



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

*“Papel del proteasoma en la replicación del calicivirus
felino”*

T E S I S

Que presenta

IBT. CARLO ARIEL FLORES CARRILLO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de la Tesis:

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

Enero, 2025

Agradecimientos

Ninguna persona puede estar donde está sin la ayuda de otros. No podemos existir ni crecer sin la ayuda de otros. Asimismo, nadie llegaría lejos en sus proyectos si en verdad se enfrentara a ellos en completa soledad. Sin duda alguna, este trabajo no es la excepción. Su conclusión no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas que han estado a mi lado. Algunas de ellas ya no están físicamente conmigo, pero sé que lo que hicieron por mí y por mi familia ha sido de muchísima ayuda para que haya logrado terminar este proyecto (entre muchos otros). Otras personas todavía están conmigo y agradezco a Dios el poder estar con ellas. Unas incluso han estado conmigo desde el inicio de mi vida y, claro, otras he tenido el placer de conocerlas a lo largo de ella. Sin embargo, algo que todas ellas tienen en común es que sé que, sin importar el problema, ellas han estado, están y estarán ahí.

Primero, gracias a Dios por bendecirme con la vida y la salud; así como de poner en mi vida a tantas personas que tanto han hecho por mí.

Segundo, a mi familia, porque desde mis abuelos paternos, a quienes tuve la fortuna de conocerlos antes de que ya no pudiera, hasta mis hermanos y primos, sé que en todos ellos puedo encontrar la luz para seguir adelante aun en los momentos más difíciles. Asimismo, aprovecho para agradecer el tener la fortuna de contar con el acompañamiento tan cálido de las mascotas de la familia, que sin duda alguna, son seres ejemplares.

Hago una especial mención por mis abuelos maternos, a los que aprecio sin límites y quienes me han acogido con gran calidez. Una más por mis padres, quienes han ido más allá de lo que muchos otros hubieran ido. Otra más por mis hermanos, quienes son mis indiscutibles consejeros y ayudantes de mayor confianza. Y una más por mis tíos María del Socorro Carrillo Castro y Jesús Velázquez Roldán, quienes siempre me han ayudado a vencer las enfermedades prontamente.

Tercero, a mis amigos, con quienes tantos buenos ratos he pasado y a quienes también he recurrido en busca de ayuda o consejo.

Cuarto, a todos los miembros del laboratorio de la Dra. Lorena Gutiérrez, quienes me enseñaron mucho de lo que aprendí estos últimos años y quienes me acogieron en todo este tiempo.

Hago una especial mención por la Dra. Lorena Gutiérrez, quien incluso desde antes de que yo fuera parte de su laboratorio, siempre estuvo dispuesta a ayudarme con la mejor disposición. Agradezco también el que haya abierto su laboratorio a mí y el acompañarme a lo largo de este proyecto como mi directora.

Quinto, a los asesores de este proyecto, la Dra. Rosa María Del Ángel y el Dr. Tomás David López Díaz, a quienes agradezco la oportunidad de contar con sus perspectivas a lo largo de este trabajo.

Y sexto, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias, y Tecnologías por el apoyo económico otorgado para mis estudios de maestría de tiempo completo (número de apoyo: 825435).

Sin duda alguna, lo más valioso que hay en la vida de un ser humano son quienes, por su propia voluntad, han decidido acompañarlo. ¡Muchas gracias!

Contenido

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Tabla de figuras.....	11
Abreviaturas.....	12
Introducción	14
Generalidades del <i>calicivirus felino (FCV)</i>	14
El ciclo replicativo del FCV	15
Sobre el receptor celular para la unión y entrada del FCV a la célula blanco	15
Sobre el genoma del FCV: generalidades, traducción y replicación	17
Generalidades del proteasoma	19
El UPS	19
El proteasoma y las infecciones virales	25
Justificación.....	29
Hipótesis.....	29
Objetivos.....	30
General	30
Específicos	30
Materiales y métodos.....	30
Esquema general del trabajo	30
Objetivo específico 1	30
Objetivo específico 2	31
Células y <i>stock</i> viral	31
Medio de cultivo y células utilizadas	31
Infecciones y <i>stock</i> viral	32
Ensayos de titulación viral por <i>TCID50</i>	33

Tratamiento de los CCs con el <i>PI</i>	34
Tratamiento con <i>MG132</i> , cosecha y lisis de los CCs.....	34
Cuantificación y electroforesis de los extractos de proteínas totales	35
Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	36
Ensayos de <i>Wb</i>	36
Resultados	37
La actividad del proteasoma de las células CRFK no se inhibe con un tratamiento por nueve horas con <i>MG132</i> a 0.01, 0.1 o 1 μM	38
El <i>tratamiento preinfección</i> con el FCV con 25 μM de <i>MG132</i> causa un retraso del <i>CPE</i>, y una reducción estadísticamente significativa de los niveles de las proteínas virales <i>VPI</i> (~60 kDa) y <i>NS3</i>, y del título viral de los sobrenadantes de los cultivos infectados	41
Análisis del <i>CPE</i> con el <i>tratamiento preinfección</i>	42
Niveles de las proteínas virales <i>VPI</i> (~60 kDa) y <i>NS3</i> con el <i>tratamiento preinfección</i>	43
Cuantificación de las partículas virales infectivas en los sobrenadantes de los CCs sujetos al <i>tratamiento preinfección</i>	48
El <i>tratamiento posinfección</i> de células CRFK con 25 μM de <i>MG132</i> causa una reducción estadísticamente significativa de los niveles de las proteínas virales <i>VPI</i> (~60 kDa) y <i>NS3</i>, y del título viral de los sobrenadantes de los cultivos infectados	50
Análisis del <i>CPE</i> con el <i>tratamiento posinfección</i>	51
Niveles de las proteínas virales <i>VPI</i> (~60 kDa) y <i>NS3</i>	52
Cuantificación de las partículas virales infectivas en los sobrenadantes de los CCs sujetos al <i>tratamiento posinfección</i>	56
Discusión	57
Elección de 25 μM como concentración a usar de <i>MG132</i> para los tratamientos <i>pre-</i> y <i>posinfección</i>	58
<i>Tratamiento preinfección</i> de los CCs infectados con el FCV	60
<i>Tratamiento posinfección</i> de los CCs infectados con el FCV	61

Conclusiones 65

Prospectivas 65

Referencias 67

Resumen

El proteasoma es parte de uno de los dos principales ejes catabólicos en las células eucariotas, el sistema ubiquitina-proteasoma. Se ha reportado que la replicación eficiente de diversos virus depende del proteasoma; sin embargo, esta posible contribución no ha sido investigada directamente para los miembros de la familia *Caliciviridae*. No obstante, recientemente en nuestro laboratorio se obtuvieron resultados que sugieren que el calicivirus felino (FCV) requiere de proteasomas funcionales para replicarse eficientemente *in vitro*. Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en el estudio de la participación del proteasoma en la replicación del FCV. Para este fin, se ocupó el *MG132*, el cual inhibe al proteasoma aunque también a otros componentes celulares, como la *cathepsina L*, la cual ha sido implicada en la entrada del FCV. Para empezar, se evaluó la capacidad de diferentes concentraciones de *MG132* de inhibir al proteasoma, utilizando a *Hsp70* como indicador. Así se eligió la concentración de 25 μM , con la que se realizaron ensayos de infección bajo dos esquemas de tratamiento: *tratamiento pre-* y *posinfección*. En el primero, el *MG132* se añadió desde dos horas antes de la infección. En el segundo, el tratamiento comenzó después de la adsorción viral y con este se buscó dejar a un lado la contribución de la inhibición de la *cathepsina L*. En ambos tratamientos, se evaluaron el progreso del efecto citopático (*CPE*), los niveles de proteínas virales por *Western blot* y el título viral de los sobrenadantes de los cultivos infectados por medio del ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular del 50%. De esta manera, se notó un retraso del *CPE* en las células infectadas y tratadas con 25 μM de *MG132* bajo el esquema del *tratamiento preinfección*; mas no se encontró un retraso similar con el *tratamiento posinfección*. Además, y con los dos esquemas de tratamiento, se hallaron en las células infectadas y tratadas con el inhibidor menores niveles de las proteínas virales *NS3* y *VPI*, así como menores títulos virales en sus sobrenadantes. En suma, la similitud de los resultados bajo ambos esquemas de tratamiento sugiere que el proteasoma es importante para la replicación del FCV en cultivo celular. No obstante, queda por descartar que la inhibición de blancos moleculares diferentes al proteasoma estén detrás de lo observado.

Abstract

The proteasome is part of one of the chief catabolic pathways in eukaryotic cells: the ubiquitin-proteasome system. Studies have shown its relevance for the efficient replication of numerous viruses; yet its role in the life cycle of the caliciviruses has not been directly addressed. Nonetheless, a recent study conducted in our laboratory suggests that functional proteasomes are required for the efficient, *in vitro* replication of the feline calicivirus (FCV). Thus, the present work was set to widen the knowledge on the possible participation of the proteasome on the replication of the FCV. Consequently, *MGI32* was used to inhibit the proteasome but without overlooking its numerous cellular targets, among which an enzyme implicated in the FCV's entry to the cells is found (i.e. *cathepsin L*). First, different concentrations of *MGI32* were tested in terms of their proteasomal inhibitory capacity. For this end, *Hsp70* was used and, as a result, 25 μ M of *MGI32* were selected as working concentration for the rest of the study. Then, infection studies were conducted following two different schemes: a *pre-* and a *post-infection treatment*. On one hand, with the *pre-infection treatment* the *MGI32* was first added to the culture two hours prior to the addition of the virus. On the other hand, with the *post-infection treatment* the inhibitor was added only after the viral inoculum had been removed from the culture, with this latter scheme being devoid of the contribution of the inhibition of *cathepsin L*. No matter the scheme, the cytopathic effect (CPE), the viral protein levels, and the supernatant viral titres were studied. Regarding the viral protein levels, they were evaluated by Western blot, while the viral titres were determined by the 50% tissue culture infectious dose assay. As a result, a delayed CPE was observed in the infected cells subjected to the *pre-infection treatment*; however, a similar delay was not observed in the infected cells subjected to the *post-infection treatment*. As for *NS3* and *VPI* protein levels, and the viral titre of the supernatants, all infected cells, regardless of the treatment, had these parameters reduced. In summary, given the similarity of the results of the infection experiments despite the utilized treatment scheme, the proteasome seems to be an important cellular factor for the efficient, *in vitro* replication of the FCV. However, the contribution of other molecular targets of the *MGI32* remains to be discarded.

