. Dos dominios conservados flanquean un dominio variable central en el cual se localizan los determinantes antigénicos que definen la especificidad de la cepa. Las partículas tipo virus (del inglés VLPs o Viral Like particles) pueden ser expresadas y purificadas con una alta fidelidad relativa, y son la fuente de muchos datos recaudados sobre los dominios funcionales y estructurales de VP1 y de las cápsides de los norovirus. Las VLPs se ensamblan en ausencia de VP2, aunque algunas evidencias sugieren que VP2 juega un papel importante en la estabilidad de la partícula (39, 60). VP1 comprende dos dominios principales denominados S por dominio “shell” y P por dominio “protruding” (61) (Fig. 4).

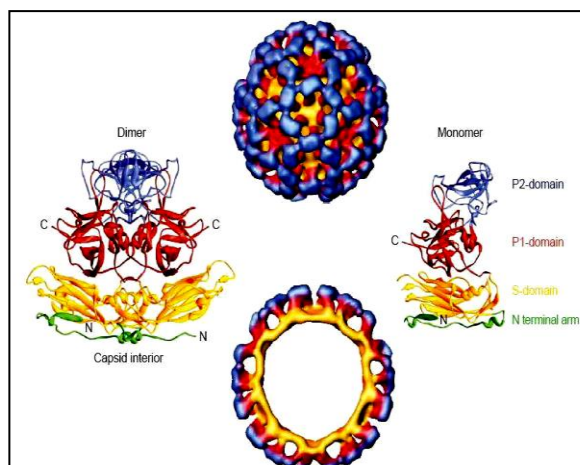


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de partículas similares al virus de Norwalk (NV VLP) resueltas mediante la reconstrucción microscópica crioelectrónica a 22 Å (representación superior, superficie, inferior, sección transversal) y por cristalografía de rayos X a 3.4 Å. Las NV VLP tienen 90 dímeros de proteína de la cápside (izquierda, diagrama de cinta) ensamblados en T=3 simetría icosaédrica. Cada

proteína monomérica de la cápside (derecha, diagrama de cinta) se divide en una región del brazo N-terminal (verde) que mira hacia el interior de la VLP, un dominio de caparazón (dominio S, amarillo) que forma la superficie continua de la VLP y un dominio que sobresale (dominio P) que emana de la superficie del dominio S. El dominio P se divide en subdominios P1 y P2 (rojo y azul, respectivamente) con el subdominio P2 en la superficie más distal de las VLP (61).

Aproximadamente 225 aminoácidos del N-terminal constituyen el dominio S que contiene elementos esenciales para la formación del icosaedro. El dominio P comprende el resto de los aminoácidos y se divide en dos subdominios, P1 y P2. Los dominios P interactúan en contactos diméricos que incrementan la estabilidad de la cápside y de las proyecciones sobre el virión. El dominio P2 es una inserción de 127 aminoácidos, y dentro de éste se localiza la región hipervariable que juega un papel importante en la unión al receptor y reactividad inmune, y es el principal responsable para las interacciones con antígenos del grupo ABO asociados con susceptibilidad a la infección por norovirus (62). Además, se sabe que la proteína VP1 incrementa la actividad de la RdRp del norovirus humano GII.4 y del MNV, teniendo un papel regulador en el ciclo replicativo de los norovirus, por el incremento en la replicación del RNA viral, y su disminución cuando VP1 está ausente (63).

VP2. Compuesta de 208-268 aminoácidos con un peso molecular calculado de 22-29 kDa, exhibe extensas secuencias variables entre las diferentes cepas (62). El papel de la VP2 en el ciclo replicativo aún no se conoce, pero es claro que es una proteína minoritaria estructural presente en una o dos copias por virión, descrita en norovirus y otros calicivirus (37, 64). VP2 no es necesaria para el ensamblaje de las VLPs, pero es esencial para la producción de virus infecciosos, como se determinó para el caso del FCV mediante un sistema de genética reversa (64).

Ciclo replicativo de los calicivirus

El ciclo replicativo de los calicivirus se puede dividir en siete etapas claramente definidas en las cuales se encuentran involucradas diferentes moléculas de la célula huésped: 1) unión al receptor, 2) entrada (mediada por endocitosis o por dinamina y colesterol), 3) liberación del genoma viral, 4) traducción, 5) replicación del genoma viral, 6) ensamblaje y 7) salida de partículas virales (Fig. 5).

Unión a receptor. Los norovirus humanos reconocen antígenos de los grupos sanguíneos (del inglés histo blood group antigens o HBGAs) que se expresan sobre la superficie de células epiteliales de la mucosa. Estos HBGAs son carbohidratos neutros unidos a proteínas o lípidos sobre la superficie celular. La asociación de los norovirus con HBGAs ha demostrado ser fundamental para ciertas cepas de virus. Estudios *in vivo* también demostraron que estos antígenos son esenciales para la susceptibilidad del humano hacia la infección por norovirus (65, 66). Algunos calicivirus animales también se unen a HBGAs incluyendo virus del género *Lagovirus* y *Recovirus*; mientras que algunas cepas del MNV y del FCV además se unen al ácido siálico de células permisivas (32). En el caso particular, del FCV, se identificó una molécula de la superficie celular como receptor de unión conocida como molécula de uniones adherentes 1 (del inglés Junction Adhesion Molecule o JAM-1), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada por varias células, y que está involucrada en la regulación de interacciones célula-célula en el sistema inmune y en la formación de uniones estrechas de la zona apical (67). Por otra parte, se tiene descrito que el MNV utiliza un receptor distinto a una molecular de adhesión, la molécula CD300lf, la cual se encontró que esencial para la unión y replicación en líneas celulares y cultivos primarios(68).

Entrada. Para tener acceso a la célula huésped, los virus, después de reconocer a su receptor en la superficie celular, utilizan algunos componentes celulares para internalizarse. El FCV entra a las células por endocitosis mediada por clatrina de una forma dependiente del pH (69, 70).

Recientemente, se ha descrito que la entrada del MNV es independiente del pH, de clatrina y caveolina, pero dependiente de dinamina II y de colesterol (71-73). Sin embargo, hay reportes de que los virus como carga endosomal, pueden utilizar diferentes vías endocíticas que se sobrelapan con la vía de endosomas tempranos o tardíos (74, 75). En los compartimentos endosomales se encuentran enzimas del huésped que incluyen catepsinas, proteínas involucradas en la fusión de algunos virus y/o desnudamiento de la cápside (76). Un trabajo reciente, sugiere un papel crucial de la catepsina L en la replicación de los calicivirus, y como un posible blanco terapéutico para la infección por los calicivirus (77)

Liberación del genoma viral. Como parte de la entrada, los virus deben liberar su genoma viral en el citoplasma de la célula huésped para llevar a cabo su ciclo replicativo. Este evento crítico durante el ciclo de vida del virus, es generalmente disparado por el ambiente ácido de los endosomas y/o por la unión a receptores celulares (78).

Traducción y replicación del genoma viral. Los virus de RNA de polaridad positiva, cuyo genoma tiene la misma polaridad que la de los RNAm, tienen la capacidad de sintetizar sus proteínas utilizando la maquinaria de traducción de la célula huésped, para posteriormente llevar a cabo su replicación y el resto de su ciclo en el citoplasma de la célula. En el caso del FCV, se conoce que existe una inhibición de la síntesis de proteínas celulares inducida por la infección, que representa una estrategia en la cual reduce la competencia con los RNAm endógenos para utilizar la maquinaria traduccional celular. La proteína VPg, unida covalentemente al genoma viral, es capaz de interactuar con varios factores del inicio de la traducción, y con ello promover una traducción exitosa. VPg, se encuentra unida tanto al RNA genómico como al subgenómico, por lo que participa en la síntesis de las proteínas no estructurales y estructurales (79). En cuanto a la replicación del RNA genómico y subgenómico, este proceso aún es poco conocido; sin embargo, se sabe que la polimerasa viral es la encargada de la síntesis de

ambos RNAs, y este proceso se lleva a cabo en complejos membranosos adosados al retículo endoplásmico en presencia de todas las proteínas no estructurales (79). Así como estudios *in vitro* se encontró que la proteína VPg de Norovirus sirve como primer proteínico para la replicación del RNA subgenómico poliadenilado (80).

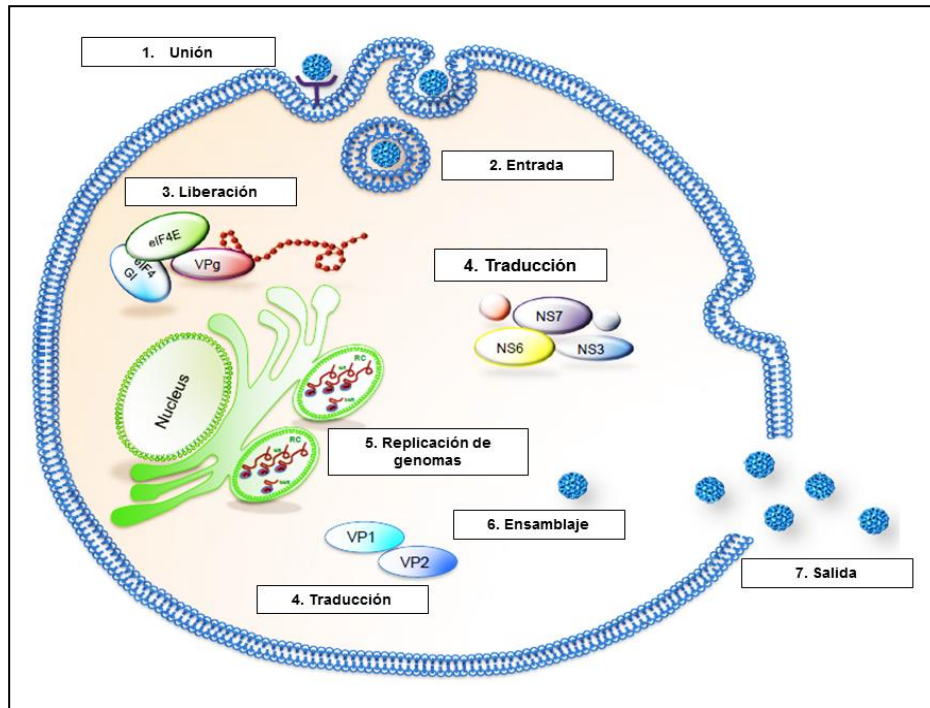


Figura 5. Representación esquemática del ciclo replicativo de los calicivirus.

En años recientes ha quedado ampliamente establecido que el ciclo replicativo de los virus requiere la interacción entre componentes virales y varios factores de la célula huésped. , Particularmente en los virus de RNA de polaridad positiva, la interacción de proteínas de unión a ácidos nucleicos de la célula huésped con elementos de la estructura del RNA usualmente presentes en los extremos 5´ y 3´ del genoma viral, están implicados en la traducción y replicación viral . Estas interacciones a menudo contribuyen a la especificidad de huésped, tropismo de tejidos y patología de las infecciones. Para los calicivirus, se ha reportado la interacción *in vitro* de varias proteínas de unión a ácidos nucleicos de la célula huésped con los extremos 5´ y 3´ del RNA genómico del virus Norwalk (NV), del FCV y del MNV (81).

Entre las proteínas identificadas se encuentran la proteína de unión a poly-C (PCBP), la proteína o autoantígeno La (La), la ribonucleoproteína heterogéneo nuclear L (hnRNP L), la proteína de unión a poly-A (PABP) y la proteína de unión al tracto de polipirimidinas (PTB), todas ellas capaces de unirse a la región no traducida 3' del NV(82). Más recientemente, se estableció que PTB se une a la RNT 5' del FCV, e inhibe la traducción para dar paso a la replicación del RNA del FCV (83). Igualmente se ha descrito que la proteína nucleolina interactúa con el genoma y la región 3' no traducida del FCV, y participa en los procesos de traducción (84, 85). Por otro lado, también se identificó la interacción de las proteínas nucleares PCBP2 y hnRNP A1 con el genoma del MNV, y su participación en la circularización del genoma viral para hacer la replicación más eficiente (86).

Ensamblaje y Salida. Finalmente, una vez que el virus ha sintetizado todas sus proteínas tanto estructurales como no estructurales, y que ha replicado su genoma viral, se lleva a cabo el ensamblaje de las nuevas partículas virales, las cuales eventualmente, saldrán de la célula huésped para infectar a nuevas células. Por estudios de cristalografía de las cápsides virales, se asume que la formación de la cápside es concomitante a la encapsidación del genoma viral, debido a que cuando esta se ensambla, no se forman poros por donde el genoma pueda ser internalizado, como en el caso de poliovirus.

Apoptosis durante el ciclo replicativo de los calicivirus.

Para el caso particular de los calicivirus, se ha descrito que la apoptosis se induce durante la primera mitad del ciclo replicativo, y se ha propuesto que participa en los procesos tardíos de la replicación, particularmente durante la salida del virus de las células infectadas, promoviendo su propagación en el huésped (1, 87-90). La apoptosis o muerte celular programada ocurre en los organismos multicelulares en respuesta a estímulos como radiaciones, agentes químicos e infecciones virales, entre otros. Se caracteriza por un número de cambios

morfológicos y en los distintos procesos bioquímicos, que incluyen encogimiento celular y desprendimiento parcial de sustrato, formación de ampollas en la membrana plasmática, condensación de la cromatina y escisión intranucleosomal (fragmentación del DNA), y en última instancia, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos que son fagocitados sin provocar una respuesta inflamatoria (91, 92). La apoptosis está controlada genéticamente y desempeña funciones en el desarrollo embrionario y homeostasis del tejido adulto, para la formación y el mantenimiento del cuerpo. La apoptosis también juega un papel protector en la eliminación de células que podrían resultar perjudiciales si llegaran a sobrevivir; por ejemplo, eliminación de células que albergan mutaciones después de la irradiación o por daños químicos que podrían dar lugar a la aparición de cáncer, así como la protección contra la infección por virus (6).

La muerte celular apoptótica es iniciada tanto por la vía extrínseca (mediada por un receptor), como por la vía intrínseca (mediada por las mitocondrias). En la vía de receptor de muerte o extrínseca, los receptores como el Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), Fas, y los Receptores de muerte 3, -4, ó -5 (DR-3, DR-4 o DR-5) interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas, que son moléculas con actividad proteolítica en residuos de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas), y con esto desencadenan la muerte de la célula (93). En la vía mitocondrial o intrínseca, una señal determinada de muerte (tal como drogas antineoplásicas, luz UV, radiación ionizante, y virus, entre otras) induce la liberación de proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria tales como el acarreador de electrones citocromo c, Smac/DIABLO, el factor inductor de apoptosis, (AIF), endonucleasa G y serin proteasas. El citocromo C liberado se une a una proteína de andamio, el factor Apaf-1, para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa- 9, la cual una vez activada activa a su vez a las procaspasas 3 y 7. Durante este proceso de activación de

caspasas, hay una regulación negativa de una familia de proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs), como survivina y XIAP (94).

Aunque ambas vías pueden activarse de manera independiente, puede existir una intercomunicación entre ellas. La caspasa 8 que participa en la vía de receptor de muerte, puede cortar a Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2. Bid cortado se trasloca del citosol a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo C del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. De esta manera se conectan las vías extrínseca e intrínseca (95). La actividad proteolítica de las caspasas proporciona las bases bioquímicas para el fenotipo apoptótico (Figura 6).

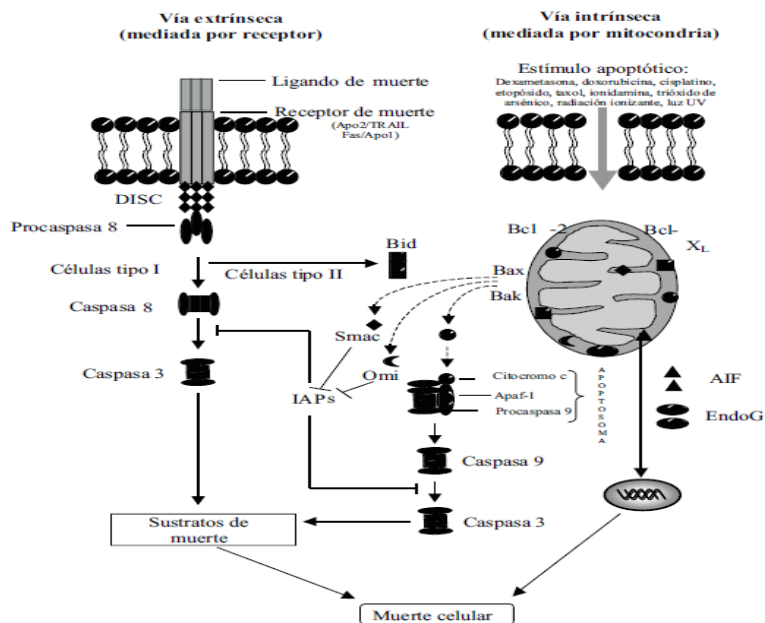


Figura 6. Vías de muerte celular. En la vía extrínseca (mediada por receptor) la unión de un ligando a su receptor de muerte es seguida por la formación del DISC (complejo de señalización inducible por muerte), lo que resulta en la activación de la procaspasa 8. En las células tipo I la caspasa 8 activa a la procaspasa 3, la cual corta a proteínas blanco, conduciendo a apoptosis. En las células tipo II, la caspasa 8 corta a Bid, el cual induce la translocación, oligomerización e inserción de Bax y/o Bak en la membrana externa mitocondrial.

Esto es seguido por la liberación de varias proteínas del espacio intermembranal mitocondrial, incluyendo a Smac/DIABLO, Omi y citocromo C. Este último forma un complejo citosólico (apoptosoma) con Apaf-1 y la procaspasa 9. Esto resulta en la activación de la procaspasa 9, la cual activa a la procaspasa 3. **En la vía intrínseca (mediada por mitocondria)**, las señales de muerte inciden directa o indirectamente en la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma. Esta vía de muerte celular es controlada por proteínas de la familia de Bcl-2. La vía intrínseca puede funcionar a través de mecanismos independientes de caspasas, implicando la liberación desde la mitocondria y la translocación hacia el núcleo de AIF y endonucleasa G. Se ha comprobado que todos los estímulos apoptóticos mostrados inducen la liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria.

Caspasas.

Las caspasas son una familia de proteasas involucradas principalmente en la apoptosis y en la activación de citocinas (Earnshaw, et al.1999). Las caspasas implicadas en la apoptosis se dividen generalmente en dos categorías: las caspasas iniciadoras, que incluyen a la caspasa 2, 8, 9 y 10, y las caspasas efectoras, que incluyen a la caspasa 3, 6 y 7. Una caspasa iniciadora se caracteriza por tener un prodominio N-terminal extendido (>90 aminoácidos) importante para su activación, mientras que una caspasa efectora contiene de 20-30 residuos en la secuencia del prodominio. Todas las caspasas se producen en las células como zimógenos catalíticamente inactivos y deben experimentar activación proteolítica durante la apoptosis. La activación de una caspasa efectora es realizada por una caspasa iniciadora a través del corte en un residuo específico interno de asparagina (Asp) que separa a la subunidad mayor de la otra menor, mientras que las caspasas iniciadoras son autoactivadas. Estas últimas contienen invariablemente uno de dos dominios de interacción proteína-proteína: el CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) o el DED (dominio efector de muerte). Estos dominios interactúan con dominios similares presentes en proteínas adaptadoras oligomerizadas y de esta manera se reclutan caspasas iniciadoras que al estar en estrecho contacto unas con otras facilitan su autoactivación (96). Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsables del corte proteolítico de un amplio espectro de blancos celulares, conduciendo finalmente a la muerte celular. Los sustratos celulares conocidos incluyen

componentes estructurales (como actina y la lámina nuclear), proteínas regulatorias como la DNAPK (proteína cinasa activada por DNA), inhibidores de desoxirribonucleasa como ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasa) y otras proteínas proapoptóticas y caspasas (95).

Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).

La actividad de las caspasas está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis o IAPs (94). Las IAPs, fueron originalmente identificadas en baculovirus, por su capacidad de suprimir la apoptosis en células infectadas del hospedero para facilitar la replicación viral (97). Se ha sugerido que la acción de estas moléculas ocurre por medio de una interacción directa con las caspasas (98). En mamíferos se han identificado ocho distintas IAPs, siendo las más estudiadas la XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina y MLIAP/Livina (99). La unidad funcional en las IAPs es el repetido IAP baculoviral o BIR (por sus siglas en inglés: Baculoviral IAP Repeat), el cual contiene 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen tres dominios BIR cada una, exhibiendo cada dominio funciones diferentes. En estas IAPs el dominio BIR3 inhibe potentemente la actividad de la caspasa 9 procesada, mientras que la región de unión entre los dominios BIR1 y BIR2 inhibe selectivamente a las caspasas 3 y 7 (100).

La proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP) es una de las IAPS más estudiadas y uno de los inhibidores endógenos de la apoptosis más potentes (94, 101). XIAP, cIAP1 y cIAP2, pueden inhibir directamente algunas caspasas (98), mientras que survivina, la proteína más pequeña de la familia de las IAPs, interactúa y actúa como cofactor con XIAP para inhibir específicamente a la activación de la caspasa-9, es por esto que la regulación negativa de survivina correlaciona con la progresión de la apoptosis (102, 103).

La liberación de citocromo C está acompañada con la salida de una proteína proapoptótica denominada Smac/DIABLO (del Inglés Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) en respuesta al estímulo pro-apoptótico. Smac/DIABLO madura se une y neutraliza la capacidad inhibitoria de las caspasas de XIAP y algunas otras IAPs (104). Promoviendo con esto la degradación de XIAP y survivina vía proteasomal debido a su auto-ubiquitilación.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha propuesto que durante la infección por calicivirus, se induce la apoptosis para facilitar la difusión de la progenie viral en el hospedero (87, 89, 90). Además, durante este proceso no se genera una respuesta inflamatoria, con lo que estos virus pueden evadir a la respuesta inmune del hospedero, la cual limitaría la replicación viral por la destrucción de las células infectadas (6).

Particularmente durante la infección con el FCV, se han descrito varios de los cambios morfológicos de la apoptosis vía mitocondrial inducida durante la infección. Se ha reportado la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial en las células CrFK infectadas, y se ha detectado la traslocación de la proteína pro-apoptóticas Bax a la mitocondria, propiciando la salida de citocromo C, lo cual activa a las caspasas -8,-9 y -3 (88). También se ha documentado el corte de PARP(del inglés Poly (ADP-ribose) Polymerases), una proteína involucrada en la reparación del DNA, que durante la apoptosis es inactivada por el corte de caspasas efectoras (como caspasa 3), formando un fragmento de 89 KDa, el cual es utilizado como un marcador de apoptosis, así como la presencia de núcleos picnóticos detectados mediante inmunofluorescencia, que correlaciona con el efecto citopático en células infectadas (87). Desde el descubrimiento de que el MNV-1 crece en las células RAW 264.7, se tuvo el primer sistema de cultivo celular en el que se estudió el papel de la apoptosis en la infección por norovirus (90). En este sistema se ha

demostrado que la replicación activa del MNV-1 induce apoptosis vía mitocondrial, reportándose la salida de citocromo C, la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3, posiblemente como resultado de la regulación a la baja de la survivina y corte de PARP en estadios tardíos del proceso apoptótico (88, 90). La inhibición directa de caspasas recién activas es permitida debido a la familia de las Proteínas Antiapoptóticas (IAPs); un grupo de supresores de apoptosis, el cual confiere protección de un estímulo inductor de muerte a través de su interacción directa con las caspasas (105). Entre los miembros más estudiados de esta familia están, la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma (XIAP) la cual es la proteína inhibidora de la apoptosis más potente (106, 107). XIAP, cIAP1 y cIAP2, pueden inhibir directamente a algunas caspasas (98), mientras que survivina, la IAP más pequeña, interactúa y actúa como un cofactor estabilizando a proteínas como XIAP para inhibir específicamente la activación de caspasa-9 activa, es por esto que la regulación negativa de survivina correlaciona con la inducción de la apoptosis (108, 109).

La liberación de citocromo C hacia el citosol está acompañada por el escape de Smac/DIABLO. En respuesta a un estímulo proapoptótico, Smac/DIABLO maduro se une y neutraliza las propiedades inhibitorias de caspasas de XIAP y de otras IAPs (110). La habilidad de XIAP para reprimir la forma activa de caspasa-9 dentro del complejo apoptosoma es abolida debido al desplazamiento de XIAP de caspasa-9 por Smac/DIABLO.

Existe la evidencia de que la traslocación y activación de algunas de estas moléculas involucradas en la apoptosis como lo es la traslocación de Bax dentro de mitocondria, liberación de citocromo C, y activación de caspasa-9 y -3 ocurre durante la infección con el FCV y MNV (88, 111-113). De esta manera, survivina, un miembro de la familia de las IAPs, es regulada negativamente durante la infección con el MNV (113, 114). La regulación negativa de survivina ocurre cuando ocurre la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas virales, correlacionando con la activación de caspasas y con el establecimiento

de la apoptosis vía intrínseca durante la infección con el MNV (113). Así como en nuestro laboratorio tenemos el antecedente que durante la infección con el FCV, existe una regulación negativa de survivina y de la salida de Smac/DIABLO a partir de las 5hpi, correlacionando con el establecimiento de la apoptosis (Tesis de Oscar Barrera, 2014).