Tabla de figuras

Figura 1 El ciclo replicativo del FCV.....	16
Figura 2 Los componentes y procesos principales del UPS.....	20
Figura 3 Componentes proteicos del proteasoma 20S.	24
Figura 4 Esquema general del trabajo del objetivo 1: elección de la concentración de MG132 a usar en experimentos con infección.	30
Figura 5 Esquema general del trabajo del objetivo 2: estudio de tres parámetros de la eficiencia de la infección con el FCV (Urbana) en CCs de CRFK.....	31
Figura 6 El proteasoma de células CRFK se inhibe a concentraciones de 10 y 25 mM de MG132 en tratamientos por nueve horas.....	40
Figura 7 El tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.	42
Figura 8 El tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132 retrasa el CPE de los CCs infectados con el FCV.....	43
Figura 9 Los niveles de las proteínas virales VP1 (~60 kDa) y NS3 se reducen significativamente con el tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.....	45
Figura 10 Los niveles de otras especies proteicas detectadas con el suero α -VP1 también se comparten a la baja en los CCs infectados con el FCV (Urbana) y sujetos al tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.....	48
Figura 11 El tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132 causa una reducción de la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes de los CCs infectados.....	49
Figura 12 El tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132.	50
Figura 13 CPE en CCs infectados con el FCV y sujetos al tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132.....	52
Figura 14 Los niveles de las proteínas virales VP1 (~60 kDa) y NS3 se reducen significativamente con el tratamiento <i>posinfección</i> con 25 μ M de MG132.....	53
Figura 15 Los niveles de otras especies proteicas detectadas con el suero α -VP1 también se comparten a la baja en los CCs sujetos al tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132.....	55
Figura 16 El tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132 causa una reducción en la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes de los CCs infectados.....	57

Abreviaturas

AAA: ATPasas asociadas con diversas actividades celulares	APPs: aminopeptidasas
ARN: ácido ribonucleico	ARNg: ARN genómico
ARNsg: ARN subgenómico	<i>ATCC: American Type Culture Collection</i>
ATP: adenosín trifosfato	<i>BCA: ácido bicinconínico</i> (por sus siglas en inglés)
CC: cultivo celular	CP: partícula catalítica (por sus siglas en inglés) o proteasoma 20S
<i>CPE: efecto citopático</i> (por sus siglas en inglés)	CR: complejo de replicación
CR: complejo(s) de replicación	CRFK: (células) Crandell Rees de riñón de gato (por sus siglas en inglés)
CVB3: virus Coxsackie B3	<i>DMEM: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco</i> (por sus siglas en inglés)
<i>DMSO: dimetilsulfóxido</i>	<i>DUBs: desubiquitinasas (deubiquitinase)</i>
<i>EDTA: ácido etilendiaminotetraacético</i> (por sus siglas en inglés)	<i>EGTA: ácido trietilenglicol diamino tetraacético</i> (por sus siglas en inglés)
<i>eIF: factores eucarióticos del inicio de la traducción</i> (por sus siglas en inglés)	<i>EMEM: medio esencial mínimo de Eagle</i> (por sus siglas en inglés)
FCV: calicivirus felino (por sus siglas en inglés)	<i>fJAM-A: molécula de unión estrecha A de felinos</i> (por sus siglas en inglés)
FR: forma(s) replicativa(s)	<i>HBBS: sal equilibrada de Hanks</i> (por sus siglas en inglés)
hpi: hora(s) posinfección	<i>Hsp70: proteína de choque térmico de 70 kDa</i> (por sus siglas en inglés)

<i>Hsp90</i> : proteína de choque térmico de 90 kDa (por sus siglas en inglés)	IBV: virus de la bronquitis infecciosa (por sus siglas en inglés)
<i>k_i</i> : constante de inhibición	LC: líder de la cápside (por sus siglas en inglés)
<i>MGI32</i> : <i>Cbz-leucina-leucina-leucinal</i>	<i>mic</i> : células sometidas a infecciones simuladas (<i>mock-infected cells</i>)
MNV: norovirus murino (por sus siglas en inglés)	MOI: multiplicidad de infección (por sus siglas en inglés)
NC: control negativo (por sus siglas en inglés)	NS: (proteína) no estructural (por sus siglas en inglés)
ORF: marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés)	PBS: <i>buffer fosfato salino</i> (por sus siglas en inglés)
PEDV: virus de la diarrea epidémica porcina (por sus siglas en inglés)	PI: inhibidor del proteasoma (por sus siglas en inglés)
<i>PMSF</i> : <i>fluoruro de fenilmetilsulfonilo</i> (por sus siglas en inglés)	RE: retículo endoplásmico
RHDV: virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (por sus siglas en inglés)	RIPA: ensayo de radioinmunoprecipitación (por sus siglas en inglés)
RP: partícula reguladora (por sus siglas en inglés) o proteasoma 19S	RRV: <i>Rhesus rotavirus</i>
<i>SDS</i> : <i>dodecilsulfato de sodio</i> (por sus siglas en inglés)	<i>SFB</i> : <i>suero fetal bovino</i>
<i>TCID50</i> : <i>ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular del 50%</i> (por sus siglas en inglés)	TURBS: sitio de unión del ribosoma río arriba del sitio de terminación (por sus siglas en inglés)
UPS: sistema/vía ubiquitina-proteasoma (por sus siglas en inglés)	UTR: región no traducida (por sus siglas en inglés)
VPg: proteína viral unida al genoma (por sus siglas en inglés)	Wb: <i>Western blot</i>

Introducción

Generalidades del *calicivirus felino (FCV)*

La familia *Caliciviridae* está compuesta por virus con un genoma de ARN monocatenario de entre 6.4 a 8.5 kb y que no tienen una envoltura lipídica (Vinjé et al., 2019). Los viriones de los calicivirus tienen un tamaño que va de entre los 27 a los 40 nm de diámetro con una simetría icosaédrica. Su genoma contempla dos, tres y hasta cuatro marcos abiertos de lectura (*ORF*, por sus siglas en inglés), como es respectivamente el caso del virus Sapporo, del FCV (por sus siglas en inglés) y del norovirus murino-1 (MNV-1, por sus siglas en inglés; (Vinjé et al., 2019).

Los calicivirus infectan distintos hospederos naturales, todos ellos hasta ahora vertebrados (Vinjé et al., 2019), y estos virus se encuentran clasificados en once géneros reconocidos. Los géneros *Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* y *Vesivirus* comprenden virus que infectan mamíferos; mientras que los géneros *Bavovirus* y *Nacovirus* contienen miembros que infectan aves; y, los dos géneros restantes, *Minovirus* y *Salovirus*, cuentan con miembros que infectan peces (Vinjé et al., 2019). Varios de ellos son patógenos de relevancia para la salud humana y otros son relevantes en el ámbito veterinario. En cuanto al primer grupo, los norovirus y los sapovirus son agentes etiológicos de gastroenteritis aguda autolimitante en humanos que representan un problema de salud pública a nivel mundial (Green, 2013). Por otro lado, en el segundo grupo se encuentran virus como el FCV, el MNV y el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV por sus siglas en inglés). EL FCV, perteneciente al género *Vesivirus*, infecta felinos, afectando su tracto respiratorio superior, lo que suele derivar en úlceras bucales, rinitis y afecciones articulares; además de que, en ocasiones, este virus causa una enfermedad sistémica (Green, 2013; Vinjé et al., 2019). El MNV, miembro del género *Norovirus*, es un patógeno entérico que infecta ratones y no causa sintomatología (Perdue et al., 2007). El RHDV, clasificado en el género *Lagovirus*, infecta conejos y liebres, y es causa de la enfermedad hemorrágica del conejo, la cual resulta mortal en un elevado porcentaje de los animales infectados (Green, 2013).

En general, el estudio de la biología de los calicivirus, y particularmente de los que infectan a humanos, ha tenido un importante reto: el establecimiento de un sistema de cultivo celular conveniente que permita su replicación (Green, 2013; Vinjé et al., 2019). Por lo tanto, el estudio de los agentes patógenos de los humanos (*i.e.* los norovirus y sapovirus) ha recurrido a virus de la misma familia que pueden propagarse con facilidad en cultivos celulares (CCs). Precisamente el FCV y el MNV son dos de los mejores modelos de estudio de la biología y patogenia de esta familia de virus (Pesavento et al., 2008).

El ciclo replicativo del FCV

Sobre el receptor celular para la unión y entrada del FCV a la célula blanco

El FCV tiene un tropismo celular determinado en buena parte por su receptor celular (Sosnovtsev & Green, 1995). La *molécula de uniones estrechas A de los felinos*, o por sus siglas en inglés *fJAM-A*, ha sido identificada como su receptor celular (**Figura 1**) (Makino et al., 2006; Stuart & Brown, 2007). Adicionalmente, se sabe que el *ácido siálico α -2,6* promueve la adhesión de las partículas virales del FCV a las células (Stuart & Brown, 2007); no obstante, por sí solo, este es incapaz de mediar la entrada del virus (Makino et al., 2006).

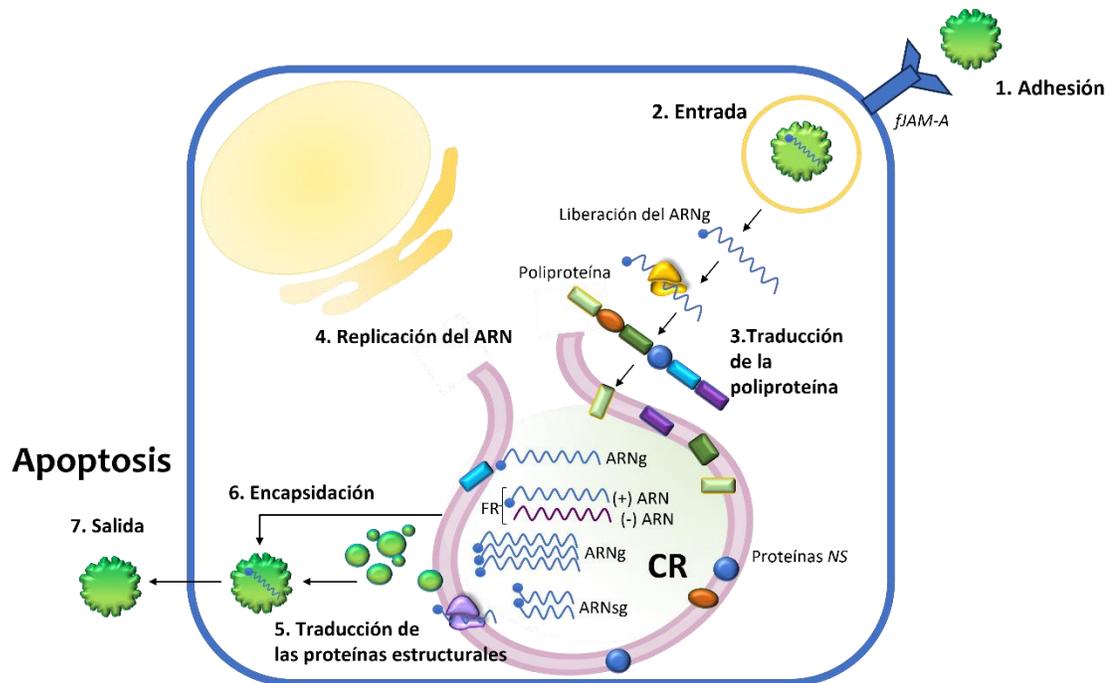


Figura 1 El ciclo replicativo del FCV.

El ciclo comienza con la interacción de la partícula viral con el receptor celular (*fJAM-A*), la cual da lugar a la endocitosis mediada por clatrina (entrada), que deriva en la liberación del ARN genómico (ARNg) en el citoplasma. Una vez liberado, este puede ser traducido por la maquinaria celular; dando lugar a la síntesis de la poliproteína que es procesada por la proteasa viral NS6/7 (NS de proteína no estructural en inglés). Este procesamiento proteolítico es parte de la maduración de las proteínas NS y este proceso permite la formación de los complejos de replicación (CR). Dentro los CR ocurre la síntesis de nuevas cadenas de ARNg, lo cual involucra a la forma replicativa (FR) del ARNg. Además, en estos compartimentos ocurre la síntesis del ARN subgenómico (ARNsg). Los ARNsg son traducidos para dar origen a las proteínas estructurales, que se autoensamblan en presencia del ARNg para la formación de la progenie viral (encapsidación). Finalmente, por medio de la apoptosis se favorece la salida de la progenie viral de las células infectadas y su dispersión en el hospedero. Imagen tomada de (Peñaflor-Téllez et al., 2022).

Tras la interacción del FCV con el *fJAM-A* ocurre la entrada a las células blanco (Kreutz & Seal, 1995), que ocurre por endocitosis mediada por clatrina (Stuart & Brown, 2006) y que implica la formación de endosomas tempranos y su acidificación (Elkin et al., 2016). Recientemente, se propuso que algunas moléculas de la proteína minoritaria de la cápside, *VP2*, forman una estructura conocida como *portal*, que

promueve la salida del ARNg de los endosomas al citoplasma en donde podrá ser traducido (Conley et al., 2019).

Sobre el genoma del FCV: generalidades, traducción y replicación

El genoma del FCV es de 7.6 kb (Vinjé et al., 2019) y codifica para tres *ORFs* (Green, 2013; Vinjé et al., 2019). El *ORF1* es traducido a partir del ARNg, mientras que los otros dos *ORFs* (*ORF2* y *ORF3*), a pesar de estar codificados en el ARNg, son traducidos del ARNsg (Green, 2013). Tanto el ARNg como el ARNsg del FCV tienen en sus extremos *regiones no traducidas* (o *UTRs*, por sus siglas en inglés) (Goodfellow & Taube, 2016). La *5'UTR* es sumamente corta y comienza con una secuencia *5'-pGpU-3'* que está enlazada covalentemente a la *proteína viral unida al genoma* (o *VPg* por sus siglas en inglés) (Alhatlani et al., 2015); mientras que la *3'UTR* es de cerca de 70 nucleótidos de longitud y está seguida por una secuencia poliadenilada (Herbert et al., 1997).

Una vez en el citoplasma, el ARNg es traducido en un proceso que involucra el reclutamiento de los *factores eucarióticos del inicio de la traducción* (*eIF*, por sus siglas en inglés) *4E* (*eIF4E*) y *3* (*eIF3*) y de otros factores asociados a la traducción, y la interacción de estos con la proteína *VPg* (Daughenbaugh et al., 2003; Goodfellow et al., 2005), la cual es responsable de promover el inicio de la síntesis de proteínas a partir del ARNg viral en tiempos tempranos, así como del ARNsg en tiempos tardíos de la replicación (Daughenbaugh et al., 2003; Goodfellow et al., 2005).

Derivado de la traducción del *ORF1* se produce una poliproteína que es procesada proteolíticamente por la propia *proteasa-polimerasa viral* (o *NS6/7*) para dar origen a seis *proteínas no estructurales*: *NS1-NS6/7* (Goodfellow & Taube, 2016). A su vez, las *proteínas NS* inducen la proliferación de membranas del retículo endoplásmico (RE); particularmente las proteínas virales *NS3* y *NS4* dan pie a la formación de los CR, los cuales son indispensables para la compartimentalización del ARNg (Bailey et al., 2010; Ettayebi & Hardy, 2003). Una vez compartimentalizado, el ARNg es replicado y las copias de este pueden ser usadas como genoma de la progenie viral; además, el ARNg en los CR actúa como molde para la síntesis del ARNsg, a partir del

cual se sintetizan las proteínas estructurales *VP1* y *VP2*, así como la *proteína líder de la cápside* (o *LC* por sus siglas en inglés) (Carter et al., 1992; Green et al., 2002; Neill et al., 1991). Cabe mencionar, que la proteína *VP1* se produce como parte de un precursor *LC-VP1* (Goodfellow & Taube, 2016) que es procesado proteolíticamente por la proteína *NS6/7* para dar lugar a las proteínas *LC* y *VP1* maduras (Sosnovtsev et al., 1998). Este precursor también es procesado por proteasas celulares, como las caspasas; sin embargo, se desconoce la función (suponiendo que la tengan) de los péptidos producidos por la escisión mediada por estos componentes del hospedero (Al-Molawi et al., 2003). La traducción de *VP2* a partir del *ORF3* depende de un elemento conocido como *sitio de unión del ribosoma río arriba del sitio de terminación* (o *TURBS* por sus siglas en inglés), el cual permite el reinicio de la traducción cuando la traducción del *ORF2* ha concluido (Meyers, 2007).

Conforme ocurre la síntesis y acumulación de los nuevos ARNg y ARNsg, así como de las proteínas *VP1* y *VP2*, se da paso a la encapsidación del ARNg (Goodfellow & Taube, 2016). Aunque este proceso no se ha descrito detalladamente, se ha propuesto que la proteína *VP1* del FCV, al interactuar con la *VPg* unida al genoma, contribuye a la encapsidación selectiva de ARN viral (Kaiser et al., 2006). Las proteínas estructurales tienen la capacidad de autoensamblarse junto con los ARN virales para dar origen a la progenie viral que se libera de la célula y se disemina en el hospedero a través de la inducción de la apoptosis.

A lo largo del ciclo replicativo de los calicivirus, diversos factores celulares desempeñan distintos papeles que pueden favorecerlo o restringirlo. Centrándonos en los primeros, los receptores en las membranas celulares son piezas clave para la internalización de virus como es el caso de la *fJAM-A* para el FCV. Otro ejemplo son los factores celulares de inicio de la traducción. Un ejemplo más son las chaperonas celulares. Estas proteínas del hospedero están implicadas en el correcto plegamiento y función de proteínas y ARN virales; y, de manera específica, se ha reportado la interacción entre la proteína de choque térmico de 90 kDa (*Hsp90* por sus siglas en inglés) y la proteína *VP1* del MNV (Vashist et al., 2015).

Resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que la proteína *VPI* del FCV es también cliente de la chaperona *Hsp90* (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Con relación a esta conclusión, Pérez Ibáñez y colaboradores encontraron que la interacción entre ambas proteínas promueve la estabilidad de *VPI*, ya que al inhibir la función de *Hsp90* con geldanamicina se promueve la degradación de *VPI*. En general, cuando *Hsp90* se encuentra inactiva, sus proteínas cliente se degradan mediante la *vía autofágica-lisosomal* o el *sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)*, por sus siglas en inglés). A este respecto, Pérez Ibáñez y cols. encontraron que la degradación de *VPI*, cuando la actividad de *Hsp90* se encuentra inhibida, no ocurre por medio de la *vía autofágica-lisosomal*. Sin embargo, no se pudo determinar si la degradación de *VPI* ocurre a través del *UPS* debido a que, al inhibirlo, no solo se halló una menor cantidad de la proteína *VPI*, sino también de otras proteínas virales (*NS6/7* y *LC*) aunque estas no sean clientes de *Hsp90* (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Este hallazgo sugirió que el *UPS* podría tener un papel importante en la replicación del FCV.

Generalidades del proteasoma

El *UPS*

El *UPS* es considerado como la principal vía de proteólisis en las células eucariotas y tiene la peculiaridad de contar con componentes ubicuos, de forma que están tanto en el núcleo como en el citoplasma de estas células [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004; Rousseau & Bertolotti, 2018)]. Puede considerarse que los componentes principales del *UPS* son: la ubiquitina, los cuatro tipos de enzimas de ubiquitinación, las enzimas desubiquitinadas¹ (o *DUBs*, por la abreviación en inglés de *deubiquitinases*) y el proteasoma [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)] (**Figura 2**). En conjunto, los anteriores componentes dan lugar a los dos mecanismos clave en esta vía, los cuales son la ubiquitinación y el procesamiento proteolítico de los sustratos ubiquitinados a cargo del proteasoma [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)] (**Figura 2**).

¹ También son conocidas como isopeptidasas.