Sin embargo, se ha descubierto que la infección viral activa no es la responsable de la regulación negativa de survivina, así como de la inducción de la apoptosis, sino que son determinados factores virales de los calicivirus los responsables de la inducción de la apoptosis. Se encontró que la expresión del ORF1 del MNV induce la regulación negativa de survivina y la apoptosis en un sistema libre de virus (114) así como que de la NTPasa de HuNoV tiene actividad proapoptótica (115). Por otro lado, durante la infección con el FCV la expresión de la proteína LC, (116), causa un redondeamiento celular típico del efecto citopático inducido en células CrFK así como la activación de caspasas (1). Sin embargo, el factor viral responsable de la regulación negativa de survivina durante la infección por el FCV aún se desconoce.

Por otra parte se tiene reportado que la inducción de apoptosis también se ve asociada con la expresión de proteasas virales, como lo son los de la familia *Picornaviridae* (100, 117, 118), en donde tienen como blanco la mitocondria la cual está asociada a la inducción de apoptosis intrínseca. Sin embargo, debido a la relación filogenética que tiene la familia *Picornaviridae* con *Caliciviridae* (119, 120), el estudio de la proteasa viral podría elucidar si está asociada con la apoptosis.

JUSTIFICACIÓN.

Los calicivirus inducen la apoptosis celular como parte de las estrategias para replicarse, lo que implica la activación y represión de ciertos factores celulares; sin embargo, muchos de los aspectos de este proceso aún son desconocidos.

El entender las moléculas que intervienen en la inducción de la apoptosis inducida por los calicivirus nos permitirá conocer más acerca de su biología así como generar información que repercuta en las estrategias de control de la infección con estos virus.

HIPÓTESIS

La regulación negativa de survivina es una de las causas de la inducción de la apoptosis durante la infección por el FCV y la apoptosis es un proceso necesario para facilitar la salida eficiente del virus.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si el control de la expresión de survivina tiene un papel en la replicación del FCV.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el efecto de la presencia de survivina en eventos tardíos de la infección con FCV.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de survivina en el ciclo replicativo del FCV.
- Determinar si la proteína no estructural NS6/7 y/o la estructural Líder de la cápside (LC) del FCV son responsables de la degradación de la proteína anti-apoptótica survivina en un sistema libre de virus.

MATERIALES Y METODOS

Virus y líneas celulares

La propagación viral y los ensayos de infección con el FCV se llevaron a cabo en células de riñón de felino Crandel Reese (CRFK). Las células CRFK se mantuvieron en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% a 37°C con 5% de CO₂. La propagación y los ensayos de infección con el MNV-1 se llevaron a cabo en la línea celular de macrófagos de la leucemia de murino, RAW 264.7, utilizando DMEM con SFB al 10%, a 37°C con 5% de CO₂.

Propagación viral

Los ensayos de propagación se llevaron a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 para ambos virus, mientras que los ensayos de infección se realizaron a una MOI de 5. El título viral se calculó por ensayos de plaqueo mediante la cuantificación del número de placas producida en diluciones seriadas en base 10.

Para lo ensayo de infección, las células RAW264.7 y CrFK se infectaron con el virus MNV o FCV a una MOI de 5, en medio MEM libre de suero, y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las células no infectadas, únicamente se incubaron con medio MEM libre de suero y virus a 37°C a las mismas condiciones que las infectadas. Después de ese tiempo, se removió el medio de las células infectadas y los controles, se lavaron con PBS de dos a tres veces y se les colocó medio MEM completo con suero al 2%. La infección se dejó transcurrir por el tiempo indicado a 37°C.

Anticuerpos

Para los ensayos de inmunofluorescencia en ambas líneas celulares, los anticuerpos primarios comerciales anti-survivina, anti-XIAP, (amablemente donados por el Dr. Nicolás Villegas) anti-Smac/DIABLO y anti-proteína de la cápside (VP1) del FCV (SantaCruz Biotechnology, SantaCruz, CA), se diluyeron en PBS 1:50, 1:100, 1:100, 1:300, respectivamente y se aplicaron sobre las células toda la noche a 4°C. El anticuerpo dirigido contra la proteína VPg

(amablemente donado por el Dr. Ian Goodfellow) del MNV-1, se diluyó 1:300, en solución de bloqueo e incubado con las células por 1 h a 37°C. Los anticuerpos secundarios Alexa 488 y Alexa 594 se diluyeron 1:300 en PBS, aplicados 1 h a temperatura ambiente.

Para los ensayos de Western blot en ambas líneas celulares, los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-Tween 20 (TBS-T): anti-survivina (1:1000), anti-XIAP (1:1000), anti-CRFP (1:500), y anti-nucleolina (SantaCruz Biotechnology, SantaCruz, CA), (1:10,000); anti-NS7 y anti-NS3 (amablemente donados por el Dr. Ian Goodfellow), (1:10,000) y anti-actina (amablemente donados por el Dr. Manuel Hernández), (1:8000) se diluyeron en TBS-Tween. Los anticuerpos secundarios para la detección de XIAP, survivina, NS3 fue HRP anti-conejo (1:10000) nucleolina, HRP anti-conejo (1:500), NS7, y actina fue utilizado HRP anti-ratón (1:10000), todos se diluyeron en TBS-T.

Extractos celulares

Para la obtención de extractos totales de proteínas, las células CrFK y RAW 264.7, se cultivaron hasta una confluencia del 80-90% en placas Petri de 100 mm. Se lavaron dos veces con PBS (NaH₂ PO₄ 0.24 g, Na₂ HPO₄ 1.44 g, NaCl 0.8 g, KCl 2 g) 1x frío y se infectaron o no con el FCV o el MNV respectivamente, a una MOI de 5. Pasado el tiempo de infección indicado en cada experimento, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se sometieron a agitación orbital 10 minutos a temperatura ambiente con 700 µl de amortiguador de lisis (ProteoJet™) suplementado con inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Se cosecharon con un gendarme y los extractos obtenidos se clarificaron mediante 20 minutos de centrifugación a 13000 rpm y a 4°C. Los extractos se separaron en alícuotas y se almacenaron a -70°C.

Western blot.

Células CrFK no infectadas e infectadas con el FCV se lavaron con PBS, se lisaron con buffer Laemmli, y se hirvieron por 10 min. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% por 2 h e incubaron a 4°C toda la noche con los anticuerpos indicados. Los blots se lavaron con TBS-Tween al 0.05% , e incubaron por 2h con los anticuerpo secundarios apropiados y se revelaron usando quimioluminiscencia (PIERCE). La cuantificación de la proteína se realizó mediante el análisis de la intensidad de las bandas escaneadas usando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y expresado en unidades arbitrarias.

Inmunofluorescencias.

Las células CrFK se crecieron toda la noche en cubre objetos e infectaron con el FCV a una MOI de 5. A los tiempos post-infección indicados las células se lavaron con buffer de citoesqueleto por 5 min y se permeabilizaron con una solución de paraformaldehído-tritón X100 al 4% por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 5 min, se bloquearon con PBS con gelatina al 0.5% por 40 min a TA, se lavaron 3 veces con PBS por 5 min, e incubaron con el anticuerpo correspondiente a 4°C toda la noche. Las muestras se lavaron 3 veces con buffer de fosfato (PBS) por 5 min, e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Invitrogen) por 1 h a TA. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, e incubaron con 1 mg/ml de 4´6´-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 2 min. Las muestras se lavaron 6 veces con PBS y 3 veces con agua bidestilada. Las muestras se trataron con el medio de montaje Vecta-Shield (Vector Laboratories A.C.) y analizaron mediante el uso de un microscopio confocal Zeiss LSM-700. Para la tinción mitocondrial, las células se marcaron *in vivo* con 50 nM de Mito Tracker Deep Red en un medio libre de suero durante 15 min a 37°C antes de fijar.

Tratamiento con lactacistina.

Células CrFK se trataron con lactacistina a una concentración al 25 μ M (Santa Cruz Biotechnology), en medio MEM libre de suero fetal bovino por 1 h antes de la infección; posteriormente, el medio con lactacistina se removió para dar paso a la adsorción viral del FCV (MOI de 5) durante 1 h, después se añadió medio MEM de mantenimiento con lactacistina a la concentración antes mencionada y la infección se permitió progresar hasta los tiempos indicados. La viabilidad de las células tratadas con lactacistina se cuantificó con el reactivo CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) (Promega).

Construcción de los plásmidos.

Cada fragmento del DNA correspondiente del mRNA de la secuencia de survivina *Felis catus* se amplificó a partir de cDNA proveniente de células CrFK no infectadas usando la DNA polimerasa PFU (Thermo Fisher Scientific) y el par de primers: FW5'-AGTCAGAATTCATGGGCGCTTCGTCGTTG-3', y RV5'-ACTCCGGATCCGCCTCCAGGGCCGCCAGCTGC-3'. La secuencia de los primers utilizados incluyen los sitios de reconocimiento para las enzimas EcoRI y BamHI. El amplicón se clonó en el vector de tránsito pJET (Thermo Fisher Scientific), y se sub-clonó dentro del vector de expresión pAmCyan-N1 (Clontech Laboratories, Inc) digerido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para generar el plásmido pAmCyan-survivin. Para la expresión de la proteína LC del FCV, la región de interés se amplificó por PCR del plásmido pQ14 el cual contiene el genoma completo del FCV Urbana (amablemente donado por la Dra. Kim Green) usando la DNA polimerasa PFU (Thermo Fisher Scientific) y el par de primers: FW5'-ACTGGCTCGAGATGTGCTCAACCTGCGC-3' y RV5'-GCACAAGCTTTTCCAATCTGAACAATGGC-3'. Las secuencias de primers incluyen los sitios de reconocimiento para las enzimas XhoI y HindIII. El

amplicón se clonó dentro del vector de tránsito pJET (Thermo Fisher Scientific), y se subclonó en el vector pAmCyan (Clontech Laboratories, Inc) digerido con las enzimas XhoI y HindIII para generar el plásmido pAmCyan-LC. Ambos plásmidos se secuenciaron para corroborar que la secuencia clonada fuera la correcta.

Transfección transitoria en CrFK

Monocapa subconfluentes de células CrFK se transfectaron en placas de 6 pozos con 3.5 µg de plásmido Cherry y Cherry-NS6/7 (amablemente donados por el Dr. Ian Goodfellow, University of Cambridge UK) pAm-Cyan, -pAm-Cyan, -pAm-Cyan-survivina o pAmCyan-LC usando Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante durante 24 o 48 h.

Transfección transitoria de células RAW 264.7

Monocapas de células RAW 264.7 fueron transfectadas en cajas de 6 pozos con 3.5 µg de los plásmidos pAm-Cyan-survivina o pAmCyan usando TransIT®-Transfection Reagent (Mirrus Bio LLC) de acuerdo a las instrucciones del fabricante durante 24 or 48 h.

Ensayo de entrada por inmunofluorescencia

Células CrFK se crecieron toda noche en cubre-objetos y transfectadas con pAm-Cyan-survivina o pAmCyan durante 48h y se infectaron con FCV a una MOI of 10 por 30 min a 4°C. Las células se trataron con buffer de citoesqueleto por 5 min y se fijaron con paraformaldehído al 4% o permeabilizaron con formaldehído tritón X100 al 4% a temperatura ambiente

(TA) por 5 min. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 5 min, posteriormente se bloquearon con PBS al 0.5% de gelatina por 40 min a TA, se lavaron con PBS 5 min, y se incubaron con el anticuerpo correspondiente a 4°C toda la noche. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS frío por 5 min, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Invitrogen) por 1 h a TA. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, e incubaron con 1 mg/ml de 4´6´-diamidino-2-phenylindol (DAPI) por 2 min. Las muestras se lavaron 6 veces con PBS y 3 veces con agua bidestilada. Las muestras se lavaron con Vecta-Shield liquid mounting media (Vector Laboratories A.C.) y se analizaron mediante microscopía confocal Zeiss LSM-700.

Ensayos de unión viral por Citometría de Flujo

El ensayo de unión viral fue realizado bajo una metodología previamente descrita. Células CrFK (1×10^6) fueron lavadas una vez con PBS e incubadas con 3×10^5 partículas virales del FCV, por 30 min a 4°C. Posteriormente las muestras fueron fijadas con PBS PFA 4% , bloqueadas con PBS/FBS al 10% por 30 min y lavadas 2 veces con PBS e incubadas con el anticuerpo anti-FCV (FCV1-43, Santa Cruz Biotechnology), que reconoce un epítotope en la proteína de la cápside, por 1 h a 4°C. Después, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con el anticuerpo correspondiente durante 1 h a 4°C.

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y analizados en el citómetro de Flujo FACSCytoflex(Becton Dickinson, Franklin Lakes, MN).

Microscopía electronica de transmisión (MET)

Para el inmuno-marcaje con oro, las células CrFK se transfectaron con los plásmidos pAm-Cyan y LC-pAm-Cyan por 24 h, se infectaron por 5 h con el

FCV a una MOI de 5, se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con PFA al 4% y glutaraldehído al 0.5% en PBS por 1 h a TA y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol. Las muestras se incluyeron en resina LR White (London Resin Co) y se dejaron polimerizar durante 48 h bajo radiación UV a 4°C. Se obtuvieron cortes finos, de 60 nm y se montaron en canastillas de nickel, e incubaron toda la noche (TN) con el anticuerpo policlonal anti-CRFP (Clontech) o el anticuerpo anti-VP1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:5) y con el anticuerpo IgG anti-conejo o anti-ratón conjugado a partículas de oro de 20 nm por 1h (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA; 1:50). Los anticuerpos se diluyeron en PBS con suero fetal bovino al 5%. Después de la incubación con los anticuerpos las muestras se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinado en el microscopio electrónico de transmisión Joel JEM-1011.

RESULTADOS

El tratamiento con lactacistina evita la degradación de survivina

En nuestro laboratorio tenemos resultados previos donde durante la infección con el calicivirus felino la proteína antiapoptótica survivina era regulada negativamente (Tesis Oscar Barrera, 2014), por lo que fue de nuestro interés evitar su degradación por lo que procedimos a utilizar el inhibidor proteasomal lactacistina, para esto, las células CrFK se trataron con diferentes concentraciones del inhibidor lactacistina durante 12h, y posteriormente se determinó la viabilidad con MTT para seleccionar la concentración óptima del inhibidor, que no alterara la viabilidad celular (Fig. 7A). Las células CrFK se trataron o no con el inhibidor proteasomal lactacistina a una concentración de 25 μ M durante 1h, se infectaron o no con el FCV a una MOI de 5, y nuevamente se les añadió medio con el inhibidor

durante el tiempo restante de la infección. Pasadas 6h, se obtuvieron extractos celulares y los niveles de expresión de survivina y XIAP se determinaron mediante ensayos de western blot. El tratamiento con lactacistina evitó la degradación tanto de survivina como de XIAP en las células infectadas, y no así en las no tratadas, corroborándose que ambas proteínas son degradadas por la vía proteasomal durante la infección (Fig. 7B).

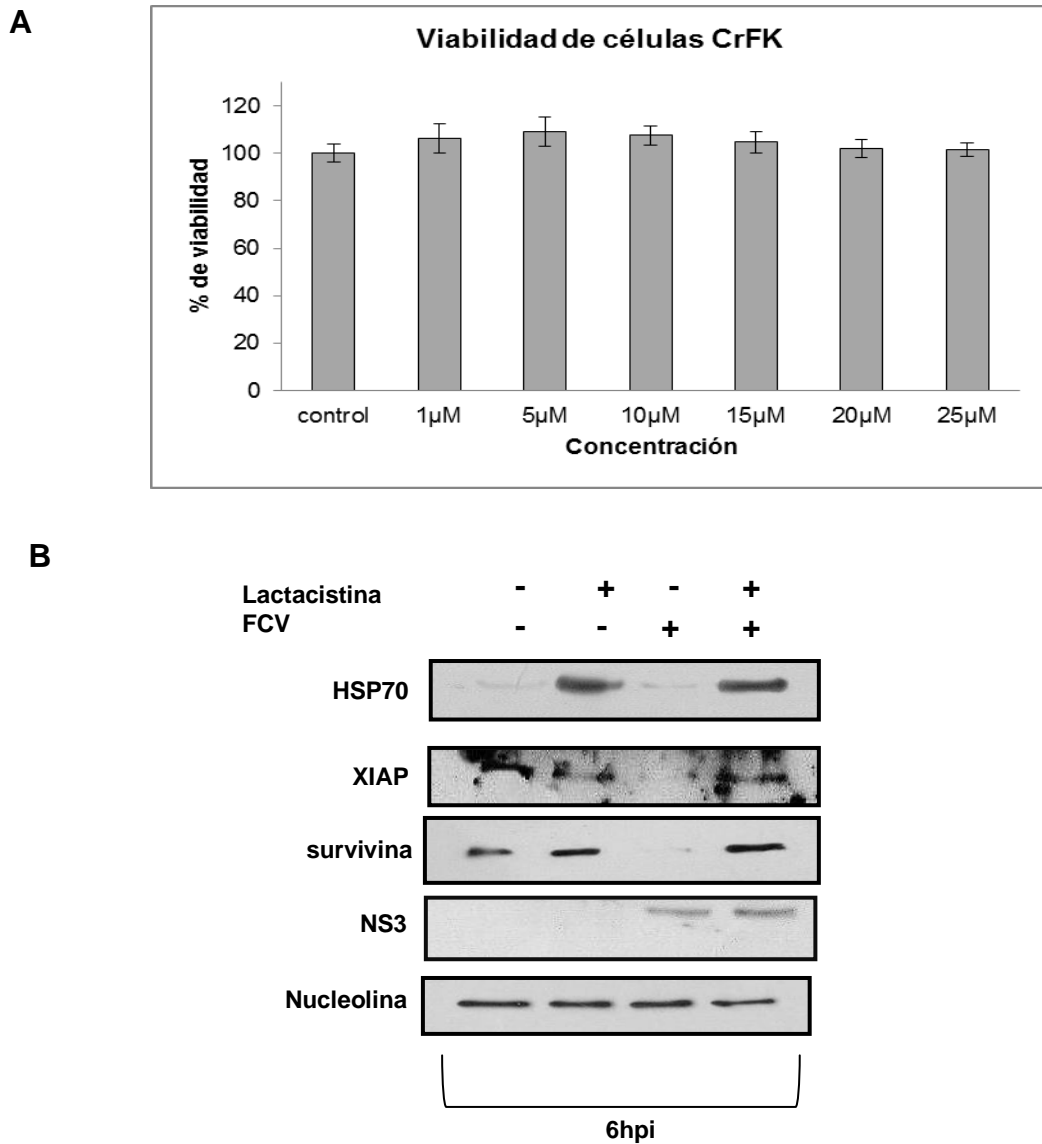


Fig. 7. El tratamiento con lactacistina no afecta la viabilidad de las células CrFK y evita la degradación de survivina y XIAP A) Curva de viabilidad de células CrFK las cuales se trataron con

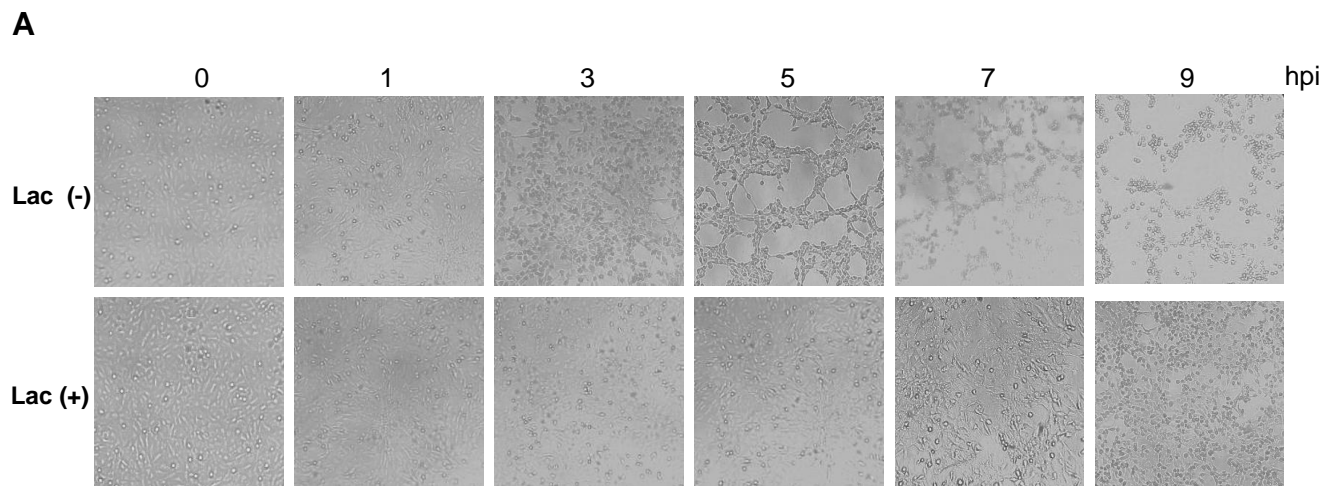
concentraciones crecientes del inhibidor proteasomal lactacistina durante 12h. B) Extractos de proteínas totales de células tratadas o no con lactacistina, no infectadas o infectadas por 6h, se analizaron por SDS-PAGE. La expresión de survivina y XIAP se analizó por western blot usando anticuerpos específicos. NS6/7 es marcador de infección viral.

Survivina previene la apoptosis y afecta la salida del FCV en células CrFK.

Habiendo corroborado que tanto XIAP como survivina eran degradadas vía proteasomal durante la infección por FCV, fue de nuestro interés evaluar el efecto del tratamiento con lactacistina sobre XIAP y survivina a distintos tiempos post-infección. Para ello, las células CrFK se trataron con 25 μ M de lactacistina y se infectaron, como se describió en la figura 7. Al evaluar el efecto citopático (CPE) producido durante la infección con el FCV en las células tratadas con lactacistina, se pudo observar un retraso de al menos 3 horas de la inducción de dicho efecto, comparado con las células infectadas que no fueron tratadas (Fig. 8A). Asimismo, al evaluar los niveles de survivina y XIAP en los extracto celulares, observamos que como en los experimentos anteriores, la presencia de lactacistina impide la degradación de ambas proteínas a los diferentes tiempos post infección. Al evaluar la progresión de la apoptosis por medio del procesamiento de caspasa 3 y PARP, pudimos apreciar que ninguna de estas proteínas fueron procesadas en presencia de lactacistina hasta las 7 hpi, a diferencia de las células no tratadas e infectadas, en donde se observa claramente la activación de la caspasa 3 y el consecuente procesamiento de PARP desde las 5 hpi (Fig 8B).

Debido a la ausencia de la apoptosis hasta las 7 h de infección, en condiciones donde se previene la degradación de survivina por el tratamiento con lactacistina, quisimos determinar si survivina tendría o no un efecto en la producción o salida de partículas virales. Para esto, cuantificamos la producción de partículas virales tanto en la fracción

asociada a la células como en el sobrenadante a las 5, 7, y 9 hpi de células tratadas o no con lactacistina mediante ensayos de plaqueo (Fig. 8E). El tratamiento con lactacistina, no causó ninguna reducción estadísticamente significativa en el título de las partículas virales asociadas a la célula, en comparación con la producción viral de las células no tratadas (Fig. 8E). Sin embargo, el título viral presente en el sobrenadante tuvo una reducción estadísticamente significativa a las 5, y 7 hpi (Fig.8F). Nuevamente, la expresión de proteína viral NS3 fue semejante en las condiciones en ausencia y presencia de lactacistina. Estos resultados indicaron que los niveles endógenos de survivina no afectan la replicación viral, sino que tiene efectos solamente en la salida del virus, en concordancia con noción de que el hecho de que la apoptosis intrínseca es requerida para la diseminación del virus dentro del hospedero como ya ha sido demostrado.