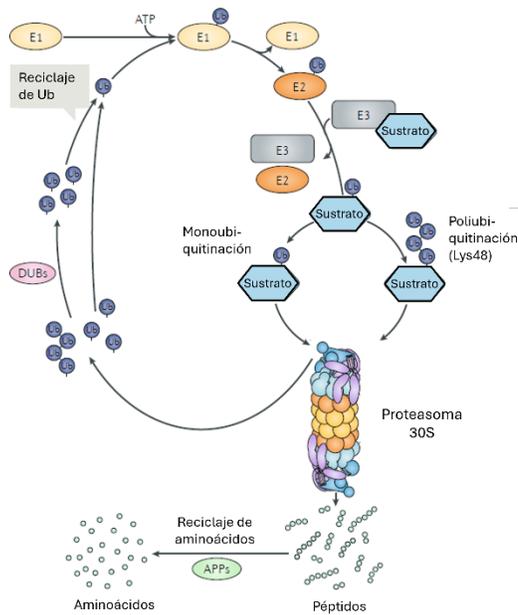


Figura 2 Los componentes y procesos principales del UPS.

El UPS es uno de los dos principales ejes catabólicos en las células eucariotas y tiene cuatro componentes clave: la ubiquitina (indicada como esferas pequeñas de color azul marino con una etiqueta que dice Ub), las enzimas de ubiquitinación (indicadas como óvalos amarillos o naranjas, y rectángulos grises con una etiqueta que dice E1, E2 o E3 respectivamente), las DUBs (óvalos rosas con una etiqueta que dice DUBs) y el proteasoma (parte media derecha del esquema). Este sistema comprende: (1) los procesos de ubiquitinación de sustratos (hexágonos de color azul claro) a cargo de las enzimas E1, E2 y E3 (más E4 en algunos casos), fenómeno que es reversible por la actividad de las DUBs, y (2) del procesamiento proteolítico por parte del proteasoma. El procesamiento proteolítico da pie a la liberación de las etiquetas de ubiquitina que marcaban al sustrato para su degradación proteasomal (parte media izquierda) y a la liberación de péptidos que pueden ser posteriormente reciclados gracias a la actividad de aminopeptidasas (APPs, óvalos verdes). Esta imagen es una adaptación de una imagen obtenida de (Rousseau & Bertolotti, 2018).

La ubiquitinación

La ubiquitinación involucra dos grupos de enzimas: las encargadas de la adición de ubiquitina (proteína de 76 aminoácidos) y aquellas que catalizan su remoción (Goldstein et al., 1975). El efecto biológico de la ubiquitinación depende de, por ejemplo, cuántas ubiquitinas son añadidas, y la manera en la que estén unidas entre sí

y al sustrato [revisado en (Dikic & Schulman, 2022)]. A manera de ejemplo, cuando se trata de la adición de cuatro o más ubiquitinas, los sustratos son degradados por el proteasoma; pero cuando son menos de cuatro ubiquitinas, los sustratos modificados son sujetos a otros efectos biológicos (como un cambio en la localización subcelular) [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Cabe destacar que la señal clásica para la degradación proteasomal implica la adición de cuatro ubiquitinas unidas entre sí por medio de enlaces lisina⁴⁸-glicina⁷⁶; además de que enlaces diferentes entre las ubiquitinas están asociados a otros procesos biológicos [revisado en (Woelk et al., 2007)]. La ubiquitinación y sus efectos biológicos están englobados en el código de ubiquitinas², el cual contempla también lo siguiente: las modificaciones postraduccionales que puede tener la ubiquitina (así como las enzimas implicadas en esta modificación de la ubiquitina), las proteínas tipo ubiquitina y, en el contexto de infecciones, las variaciones del código establecidas por patógenos [revisado en (Dikic & Schulman, 2022)].

Entre las principales enzimas involucradas en la ubiquitinación se encuentran las dependientes de ATP (adenosín trifosfato), las cuales son conocidas como *E1* o *enzimas activadoras de ubiquitina* [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Como su nombre sugiere, estas están implicadas en la activación de la ubiquitina por medio del ATP, lo que permite que los siguientes eventos catalizados por las demás enzimas de ubiquitinación ocurran [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. La activación de la ubiquitina a cargo de la enzima *E1* da pie a la formación de un intermediario de alta energía denominado *E1-ubiquitina*, el cual es modificado cuando este interactúa con la siguiente enzima en la cascada: la enzima *E2* o *enzima conjugadora de ubiquitinas* [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Esta interacción entre el intermediario *E1-ubiquitina* y la enzima *E2* deriva en la transferencia de la ubiquitina activada a la enzima *E2* [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Luego, la enzima *E2* interactúa con la siguiente enzima de la cascada, la enzima *E3* o *ubiquitina ligasa*; no obstante, antes de esta interacción, la enzima *E3* ya ha reconocido a su sustrato proteico (el cual será la proteína que recibirá la

² Del inglés “*ubiquitination code*” (se podría traducir también como código de ubiquitinación).

ubiquitina ya conjugada a la enzima *E2*) [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)].

En el contexto de la degradación proteasomal, tras la interacción de la enzima *E2* con la *E3*, la ubiquitina es transferida a un residuo de lisina del sustrato reconocido por la enzima *E3* y el proceso de ubiquitinación recién descrito es llevado a cabo más veces (al menos tres veces más), pero, en las siguientes ocasiones, el residuo de lisina al que se une la ubiquitina entrante es de la ubiquitina previamente añadida [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Es común que las ubiquitinas de la cadena de poliubiquitinas, que señalan para degradación proteasomal, estén unidas por medio de enlaces *lisina 48-glicina 76* [revisado en (Dikic & Schulman, 2022; Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]; y, por último, con relación a la formación de la cadena de poliubiquitinas, en este proceso puede participar la enzima *E4*, la cual también es conocida como el *factor de elongación de la cadena* [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)].

En contraste con las enzimas *E1* a *E4*, las *DUBs* catalizan la escisión de los enlaces que unen la ubiquitina con alguna otra proteína (pudiendo ser esta otra ubiquitina); como en el caso de las *DUBs* que forman parte del proteasoma, ya que estas promueven la remoción de ubiquitinas de un sustrato marcado con estas etiquetas proteicas, lo cual a su vez da pie a que las ubiquitinas no sean degradadas junto a su sustrato cuando el proteasoma actúa sobre este [revisado en (Dikic & Schulman, 2022; Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. No obstante, estas *cisteína proteasas* también hacen posible que las ubiquitinas recién sintetizadas puedan participar en el proceso de ubiquitinación, ya que estas proteínas son sintetizadas en forma de precursores que son proteolíticamente procesados para dar lugar a monómeros de ubiquitina [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004); (Pickart, 1998)]. Debido a lo anterior, estas enzimas son piezas centrales en el mantenimiento de los niveles intracelulares de ubiquitina [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)].

El proteasoma

El procesamiento proteolítico a cargo del proteasoma implica un reconocimiento de los sustratos ubiquitinados [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004)]. Estos dos procesos (reconocimiento y procesamiento proteolítico) dependen de dos subcomplejos funcionales: la *partícula catalítica* (*CP*, por sus siglas en inglés) o también conocida como *proteasoma 20S*, y la *partícula reguladora* (*RP*, por sus siglas en inglés) o *proteasoma 19S* [revisado en (Dikic & Schulman, 2022; Roos-Mattjus & Sistonen, 2004; Rousseau & Bertolotti, 2018)]. Estos subcomplejos se encuentran en una relación 2:1 (*RP:CP*) en el *proteasoma 30S* y 1:1 en el *proteasoma 26S*.

En términos temporales, para la degradación de una proteína blanco se requiere primero de la acción de la *RP* seguida de la actividad de la *CP*. La *RP* se encarga del reclutamiento de los sustratos ubiquitinados por medio de al menos tres receptores de ubiquitina intrínsecos; aunque también puede hacer uso de receptores extrínsecos (Dikic & Schulman, 2022). Este reclutamiento da pie a la interacción entre la *RP* y el sustrato ubiquitinado y reclutado, y esta interacción a su vez deriva en la inducción de cambios conformacionales que activan la capacidad proteolítica de la *CP* (Dikic & Schulman, 2022). Luego, la *RP*, por medio de sus *DUBs* y de sus *proteínas ATPasas AAA* (*ATPasas asociadas con diversas actividades celulares*), transloca al sustrato sin ubiquitinas (por acción de las *DUBs*) y desnaturalizado³ (por las *AAA ATPasas*) hacia el interior de la *CP* (De la Peña et al., 2018) no sin antes activar la compuerta de entrada a la *CP*, la cual está constituida por subunidades α de la *CP* (Finley, 2009). Con relación a las *AAA ATPasas* y a las *DUBs*, las primeras se hallan en la base de la *RP* y las segundas en la tapa de la *RP* (Rousseau & Bertolotti, 2018); considerando que esta es la parte externa de la *RP* que no está en contacto con la *CP* y que la base es la parte de la *RP* que está en contacto con la *CP*.

La *CP* contiene dos copias de tres diferentes subunidades proteolíticas (**Figura 3**, panel A) [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004; Rousseau & Bertolotti, 2018)]. Estas subunidades son las $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ (**Figura 3**, panel B) y tienen

³ “Unfolded”.

respectivamente actividad tipo caspasa, tripsina y quimiotripsina [revisado en (Habib et al., 2022)]. Además, hay un total de siete subunidades β diferentes que, en conjunto, forman un anillo (**Figura 3**, panel B) [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004; Rousseau & Bertolotti, 2018)]. Por cada CP, hay dos anillos de subunidades β y otros dos similares formados por subunidades α que están localizados sobre los anillos de subunidades β y que, como se mencionó, participan en la regulación de la entrada de los sustratos a la CP (específicamente al centro compuesto por los dos anillos de subunidades β) [revisado en (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004; Rousseau & Bertolotti, 2018)].