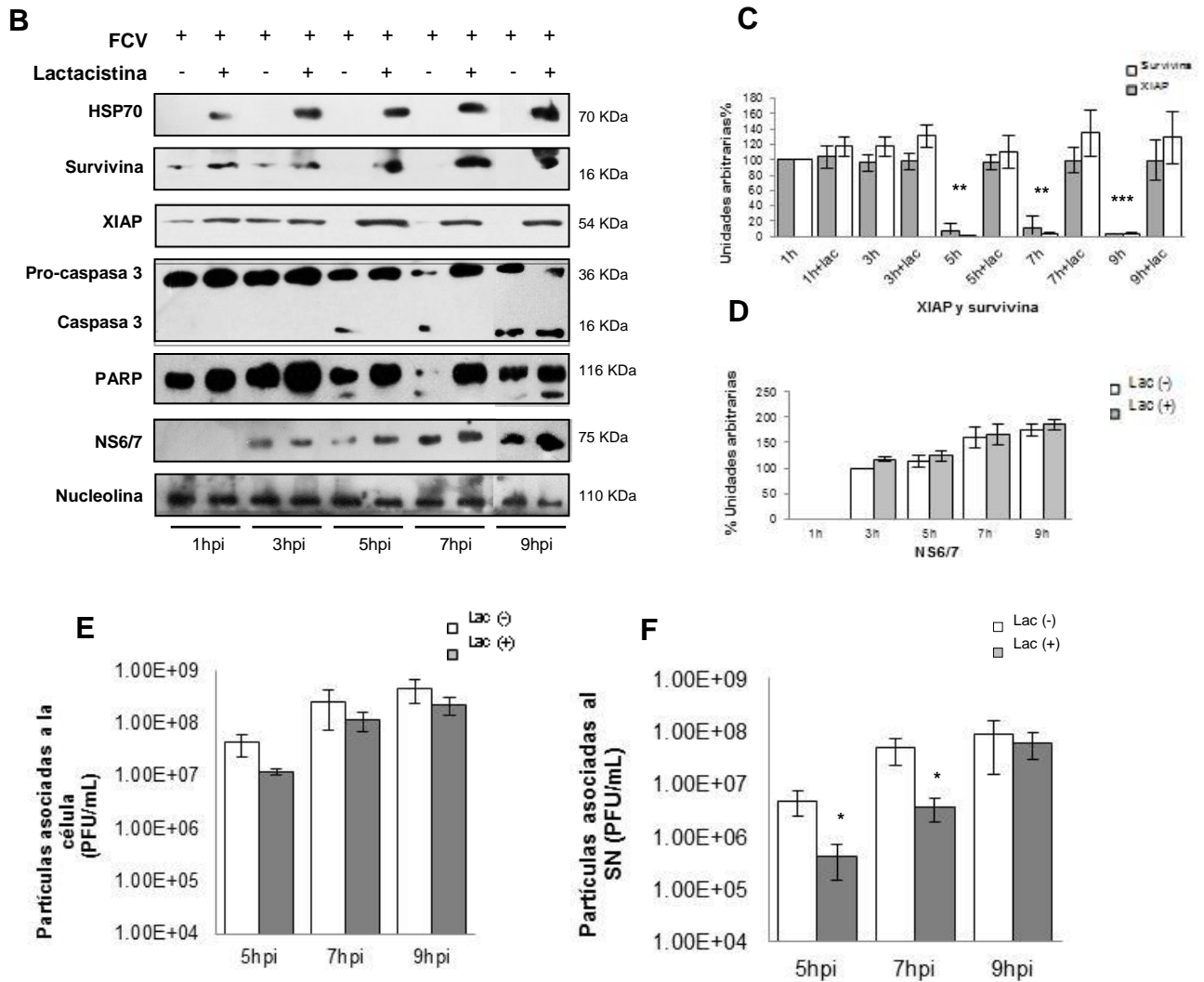


Fig. 8. El tratamiento con lactacistina retrasa la degradación de survivina y afecta la salida FCV de las células CrFK. A) Células infectadas con el FCV a una MOI de 5, se trataron o no con el inhibidor proteasomal lactacistina y el efecto citopático (CPE) se analizó por microscopía de campo claro. B) Se obtuvieron extractos proteicos totales de células no infectadas e infectadas a las 1, 3, 5, 7 y 9 h, tratadas o no con lactacistina y se analizaron por SDS-PAGE. La expresión de survivina y XIAP fue analizado por western blot usando anticuerpos específicos. NS6/7 indica la infección viral; procaspasa-3 y procesamiento de PARP indica la activación de caspasa-3 ; HSP70 se uso como marcador de inhibición proteasomal y nucleolina como control de carga. C) y D) Densitometrías de las bandas cuantificadas mediante el uso del software ImageJ y expresadas como unidades arbitrarias. Las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 experimentos independientes. E) Cuantificación de las partículas virales asociadas a la célula y F) al sobrenadante obtenidas a las 5, 7 y 9 hpi y cuantificadas por ensayo de plaqueo. Las desviaciones estándar fueron obtenidas de duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), fueron calculados usando el software GraphPad Prism 7.00..

La sobre-expresión de survivina tiene un efecto negativo en la producción del FCV.

Cuando el proteasoma fue inhibido, los niveles de survivina endógena se mantuvieron en células infectadas, lo cual trajo como consecuencia la inhibición de la apoptosis y con ello una salida deficiente del FCV. Sin embargo, resultaba interesante a fin de evaluar mejor el papel de survivina durante la replicación viral determinar si la sobre-expresión de survivina tenía algún efecto en la replicación del FCV. Para ello, la región codificante del mRNA de survivina de *Felis catus* fue clonado en el vector de tránsito pJET y posteriormente subclonado en el vector de expresión pAm-Cyan-N1, denominándolo pAm-Cyan survivina. Una vez obtenido el plásmido pAm-Cyan-survivina, las células CrFK se transfectaron tanto con este vector pAm-Cyan-survivina y pAm-Cyan durante 48h y se infectaron con el FCV a una MOI de 5 por 5, 7 y 9 h y el efecto citopático y el rendimiento viral de la fracción asociada a la célula fueron analizadas por microscopía en campo claro y ensayo de plaqueo respectivamente (Fig. 9) La sobre-expresión de survivina generó un retraso en el efecto citopático causado por la infección del FCV (Fig. 9A, panel inferior) en comparación con las células transfectadas con el vector pAm-Cyan (Fig. 9A, panel superior). En concordancia con los resultados obtenidos con el tratamiento con lactacistina, la producción viral en los sobrenadantes de las células transfectadas con el vector pAm-Cyan-survivina, se redujo casi 1 log a las 5 y 7 hpi respectivamente, en comparación con el rendimiento viral obtenido de las células transfectadas con el vector pAm-Cyan (Fig. 9C), y en concordancia con una reducción de 1 log de la producción viral a las 5 y 7 hpi de los sobrenadantes de las células tratadas con lactacistina (Fig. 9F). Además, hubo una reducción estadísticamente significativa en el número de partículas asociadas a las células transfectadas con pAm-Cyan-survivina e infectadas por 5 y 7 h y no así con las transfectadas con pAm-Cyan(Fig. 9B), sugiriendo que la sobre-expresión de survivina tiene un efecto negativo en la

producción viral. Todos estos resultados nos indicaron que la sobre-expresión de survivina afecta negativamente la replicación del FCV.

La sobre-expresión de survivina causa una reducción en los pasos tempranos del ciclo replicativo durante la infección con el FCV.

Debido a que la producción viral fue afectada por la sobre-expresión de survivina, quisimos determinar qué paso de la replicación del FCV podría estar afectado; para esto, los niveles de las proteínas no estructurales en esta condición fueron analizados por western blot (Fig. 9D and 9E). Células CrFK se transfectaron con los vectores pAm-Cyan-survivina o pAm-Cyan por 48h, se infectaron con el FCV a una MOI de 5 por 5, 7 y 9 hpi y se obtuvieron extractos protéicos totales, y los niveles de la proteína viral NS6/7 se analizaron por western blot (Figure 9E). Las células CrFK que sobre-expresaron a survivina mostraron una reducción estadísticamente significativa de los niveles de la proteína viral NS6/7 (97.23, 90.65 y 55.55%) a las 5, 7, y 9 hpi en comparación con los niveles observados en las células transfectadas con el vector pAm-Cyan (Fig. 9E). En las mismas condiciones, los niveles de XIAP y de survivina endógena no se afectaron por la infección viral, en concordancia con la ausencia de la activación de procaspasa-3 y el procesamiento de PARP (Fig. 9D). Estos resultados indican que la reducción del rendimiento viral en condiciones donde survivina es sobre-expresada podría tener una consecuencia en la reducción de la producción de las proteínas no estructurales o en pasos tempranos del ciclo replicativo.

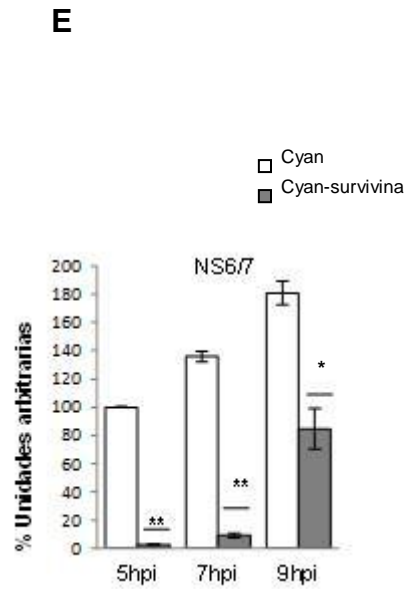
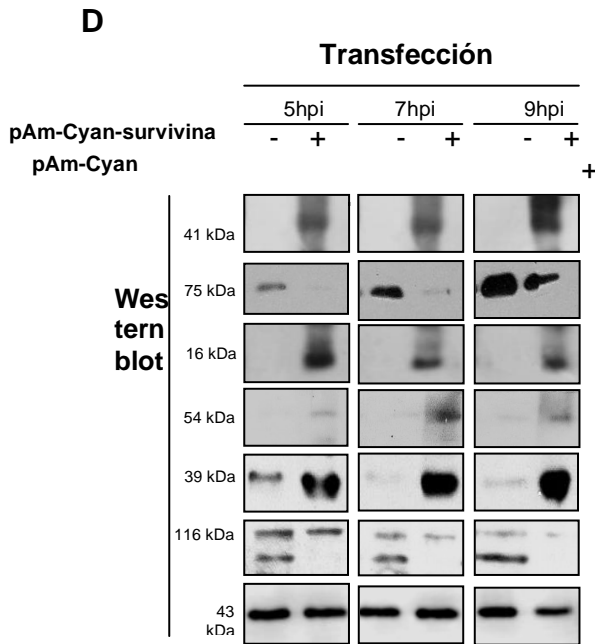
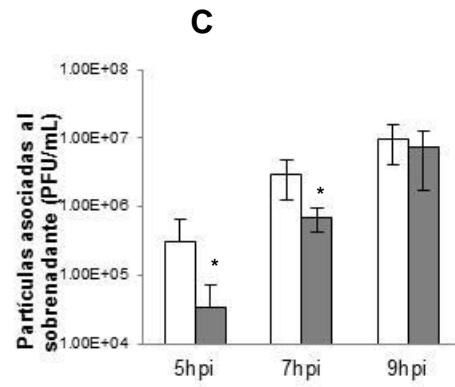
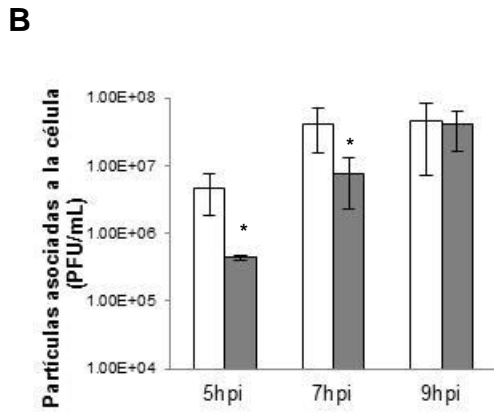
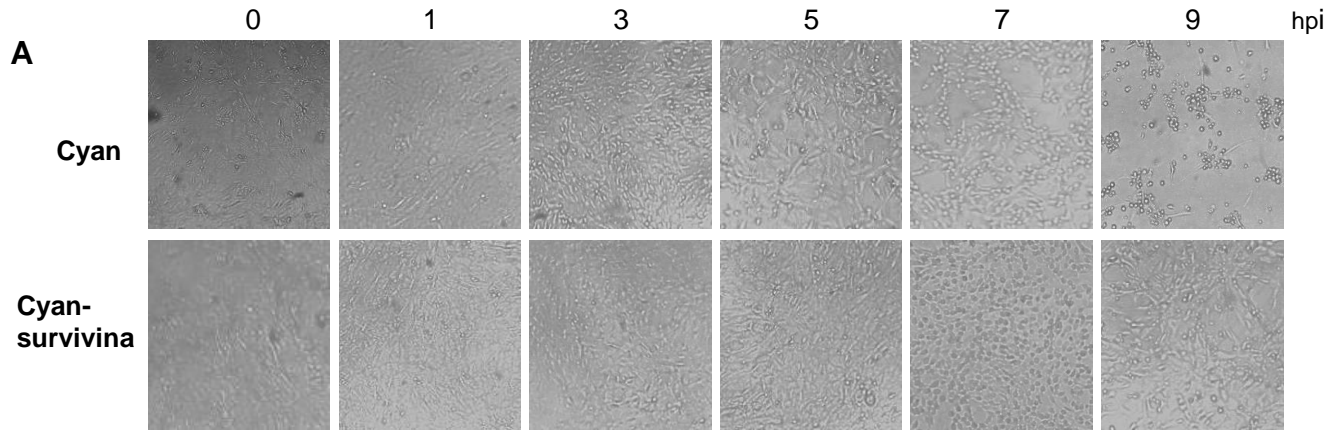
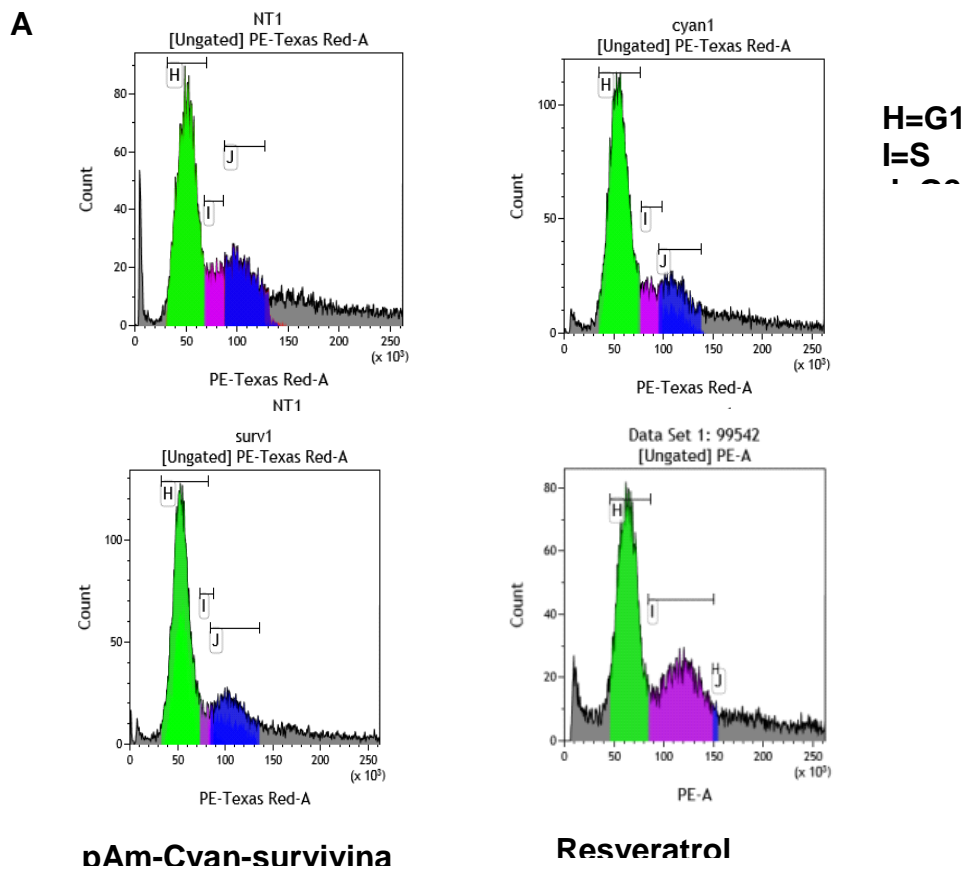


Fig. 9. La sobre-expresión de survivina tiene un efecto negativo sobre la replicación del FCV. A) Células CrFK fueron transfectadas con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina e infectadas con el FCV a una MOI de 5; el CPE fue evaluado a las 0, 1, 3, 5, 7, y 9 h por microscopía en campo claro. B) Partículas virales asociadas a la célula y C) a los sobrenadantes se obtuvieron a las 5, 7 y 9h y se cuantificaron por ensayo de plaqueo y las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 ensayos independientes. D) Extractos totales de células CrFK transfectadas durante 48 h con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina-e infectadas con el FCV a una MOI de 5 se analizaron por SDS-PAGE. La expresión de pAm-Cyan-survivina y NS6/7 se analizaron por western blot usando anticuerpos específicos. La expresión de survivina y XIAP y el procesamiento de procaspasa-3 y PARP indican la apoptosis. Actina se usó como control de carga. E) La intensidad de la banda de NS6/7 de las imágenes escaneadas fueron cuantificadas usando el ImageJ software y expresadas como unidades arbitrarias. Las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de al menos 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), $P < 0.0001$ (***), fueron calculados usando GraphPad Prism 7.00.

La sobre-expresión de survivina no induce un cambio en el ciclo celular en ni afecta la síntesis de novo de las proteínas en las células CrFK.

El efecto negativo de la sobre expresión de survivina en la producción de la progenie viral y en la síntesis o procesamiento de las proteínas virales no estructurales, podría ser debido a que la sobre-expresión de survivina induce un arresto en la fase S del ciclo celular (121), lo cual podría afectar las condiciones óptimas para replicación del FCV, ya que se ha reportado que el MNV, induce un arresto celular en la fase G1 para una replicación eficiente (122). Es por ello que se procedió a analizar el ciclo celular mediante la cuantificación de la cantidad de DNA teñido con yoduro de propio (PI) por medio de citometría de flujo (Figure 10). Cuando se analizó la cantidad de DNA en células transfectadas con el vector pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina, no se encontraron diferencias significativas en las fases del ciclo celular entre las células transfectadas con un vector u otro, a diferencia del control positivo de células tratadas con resveratrol (10 μ M), en donde se observa claramente la inducción del arresto en la fase S (Figura 10). Estos resultados nos indican que la sobre-expresión de survivina no tuvo un efecto significativo sobre el ciclo celular, por lo que el efecto negativo de survivina sobre la infección no se relaciona con estos cambios (Fig 10 B).

Con base en este resultado se analizó si la sobre-expresión de survivina tendría un efecto negativo sobre la traducción de las proteínas celulares. Para esto se realizó un ensayo de síntesis de novo de proteínas celulares, donde células CrFK, transfectadas con pAm-Cyan o pAm-Cyan-survivina se incubaron con medio que contenía metionina marcada con S^{35} ; posteriormente se obtuvieron extractos proteicos totales y las proteínas marcadas se analizaron mediante SDS-PAGE y se revelaron pAm-Cyan-survivina por autoradiografía (Figura 10C). No se encontró una diferencia significativa en la intensidad de las bandas de proteínas medidas a las 24 y 36 hpt, entre ambos extractos, en ambos extractos, indicando que la sobre-expresión de survivina no afecta la síntesis de proteínas de las células CrFK (Fig 10 C).



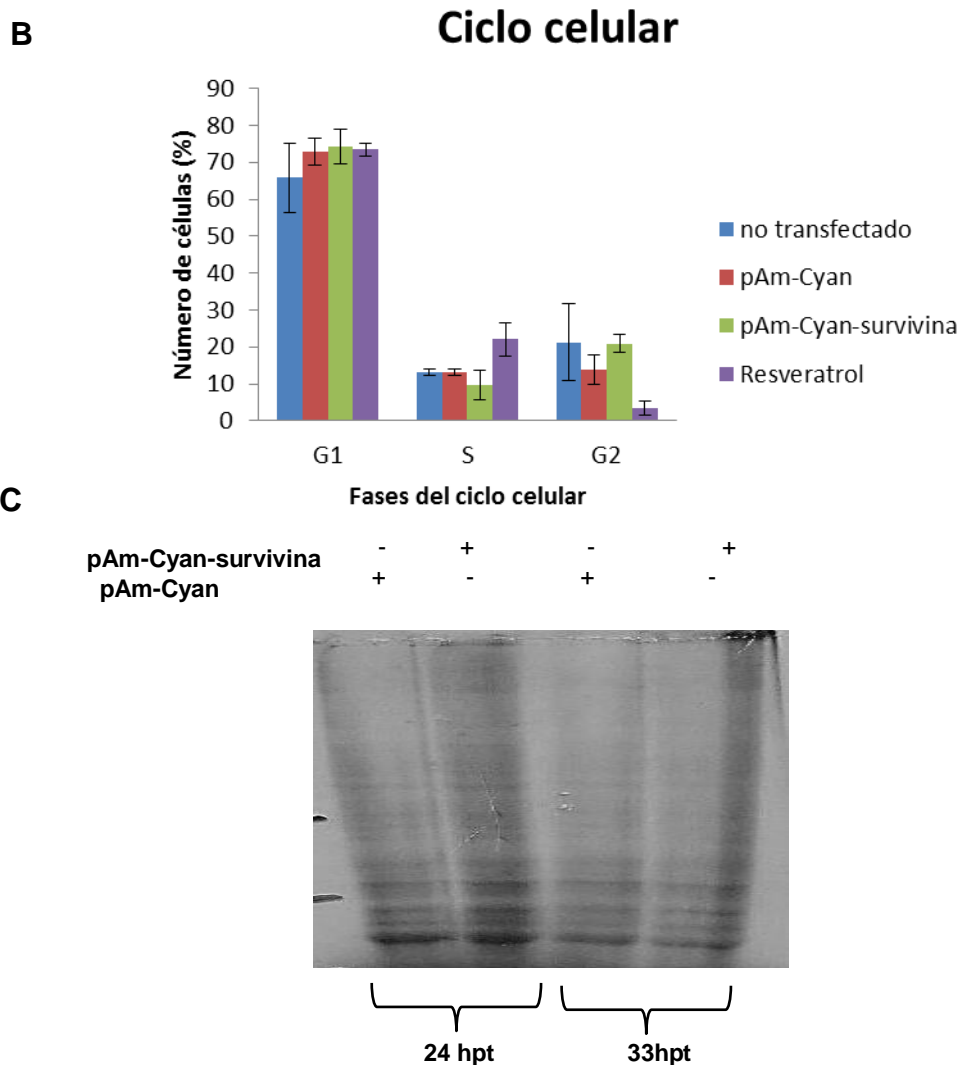
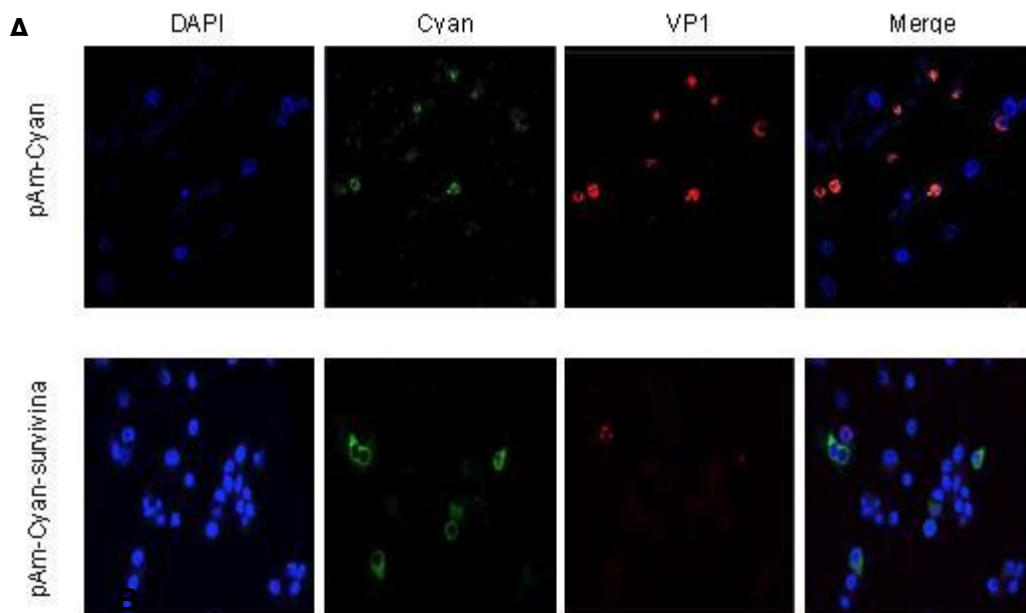


Fig. . 10 La sobre-expresión de survivina no tiene un efecto sobre el ciclo celular o en la síntesis de novo de proteínas en células CrFK. A) La fase del ciclo celular de células CrFK se determinó mediante la cuantificación de DNA por citometría de flujo en condiciones no tratadas, transfectadas con pAm-Cyan, pAm-Cyan-survivina, y tratadas con resveratrol (control positivo fase S). B) Representación gráfica de la cuantificación de células CrFK positivas a distintas fases del ciclo celular en condiciones no tratadas, transfectadas con pAm-Cyan, pAm-Cyan-survivina, y tratadas con resveratrol C) Autoradiografía de extractos de proteínas totales de células CrFK transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina a las 24 y 33 hpt y marcadas con S35. El ciclo celular fue determinado usando el FlowJo software. Las desviaciones estándar fueron obtenidas de duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), fueron calculados usando GraphPad Prism 7.00 software.

La sobre-expresión de survivina tiene un efecto paracrino y autocrino contra la infección del FCV en células CrFK.

Otra manera de determinar el efecto de la sobre-expresión de survivina en la infección con el FCV, fue analizar la expresión de la proteína de mayoritaria de la cápside VP1 mediante ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal. Para ello, células CrFK se transfectaron con los vectores pAm-Cyan-survivina o pAm-Cyan por 48h y posteriormente se infectaron con el FCV a una MOI de 5 hasta las 5 hpi, que es el tiempo donde survivina es regulada negativamente durante la infección (Figure 11). En las células transfectadas con pAm-Cyan-survivina, se observó una reducción estadísticamente significativa de la expresión de la proteína VP1 (Figura 11, panel inferior), en comparación con la expresión de VP1 de las células transfectadas con pAm-Cyan (Figura 11, panel superior). De manera interesante, se observó que en la células transfectadas con pAm-Cyan-survivina, no solamente se presentó la reducción de la expresión de VP1 tanto en las células transfectadas como las que no se transfectaron (Fig 11, panel inferior). Indicando que la sobre-expresión de survivina en células CrFK podría tener un efecto protector paracrino y autócrino contra la infección por FCV.