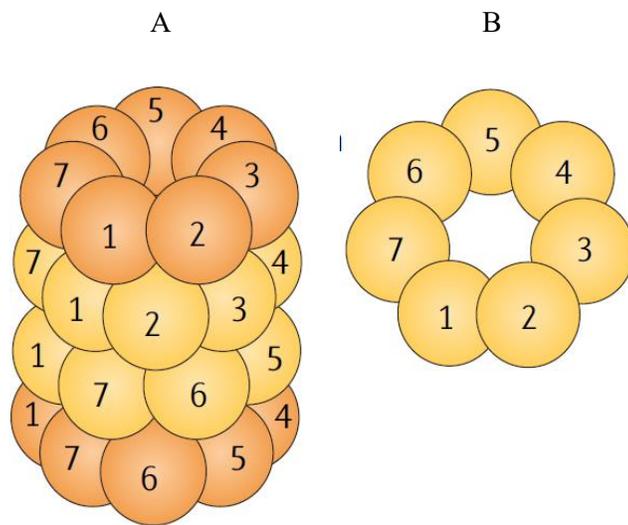


Figura 3 Componentes proteicos del proteasoma 20S.

El proteasoma 20S (la CP) es la parte central del proteasoma 26S o 30S y está constituido por subunidades α y β que forman los denominados anillos en función de las subunidades proteicas que los constituyen. (A) Hay dos anillos α (esferas naranjas) y dos anillos β (esferas amarillas). Cada anillo α o β está constituido por siete subunidades α o β (respectivamente; anillo β mostrado en panel B) y por cada anillo β hay tres subunidades que catalizan la proteólisis de los sustratos marcados para su degradación proteasomal. Figuras tomadas de (Rousseau & Bertolotti, 2018).

El proteasoma está implicado en la presentación de antígenos endógenos y en la regulación de los niveles de expresión de las proteínas celulares. En cuanto al último punto, el proteasoma lleva a cabo la proteólisis de proteínas que estén dañadas o mal plegadas, que tienen funciones reguladoras (como algunas implicadas en el control del

ciclo celular) o que tienen una vida media corta [revisado en (Rousseau & Bertolotti, 2018)]. Los fenómenos biológicos recién mencionados son algunos en los que el proteasoma ha sido implicado de entre múltiples fenómenos celulares. Su importancia se ve reflejada en el hecho de que, a diferencia de la vía autofágica-lisosomal, si el proteasoma no es funcional, las células pierden su viabilidad (Finley, 2009).

El proteasoma y las infecciones virales

Dado que los virus aprovechan los recursos y vías de las células que infectan y que el proteasoma tiene un papel central en una gran y variada cantidad de funciones celulares fundamentales, y a que los virus manipulan a su favor esta maquinaria celular, no es de sorprender que el proteasoma tenga una función importante en el contexto de las infecciones virales. Por ejemplo, durante la infección con el virus Coxsackie B3 (CVB3), ocurre una acumulación de proteínas ubiquitinadas y, si se inhibe la actividad del proteasoma con epoxomicina, el nivel de los intermediarios derivados del procesamiento de los precursores proteicos P1 y 3CD es menor en comparación con las células infectadas, pero con proteasomas funcionales (Voss et al., 2021). Sin embargo, el proteasoma no está implicado en el procesamiento de todos los precursores virales del CVB3, ya que su participación no fue necesaria para el procesamiento del precursor P2 (Voss et al., 2021). Con lo anterior en cuenta, destaca el requerimiento de un proteasoma funcional para una infección eficiente por parte del CVB3.

Otro ejemplo de la importancia del proteasoma es en las infecciones con el rotavirus de *Rhesus* (RRV), ya que este requiere de proteasomas funcionales para una replicación eficiente de su genoma (ARN de doble cadena segmentado) y para la formación de partículas virales (López et al., 2011). En el estudio referido, el uso de distintos *inhibidores del proteasoma* (PIs por sus siglas en inglés), entre ellos el *MG132* (*Cbz-leucina-leucina-leucinal*), redujeron el título viral y los niveles de ARN viral de los distintos segmentos que conforman el genoma viral. Además, el uso de *MG132* derivó en un cambio en el tamaño y número de viroplasmos, y en la distribución subcelular de las proteínas *VP1*, *VP2* y *VP6*, las cuales son parte de estos compartimentos virales y participan en la replicación y transcripción del genoma viral.

Otros ejemplos de la importancia del proteasoma se encuentran en infecciones con algunos coronavirus. Al respecto, los virus de la bronquitis infecciosa (IBV por sus siglas en inglés) y de la diarrea epidémica porcina (o PEDV por sus siglas en inglés), a pesar de pertenecer a géneros diferentes, requieren de un *UPS* funcional para que ocurra la fusión de su membranas con las de los lisosomas o endosomas de las células infectadas (Yuan et al., 2023). En la investigación referida se reporta que los niveles de la *proteína viral N* (la cual, junto con el ARN viral, conforma la nucleocápside), del ARN viral y de la progenie viral infecciosa liberada fueron menores en los cultivos infectados con IBV y tratados con algún *PI* (*MG132*, *epoxomicina* o *Bortezomib*) en comparación a los cultivos tratados con el *vehículo* (*dimetilsulfóxido*, *DMSO*), precisando que estas reducciones se observaron cuando los tratamientos con los *PIs* se realizaron a tiempos tempranos de la infección, especialmente entre las 0 y 4 horas posinfección (hpi). En el caso del PEDV, también se observó que los niveles de la *proteína N* fueron menores en los cultivos infectados y tratados con cualquiera de los tres *PIs* cuando estos se usaban entre las 0 y 6 hpi; aunque la mayor reducción se notó cuando la aplicación del *PI* se realizó entre las 0 y 2 hpi. Además, se determinó que la *proteína N* de ambos virus está sujeta a un procesamiento proteolítico sensible al uso de *MG132* y que ocurre luego de la fusión de membranas; y que la traducción de una proteína temprana del IBV se ve reducida en cultivos tratados con algún *PI* entre las 0 y 2 hpi o entre las 2 y 4 hpi; aunque lo anterior podría deberse a la restricción del evento de fusión de membranas.

Antecedentes directos y consideraciones finales

Adicionalmente, en un trabajo reciente de la Dra. Pérez Ibáñez y cols., realizado en nuestro laboratorio, se reportó que la proteína *VPI* del FCV es cliente de la chaperona *Hsp90* y, cuando la actividad de *Hsp90* es inhibida, esta proteína viral es degradada (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Con la finalidad de determinar la vía de degradación de *VPI*, considerando que las proteínas clientes de *Hsp90* se degradan a través del *UPS* o de la vía autofágica-lisosomal, se realizaron ensayos con inhibidores de ambas vías. De esta forma se determinó que, en ensayos de infección en células Crandell Rees de riñón de gato (CRFK por sus siglas en inglés) en condiciones en las que *Hsp90* se encuentra

inhibida, la degradación de *VPI* del FCV no depende de la vía autofágica-lisosomal. No obstante, la participación del proteasoma como parte del *UPS* en la degradación de *VPI* del FCV no pudo determinarse debido a que el uso del inhibidor *MG132* redujo significativamente la cantidad de todas las proteínas virales analizadas (no solamente de *VPI*), sugiriendo que el proteasoma es un factor celular importante para la replicación del FCV.

Considerando que en (Pérez-Ibáñez et al., 2024): (1) se realizaron ensayos de infección en células CRFK en las que el proteasoma se inhibió con *MG132* a una concentración de 25 μ M y (2) que este inhibidor se añadió dos horas antes de la adición del inóculo viral, surge la duda de si el *inhibidor* pudo actuar sobre componentes celulares (distintos al proteasoma) que participan en algún punto del ciclo replicativo del FCV, especialmente aquellos implicados en eventos tempranos del ciclo replicativo, como la *cathepsina L*, que participa en la entrada del FCV (Urbana) a células CRFK y que es uno de los blancos celulares del *MG132* (Tabla I).

Tabla 1 La *ki* de MG132 para diferentes blancos celulares y la implicación de estos en el ciclo replicativo del FCV.

Componente celular	<i>ki</i>	Referencia	Implicación en el ciclo replicativo del FCV	Referencia
Subunidad $\beta 5$ del proteasoma	Entre 2 y 4 nM	Revisado en (Kisselev & Goldberg, 2001)	Desconocida	-
Subunidad $\beta 2$ del proteasoma	2760 nM	Revisado en (Kisselev & Goldberg, 2001)	Desconocida	-
Subunidad $\beta 1$ del proteasoma	900 nM	Revisado en (Kisselev & Goldberg, 2001)	Desconocida	-
<i>Catepsina L</i> purificada	Rango nanomolar (1×10^0 nM)	(Sasaki et al., 1990)	Entrada	(Shivanna et al., 2014)
<i>Calpaínas m</i> y μ purificadas	Rango micromolar (1×10^{-2} μ M)	(Sasaki et al., 1990)	Salida de progenie	(Brennan, 2008)
<i>Catepsina B</i> purificada	Rango micromolar (1×10^{-1} μ M)	(Sasaki et al., 1990)	No implicada	(Brennan, 2008; Shivanna et al., 2014)
<i>Catepsina H</i> purificada	Rango micromolar ($>1 \times 10^2$ μ M)	(Sasaki et al., 1990)	Desconocida	-

Con base en lo anterior, para determinar el efecto específico de los inhibidores del proteasoma sobre el ciclo replicativo del FCV, es necesario utilizar concentraciones

del *inhibidor* que afecten al proteasoma pero que no inhiban a otras proteasas, especialmente la *cathepsina L* y las *calpáinas* por medio del uso de concentraciones en el rango nanomolar (*e.g.* >1 nM). Otra opción es el agregar la droga en diferentes momentos del ciclo replicativo, por ejemplo, después de la adsorción viral para descartar la posible inhibición de la *cathepsina L*. Ambas estrategias nos permitirían determinar si el proteasoma está implicado en la replicación del FCV.

Justificación

Debido a que el proteasoma está implicado en la replicación de diversos virus y a que antecedentes directos de nuestro laboratorio sugieren que este componente celular también es importante para la replicación eficiente del FCV en células CRFK, este trabajo aborda la necesidad de esclarecer el posible papel del proteasoma en la replicación del FCV en células infectadas y tratadas con el *inhibidor del proteasoma MG132*. Atendiendo los antecedentes directos y la inhibición no selectiva de otras enzimas implicadas en el ciclo replicativo del virus por parte de este *inhibidor*, este trabajo considera la búsqueda de condiciones específicas para la inhibición del proteasoma que no modifiquen la actividad de la *cathepsina L*, enzima que participa en la entrada del FCV a células CRFK.