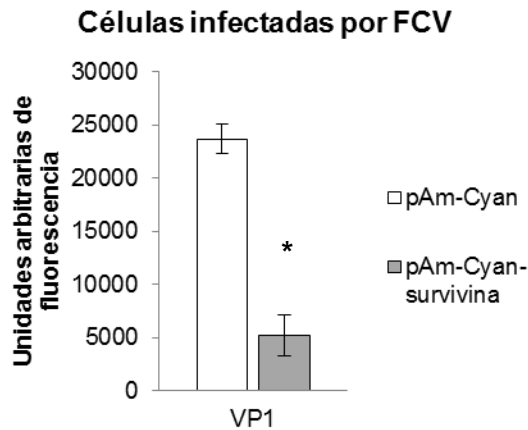
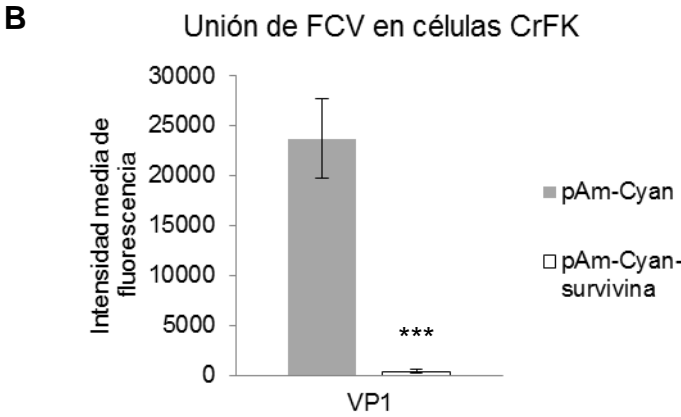
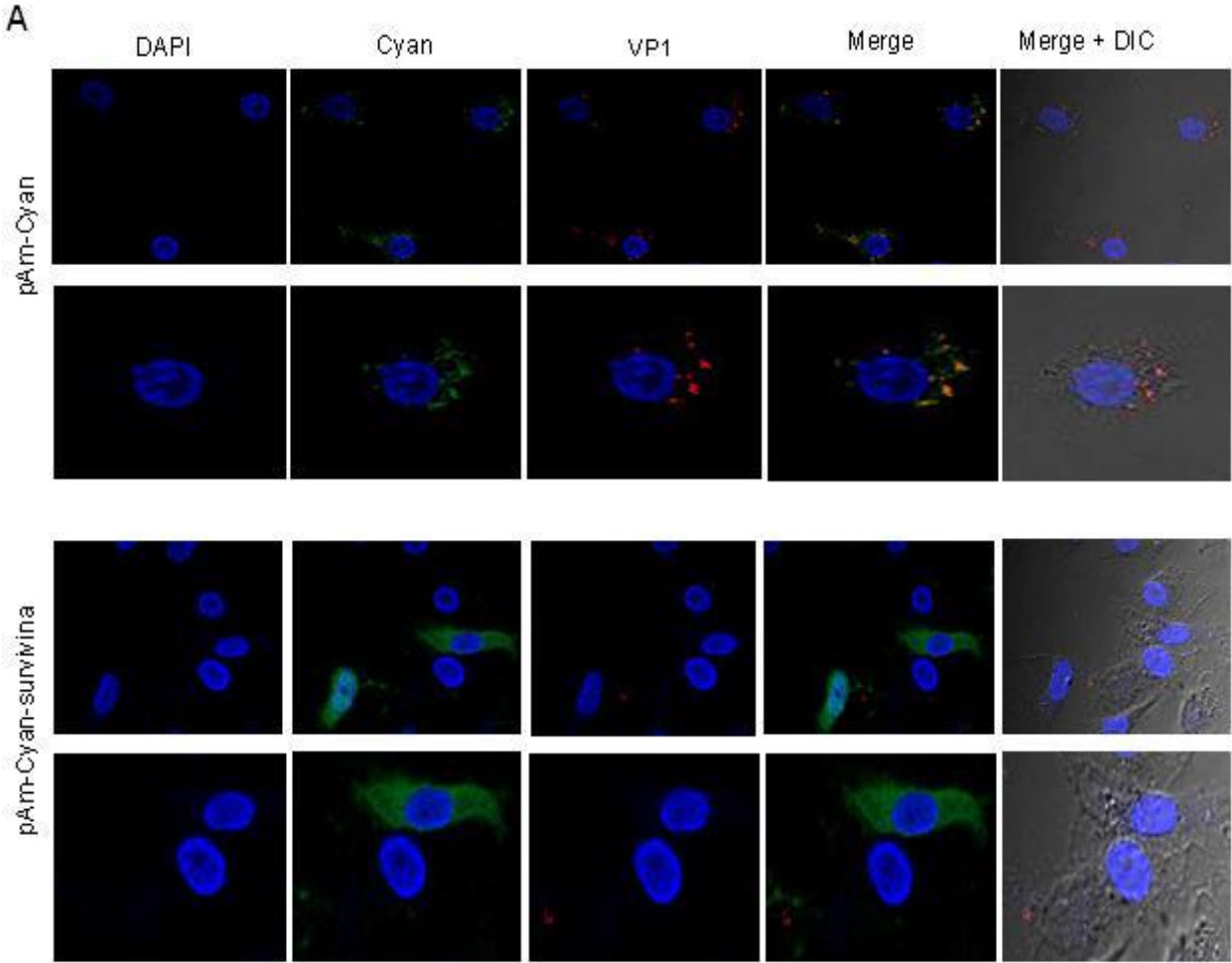


Figura 11. La sobre-expresión de survivina afecta la presencia de la proteína viral VP1 de manera autócrina y paracrina: A) Microscopía de fluorescencia de células CrFK transfectadas con pAm-Cyan (panel superior) o pAm-Cyan-survivina (panel inferior) B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de la proteína VP1 durante la sobre-expresión de survivina. Las desviaciones estándar se calcularon a partir de al menos 3 experimentos independientes. Las células se analizaron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes muestran un corte sencillo tomado de cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia se determinó con el software Icy.

La sobre-expresión de survivina afecta la unión del FCV en las células CrFK

El efecto negativo en la producción viral y en la síntesis y/o procesamiento de las proteínas no estructurales del FCV debido a la sobre expresión de survivina, nos indicó que posiblemente se estaban alterando eventos tempranos del ciclo replicativo como la unión virus-célula, entrada o replicación del genoma viral. Para determinar el efecto de la sobre expresión de survivina en la unión, las células CrFK transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina se incubaron con FCV durante 30 min a 4 °C, y las partículas virales se detectaron con un anticuerpo anti-VP1 en células no permeabilizadas. Al evaluar la presencia de VP1 en la superficie de las células que sobre-expresan survivina se encontró una reducción en la

presencia de VP1 en comparación con las células transfectadas con el pAm-Cyan (Fig 12 A y B).



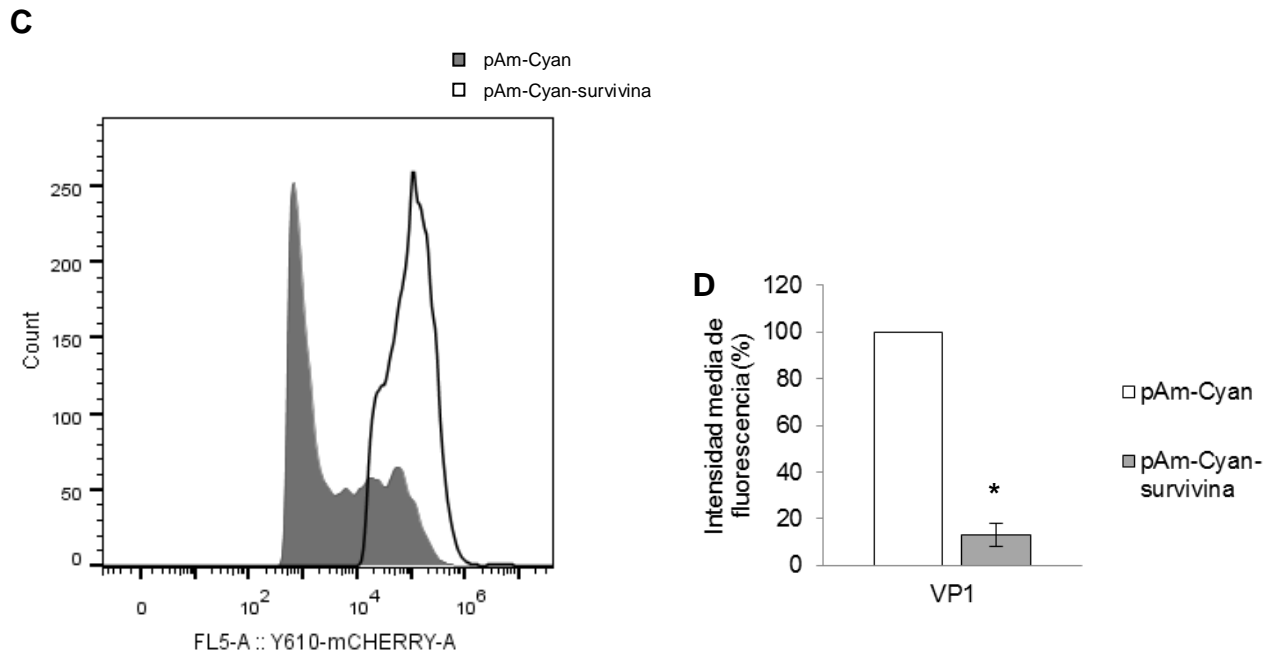


Figura 12. La sobre-expresión de survivina afecta la unión del FCV a las células CrFK: A) Microscopía de fluorescencia del ensayo de unión del FCV en células CrFK no permeabilizadas y transfectadas con pAm-Cyan (panel superior) o pAm-Cyan-survivina (panel inferior), incubadas con el FCV a una MOI de 10 durante 30 min a 4°C. B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de la proteína VP1 en células que sobre-expresan survivina. Las desviaciones estándar fueron determinadas por 3 experimentos independientes. Las células fueron analizadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes muestran un corte sencillo tomado de cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia fue determinado por el software Icy. C) Histograma del ensayo de unión del FCV en células CrFK donde se cuantificó el número de células positivas a VP1. La cuantificación se determinó por el software FlowJo. Desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 experimentos independientes. D) Intensidad media de fluorescencia de la proteína VP1 durante la sobre-expresión de survivina. Las desviaciones estándar se determinaron a partir de 3 experimentos independientes. Las células se analizaron usando un citómetro Beckman Coulter's CytoFLEX. Los valores de $P < 0.05$ (*), se calcularon usando GraphPad Prism 7.00 software.

Quando se realizó la cuantificación del número de células positivas a las cuales se les adhirió el FCV, por citometría de flujo se confirmó la reducción observada por microscopía confocal, la cual fue estadísticamente significativa entre las células que sobre-expresan survivina con respecto a las que no (Fig

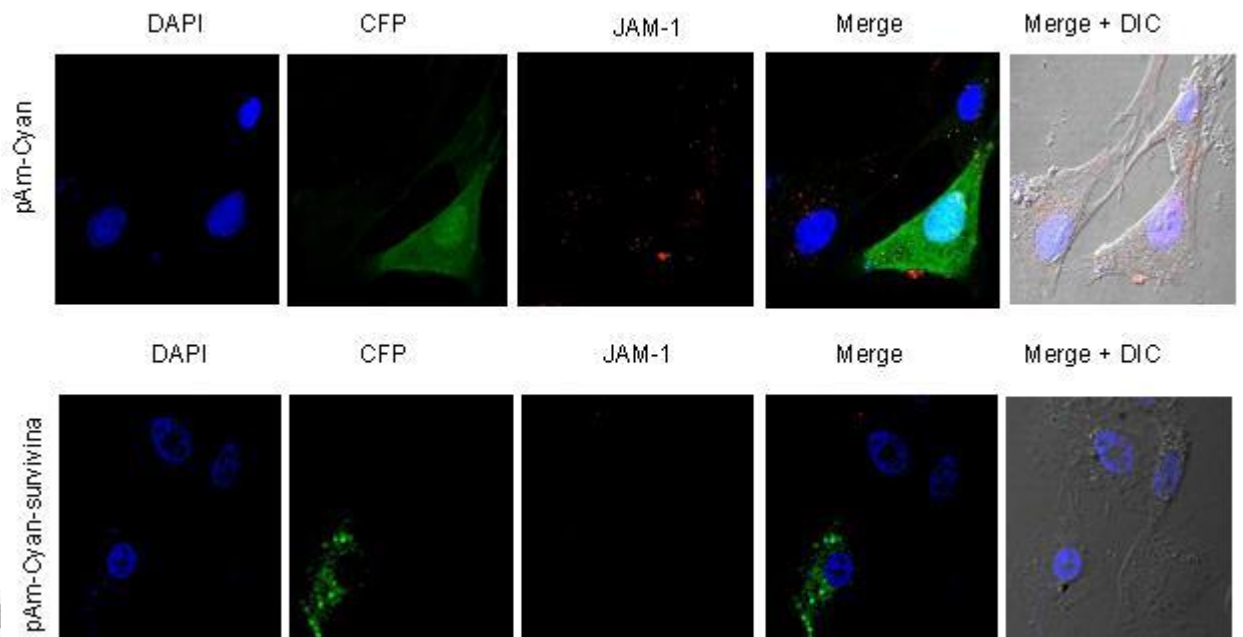
12 C y D). Todos estos resultados nos indican que la sobre-expresión de survivina afecta la unión del FCV a su célula blanco.

JAM-1 es internalizada durante la sobre-expresión de survivina en células CrFK

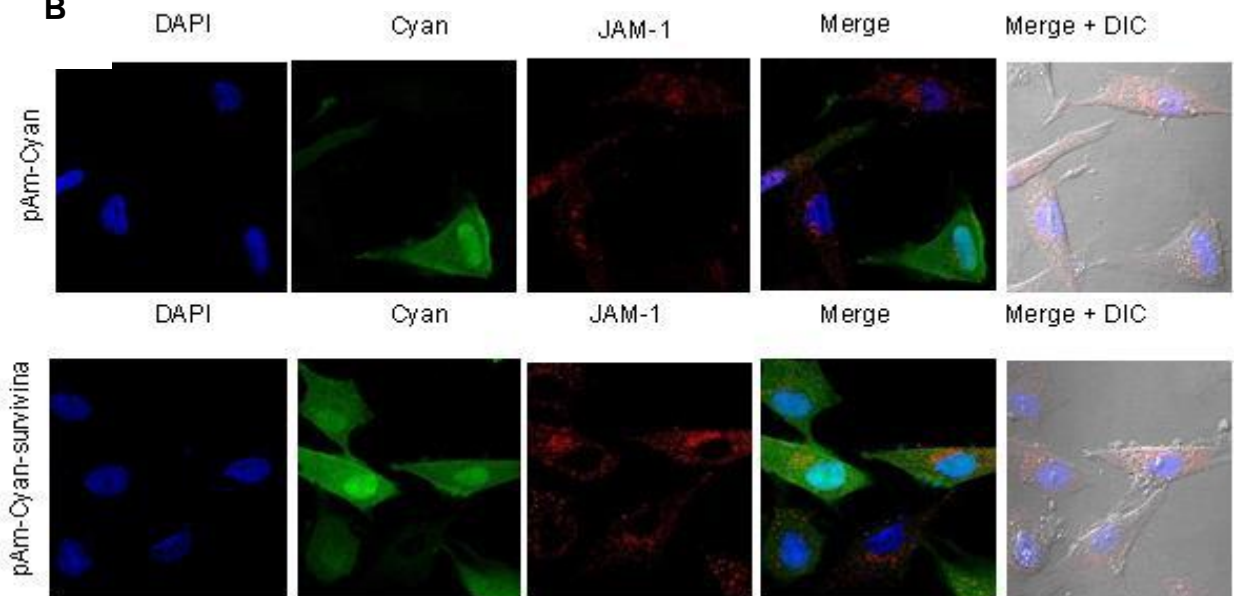
Debido a la reducción en la unión del FCV a sus células blanco en condiciones de sobre-expresión de survivina, fue de nuestro interés determinar si la expresión del receptor funcional para este virus, la molécula de adhesión JAM-1, se encontraba alterada. Para ello, la presencia de la proteína JAM-1 en la superficie de células no permeabilizadas transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia (Figura 13). Se encontró que la sobre-expresión de survivina induce una reducción significativa de la presencia de la proteína JAM-1 en la superficie celular (Figura 13, panel inferior) en comparación con las células transfectadas con pAm-Cyan (Figura 13 A panel superior). Para determinar si esta reducción en la superficie era debida a una relocalización del receptor en la célula o a un cambio en sus niveles de expresión, se cuantificó la presencia JAM-1 intracelular en células permeabilizadas transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina mediante ensayos de inmunofluorescencia (Fig 13B). En estos ensayos encontramos que el marcaje de JAM-1 aumenta intracelularmente durante la sobre-expresión de survivina pero no así cuando las células fueron transfectadas con pAm-Cyan (Figura 13B). Para corroborar los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, se realizaron ensayos de citometría de flujo en los que cuantificamos una baja presencia de JAM-1, en las células no permeabilizadas durante la sobre-expresión de survivina (Fig. 13E), y un aumento en las células permeabilizadas para JAM-1 que sobre-expresan survivina (Fig 13G), en comparación con el control. Finalmente para confirmar que la intensidad de fluorescencia era debido a una relocalización de JAM-1 y no un cambio en su expresión, se realizaron extractos totales de células transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina y la expresión de

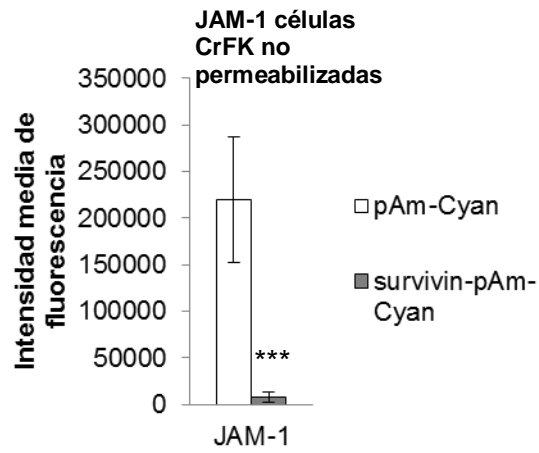
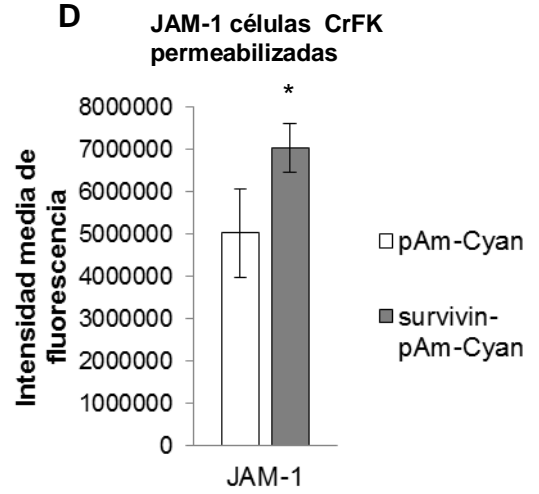
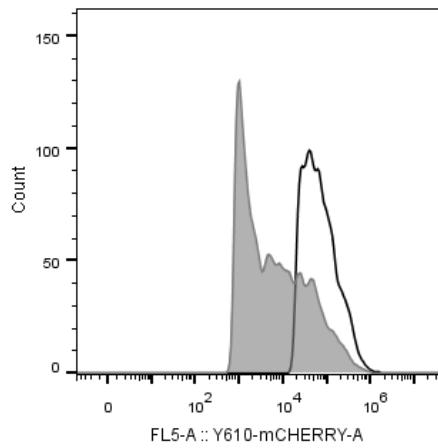
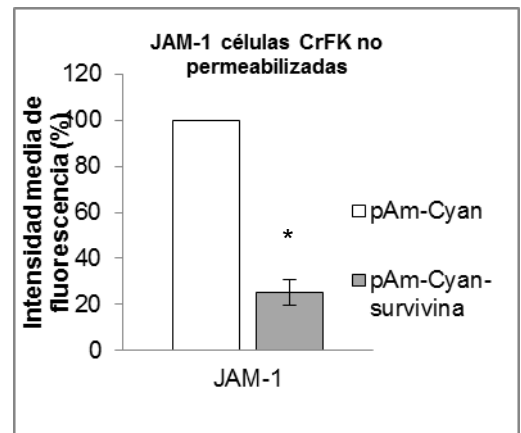
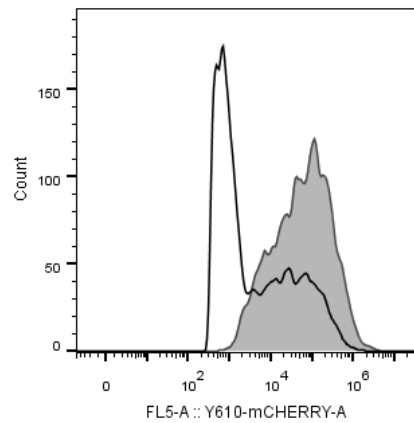
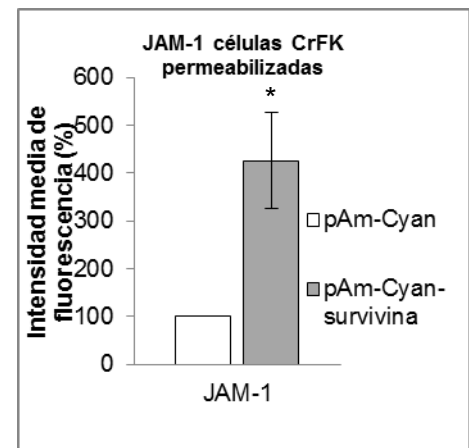
JAM-1 se determinó por western blot (Figura 13I-J). En estos ensayos no se encontró un cambio estadísticamente significativo en la cantidad de proteína JAM-1 total en las células transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina, indicando que la sobre-expresión de survivina induce una internalización del receptor JAM-1, pero sin afectar los niveles de expresión de la proteína, lo que concuerda con la disminución en la unión del FCV a estas células.

A



B



C**D****E****F****G****H**

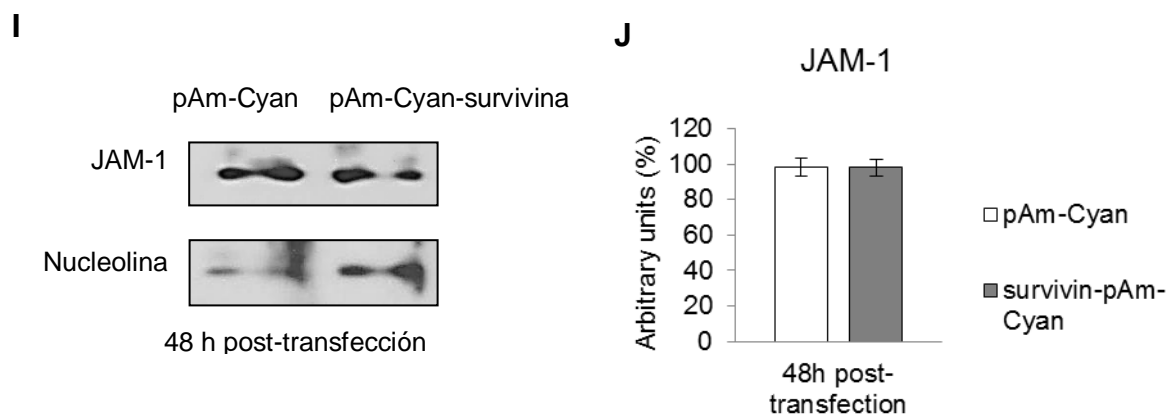


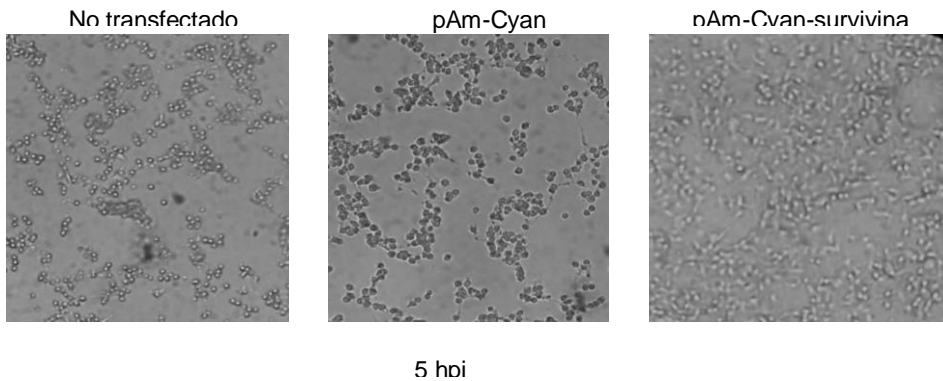
Figura 13. La sobre-expresión de survivina internaliza a la molécula de adhesión JAM-1 en células CrFK: Microscopía de fluorescencia del ensayo de unión del FCV en células CrFK A) no permeabilizadas y B) permeabilizadas, transfectadas con pAm-Cyan (panel superior) o pAm-Cyan-survivina (panel inferior), las cuales e incubaron con el FCV a una MOI de 10 durante 30 min a 4°C. C) y D) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de la proteína VP1 durante la sobre-expresión de survivina. Las desviaciones estándar fueron determinadas por 3 experimentos independientes. Las células fueron analizadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imagines muestran un corte sencillo tomado de cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia se determinó con el software Icy. Histograma de la presencia de la molécula de adhesión JAM-1 en células CrFK donde se cuantificó el número de células positivas a JAM-1, E) permeabilizadas y F) no permeabilizadas. La cuantificación se determinó con el software FlowJo. G) Western blot de extractos totales de células CrFK transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina donde se detectó la expresión de JAM-1 con anticuerpos específicos. H) La cuantificación de las bandas de JAM-1 se realizó mediante el programa ImageJ software. Las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), fueron calculados usando GraphPad Prism 7.00 software.

Las células CrFK que sobre-expresan survivina secretan factores al sobrenadante que protegen a las células CrFK de la infección por el FCV.

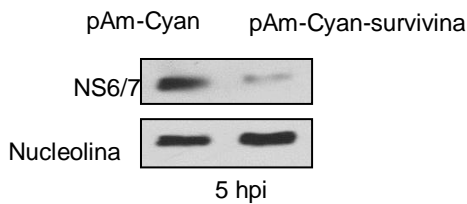
Al encontrar que la sobre-expresión de survivina indujo una reducción de la unión del FCV tanto a las células transfectadas como a las no transfectadas a través de la internalización del receptor JAM-1, fue de nuestro interés analizar si en los sobrenadantes podría existir algún factor secretado por las células que sobre-expresan survivina, que pudieran proteger a las células

CrFK de la infección con el FCV. Es por ello que el medio condicionado de células no infectadas y transfectadas tanto con el plásmido pAm-Cyan como con pAm-Cyan-survivina por 48 hpt, se incubó con una monocapa de células CrFK durante 24h, que posteriormente se infectaron con el FCV, por 5 h y el título viral del sobrenadante y de la fracción asociada a la célula se determinó mediante ensayos de plaqueo (Figura 14). De manera interesante el tratamiento con los sobrenadantes de las células que sobre-expresan survivina tuvo un efecto negativo en la producción viral, en correlación con la reducción de la expresión de la proteína viral NS6/7, lo que corrobora que el tratamiento con los sobrenadantes provenientes de células CrFK que sobre-expresan survivina tienen un efecto citoprotector contra la infección con el FCV.

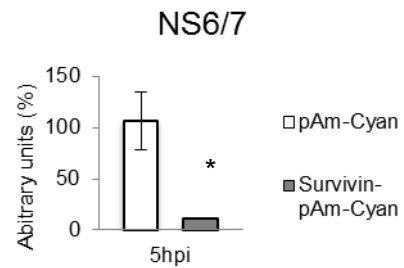
A



B



C



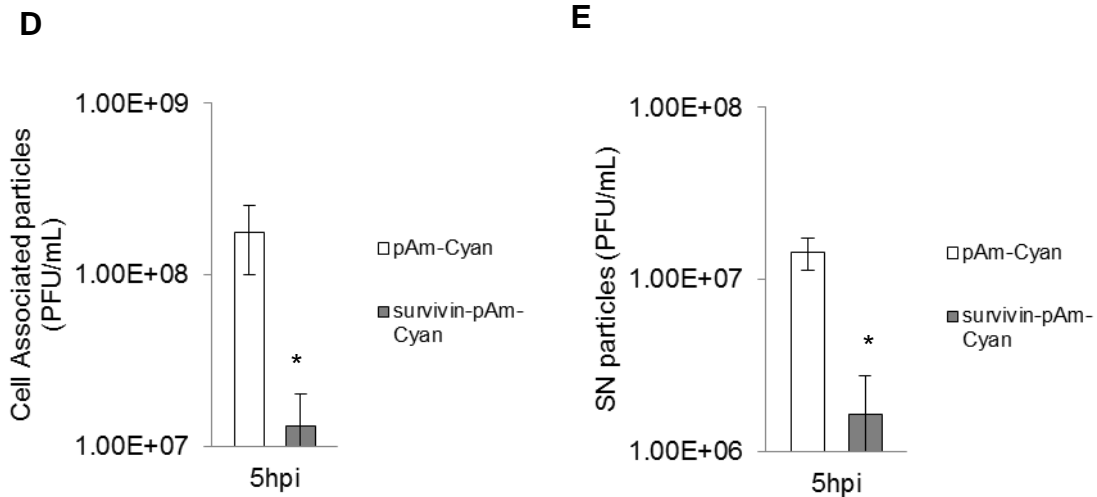
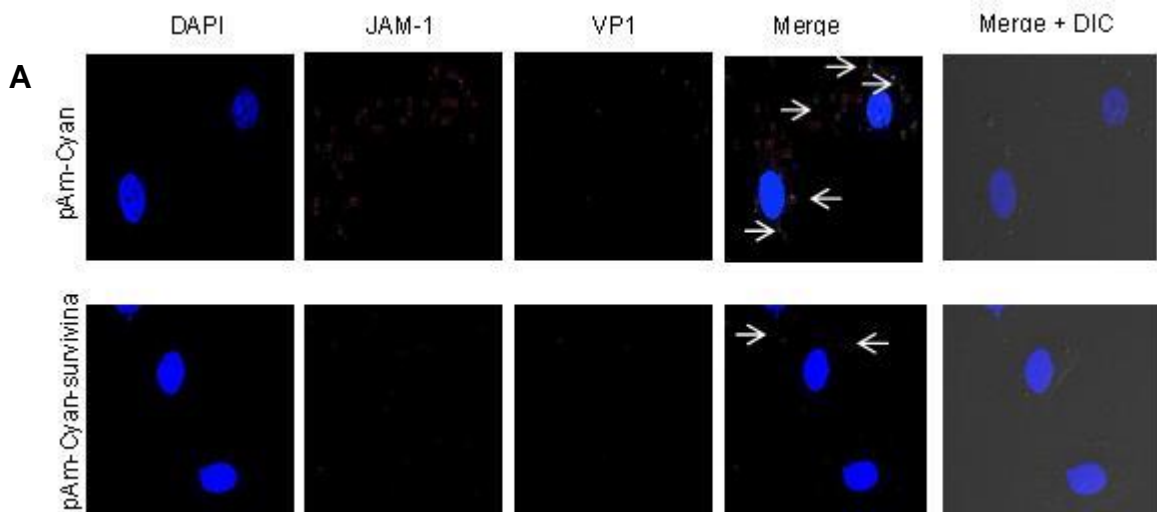


Figura 14. Los sobrenadantes de las células que sobre-expresión a survivina contienen factores que protegen a las células CrFK de la infección del FCV: A) Microscopía de campo claro del efecto citopático producido en células CrFK por el tratamiento de con el sobrenadante de células transfectadas con pAm-Cyan o pAm-Cyan-survivina e infectadas con el FCV B) Detección de la proteína viral NS6/7 en la condiciones del experimento A. C) Análisis densitométrico de la proteína viral NS6/7, la intensidad de las bandas de las imágenes escaneadas fue cuantificada mediante el programa ImageJ software. D) y E) cuantificación de la producción de partículas virales asociadas a la células y al sobrenadante, mediante ensayos de plaqueo. Las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), se calcularon usando el programa GraphPad Prism 7.00 software.

El tratamiento con los sobrenadantes provenientes de células CrFK que sobre-expresan survivina afectan la unión del FCV a su célula blanco por medio de la internalización de la molécula JAM-1

Los resultados anteriores sugieren que la sobre expresión de survivina podría causar un efecto negativo en eventos tempranos del ciclo replicativo, debido a que el tratamiento con los sobrenadantes de las células que sobre expresan a survivina tienen un efecto similar al ocurrido cuando en un cultivo se sobre-expresa a survivina. Por lo tanto es posible que el tratamiento con los sobrenadantes de células que sobre expresan survivina podría estar afectando la unión o la entrada del FCV por medio de la internalización del

receptor JAM-1, tal y como sucede cuando en células CrFK sobre-expresan a survivina. Para corroborar esto, primeramente se realizaron ensayos de unión del FCV de células tratadas con el medio condicionado proveniente de células transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina (Figura 15). Al analizar la presencia tanto del FCV (verde) como del receptor JAM-1 (rojo) en células no permeabilizadas tratadas con el sobrenadante de células que sobre expresan survivina, encontramos una reducción estadísticamente significativa de ambos marcajes, comparado con la detección de ambas moléculas en las células tratadas con el sobrenadante de células transfectadas con pAm-Cyan (Figura 15 A (panel inferior) y C). Asimismo, detectamos una mayor intensidad de fluorescencia de la proteína JAM-1 intracelular en aquellas células tratadas con el medio condicionado de células que sobre-expresan a survivina que con aquellas tratadas con los sobrenadantes de células que no sobre-expresan survivina (Figura 15 B panel inferior y E). Estos resultados en conjunto apuntan que en los sobrenadantes de las células que sobre expresan survivina esta presente un factor que causa una reducción de la unión del FCV a su célula blanco por medio de la internalización de receptor funcional JAM-1 y con esto la afectación de los eventos tempranos del ciclo replicativo.



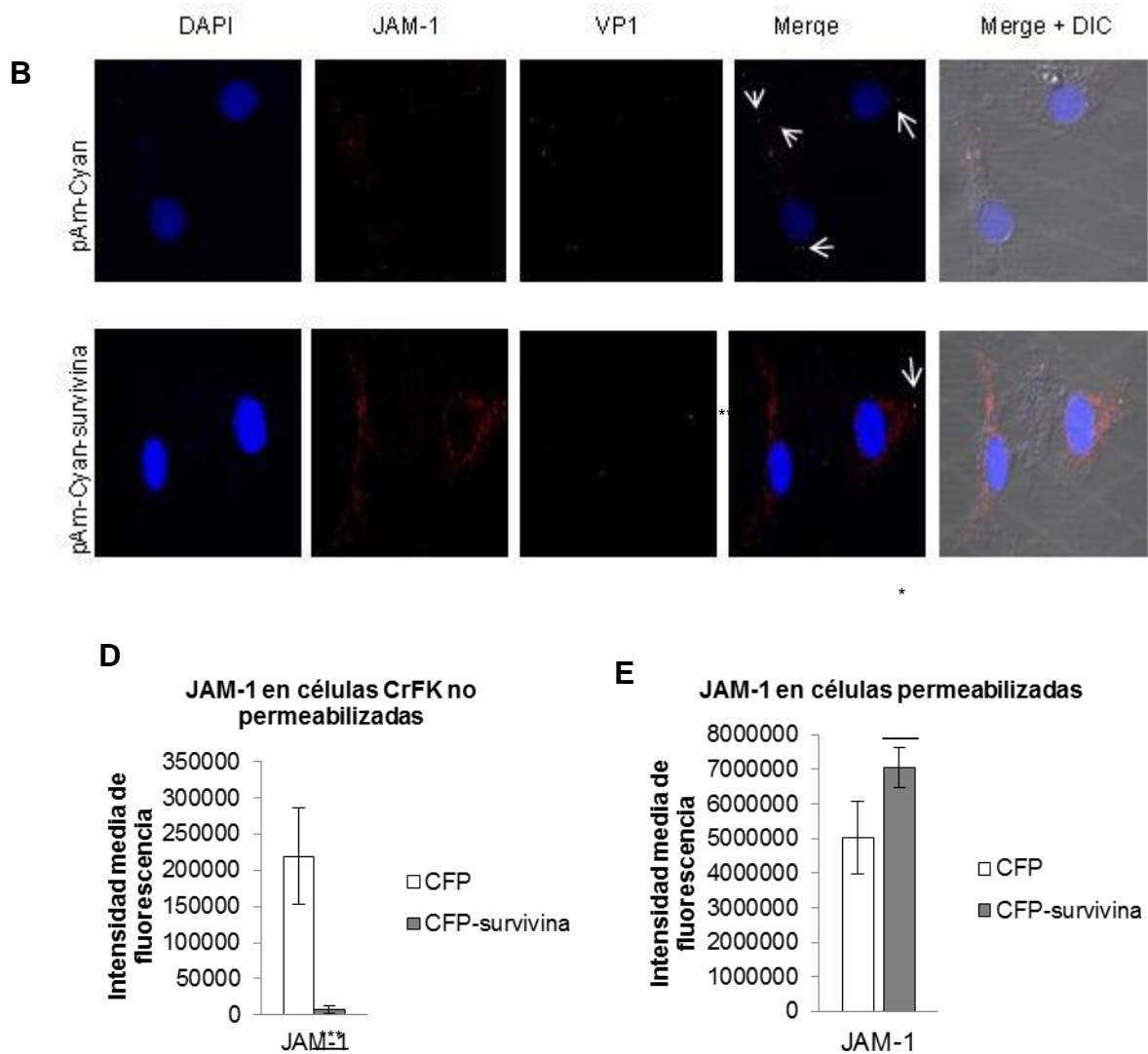
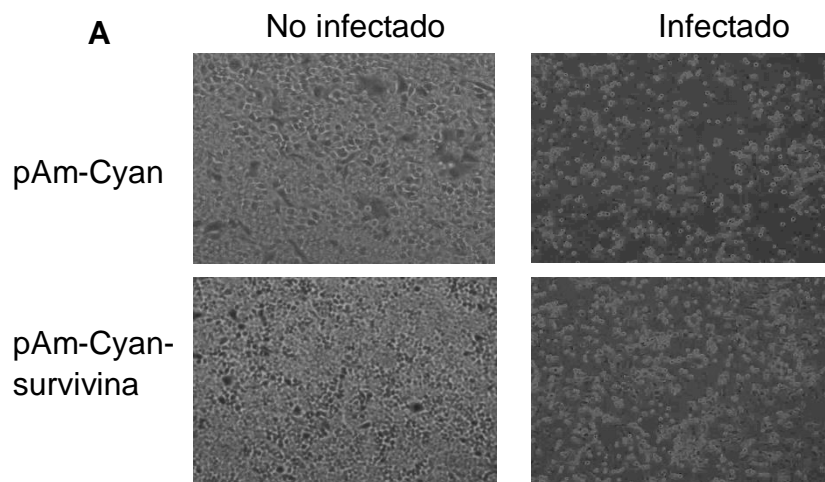


Figura 15. El sobrenadante de células que sobre-expresión de survivina induce una internalización de la molécula de adhesión JAM-1 en células CrFK y afecta la unión del FCV en células CrFK: Microscopía de fluorescencia del ensayo de unión del FCV en células CrFK A) no permeabilizadas y B) permeabilizadas, transfectadas con pAm-Cyan (panel superior) o pAm-Cyan-survivina (panel inferior), infectadas con el FCV a una MOI de 10 durante 30 min a 4°C. C) y D) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de la proteína VP1 durante la sobre-expresión de survivina. Las desviaciones estándar se determinaron por 3 experimentos independientes. Las células se analizaron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes muestran un corte sencillo tomado de cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia se determinó con el software Icy. Las

desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), se calcularon usando GraphPad Prism 7.00 software.

Los sobrenadantes provenientes de las células que sobre-expresan a survivina protegen solamente contra la infección por el FCV.

Para determinar si el efecto citoprotector del sobrenadante de células que sobre-expresan survivina podría tener un efecto sobre otro calicivirus, decidimos analizar su efecto durante la infección con el MNV en células RAW 264.7. Para ello, estas células fueron tratadas con el medio condicionado proveniente de células CrFK que fueron transfectadas con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina, durante 24h. Posteriormente, se infectaron con el MNV durante 16h, y la expresión de la proteína viral NS7 se determinó por ensayos tipo western blot y la producción viral por ensayos de plaqueo (Figura 16). El tratamiento con los sobrenadantes que sobre-expresan survivina no tuvieron un efecto sobre la síntesis y/o procesamiento de la proteína NS7, así como tampoco hubo alguna reducción en la producción y/o salida del MNV, lo que nos indica que el efecto inhibitorio de los sobrenadantes que sobre-expresan a survivina es específico del FCV.



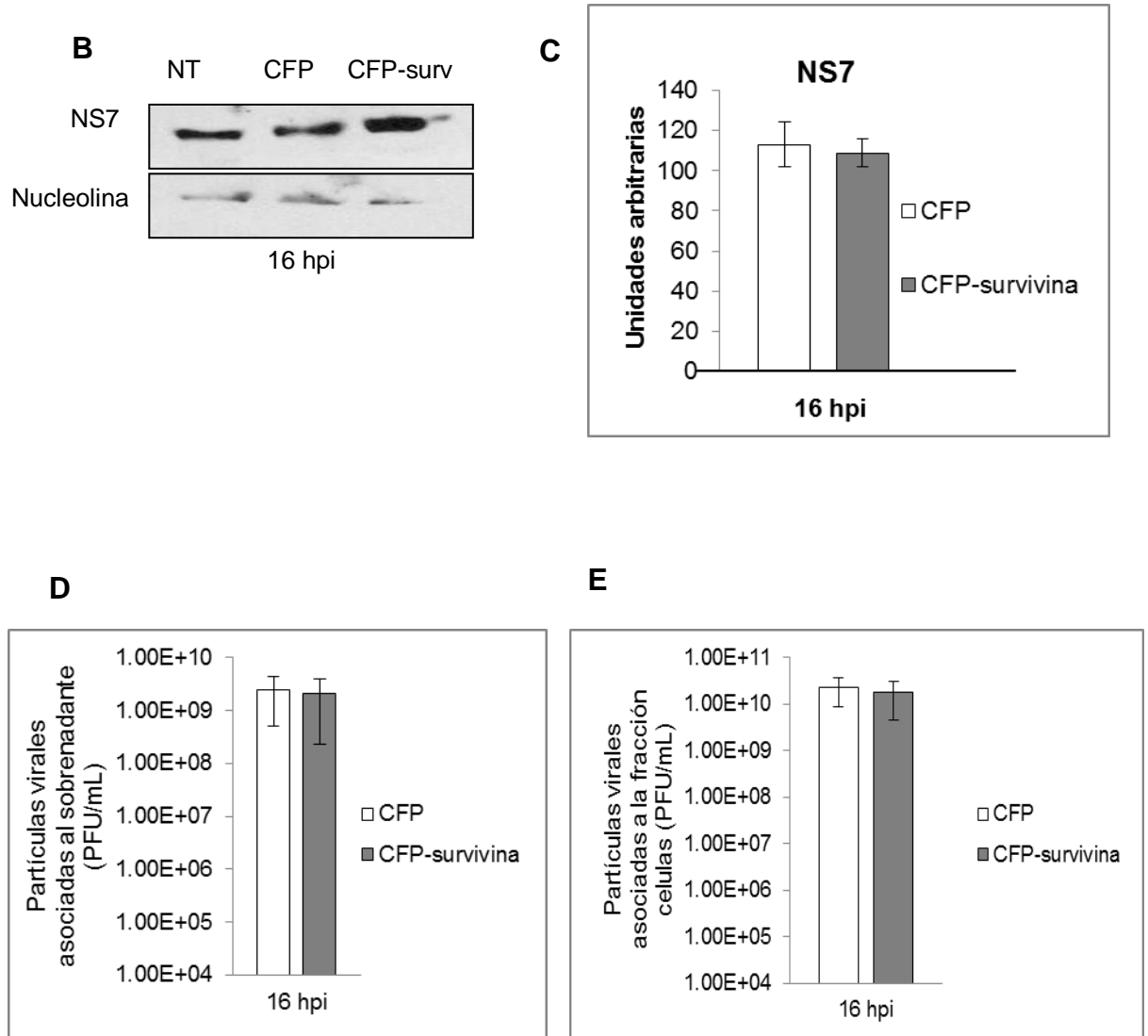


Figura 16. El sobrenadante de células CrFK que sobre-expresan a survivina no protegen de la infección del MNV a células RAW 264.7: A) Microscopía de campo claro del efecto citopático producido en células RAW 264.7 por el tratamiento de con el sobrenadante de células CrFK transfectadas con pAm-Cyan o pAm-Cyan-survivina e infectadas con el MNV B) Detección de la proteína viral NS7 en la condiciones del experimento A. C) Análisis densitométrico de la proteína viral NS7, la intensidad de las bandas de las imágenes escaneadas fue cuantificada mediante el programa ImageJ software. D) y E) cuantificación de la producción de partículas virales asociadas a la células y al sobrenadante, mediante ensayos de plaqueo. Las desviaciones estándar se obtuvieron de

duplicados de 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), se calcularon usando el programa GraphPad Prism 7.00 software.

La sobre-expresión de survivina en células RAW 264.7 no tuvo un efecto en la síntesis y o procesamiento de las proteínas no estructurales del MNV, pero si en la salida viral.

Con los resultados anteriores fue de nuestro interés determinar si la sobre-expresión de survivina tiene un efecto negativo en la infección de otro calicivirus; para ello, sobre-expresamos a survivina en células RAW 264.7 las cuales son permisivas y susceptibles a la infección con el MNV. Primeramente se analizó la traducción viral por medio del análisis de la presencia de la proteína NS7 en extractos totales de células infectadas mediante ensayos de western blot. Como puede observarse en la (Figura 17), no hubo cambio en la síntesis y/o presencia de ésta durante la sobre-expresión de survivina comparada con la condición en donde las células se transfectaron con pAm-Cyan, indicando que survivina no afecta eventos tempranos del ciclo replicativo. Para analizar si survivina tiene algún efecto en eventos tardíos del ciclo replicativo como la morfogénesis o la salida viral, la células se transfectaron con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-Survivina, se infectaron con el MNV por 16h y la producción de partículas virales se cuantificó por el método de plaqueo en las fracciones asociadas al sobrenadante y a la célula. En las células que sobre expresaron a survivina, se encontró una reducción estadísticamente significativa de aproximadamente 1 log del título viral de la fracción asociada al sobrenadante y no así en la fracción asociada a las células o en las condiciones control. Estos resultados tomados en conjunto sugieren que la sobre-expresión de survivina no afecta la replicación de MNV pero si afecta la salida, en concordancia con el hecho de que la apoptosis tiene un papel importante en la salida y diseminación de los calicivirus.

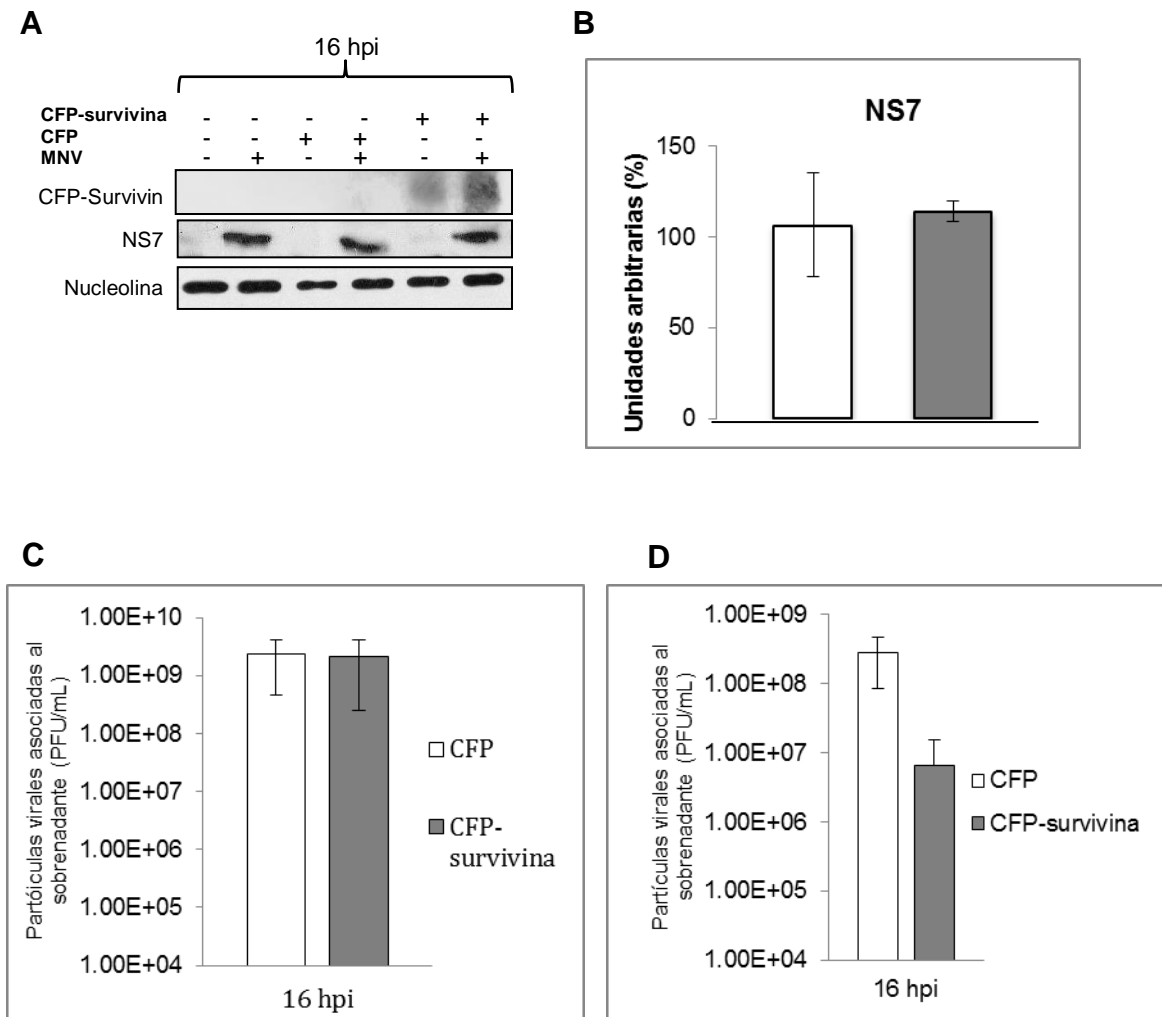


Figura 17. La sobre-expresión de survivina no protegen de la infección con el MNV: A) Células RAW 264.7 fueron transfectadas con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-survivina por 48h e infectadas con el MNV a una MOI de 5 por 16h; extractos totales fueron obtenidos y se analizaron por SDS-PAGE. La expresión de pAm-Cyan y NS7 se analizaron por western blot usando anticuerpos específicos. Nucleolina se usó como control de carga. B) La intensidad de la banda de NS6/7 de las imágenes escaneadas fueron cuantificadas usando el ImageJ software y expresadas como unidades arbitrarias. C) Partículas virales asociadas a la célula y D) a los sobrenadantes se obtuvieron a las 5, 7 y 9h y se cuantificaron por ensayo de plaqueo y las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de 3 ensayos independientes. Las desviaciones estándar se obtuvieron de duplicados de al menos 3 experimentos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (*), $P < 0.0001$ (***), fueron calculados usando GraphPad Prism 7.00.