Hipótesis

El proteasoma es necesario para la replicación eficiente del FCV en células CRFK.

Objetivos

General

Determinar la participación del proteasoma en la replicación del FCV en células CRFK.

Específicos

1. Establecer las condiciones para la inhibición específica del proteasoma.
2. Confirmar la importancia del proteasoma para la replicación eficiente del FCV.

Materiales y métodos

Esquema general del trabajo

Objetivo específico 1

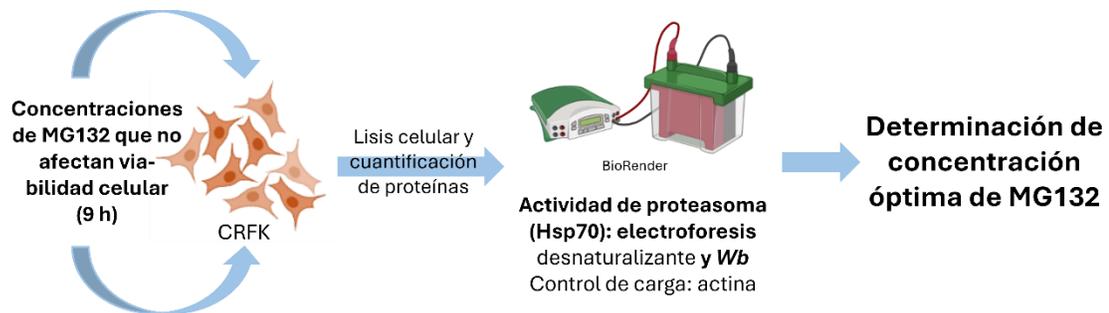


Figura 4 Esquema general del trabajo del objetivo 1: elección de la concentración de MG132 a usar en experimentos con infección.

Para determinar la concentración de MG132 que se usará en los experimentos con infección, se trataron células CRFK por nueve horas con diferentes concentraciones de MG132 que no afectaran la viabilidad celular (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Después, se cosecharon y lisaron las células para luego extraer todas sus proteínas y analizar los extractos proteicos totales por Wb, tomando la inducción de Hsp70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) como indicador de la inhibición de la actividad del proteasoma.

Objetivo específico 2

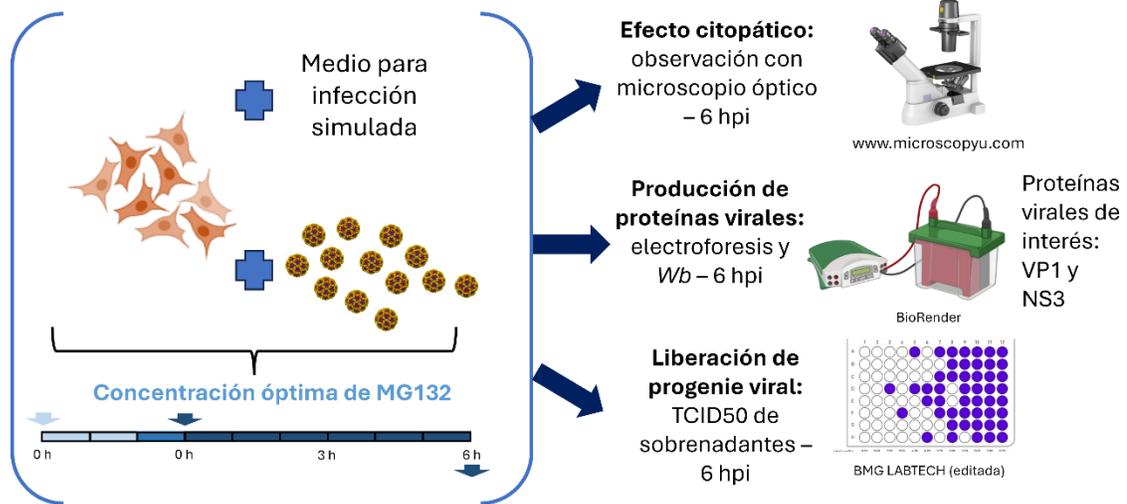


Figura 5 Esquema general del trabajo del objetivo 2: estudio de tres parámetros de la eficiencia de la infección con el FCV (Urbana) en CCs de CRFK.

Para evaluar el posible papel del proteasoma en la replicación del FCV (Urbana) in vitro, se realizaron tratamientos pre- y posinfección de CCs CRFK con la concentración de MG132 previamente elegida. En el tratamiento preinfección, a diferencia del , se añadió MG132 al medio de cultivo desde dos horas antes de la adición del inóculo viral o del inóculo control para células falsamente infectadas (mock-infected cells, mic). En ambos esquemas de tratamiento, se infectaron los CCs con el FCV a una MOI de 5 UFP/CRFK y se permitió que el periodo de adsorción viral (1 h) ocurriera en medios de cultivo libres del PI o de su vehículo. Se documentó la apariencia de los CCs al inicio del tratamiento y al final de este (a las 6 hpi) mediante el uso de un microscopio óptico. Al término del tratamiento, se cosecharon y lisaron las células de cada condición. Posteriormente se realizó la extracción total de proteínas y se evaluó por Wb la presencia de las proteínas virales NS3 y VP1, así como de Hsp70 y de β -actina. Los sobrenadantes recolectados se titularon por medio del ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular del 50% (TCID50).

Células y stock viral

Medio de cultivo y células utilizadas

Se utilizaron células CRFK obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas son células mesenquimales (Lawson et al., 2019) y, para este trabajo, se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (o DMEM por sus siglas en inglés)

suplementado con *suero fetal bovino (SFB)* al 2% (v/v) o al 7% (v/v), según se indique, a 37°C, 5% CO₂ y en un ambiente húmedo.

Infecciones y *stock* viral

Se utilizó la cepa Urbana del FCV para infectar las células CRFK. Las infecciones se realizaron usando los siguientes formatos para cada experimento y usando *DMEM sin SFB* para preparar los inóculos virales: (1) cajas p100 para la generar el *stock viral*, (2) cajas p60 para los tratamientos por 6 y 8 horas con *MGI32*, (3) placas de 12 pozos para la titulación del *stock viral*, y (4) placas de 96 pozos para la titulación viral de los sobrenadantes de los CCs tratados con *MGI32*. Las infecciones de los CCs destinados a *tratamientos pre- y posinfección* con *MGI32* se realizaron usando una *MOI* de 5 UFP del FCV (Urbana) por CRFK, considerando que un CC CRFK confluyente en una caja p100 (56.7 cm²) tiene 7×10^6 células CRFK y que la proporción *área cultivable:células CRFK* es válida para las cajas p60.

Para generar el *stock viral*, los CCs se lavaron dos veces con *buffer fosfato salino (PBS)*, por sus siglas en inglés) estéril y filtrado. Posterior a los lavados, se añadió el inóculo viral y se permitió que ocurriera la adsorción de las partículas virales durante una hora en las condiciones de cultivo celular previamente descritas. Durante la hora de adsorción, se agitaron cuidadosa y rápidamente las cajas cada quince minutos, comenzando inmediatamente tras la adición del inóculo viral. Luego de cada agitación, las cajas se mantuvieron en la incubadora.

Terminada la hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y los CCs se lavaron con *PBS* estéril y filtrado. Posteriormente, se agregó medio *DMEM con SFB (2%)* a los CCs en infección y estos se incubaron por 48 h en las condiciones anteriormente descritas. Transcurridas las 48 h, las cajas se congelaron (-80°C) y descongelaron (temperatura ambiente) cinco veces para después recolectar el medio de cultivo y distribuirlo en viales de 1 mL.

Ensayos de titulación viral por plaqueo

Para titular el *stock viral*, se ocuparon placas de 12 pozos con CCs al 80% confluencia y diluciones seriadas base 10 del *stock viral* (desde 10^{-1} hasta 10^{-10}). Los CCs se lavaron una vez con *PBS 1X* (estéril y filtrado) antes de ser inoculados con las diluciones seriadas. Una vez lavados, se añadió el inóculo asignado a cada pozo, considerando también el uso del *stock viral* sin diluir (control positivo) y *DMEM sin SFB* (control negativo). Tan pronto se agregaron los inóculos correspondientes, se agitaron las placas de 12 pozos cada quince minutos por una hora. Después, se retiraron todos los inóculos y se lavaron todos los CCs dos veces con *PBS 1X* (estéril y filtrado). Luego se añadió 500 μ L de *carboximetilcelulosa* (2% (p/v)) por pozo y se incubaron los CCs por 48 h. Tras dicho periodo, se sustituyó la *carboximetilcelulosa* por *formalina* (400 μ L/pozo, 3.7% (v/v), 20 minutos), la cual se preparó diluyendo *formaldehído* (37%) en *PBS 1X* en una relación 1:10. Posteriormente, la *formalina* se sustituyó con *solución de cristal violeta* (400 μ L/pozo, 20 minutos) preparada con 0.1 g de *cristal violeta*, 29.9 mL de *etanol absoluto* y 70 mL de *agua bidestilada*. Finalmente, se lavaron todos los CCs con agua corriente y se dejaron secar para determinar el título del *stock viral* con base en la cantidad de placas líticas formadas.

Ensayos de titulación viral por TCID50

CCs CRFK en placas de 96 pozos y a una confluencia de entre el 75 y el 80% se lavaron con *PBS 1X* (estéril y filtrado) para luego ser inoculados con diluciones seriadas base 10 (10^{-1} a 10^{-6}) de los sobrenadantes de los CCs infectados y tratados con *MG132*. Las diluciones seriadas se prepararon con *DMEM con SFB* (2%) (Bidawid et al., 2003). Además de estas diluciones, se utilizó *DMEM con SFB* (2%) *sin virus* a manera de control negativo.

Finalizada la adición de los inóculos, las placas de 96 pozos se agitaron cada quince minutos por una hora para luego retirar los inóculos y lavar una vez los CCs con *PBS 1X* (estéril y filtrado). Después se añadió *DMEM con SFB* (7%) a todos los pozos y se incubaron los CCs en las condiciones previamente mencionadas durante 96 h. Finalmente, se lavaron los CCs una vez con *PBS 1X* (estéril y filtrado) previo a que se

fijaran y se tiñeran de manera similar a como se describió para la titulación del *stock viral*. El título viral se determinó por medio del método de Reed & Muench (Reed & Muench, 1938).