La expresión de NS6/7 está asociada con el efecto citopático de células CrFK.

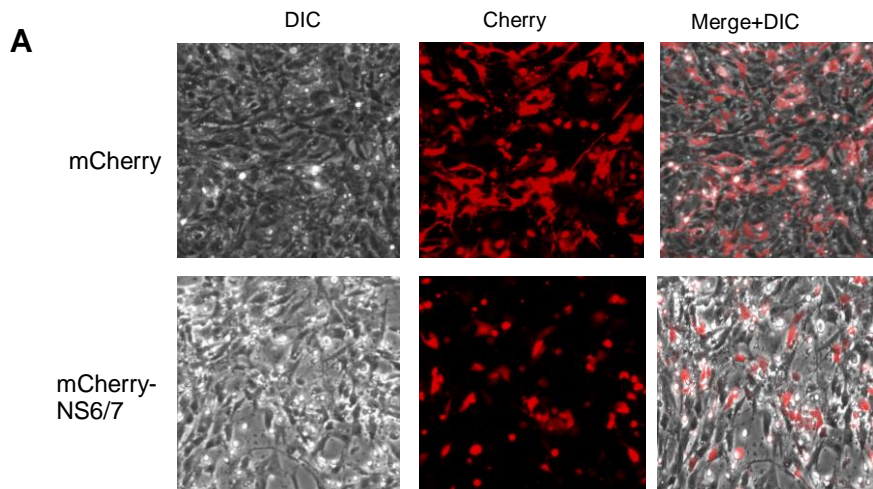
Se ha documentado que la regulación negativa de survivina ocurre tanto en la replicación del MNV (90) como en la del FCV (Tesis, Barrera Vázquez, 2014). Además, se ha escrito que la expresión de la poliproteína codificada por el ORF1 del MNV en un sistema libre de virus fue suficiente para regular negativamente a survivina e inducir la activación de caspasa 9 y por lo tanto de establecer la apoptosis (123). Sin embargo, se desconoce cuál de las proteínas NS es la responsable de este efecto. Por otro lado, durante la infección con el FCV, se ha descrito que LC causa un efecto citopático muy similar al inducido por la infección del FCV en células CrFK (1); sin embargo, ninguna molécula viral ha sido reportada como la responsable para la degradación de survivina durante la infección por el FCV.

Para determinar qué factor es el que está involucrado en la apoptosis y en la regulación negativa de XIAP y survivina durante la infección con el FCV, analizamos 2 proteínas virales: la proteasa-polimerasa NS6/7 debido a diversos reportes en los que se ha asociado a distintas proteasas virales con la inducción de la apoptosis (100, 124-128), y a la proteína LC que está asociada con el efecto citopático inducido por la infección del FCV (1).

La proteína viral NS6/7 fue clonada en el vector de expresión eucariótico mCherry por el grupo del Dr. Ian Goodfellow, de la Universidad de Cambridge, UK, denominada NS6/7-Cherry. Para determinar si la proteína NS6/7 del FCV era la responsable de la degradación de survivina y XIAP, los plásmidos mCherry y mCherry-NS6/7 se transfectaron en células CrFK por 48 hpt y se evaluó el efecto citopático por microscopía de epifluorescencia (Figura 18A). La expresión de la proteína NS6/7-Cherry causó un efecto citopático en las células CrFK que consistió en la ruptura de la monocapa, en comparación con las células transfectadas con el vector mCherry solo,

donde la monocapa de mantuvo intacta (Fig. 18A). Sin embargo, no se observó redondeamiento celular, como durante la infección.

Para determinar si la proteasa viral NS6/7 tiene alguna asociación con la inducción de la apoptosis, se analizó la localización subcelular de esta proteasa, debido a que en diversas infecciones virales, las proteasas virales se traslocan a la mitocondria y al núcleo para la inducir la apoptosis. Para ello las células CrFK se transfectaron con los plásmidos mCherry y mCherry-NS6/7 y a las 48 hpt se trataron con mitotracker, un marcador de mitocondrias y la localización de la proteína cherry-NS6/7 se determinó por ensayos de microscopía confocal (Figura 18B). Tanto mCherry como mCherry-NS6/7 se expresan en el citoplasma y en el núcleo de las células transfectadas; sin embargo, no se encontró colocalización con las mitocondrias indicando con este resultado que la proteína NS6/7 no se asocia a la red mitocondrial.



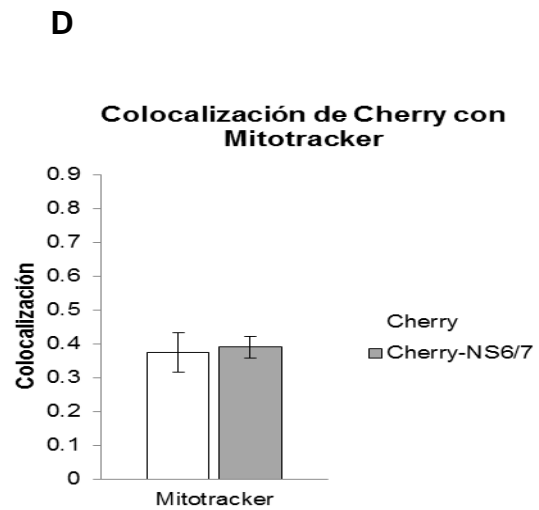
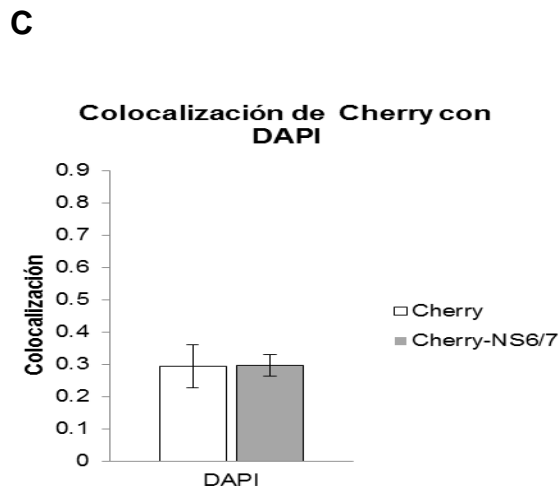
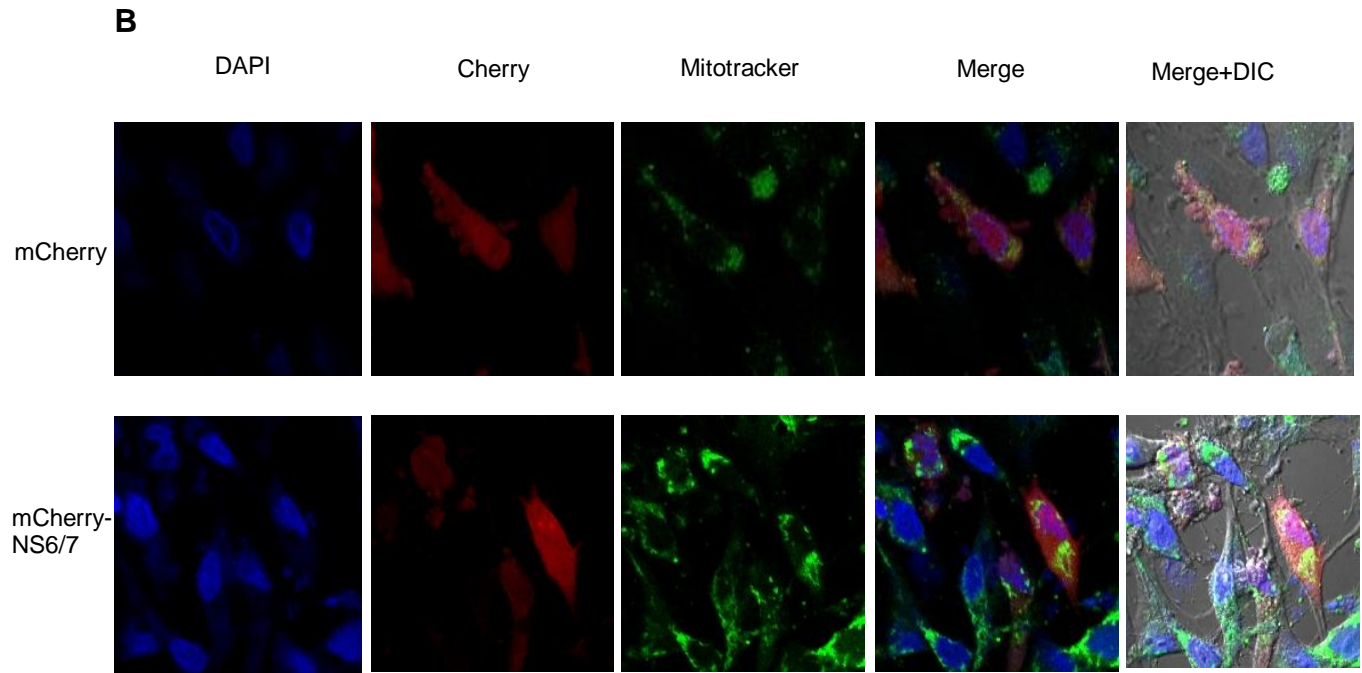


Figura 18. La proteína NS6/7 no colocaliza con el núcleo o la red mitocondrial en células CrFK. A) Microscopía de fluorescencia de células CrFK transfectadas con Cherry (panel superior) o Cherry-NS6/7 (panel inferior), donde se puede observar la inducción de efecto citopático en células transfectadas con Cherry-NS6/7. B) Inmunofluorescencia de células permeabilizadas, transfectadas con mCherry (panel superior) o mCherry-NS6/7 (panel inferior). C) y D) Cuantificación de la colocalización de Cherry con DAPI y Mitotracker, donde no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el coeficiente de Pearson en ambas condiciones. Las desviaciones estándar fueron determinadas por 3 experimentos independientes. Las células fueron analizadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes muestran un corte sencillo tomado de

cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. El coeficiente de Pearson fue determinado por el software Icy.

La expresión de la proteína viral NS6/7 en células CrFK no está asociada con la inducción de la apoptosis.

A pesar de que la proteína Cherry-NS6/7 no se encontraba asociada con la mitocondria, decidimos evaluar si ésta tenía la capacidad de degradar a survivina y XIAP y de inducir apoptosis, en la células CrFK, para ello, la presencia de survivina, XIAP y la integridad de caspasa 3 y la proteína PARP se analizó en extractos proteicos de células transfectadas con mCherry y mCherry-NS6/7 mediante ensayos tipo western blot (Figura 19). No se observaron cambio en los niveles de survivina, XIAP, caspasa-3 y PARP en ninguna de la condiciones probadas, a diferencia de los extractos de células infectadas por 7 h (control positivo), en los que se observa la degradación de XIAP, una reducción en los niveles survivina así como el procesamiento de caspasa-3 y de PARP indicando que la expresión de NS6/7 no está asociado con la inducción de la apoptosis en células transfectadas.

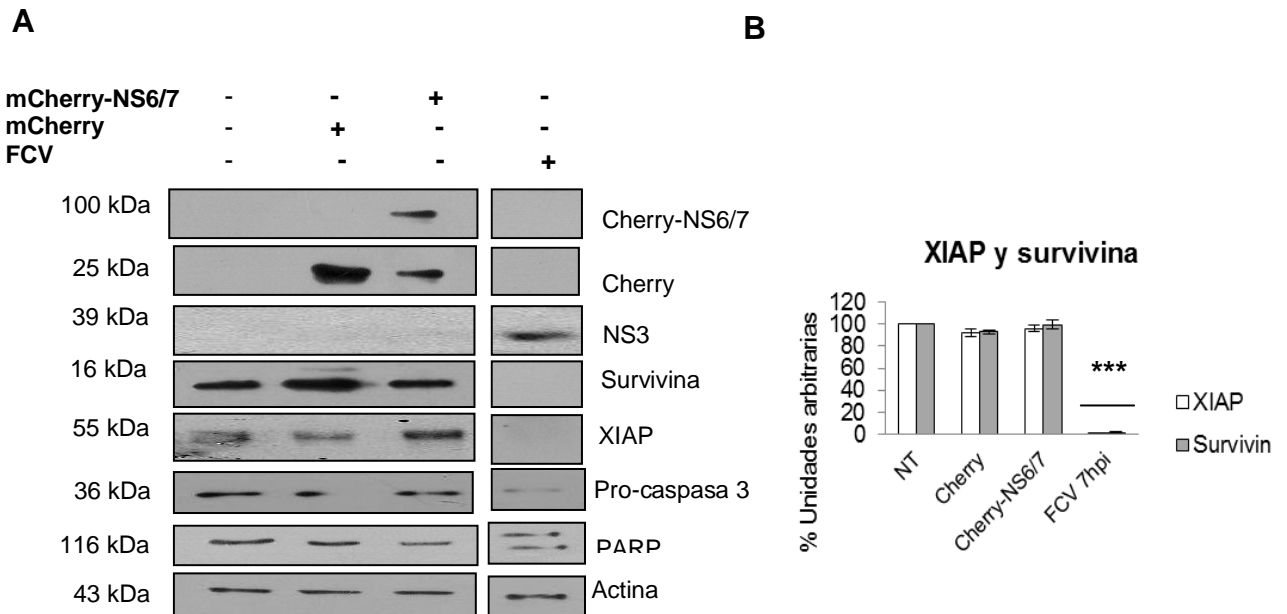


Fig. 19. Expresión de Cherry-NS6/7 no tiene un efecto sobre la expresión de XIAP y survivina ni en la inducción de la apoptosis A) Células CrFK no transfectadas y transfectadas con los plásmidos

mCherry y mCherry-NS6/7 durante 48h, así como infectadas con el FCV a una MOI de 5 durante 7hpi, los extractos totales fueron obtenidos y analizadas por SDS-PAGE. La expresión tanto de Cherry, Cherry-NS6/7 y NS3 fueron analizadas por western blotting usando anticuerpos específicos. La expresión de survivina y XIAP, y el procesamiento de procaspasa-3 y PARP indican la apoptosis. Actina fue usado como control de carga. B) La intensidad de la banda de NS6/7 de las imágenes escaneadas fueron cuantificadas usando el ImageJ software y expresadas como unidades arbitrarias. Desviaciones estándar fueron obtenidas de duplicados de al menos 3 experimentos independientes.

La expresión de la proteína LC induce redondeamiento de las células CrFK, y colocaliza con el núcleo y la mitocondria asociada con la regulación negativa de XIAP y survivina en células CrFK transfectadas.

Para analizar si la proteína LC está involucrada con la regulación negativa de survivina y XIAP, la secuencia de la proteína LC se clonó a partir de la clona infecciosa de FCV Urbana pQ14, donde el producto de PCR de aproximadamente 372 pb se ligó en el vector de transito pJET y posteriormente se subclonó en el vector de expresión eucariótico pAm-Cyan-N1, generando así el plásmido LC-pAm-Cyan-N1(Fig. 20)

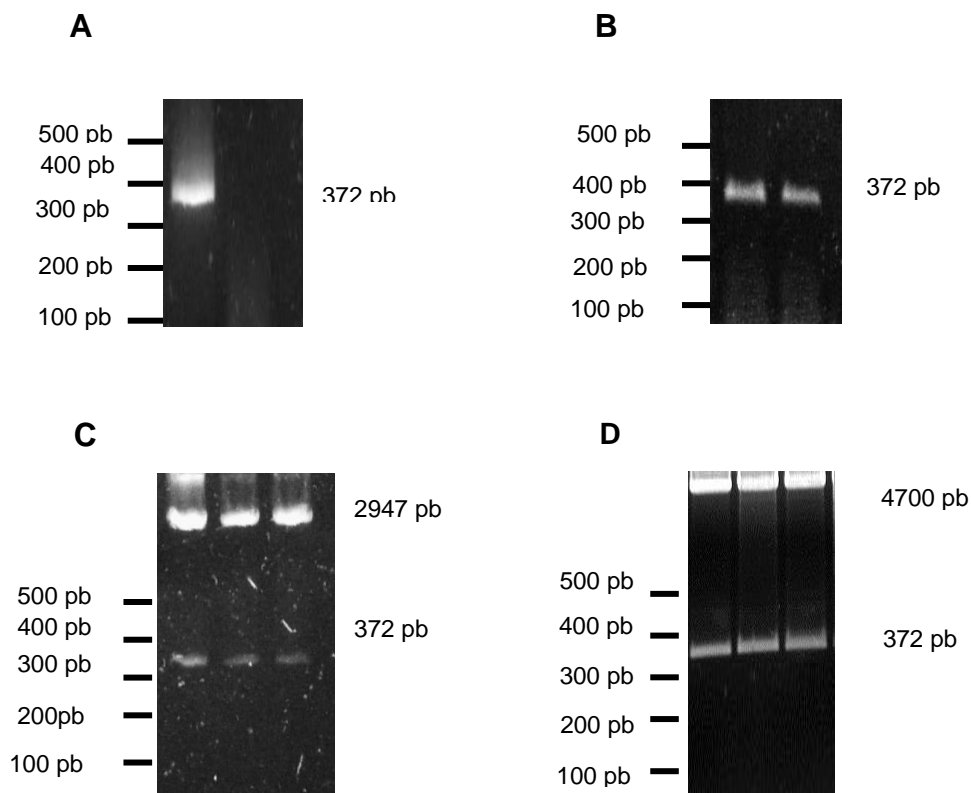
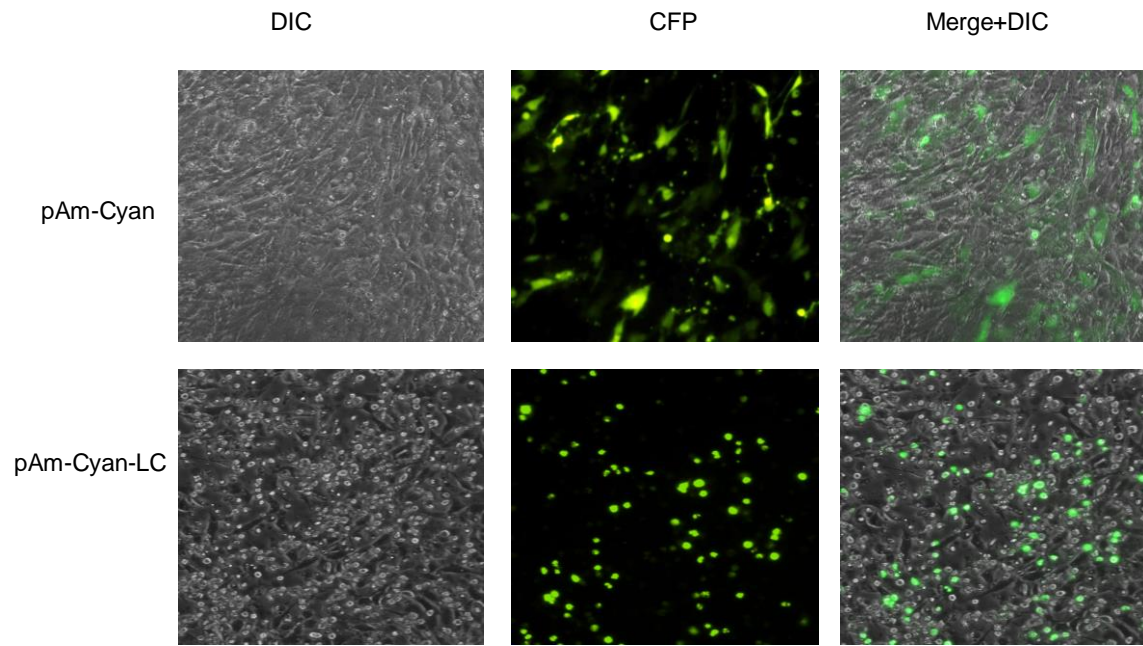
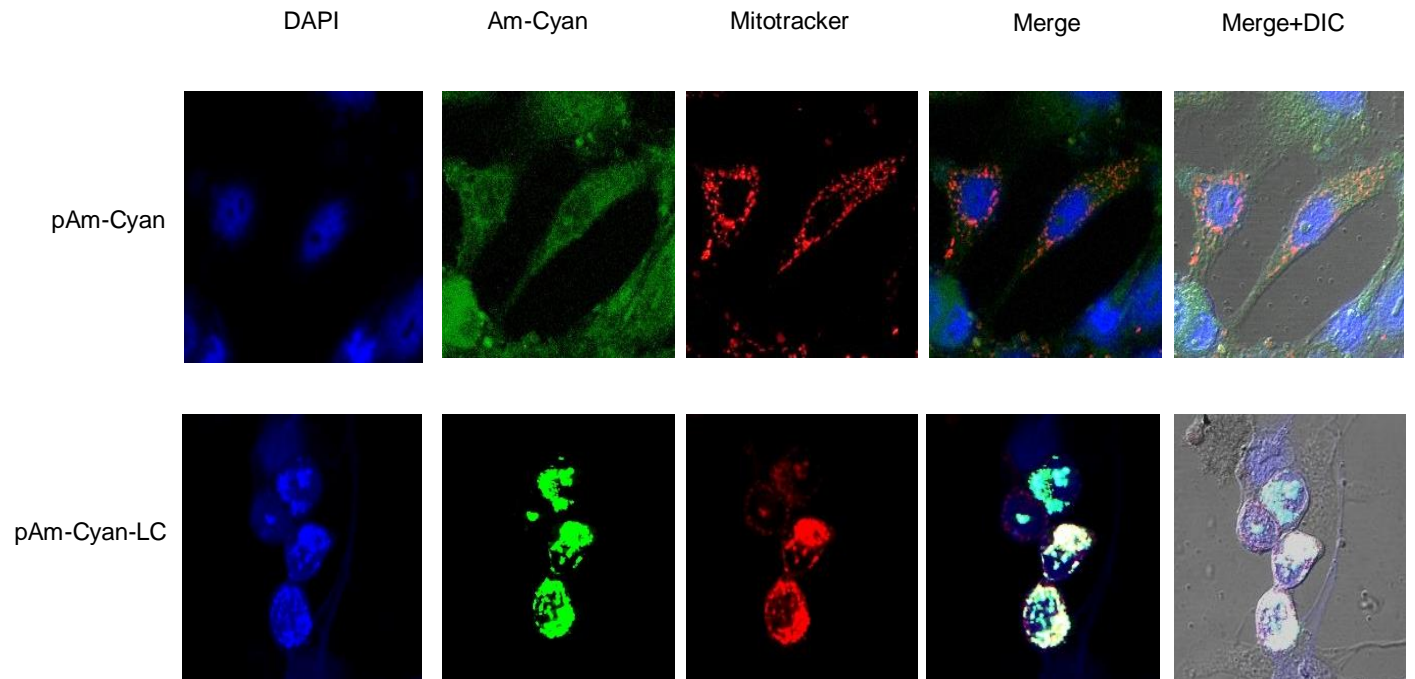


Figura 20. Clonación de LC. A) Amplificación de LC del plásmido de la clona infecciosa de FCV Urbana pQ14. B) PCR colony de 2 colonias positivas a LC. C) Digestión enzimática de DNA plasmídico de 3 clonas diferentes transformadas con el plásmido LC-JET. D) Digestión enzimática de DNA plasmídico de 3 clonas diferentes transformadas con el plásmido LC-pAm-Cyan (panel C, carriles 3 y 4) y pcDNA3.1 (-) (panel F, carriles 2-5) respectivamente.

Los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC se transfectaron en células CrFK por 48 hpt y se evaluó el efecto citopático por microscopía de epifluorescencia (Figura 21A). La expresión de la proteína pAm-Cyan-LC causó un efecto citopático en las células CrFK que consistió en la ruptura de la monocapa, en comparación con las células transfectadas con el vector pAm-Cyan vacío, donde la monocapa se mantuvo intacta (Fig. 21A). Además de que se observó el redondeamiento celular, característico de la infección y que previamente se había asociado a la presencia de esta proteína (1).

Para determinar si la proteasa viral LC tenía alguna asociación con la inducción de la apoptosis, se analizó su localización subcelular. Para ello, las células CrFK se transfectaron con los plásmidos pAm-Cyan o pAm-Cyan-LC y a las 48 hpt se trataron con mitotracker, un marcador de mitocondrias y la localización de la proteína pAm-Cyan-LC se determinó por ensayos de microscopía confocal (Figura 21B). Tanto pAm-Cyan como pAm-Cyan-LC se expresan en el citoplasma y en el núcleo de las células transfectadas; sin embargo, a diferencia con NS6/7, sí se observó colocalización entre las mitocondrias, indicando con este resultado que la proteína LC posiblemente se asocia a la red mitocondrial.

A**B**

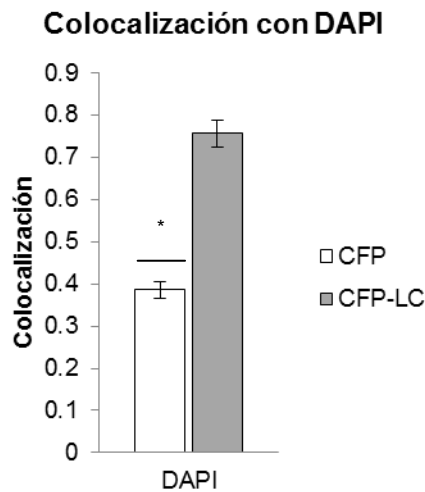
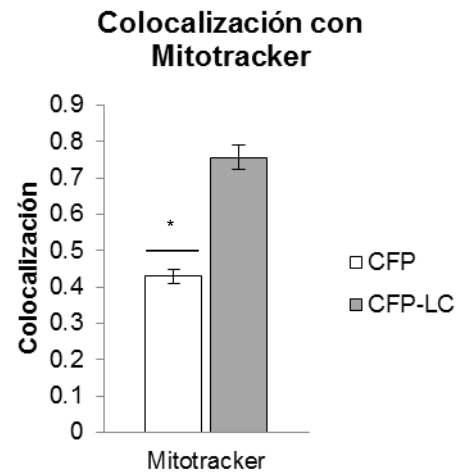
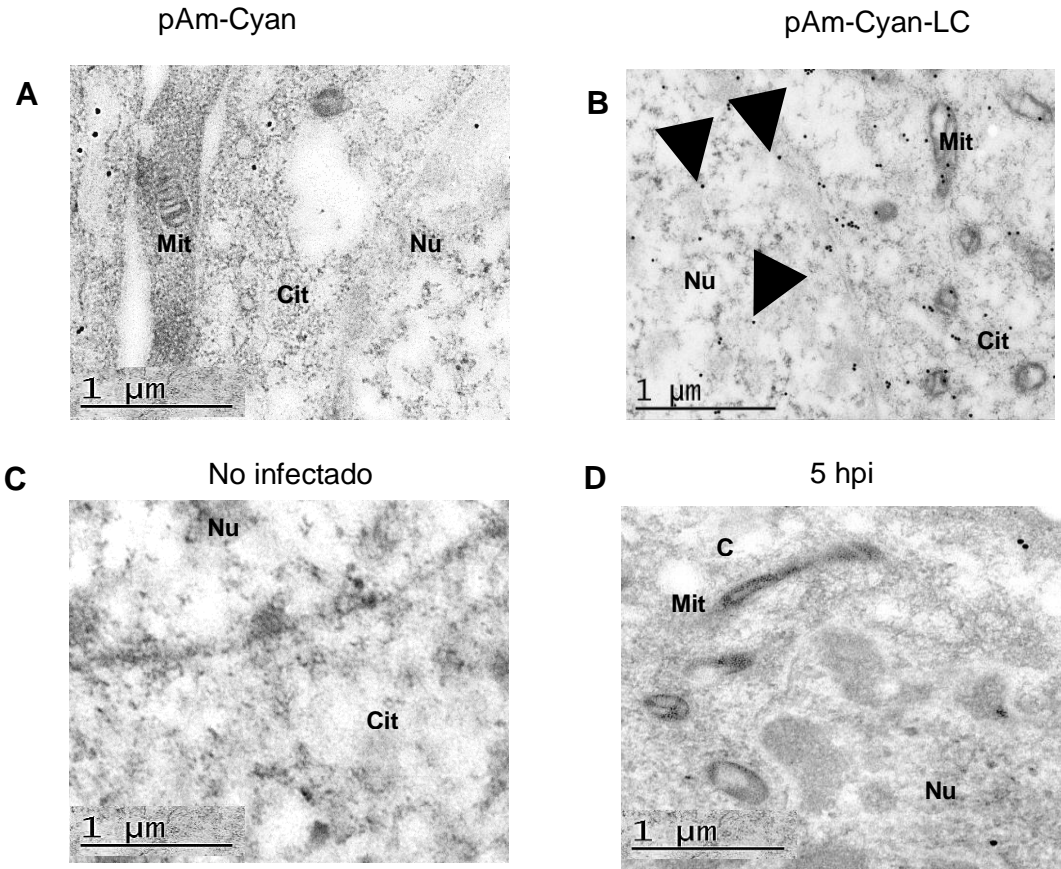
C**D**

Figura 21. La proteína LC colocaliza con el núcleo y la red mitocondrial en células CrFK: A) Microscopía de fluorescencia de células CrFK transfectadas con pAm-Cyan (panel superior) o pAm-Cyan-LC (panel inferior), donde se puede observar la inducción de efecto citopático característico inducido por el FCV en células transfectadas con pAm-Cyan-LC. B) Análisis de la localización subcelular de la proteína pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC donde se observa una fuerte co-localización de pAm-Cyan-LC con DAPI o Mitotracker. C) y D) Cuantificación de la colocalización de pAm-Cyan con DAPI y Mitotracker, donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el coeficiente de Pearson durante la expresión de pAm-Cyan-LC. Las desviaciones estándar fueron determinadas por 3 experimentos independientes. Las células fueron analizadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes muestran un corte sencillo tomado de cortes en Z. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. El coeficiente de Pearson fue determinado por el software Icy.

La proteína LC posiblemente se trasloca al núcleo e induce un re-arreglo en el retículo endoplasmático.

Para corroborar la asociación de LC con el núcleo y la mitocondrial se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión donde se marcó la proteína LC con anticuerpos acoplados a partículas de oro. Se encontró una cantidad estadísticamente significativa de partículas de oro en el núcleo y en el retículo endoplasmático, además, cuando se analizó la morfología del retículo endoplasmático, se encontró un re-arreglo en las

membranas de este organelo en aquellas células que expresan LC-pAm-Cyan comparadas con las que fueron transfectadas con el vector vacío.



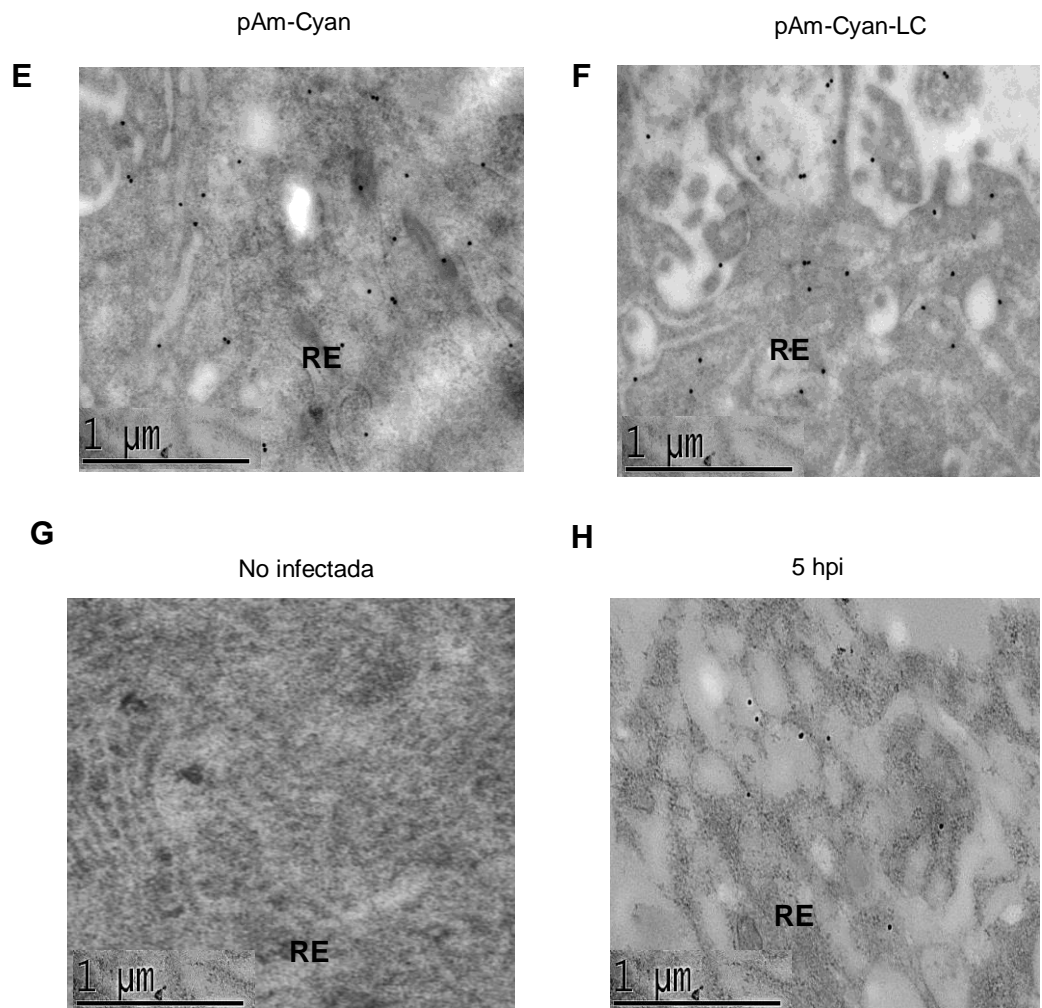


Fig 22. La proteína LC del FCV posiblemente se trasloca al núcleo e induce un re-arreglo en la estructura del retículo endoplásmico. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de núcleo de células transfectadas con A) pAm-Cyan y B) pAm-Cyan-LC (C) no infectadas e D) infectadas con el FCV. Células transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC transfectadas con un inmunomarcaje con partículas de oro de Cyan Mostraron poco marcaje de la presencia de Cyan (A) dentro del núcleo, comparado con las células transfectadas con pAm-Cyan-LC (flechas) (B). La proteína VP1 inmunomarcada fue utilizada como un control de infección para el FCV (D). Alteraciones en la morfología del retículo endoplásmico fueron observadas durante la transfección del pAm-Cyan-LC.F) muy similarmente a lo que ocurre durante la infección con el FCV H), a comparación de las condiciones control E) y G).

Transfección de la proteína LC causa daño mitocondrial.

La regulación negativa de survivina y XIAP están asociadas con la salida de Smac/DIABLO de la mitocondria después de un evento catalizado por caspasa (129), por lo tanto, nosotros quisimos determinar si LC estaba asociados con cambios en la integridad mitocondrial. Células CrFK fueron transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC, y la integridad de la mitocondria fue evaluada por microscopía inmuno-electronica para determinar la asociación de la expresión de LC con la integridad de la mitocondria (Fig. 22). La localización de la proteína se realizó mediante la inmunodetección con partículas de oro, donde por medio de microscopía electrónica se marcó con partículas de oro la proteína Cyan con un anticuerpo específico y se determinó su localización subcelular tanto de Cyan sola (Fig 23 A) y Cyan unida a LC (Fig 23 B)) La proteína LC se encontró extensamente localizada en la membrana mitocondrial, así como en la membrana interior de la mitocondria (Fig. 23B). Además, el daño en la morfología mitocondrial (marcado con *) fue observado en células transfectadas con LC así como en células infectadas (Fig. 23B and 22D), en comparación con las células no infectadas y transfectadas con el vector pAm-Cyan, donde la integridad de la mitocondria se observó sin alteraciones (Fig. 23A and 23C). Estos resultados demuestran que la proteína LC del FCV interactúa con la membrana mitocondrial e induce un daño similar al observado durante la infección.

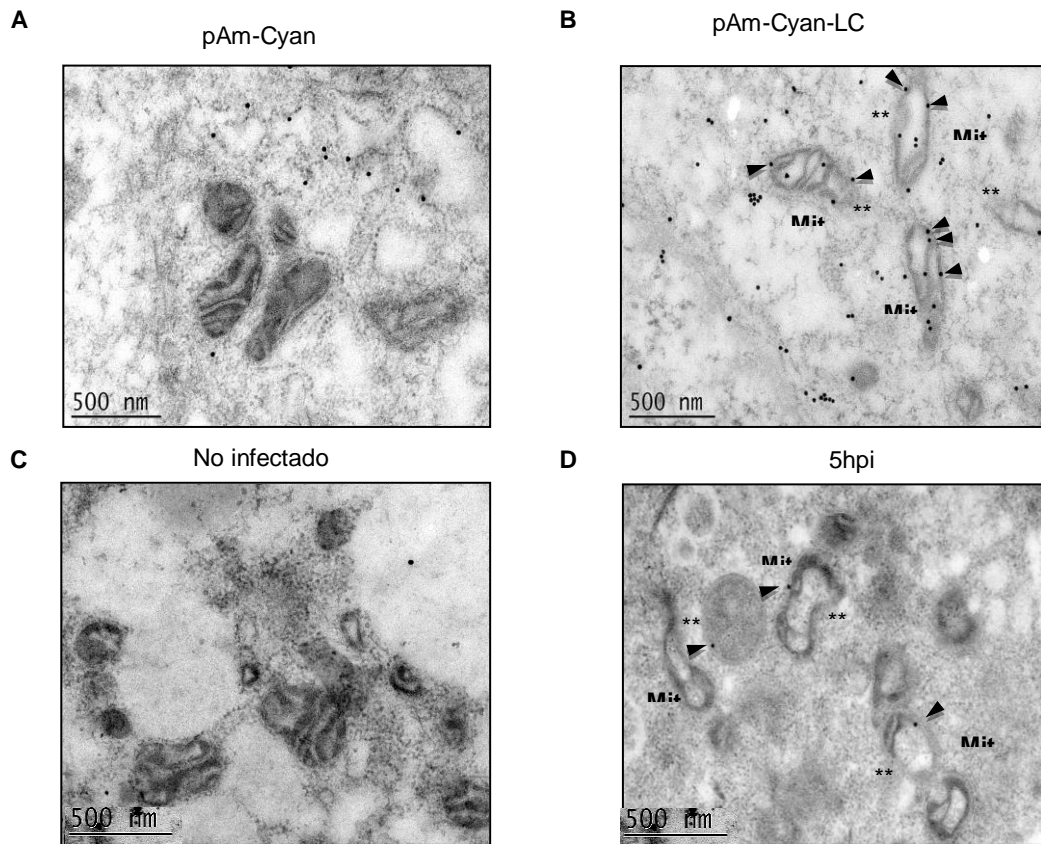


Fig 23. La proteína LC del FCV interactúa con la membrana de la mitocondria e induce daño mitocondrial. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de núcleo de células transfectadas con A) pAm-Cyan y B) pAm-Cyan-LC (C) no infectadas e D) infectadas con el FCV. Células transfectadas con pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC con un inmunomarcaje con partículas de oro de Cyan Mostraron mayormente marcaje de la presencia de Cyan (A) en el citoplasma que en la mitocondria, comparado con las células transfectadas con pAm-Cyan-LC (flechas) (B). La proteína VP1 inmunomarcada fue utilizada como un control de infección para el FCV (D). Alteraciones en la morfología de la mitocondria fueron observadas durante la transfección del pAm-Cyan-LC.F) muy similarmente a lo que ocurre durante la infección con el FCV H), a comparación de las condiciones control E) y G). Alteraciones de la morfología mitocondrial como lo son la desintegración de la membrana (marcada con ***)

La proteína LC está asociada con la regulación negativa de XIAP y survivina en células CrFK transfectadas.

Para analizar si la proteína LC del FCV está asociada con la regulación negativa de survivina y XIAP, células CrFK fueron transfectadas con la construcción LC-pAm-Cyan y el efecto citopático fue evaluado (CPE) por microscopía de epifluorescencia. La expresión de LC causó un CPE característico, el cuál se distingue por el redondeamiento de las células, así como su desprendimiento de la superficie (Fig. 5A), como se tiene previamente descrito (1), en comparación con la monocapa transfectada con pAm-Cyan solo, donde la monocapa permaneció sin cambios (Fig. 5A). Además, los extractos celulares de estas células fueron obtenidos y la integridad de survivina y XIAP fue analizada (Fig. 24B). Ningún cambio en los niveles de survivina, XIAP, caspasa-3 y PARP fueron detectados en células no transfectadas así como en células transfectadas con el vector pAm-Cyan (Fig. 24B); sin embargo una fuerte reducción en los niveles de survivina y XIAP fueron detectados en células transfectadas con LC-pAm-Cyan así como en extractos provenientes de células infectadas, en correlación con el procesamiento de caspasa-3 y PARP (Fig. 24B). Estos resultados en conjunto indican que la LC induce cambios como lo es la regulación negativa de survivina y XIAP y la activación de caspasa-3; soportando la idea de que esta proteína tiene un papel en el establecimiento de la vía intrínseca de la apoptosis y de su relación con la regulación negativa de survivina y XIAP en células infectadas con el FCV.

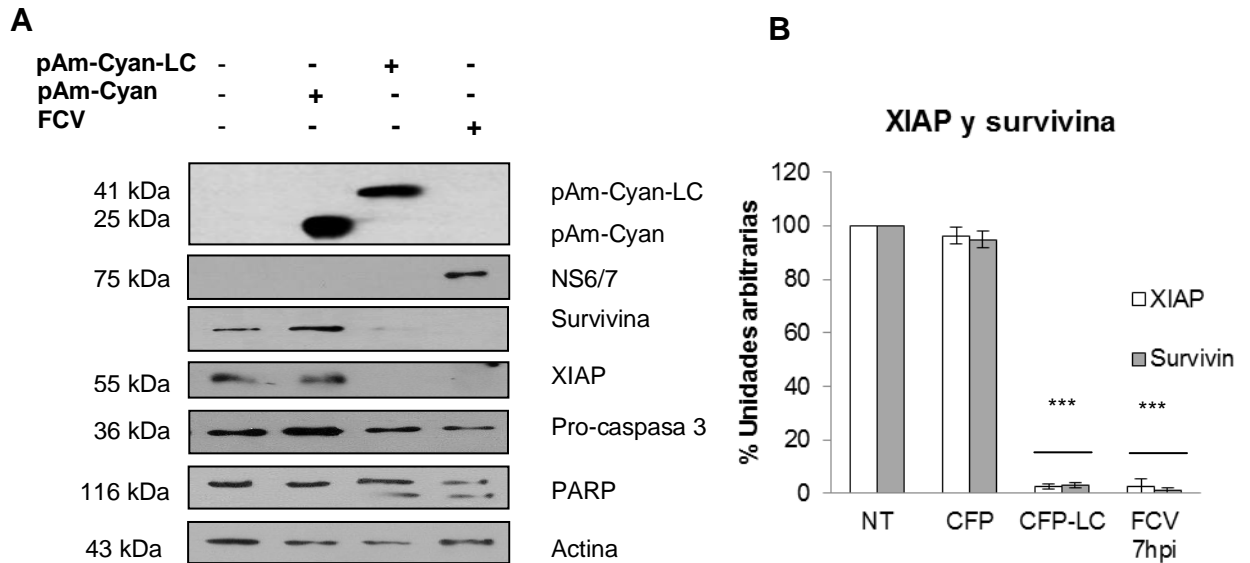


Fig. 24. LC regula negativamente la expresión de survivina y XIAP. A) Se realizaron extractos totales de células no infectadas, infectadas con el FCV a una MOI de 5 por 5 h, y transfectadas con el plásmido pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC por 48 h y fueron analizados por SDS-PAGE. La expresión de proteínas fue analizada por western blotting usando anticuerpos específicos. La integridad de las proteínas survivina y XIAP fue detectada usando anticuerpos específicos. El procesamiento de procaspasa-3 y PARP indica la activación de caspasas. NS6/7 indica la infección viral. Actina fue usado como control de carga. C) La intensidad de las bandas de survivin y XIAP de las imágenes escaneadas fue cuantificada usando el ImageJ software y expresada como unidades arbitrarias. Las desviaciones estándar fueron obtenidas de duplicados de al menos 3 ensayos independientes. Los valores de $P < 0.05$ (***) fueron calculados usando el GraphPad Prism 7.00.

Todos estos resultados indican que regulación negativa de survivina es necesaria para la replicación exitosa del FCV debido a que su presencia o sobre-expresión actúa negativamente a distintos niveles del ciclo replicativo, así como también la proteína viral LC es el factor responsable de la regulación negativa de survivina.

DISCUSIÓN

Algunos miembros de la familia *Caliciviridae* como el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, (RHDV) FCV y MNV han sido importantes modelos de estudio de los mecanismos moleculares de la replicación del calicivirus. La replicación de estos virus resulta en la inducción de un notorio efecto citopático seguido por la inducción de muerte celular asociada con la apoptosis (87, 88, 90, 130-132). Aunque el papel de la inducción de la apoptosis durante de la replicación de los calicivirus aún es desconocido, ha sido reportado que facilita la diseminación de la progenie viral dentro del hospedero (133-135).

Se tiene reportado que la inducción de cambios apoptóticos y bioquímicos así como la activación de la vía mitocondrial ocurren durante la infección del MNV y FCV en cultivo celular, como lo son la condensación cromosomal, fragmentación de DNA, liberación de citocromo c dentro del citosol, y la activación de caspasas (87, 90). Sin embargo, la información del papel de las proteínas pro- y anti-apoptogénicas durante la progresión de la apoptosis aún está muy limitado. Bajo este contexto, Bok et al., en 2009 reportó que survivina, una proteína inhibitoria de la apoptosis, es negativamente regulada durante la infección con el MNV (90). Los autores mostraron que el decremento de survivina a nivel de mRNA y proteína ocurre a partir de las 12 hpi y continúa hasta las 24 hpi. Sin embargo, es desconocido si la regulación negativa de survivina y otros factores anti-apoptóticos es un mecanismo común durante la infección por diferentes calicivirus. Nosotros encontramos que durante la infección con el FCV, survivina y XIAP son reguladas negativamente a partir de las 5 hpi, sugiriendo que su regulación negativa podría ocurrir en todos los miembros de la familia de estos virus.

Survivina es una IAP estructuralmente única que ha sido implicada durante la protección de la apoptosis and regulación de la mitosis (136). Además de survivina, XIAP es también un regulador clave de la supervivencia en tumores y en respuesta a la inducción de la muerte celular. La proteína XIAP es un potente inhibidor de la apoptosis y el aumento de su expresión es inducido por diferentes condiciones como privación de suero y exposición a etopósido (137, 138). En respuesta al estímulo de muerte celular, survivina se asocia con XIAP y este complejo potencia la estabilidad de XIAP y promueve sinérgicamente una actividad anti-apoptótica contra el procesamiento/activación de caspasa-9, sola o en el contexto del apoptosoma y bloquea la apoptosis *in vivo* (139). Nosotros encontramos que la regulación negativa de survivina correlaciona con la regulación negativa de XIAP en concordancia con el hecho de que en la ausencia de survivina, y la degradación de XIAP ocurre rápidamente (139), un punto básico durante la activación de la apoptosis.

Uno de los principales antagonistas de survivina y XIAP es la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO, la cual es un dímero, que impide estéricamente/competitivamente la unión de XIAP con caspasas-3, -7 (140), permitiendo su liberación para dirigir la activación de la muerte celular (141, 142). Aunque Smac/DIABLO no es capaz de degradar a XIAP, su presencia en el citoplasma puede inducir la degradación de XIAP y la inhibición de survivina (143, 144). En concordancia con esto, durante la infección con el FCV, encontramos que la degradación de XIAP y survivina correlaciona con la translocación de Smac/DIABLO del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol, con la consecuente activación de la actividad de caspasas que dirige a la apoptosis y diseminación viral a través del hospedero, contribuyendo a una infección exitosa.

Se ha descrito que posterior a la salida de Smac/DIABLO desde la mitocondria, este es rápidamente degradado por el proteasoma debido a la acción de XIAP, el cual funciona como una ubiquitin ligasa promoviendo la

ubiquitilación de Smac/DIABLO (145). Es por eso, que es posible que la degradación de XIAP durante la infección del FCV es otro factor que podría mantener a Smac/DIABLO activo para promover la activación de otras IAPs y permitir la progresión de la apoptosis..

La estabilización de survivina mediante el empleo de lactacistina, un compuesto que inhibe la actividad proteasomal, y con esto la degradación de algunos miembros de la familia de las IAPs (146, 147), no afectó significativamente la producción de partículas del FCV; sin embargo el virus liberado de las células infectadas fue reducido hasta las 7 hpi, corroborando con reportes previos de diferentes grupos de investigación que indican que la apoptosis está involucrada en la diseminación viral (133, 134). Por otra parte, la sobre-expresión de survivina en células CrFK afectaron no sólo la salida sino también la producción viral; el decremento de la presencia de proteínas virales en este contexto en particular, sugiere que la sobre-expresión de survivina podría tener un efecto negativo en eventos anteriores de la infección, durante la unión y la entrada viral.

A este respecto, en este trabajo determinamos que la sobre-expresión de survivina tuvo un efecto negativo en la unión del FCV a sus células blanco. Los resultados obtenidos a este respecto sugieren que la reducción de la unión de FCV a las células es debido a que las células que sobre-expresan survivina secretan factores que producen la internalización de su receptor(148, 149), la molécula de adhesión JAM-1, al interior de la célula. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado y es una de las razones que proponen para explicar porque las células que sobre expresan a survivina son responsables de la aparición de cáncer, ya que entre otras razones, al internalizarse las moléculas de adhesión, las células pueden liberarse de las uniones estrechas y con esto promover la metástasis(150). Otra de las razones es que la survivina induce una estabilidad celular relacionada con la resistencia a la apoptosis.