Tratamiento de los CCs con el *PI*

Se disolvió *MG132* (*Merck Sigma-Aldrich*, número de catálogo: SML1135-5MG) en *DMSO* y se prepararon soluciones de 0.01, 0.1, 1, 10 y 25 μM en *DMEM con 2% SFB* a partir de una alícuota de *MG132*. Asimismo, se prepararon soluciones del *vehículo*, *DMSO*, en *DMEM con SFB (2%)* como controles. Todo lo anterior se realizó en condiciones de esterilidad.

Tratamiento con *MG132*, cosecha y lisis de los CCs

Se utilizaron CCs sembrados en cajas p60 a una confluencia del 80% y se realizaron los tratamientos por nueve horas con diferentes concentraciones de *MG132*. Estos CCs se lavaron una vez con *PBS IX* (estéril y filtrado) y se expusieron a 0.01, 0.1, 1, 10 o 25 μM de *MG132*, o a las soluciones control (*DMSO*) correspondientes. A las nueve horas de tratamiento, los CCs se cosecharon y lisaron. La lisis se realizó siguiendo el *protocolo de extracción de proteínas totales* de *Abcam* para *Wb* (*Abcam*, 2023).

Por otro lado, CCs CRFK sembrados en cajas p60 y a una confluencia de entre el 80 y el 90% se sometieron a los *tratamientos pre- y posinfección* con 25 μM de *MG132*. Estos CCs se infectaron con el FCV (Urbana) a una *MOI* de 5 permitiendo que se llevara a cabo la adsorción viral durante una hora en medios de cultivo libres de *MG132* y/o *DMSO*. Con estos CCs se evaluó el *CPE*, la expresión de proteínas virales y la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes.

En cuanto a los CCs destinados al *tratamiento preinfección*, se comenzó por lavar los CCs con *PBS IX* (estéril y filtrado) una vez, para luego añadir *MG132* a 25 μM o *DMSO* y dejar en incubación por dos horas en las condiciones previamente descritas. Finalizadas las dos horas, se lavaron los CCs con *PBS IX* (estéril y filtrado) una vez y se añadió el inóculo viral o el inóculo control para las *mic*. Luego se agitaron

las cajas en cuestión cada quince minutos por una hora (periodo de adsorción). Después, se retiró el inóculo y se lavaron los CCs con *PBS 1X* (estéril y filtrado) una vez. Posteriormente, se añadió *MG132* a 25 μM o *DMSO* y se dejaron en incubación los CCs por 6 horas en las condiciones previamente descritas. Terminado dicho periodo, los CCs se observaron al microscopio y se tomaron fotografías de los campos observados. Después se recolectaron los sobrenadantes de los CCs infectados para su titulación por *TCID50*, y se cosecharon y lisaron las células de cada condición. La lisis celular se realizó como se describió anteriormente.

Con relación a los CCs destinados al *tratamiento posinfección*, se añadió el inóculo viral (FCV, Urbana, MOI de 5 UFP/CRFK) o el inóculo control, y se permitió que el periodo de adsorción (1 h) ocurriera en medio de cultivo libre de *MG132* y/o *DMSO*. Posteriormente, se retiró el inóculo y se añadió *MG132* (25 μM) o *DMSO* a los CCs para un tratamiento por 6 h a la par de la infección. Luego de las seis horas de tratamiento, se procedió a evaluar el *CPE* y a realizar la lisis celular como se describió arriba.

Cuantificación y electroforesis de los extractos de proteínas totales

Después de la extracción de las proteínas totales, estas se cuantificaron con el *kit Pierce BCA Protein Assay Kit* (número de catálogo: 23225) de *Thermo Fisher* (Thermo Fisher, n.d.). Después, se disolvieron 10 μg de cada extracto proteico en *buffer de muestra Laemmli 4X* [β -mercaptoetanol (10% v/v), azul de bromofenol (0.4% m/v), SDS (4% m/v), glicerol (40% v/v), Tris-Cl pH = 6.8 (20% v/v) y agua bidestilada]. Luego, los extractos disueltos en *buffer de muestra Laemmli 4X* se incubaron a 80°C por cinco minutos y se centrifugaron a 10,000 x g [*Thermo Scientific – Sorvall Legend Micro 21 R* (rotor 75003424)]. Posteriormente, se cargaron los extractos proteicos totales en geles de *SDS-poliacrilamida (10%)* previamente colocados en cámaras de electroforesis con *buffer de corrida de Tris-glicina*. Asimismo, se cargó el *marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa* (Thermo Scientific, 1.5 μL) y, se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 60 V por 30 minutos y luego a un voltaje constante de 80 V por unos 105 minutos.

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Una vez concluida la electroforesis de los extractos de las proteínas totales, se realizó su transferencia a una *membrana de nitrocelulosa* (0.45 μm de poro; Bio-Rad, número de catálogo: 1620115; Burnette, 1981) previamente equilibrada (durante 20 minutos) junto con el gel, en *buffer de transferencia Dunn* frío (-20°C) (Dunn, 1986; Gooderham, 1984). Para la transferencia de proteínas se usó un voltaje constante de 85 V durante 80 minutos.

Ensayos de *Wb*

Anticuerpos

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón de *Santa Cruz Biotechnology*: α -*Hsp70* (número de referencia: sc-66048) a una dilución de 1:1,000 y α - *β -actina* (número de referencia: sc-47778) a una dilución de 1:120,000. Estas diluciones se prepararon en *PBS-Tween 20 al 0.1% (v/v)*.

Asimismo, se usó un suero inmune para la detección de la proteína *NS3* y otro para la detección de *VPI*. El primero (α -*NS3*) fue donado por el Dr. Ian Goodfellow, de la Universidad de Cambridge, Reino Unido, y se obtuvo de conejos inmunizados. Este suero se ocupó a una dilución 1:35,000 en *PBS-Tritón X-100 al 0.1% (v/v)* y *1% (p/v) de leche semidescremada (Svelty de Nestlé®)*. El segundo (α -*VPI*) se elaboró en el laboratorio por la Dra. Pérez Ibáñez a partir de la inmunización de ratones (Pérez-Ibáñez et al., 2024) y se ocupó a una dilución 1:120,000 en *PBS-Tween 20 al 1% (v/v)*.

Como anticuerpos secundarios, se usaron anticuerpos policlonales de cabra de *Jackson ImmunoResearch*: α -*IgG (H+L) de conejo* (RRID: AB_2313567) y α -*IgG (H+L) de ratón* (RRID: AB_10015289); ambos conjugados a la enzima peroxidasa de rábano picante y usados a una dilución 1:20,000. El anticuerpo α -*IgG (H+L) de conejo* se diluyó en *PBS-Tritón X-100 (0.1% v/v) con leche semidescremada (Svelty de Nestlé®) al 1% (m/v)* y el anticuerpo α -*IgG (H+L) de ratón* se diluyó en *PBS-Tween 20 (0.1% v/v)*.

Deteccción de proteínas de interés

Después de la transferencia de los extractos proteicos totales a las membranas de nitrocelulosa, estas se bloquearon con una solución de *leche semidescremada (Svelty de Nestlé®) al 5% (m/v)* en *PBS IX*. EL bloqueo se realizó a temperatura ambiente durante 45 minutos y en agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron brevemente con *PBS-Tween 20 (0.1% (v/v))* o *PBS-Tritón X-100 (0.1% (v/v))*. Se eligió una u otra solución de lavado con base en el disolvente utilizado para la solución del anticuerpo primario. Después del lavado, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con las soluciones de anticuerpos primarios correspondientes. Posteriormente, se retiraron las soluciones de los anticuerpos primarios y se lavaron las membranas tres veces con *PBS-Tween 20 (0.1% v/v)* o *PBS-Tritón X-100 (0.1% v/v)*, según correspondió, por 15 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Tras los lavados, las membranas se incubaron durante dos horas, a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente. Posteriormente, se realizaron de nuevo tres lavados y las membranas se expusieron a la solución *Femto (SuperSignal™ West Femto de Thermo Scientific™; número de catálogo: 34096)*. Las señales correspondientes a las proteínas de interés se capturaron en *placas autorradiográficas (Autoradiography Film de UltraCruz®; número de catálogo: sc-201697)* y se revelaron utilizando las soluciones *reveladora (Developer and Replenisher de Carestream Dental GBX; número de catálogo: 5158621)* y *fijadora (Fixer and Replenisher de Carestream Dental GBX; número de catálogo: 1901875)*. Finalmente, para la cuantificación relativa de las proteínas, se usó el *software ImageJ* (disponible en <https://imagej.net/ij/>) (C. A. Schneider et al., 2012) siguiendo el protocolo para la cuantificación relativa de proteínas (Davarinejad, 2015).

Resultados

Estudios previos de nuestro laboratorio identificaron que la proteína mayoritaria de la cápside (*VPI*) del FCV (Urbana) se degrada como consecuencia de la inhibición de la

proteína *Hsp90*, indicando que *VPI* es una proteína cliente de esta chaperona (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Al investigar su vía de degradación en estas condiciones, se descartó a la autofagia; por lo que se investigó si el proteasoma pudiera ser el responsable de este proceso. No obstante, no se pudo adjudicar al proteasoma dicha degradación, porque su inhibición derivó en una menor cantidad de todas las proteínas virales estudiadas, incluso de aquellas que se determinó que no son clientes de *Hsp90*. Lo anterior sugiere que: (1) el proteasoma podría ser una vía importante para la replicación del FCV (Urbana) y/o (2) que la concentración utilizada de *MG132* (25 μ M) podría haber afectado a otros componentes celulares implicados en eventos tempranos de la infección considerando que el *inhibidor* se añadió dos horas antes de la adsorción viral.