Los resultados obtenidos en los que se demuestra que a diferencia de lo que ocurre con la infección por el FCV, ni la sobreexpresión de survivina ni los sobrenadantes de células que sobreexpresan a survivina tuvieron un efecto citoprotector en células infectadas con el MNV, un calicivirus que utiliza un receptor que no es una molécula de adhesión, apoya la idea de que el efecto inhibitorio en los eventos tempranos de la infección por el FCV es realmente debido a la internalización del receptor. La sobre-expresión de survivina solamente afecta a proteínas de la uniones estrechas y no a proteínas como lo es el receptor CD300lf el cual es el receptor funcional para el MNV (68), explicando con esto el por qué la sobre-expresión de survivina en células RAW 264.7 sólo afectó eventos tardíos de la infección como lo es la salida, debido a que se tiene descrito que la inducción de la apoptosis es importante para la liberación de los Calicivirus(135).

Una vez corroborado que survivina y XIAP son reguladas negativamente durante la infección con el FCV, fue de nuestro interés determinar cuál componente viral era el responsable de dicha regulación. Dos de las moléculas más estudiadas fueron: 1) la proteasa polimerasa NS6/7, debido a que varias proteasas virales están involucradas en la inducción de la apoptosis (124, 126); y 2) la proteína LC, la cual es esencial para la producción de virus y está asociada con la inducción del efecto citopático (CPE), causando redondeamiento en las células CrFK y la generación de la rápida diseminación del virus, así como de la activación de caspasas (1).

La transfección de la proteína NS6/7 activa resultó en la destrucción de la monocapa de las células CrFK; sin embargo, no causó el típico redondeamiento en las células CrFK mostradas durante la infección con el FCV (1). A demás, la transfección de NS6/7 no causó reducción alguna en la cantidad de survivina y XAIP; así como tampoco activación de caspasas y degradación de PARP, indicando que NS6/7 no causa apoptosis como proteína viral individual, en contraste con otras proteasas (100, 124-128). Por otra lado, la expresión de la proteína LC causó la destrucción de la

monocapa y el típico redondeamiento de las células CrFK que se induce durante la infección por el FCV, como se describió previamente (1). La transfección de LC también causó la regulación negativa de survivina y XIAP en concordancia con el procesamiento de caspasa-3 y PARP. Estos resultados en conjunto con la presencia de LC en la membrana mitocondrial y dentro de la mitocondria, así como el daño observado por ME fuertemente indican que la LC como proteína individual es responsable de la inducción de apoptosis.

La inducción de la apoptosis intrínseca es un mecanismo común durante la infección con los calicivirus. Aunque varios parámetros de la apoptosis se han documentado que ocurren durante la infección con distintos miembros de diferentes géneros de la familia *Caliciviridae* (3, 87, 88, 90, 130, 151, 152), la regulación negativa de survivina sólo ha sido reportada durante la infección con el MNV (90, 123). En este trabajo demostramos que la regulación negativa de survivina y XIAP ocurre durante la infección con el FCV y durante la expresión de LC; y con esto la regulación de muchas proteínas anti-apoptóticas, entre ellas survivina, que propicia la inducción de la apoptosis, lo cual podría ser una característica común entre todos los miembros de la familia *Caliciviridae*. Considerando las diferentes proteínas involucradas en el establecimiento de la apoptosis, la LC es producida en las células infectadas con el FCV como consecuencia del procesamiento de la proteína precursora de la proteína mayoritaria de cápside VP1, codificada por el ORF2, una característica genética única del miembros de este género. Esto nos indica que las proteínas/moléculas virales responsables para la inducción de la apoptosis en los diferentes miembros de la familia *Caliciviridae* deben de ser diferentes. Bajo esta consideración, la regulación negativa de survivina y la inducción de la apoptosis durante la infección con el MNV es causada por la expresión de la poliproteína codificada por el ORF1 (123), mientras que en el norovirus humano la GII-NTPsa presenta actividad a pro-apoptótica, además de que puede ser potenciada por la co-expresión del N-terminal o proteína p22. (153).

Todos estos resultados en conjunto demuestran que la LC es responsable de la inducción de la apoptosis en células transfectadas. El conocimiento de proteínas virales específicas responsables para la inducción de la apoptosis que involucre la regulación negativa de muchas moléculas tales como survivina y XIAP, es importante no sólo para la biología de los virus, sino también para entender la importancia de elegir como blanco múltiples IAPs, como lo son survivina y XIAP, para potenciar la sensibilidad a la apoptosis a una variedad de tipos de cáncer .(1)

RESUMEN DE RESULTADOS

La presencia de survivina no afecta la síntesis de proteínas no estructurales sólo afecta la salida viral, sin embargo, la sobre-expresión de survivina inhibe la síntesis de proteínas virales no estructurales y producción viral, debido a que afecta eventos tempranos de la infección.

La regulación negativa de survivina es necesaria para que la infección por el FCV sea eficiente, debido a que tanto su presencia como su sobre-expresión afecta a distintos niveles el ciclo replicativo del FCV en células CrFK.

Una citoprotección contra el FCV se produce se produce de manera autócrina y parácrina durante la sobre-expresión de survivina en correlación con la internalización del receptor funcional JAM-1.

Durante la sobre-expresión de survivina se liberan factores al sobrenadante que son capaces de inhibir la unión del FCV a su célula blanco debido a la internalización del receptor JAM-1.

El tratamiento con el sobrenadante de células CrFK que sobre-expresan survivina no tuvieron efecto contra la infección con el MNV en células

RAW264.7 apoyando la idea de que el efecto de survivina sobre el FCV es específico.

La sobre-expresión de survivina en células RAW 264.7 no afectó la síntesis y/o procesamiento de las proteínas no estructurales del MNV, sin embargo, si afectó la salida, indicando que su efecto solamente es en evento tardíos del ciclo replicativo de este calicivirus.

La expresión de NS6/7 a pesar causó efecto citopático en células CrFK, no presentó actividad proapoptótica debido a que no fue capaz de regular negativamente a las proteínas antiapoptóticas XIAP y survivina, ni en la activación de caspasas ni procesamiento de PARP.

La proteína LC además de inducir un efecto citopático típico que sucede durante la infección con el FCV, fue capaz de generar alteraciones y daño estructural en las mitocondrias.

La expresión de la proteína LC en células CrFK causó la regulación negativa de XIAP y survivina, así como de la progresión de la apoptosis debido a la activación de caspasa 3 y procesamiento de PARP, indicando que este factor es el responsable de la regulación negativa de survivina.

CONCLUSIONES

La regulación negativa de survivina es necesaria para que el FCV tenga un ciclo replicativo eficiente, y dicha regulación es causada por la proteína viral LC.

PERSPECTIVAS

- Analizar los sobrenadantes de las células que sobre-expresan survivina para determinar qué posibles factores podrían estar involucrados en la internalización de JAM-1.

- Determinar cuál región de LC es la responsable de la regulación negativa de XIAP y survivina, así como su mecanismo de acción.
- Determinar si LC es capaz de regular negativamente a survivina en líneas celulares de cáncer que la sobre-expresan.
- Probar si LC es capaz de reducir tumores inducidos por la sobre-expresión de survivina en un sistema in vivo.

REFERENCIAS

1. Abente EJ, Sosnovtsev SV, Sandoval-Jaime C, Parra GI, Bok K, Green KY. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of virology*. 2013;87(6):3003-17.
2. Green K. Human caliciviruses. *Fields virology*. 2001;1:841-74.
3. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*. 2003;299(5612):1575-8.
4. Sosnovtsev S, Green KY. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology*. 1995;210(2):383-90.
5. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology*. 2006;3(1):33.
6. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annual Reviews in Microbiology*. 1999;53(1):577-628.
7. Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD, Parashar UD. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLoS medicine*. 2016;13(4):e1001999.
8. Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PloS one*. 2016;11(4):e0151219.
9. Pringle K, Lopman B, Vega E, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future microbiology*. 2015;10(1):53-67.
10. Green K, Ando T, Balayan M, Berke T, Clarke I, Estes M, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(Supplement_2):S322-S30.
11. Clarke I, Estes M, Green K, Hansman G, Knowles N, Koopmans M, et al. *Caliciviridae*. 2012.
12. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of *Caliciviridae*. *Journal of virology*. 2008;82(11):5408-16.
13. L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier É, Lamontagne A-M, Ouardani M, Lacroix G, et al. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of *Caliciviridae*. *Virus genes*. 2009;39(1):66.
14. Wolf S, Reetz J, Otto P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Archives of virology*. 2011;156(7):1143-50.
15. Ng TFF, Marine R, Wang C, Simmonds P, Kapusinszky B, Bodhidatta L, et al. High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *Journal of virology*. 2012;JVI. 00869-12.
16. Wolf S, Reetz J, Hoffmann K, Gründel A, Schwarz B-A, Hänel I, et al. Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Archives of virology*. 2012;157(8):1499-507.
17. Liao Q, Wang X, Wang D, Zhang D. Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Archives of virology*. 2014;159(9):2529-31.
18. Desselberger U, Goodfellow I. Noroviruses: a global cause of acute gastroenteritis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(8):664-5.
19. Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel H. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *Journal of Virology*. 1990;64(7):3331-6.

20. Gaskell R. Viral-induced upper respiratory tract diseases. Feline medicine and therapeutics/edited by EA Chandler, ADR Hilbery; scientific editor CJ Gaskell; for the British Small Animal Veterinary Association. 1985.
21. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *Journal of clinical microbiology*. 1980;12(1):105-11.
22. Khan RR, Lawson AD, Minnich LL, Martin K, Nasir A, Emmett MK, et al. Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;48(3):328-33.
23. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu T-C, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 2010;141(7):1135-45.
24. Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Ramsden CA, Andrianopoulos N, et al. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII. 3. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(7):644-7.
25. Capizzi T, Makari-Judson G, Steingart R, Mertens WC. Chronic diarrhea associated with persistent norovirus excretion in patients with chronic lymphocytic leukemia: report of two cases. *BMC infectious diseases*. 2011;11(1):131.
26. Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Lodenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;blood-2010-12-325886.
27. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972;10(5):1075-81.
28. Lopman B, Brown D, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *Journal of Clinical Virology*. 2002;24(3):137-60.
29. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(18):1776-85.
30. Humphrey T, Cruickshank J, Cubitt W. An outbreak of calicivirus associated gastroenteritis in an elderly persons home. A possible zoonosis? *Epidemiology & Infection*. 1984;93(2):293-9.
31. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*. 2009;44(1):1-8.
32. Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*. 2010;2(3):748-81.
33. Farkas T, Lun CWP, Fey B. Relationship between genotypes and serotypes of genogroup 1 noroviruses: a model for human norovirus antigenic diversity. *Journal of General Virology*. 2014;95(7):1469-78.
34. Hansman GS, Jiang XJ, Green KY. *Caliciviruses: molecular and cellular virology*: Horizon Scientific Press; 2010.
35. McFadden N, Bailey D, Carrara G, Benson A, Chaudhry Y, Shortland A, et al. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS pathogens*. 2011;7(12):e1002413.
36. Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic acids research*. 2008;36(8):2530-46.

37. Sosnovtsev SV, Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*. 2000;277(1):193-203.
38. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang K-O, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *Journal of virology*. 2006;80(16):7816-31.
39. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of virology*. 1992;66(11):6527-32.
40. Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, et al. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *Journal of virology*. 2002;76(17):8582-95.
41. Ettayebi K, Hardy ME. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of virology*. 2003;77(21):11790-7.
42. WEIR ML, Amira K, TRIMBLE WS. Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochemical Journal*. 1998;333(2):247-51.
43. Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *Journal of virology*. 2001;75(4):1611-9.
44. Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *Journal of virology*. 2002;76(14):7060-72.
45. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, et al. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary microbiology*. 2016;185:62-7.
46. Berstein H, Baltimore D. Poliovirus mutant that contains a cold-sensitive defect in viral RNA synthesis. *Journal of virology*. 1988;62(8):2922-8.
47. Doedens JR, Giddings TH, Kirkegaard K. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *Journal of virology*. 1997;71(12):9054-64.
48. Burroughs J, Brown F. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *Journal of general Virology*. 1978;41(2):443-6.
49. Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology*. 2002;12(12):1046-51.
50. Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté J-F. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of virology*. 2000;74(17):7730-7.
51. Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau M-E, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, et al. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(35):25315-25.
52. Chung L, Bailey D, Leen EN, Emmott EP, Chaudhry Y, Roberts LO, et al. Norovirus translation requires an interaction between the C terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; jbc. M114. 550657.
53. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO reports*. 2005;6(10):968-72.

54. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO journal*. 2003;22(11):2852-9.
55. Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *Journal of virology*. 1998;72(4):3051-9.
56. Humoud MN, Doyle N, Royall E, Willcocks MM, Sorgeloos F, van Kuppeveld F, et al. Feline Calicivirus infection disrupts the assembly of cytoplasmic stress granules and induces G3BP1 cleavage. *Journal of virology*. 2016:JVI. 00647-16.
57. Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang K-O, Babu V, Uche U, Arnold JJ, et al. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of virology*. 2005;79(4):2393-403.
58. Ng KK-S, Pendás-Franco N, Rojo J, Boga JA, Machín À, Alonso JMM, et al. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(16):16638-45.
59. Prasad B, Rothnagel R, Jiang X, Estes M. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of virology*. 1994;68(8):5117-25.
60. Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BV, Estes MK. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of virology*. 2002;76(8):4044-55.
61. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999;286(5438):287-90.
62. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *Journal of virology*. 2003;77(23):12562-71.
63. Subba-Reddy CV, Yunus MA, Goodfellow IG, Kao CC. Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *Journal of virology*. 2012:JVI. 01208-12.
64. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang K-O, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *Journal of virology*. 2005;79(7):4012-24.
65. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(9):1335-7.
66. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature medicine*. 2003;9(5):548.
67. Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *Journal of virology*. 2006;80(9):4482-90.
68. Orchard RC, Wilen CB, Doench JG, Baldrige MT, McCune BT, Lee Y-CJ, et al. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science*. 2016;353(6302):933-6.
69. Stuart AD, Brown TDK. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *Journal of virology*. 2006;80(15):7500-9.
70. Kreutz LC, Seal B, Mengeling W. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Archives of virology*. 1994;136(1-2):19-34.

71. Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin-and cholesterol-dependent pathway. *Journal of General Virology*. 2010;91(6):1428-38.
72. Perry JW, Taube S, Wobus CE. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus research*. 2009;143(1):125-9.
73. Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *Journal of virology*. 2010;84(12):6163-76.
74. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(8):3542-52.
75. Sharma DK, Choudhury A, Singh R, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *Journal of Biological Chemistry*. 2002.
76. Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol*. 2011;195(7):1071-82.
77. Shivanna V, Kim Y, Chang K-O. Endosomal acidification and cathepsin L activity is required for calicivirus replication. *Virology*. 2014;464:287-95.
78. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:23-43.
79. Hyde JL, Sosnovtsev SV, Green KY, Wobus C, Virgin HW, Mackenzie JM. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *Journal of virology*. 2009;83(19):9709-19.
80. Rohayem J, Robel I, Jäger K, Scheffler U, Rudolph W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *Journal of virology*. 2006;80(14):7060-9.
81. Gutiérrez-Escolano AL. Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. *Future Virology*. 2014;9(2):147-60.
82. Bailey D, Karakasiliotis I, Vashist S, Chung LMW, Reese J, McFadden N, et al. Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *Journal of virology*. 2010;84(6):2859-70.
83. Karakasiliotis I, Vashist S, Bailey D, Abente EJ, Green KY, Roberts LO, et al. Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS One*. 2010;5(3):e9562.
84. Cancio-Lonches C, Yocupicio-Monroy M, Sandoval-Jaime C, Galvan-Mendoza I, Ureña L, Vashist S, et al. Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *Journal of virology*. 2011;85(16):8056-68.
85. Hernández BA, Sandoval-Jaime C, Sosnovtsev SV, Green KY, Gutiérrez-Escolano AL. Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA. *Virology*. 2016;489:51-62.
86. López-Manríquez E, Vashist S, Ureña L, Goodfellow I, Chavez P, Mora-Heredia JE, et al. Norovirus Genome Circularisation and Efficient Replication is Facilitated by Binding of PCBP2 and hnRNP A1. *Journal of virology*. 2013;JVI. 03433-12.

87. Naton A, Kass GE, Carter MJ, Roberts LO. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *Journal of general virology*. 2006;87(2):357-61.
88. Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*. 2003 Jul;94(1):1-10. PubMed PMID: WOS:000184190300001. English.
89. Furman LM, Maaty WS, Petersen LK, Ettayebi K, Hardy ME, Bothner B. Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection. *Virology journal*. 2009;6(1):139.
90. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264. 7 cells is associated with downregulation of survivin. *Journal of virology*. 2009;83(8):3647-56.
91. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(6):2239-44.
92. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & development*. 1996;10(1):1-15.
93. Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37(11):719-27.
94. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & development*. 1999;13(3):239-52.
95. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
96. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 1999;68(1):383-424.
97. Seshagiri S, Miller LK. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(25):13606-11.
98. Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(4):287.
99. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(11):897.
100. Li M-L, Hsu T-A, Chen T-C, Chang S-C, Lee J-C, Chen C-C, et al. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology*. 2002;293(2):386-95.
101. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*. 2001;104(5):781-90.
102. Pyrko P, Soriano N, Kardosh A, Liu Y-T, Uddin J, Petasis NA, et al. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Molecular cancer*. 2006;5(1):19.
103. Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowsert LM, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*. 2000;2(3):235-41.
104. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(6):390-7.
105. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2002 Jun;3(6):401-10. PubMed PMID: WOS:000175907600013. English.

106. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J*. 1999 Oct 1;18(19):5242-51. PubMed PMID: 10508158. Pubmed Central PMCID: 1171595.
107. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):781-90. PubMed PMID: 11257231.
108. Pyrko P, Soriano N, Kardosh A, Liu YT, Uddin J, Petasis NA, et al. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer*. 2006 May 18;5. PubMed PMID: WOS:000239968900001. English.
109. Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*. 2000 May-Jun;2(3):235-41. PubMed PMID: WOS:000087401500006. English.
110. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo Journal*. 2001 Dec 3;20(23):6627-36. PubMed PMID: WOS:000172629100008. English.
111. Al-Molawi N, Beardmore VA, Carter MJ, Kass GEN, Roberts LO. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *Journal of General Virology*. 2003 May;84:1237-44. PubMed PMID: WOS:000182638700022. English.
112. Natoni A, Kass GEN, Carter MJ, Roberts LO. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *Journal of General Virology*. 2006 Feb;87:357-61. PubMed PMID: WOS:000234906800013. English.
113. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. Apoptosis in Murine Norovirus-Infected RAW264.7 Cells Is Associated with Downregulation of Survivin. *Journal of Virology*. 2009 Apr 15;83(8):3647-56. PubMed PMID: WOS:000264327300022. English.
114. Herod MR, Salim O, Skilton RJ, Prince CA, Ward VK, Lambden PR, et al. Expression of the Murine Norovirus (MNV) ORF1 Polyprotein Is Sufficient to Induce Apoptosis in a Virus-Free Cell Model. *Plos One*. 2014 Mar 5;9(3). PubMed PMID: WOS:000332479400117. English.
115. Yen J-B, Wei L-H, Chen L-W, Chen L-Y, Hung C-H, Wang S-S, et al. Subcellular localization and functional characterization of GII. 4 norovirus-encoded NTPase. *Journal of virology*. 2018;92(5):e01824-17.
116. Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol*. 1998 Apr;72(4):3051-9. PubMed PMID: 9525628. Pubmed Central PMCID: 109753.
117. Croft SN, Walker EJ, Ghildyal R. Human Rhinovirus 3C protease cleaves RIPK1, concurrent with caspase 8 activation. *Scientific reports*. 2018;8(1):1569.
118. Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Groszmann Z, Nophar Y, Luria S, et al. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(4):1271-7.
119. Berke T, Matson D. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Archives of virology*. 2000;145(7):1421-36.
120. Nakamura K, Someya Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Sato T, et al. A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *Journal of virology*. 2005;79(21):13685-93.

121. Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 INK4a and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene*. 2000;19(29):3225.
122. Davies C, Brown C, Westphal D, Ward J, Ward VK. Murine Norovirus replication induces a G0/G1 cell cycle arrest in asynchronous growing cells. *Journal of virology*. 2015;JVI. 03673-14.
123. Herod MR, Salim O, Skilton RJ, Prince CA, Ward VK, Lambden PR, et al. Expression of the murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PloS one*. 2014;9(3):e90679.
124. Zaragoza C, Saura M, Padalko EY, Lopez-Rivera E, Lizarbe TR, Lamas S, et al. Viral protease cleavage of inhibitor of κ B α triggers host cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(50):19051-6.
125. Chau DH, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, et al. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis*. 2007;12(3):513-24.
126. Barco A, Feduchi E, Carrasco L. Poliovirus protease 3Cpro kills cells by apoptosis. *Virology*. 2000;266(2):352-60.
127. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *Journal of general virology*. 2003;84(8):2191-5.
128. Lin J-C, Lin S-C, Chen W-Y, Yen Y-T, Lai C-W, Tao M-H, et al. Dengue viral protease interaction with NF- κ B inhibitor α/β results in endothelial cell apoptosis and hemorrhage development. *The Journal of Immunology*. 2014;193(3):1258-67.
129. Prévost C, Sharp ME, Kory N, Lin Q, Voth GA, Farese RV, et al. Mechanism and determinants of amphipathic helix-containing protein targeting to lipid droplets. *Developmental cell*. 2018;44(1):73-86. e4.
130. Al-Molawi N, Beardmore VA, Carter MJ, Kass GE, Roberts LO. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *Journal of general virology*. 2003;84(5):1237-44.
131. Niedzwiedzka-Rystwej P, Deptula W. Apoptosis of peripheral blood leukocytes from rabbits infected with non-haemagglutinating strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012 Sep 15;149(1-2):54-7. PubMed PMID: WOS:000308831300008. English.
132. Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *Journal of Comparative Pathology*. 2000 Aug-Oct;123(2-3):135-40. PubMed PMID: WOS:000089456600008. English.
133. Olsen CW, Kehren JC, Dybdahl-Sissoko NR, Hinshaw VS. bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *Journal of virology*. 1996;70(1):663-6.
134. Rodríguez-Grille J, Busch LK, Martínez-Costas J, Benavente J. Avian reovirus-triggered apoptosis enhances both virus spread and the processing of the viral nonstructural muNS protein. *Virology*. 2014;462:49-59.
135. Alvarez-Sanchez C, Cancio-Lonches C, Mora-Heredia JE, Santos JC, Barrera-Vázquez OS, Yocupicio M, et al. Negative effect of heat shock on FCV release from infected cells is associated with the control of apoptosis. *Virus research*. 2015.
136. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(1):46.
137. Wei Y, Sinha SC, Levine B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*. 2008;4(7):949-51.

138. Gill C, Dowling C, O'Neill AJ, Watson RWG. Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Molecular cancer*. 2009;8(1):39.
139. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(33):34087-90.
140. Flanagan L, Sebastia J, Tuffy LP, Spring A, Lichawska A, Devocelle M, et al. XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis. *Cell death & disease*. 2010;1(6):e49.
141. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *Journal of Biological Chemistry*. 2002.
142. Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin X-M, et al. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(35):9278-93.
143. Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal*. 2004;18(14):1782-4.
144. McNeish I, Lopes R, Bell S, McKay T, Fernandez M, Lockley M, et al. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental cell research*. 2005;302(1):69-82.
145. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(39):36611-6.
146. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of cell science*. 2000;113(23):4363-71.
147. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 2000;288(5467):874-7.
148. Fernández JG, Rodríguez DA, Valenzuela M, Calderon C, Urzúa U, Munroe D, et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Molecular cancer*. 2014;13(1):209.
149. Stamatovic SM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. Relocalization of junctional adhesion molecule-A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Molecular and cellular biology*. 2012:MCB. 06678-11.
150. Naik MU, Naik TU, Suckow AT, Duncan MK, Naik UP. Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer research*. 2008;68(7):2194-203.
151. Jung J, Lee B, Tai J, Park J, Lee Y. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *Journal of comparative pathology*. 2000;123(2-3):135-40.
152. Alonso C, Oviedo J, Martin-Alonso J, Diaz E, Boga J, Parra F. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Archives of virology*. 1998;143(2):321-32.
153. Yen JB, Wei LH, Chen LW, Chen LY, Hung CH, Wang SS, et al. Subcellular Localization and Functional Characterization of GII.4 Norovirus-Encoded NTPase. *J Virol*. 2018 Mar 1;92(5). PubMed PMID: 29212938. Pubmed Central PMCID: 5809722.

ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
FCV	calicivirus felino
HuCV	calicivirus humanos
GA	gastroenteritis
°C	grados Celsius
H ⁺	hidrógeno
hpi.	horas post-infección
Kb	kilo bases
kDa	kilo daltones
ORF	marco de lectura abierto
TA	temperatura ambiente
µg	microgramos
µl	microlitros
mg	miligramos
ml	mililitros
hpi	horas post-infección
hpt	horas post-transfección
min	minutos
ng	nanogramos
nm	nanómetros
nts	nucleótidos
pb	pares de bases
RNT	región no traducida
NV	virus Norwalk
WB	western blot
LC	Líder de la cápside