Después de revisar la literatura referente a la acción del *MG132* sobre blancos moleculares diferentes al proteasoma, se concluyó que el *MG132* (25 μ M) podría haber inhibido la actividad de una enzima requerida para la entrada de diferentes calicivirus, la *cathepsina L* (Shivanna et al., 2014), teniendo en cuenta que esta enzima es un blanco molecular de los aldehídos peptídicos (Sasaki et al., 1990) y que se puede esperar que su actividad haya sido inhibida con el tratamiento utilizado de *MG132* a 25 μ M dado que con 10 μ M de este *PI* se inhibe la actividad de las cisteína proteasas de diferentes lisados celulares animales (Pwee, 2022). Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la *cathepsina L* podría haber afectado la entrada viral, lo que explicaría la menor cantidad de proteínas virales. Entonces, para evaluar el papel del proteasoma en la replicación del FCV (Urbana) *in vitro*, se comenzó por establecer las condiciones de su inhibición con *MG132* que no inhibieran la actividad la *cathepsina L*; por lo que se incluyeron en las pruebas concentraciones de *MG132* menores de 10 μ M.

La actividad del proteasoma de las células CRFK no se inhibe con un tratamiento por nueve horas con *MG132* a 0.01, 0.1 o 1 μ M

Se ha reportado que la viabilidad celular no cambia con tratamientos de cinco horas con 50 μ M de *MG132* (Lee & Goldberg, 1996). En línea con lo anterior, recientemente

en nuestro laboratorio se encontró que la viabilidad de las células CRFK no cambia en presencia de *MG132* a 10, 15, 20, 25, 40 y 50 μM por once horas (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Con base en estos antecedentes, se decidió evaluar la inhibición de la actividad del proteasoma con *MG132* a 0.01, 0.1, 1, 10 y 25 μM y detectando el aumento de los niveles de la proteína *Hsp70* como indicadora de este proceso (Oroñ et al., 2022). Para esto, se trataron CCs de CRFK por nueve horas con *MG132* a 0.01, 0.1, 1, 10 y 25 μM , y la inducción de *Hsp70* se determinó en los extractos proteicos totales de estos CCs por *Wb*. La elección de la duración de estos tratamientos se basa en la duración del tratamiento más largo que se ocupó para investigar la importancia del proteasoma en la infección con el FCV (Urbana).

A partir de tres experimentos independientes, se determinó que únicamente los tratamientos por nueve horas con 10 o 25 μM de *MG132* inhiben la actividad del proteasoma de las células CRFK, ya que, como se muestra en la **Figura 6** (panel A), solo se detectó *Hsp70* en los extractos de los CCs tratados con cualquiera de estas dos concentraciones de *MG132*. Asimismo, derivado del análisis estadístico de la cantidad relativa promedio normalizada de *Hsp70*, se concluyó que no hay diferencia estadísticamente significativa en estas dos condiciones **Figura 6** (panel B). Al respecto, el nivel promedio de *Hsp70* en los extractos de los CCs tratados con 10 μM de *MG132* fue 26.368% mayor al nivel de los extractos de los CCs tratados con 25 μM de *MG132*.

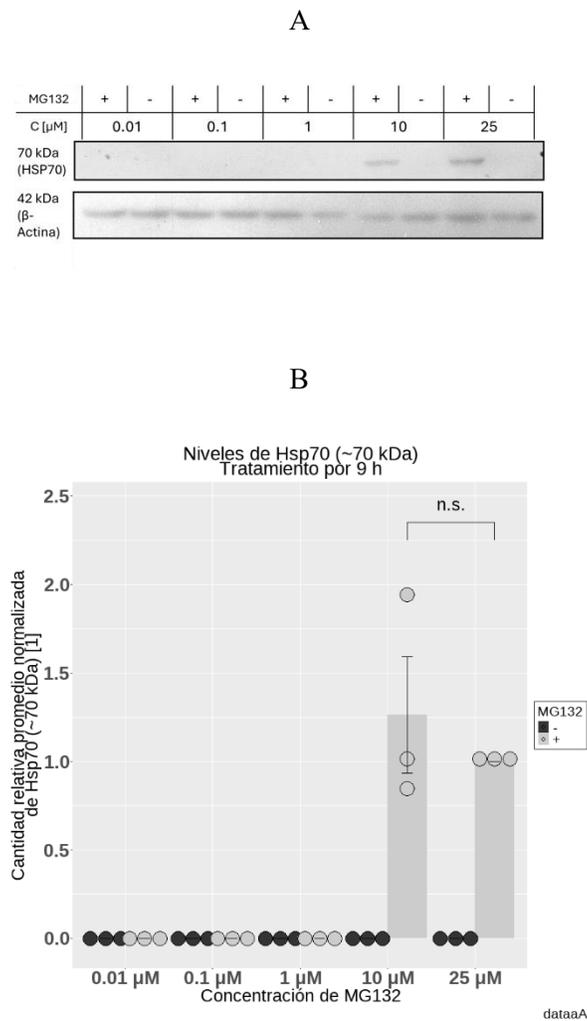


Figura 6 El proteasoma de células CRFK se inhibe a concentraciones de 10 y 25 mM de MG132 en tratamientos por nueve horas.

(A) Análisis de los niveles de Hsp70 en extractos proteicos totales de CCs CRFK tratados por nueve horas con MG132 a 0.01, 0.1, 1, 10 o 25 μM, o con el vehículo (DMSO). Se usó β-actina como control de carga. Se muestra un Wb representativo de un total de tres experimentos independientes. (B) Cantidad relativa promedio normalizada (y su error estándar) de Hsp70. Los datos mostrados corresponden al análisis de tres experimentos independientes. El análisis densitométrico se realizó con ImageJ (Davarinejad, 2015; C. A. Schneider et al., 2012), y el análisis estadístico se llevó a cabo con R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y el paquete Rcmdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para graficar los datos (Kassambara, 2023).

Para evitar que el *MG132* inhiba componentes celulares diferentes al proteasoma y que sean importantes para la replicación del FCV (Urbana) *in vitro*, se probaron diferentes concentraciones de este *inhibidor* para identificar la concentración más baja que lograra inhibir al proteasoma y que no afectara la actividad de otros factores celulares relevantes durante la entrada del FCV. Esto permitiría esclarecer el papel del proteasoma en los niveles de las proteínas virales (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Debido a que no se detectó la inhibición del proteasoma en los extractos proteicos totales de los CCs tratados con *MG132* a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 μM (**Figura 6**), se recurrió a usar la concentración de 25 μM de *MG132* pero añadiendo este

inhibidor después de la entrada del virus. Esta estrategia alternativa al uso de concentraciones menores a 25 μM de *MG132* permite descartar que la inhibición de las proteínas relevantes para la entrada del FCV (Urbana), como la *cathepsina L* (Shivanna et al., 2014), sea la responsable de la disminución de la cantidad de proteínas virales en los extractos de las células infectadas y tratadas con *MG132* a 25 μM , siguiendo lo reportado en (Pérez-Ibáñez et al., 2024).

El tratamiento preinfección con el FCV con 25 μM de *MG132* causa un retraso del *CPE*, y una reducción estadísticamente significativa de los niveles de las proteínas virales *VP1* (~60 *kDa*) y *NS3*, y del título viral de los sobrenadantes de los cultivos infectados

CCs CRFK se trataron con *MG132* a 25 μM y se infectaron con el FCV (Urbana) a una *MOI* de 5 para estudiar: (1) el progreso del *CPE* por medio de la microscopía óptica, (2) los niveles de proteínas virales por *Wb* y (3) la cantidad de partículas virales infectivas en los sobrenadantes por medio del ensayo de *TCID50*. Este *tratamiento*, que denominamos *preinfección*, consistió en dos horas de tratamiento con *MG132* (o su *vehículo*) previo a la adsorción viral y seis horas de tratamiento posterior a la adsorción viral, como se esquematiza en la **Figura 7**.

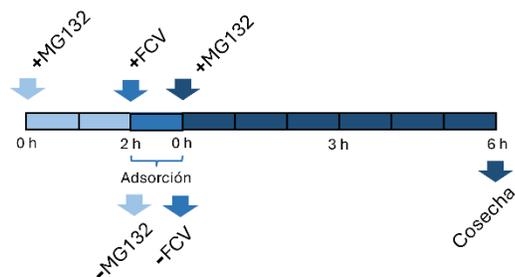


Figura 7 El tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.

Línea temporal del tratamiento preinfección de los CCs CRFK. Se comenzó por agregar MG132 (25 μ M) a los medios de cultivo dos horas antes de la adsorción viral; luego, se retiró el inhibidor y se añadió el inóculo viral (FCV, cepa Urbana). Se permitió que la adsorción viral ocurriera por una hora en los medios libres de MG132 y, tras este periodo, se retiró el inóculo viral y se agregó MG132 a los medios de cultivo, extendiendo el tratamiento seis horas más. Los CCs se analizaron con un microscopio invertido antes del comienzo del tratamiento y al final de este, y se tomaron fotografías de los campos observados en ambos tiempos. Una vez finalizado el tratamiento, se cosecharon todos los CCs para obtener los extractos proteicos para su análisis por Wb y se recolectaron los sobrenadantes para su titulación por medio del ensayo de TCID50.

Análisis del CPE con el tratamiento preinfección

Se utilizó el esquema del *tratamiento preinfección* para tratar CCs CRFK con 25 mM de MG132 e infectar con el FCV (Urbana) a una MOI de 5. Al comienzo del tratamiento y a las 6 hpi, se observaron los CCs con el microscopio invertido y se evaluó el progreso del CPE. Todos los CCs infectados sujetos al *tratamiento preinfección* comenzaron sin señales de estrés celular. Sin embargo, como era de esperarse, esto cambió para los CCs infectados y tratados con el *vehículo* (DMSO), ya que a las 6 hpi se observó un claro CPE dada la disrupción de la monocapa, el redondeamiento celular y la presencia de células refringentes (**Figura 8**) [ver (Sosnovtsev & Green, 2003)]. No obstante, el cambio en la integridad de la monocapa, el redondeamiento celular y la presencia de células refringentes en los CCs tratados con MG132 e infectados fue mucho menos evidente que en sus pares expuestos al *vehículo* (**Figura 8**). Esto lo interpretamos como un retraso en el CPE en los CCs infectados y tratados con MG132 y corrobora los

ensayos de (Pérez-Ibáñez et al., 2024), los cuales indican que el tratamiento con 25 μM de *MG132* impide la replicación eficiente del FCV (Urbana) *in vitro*.

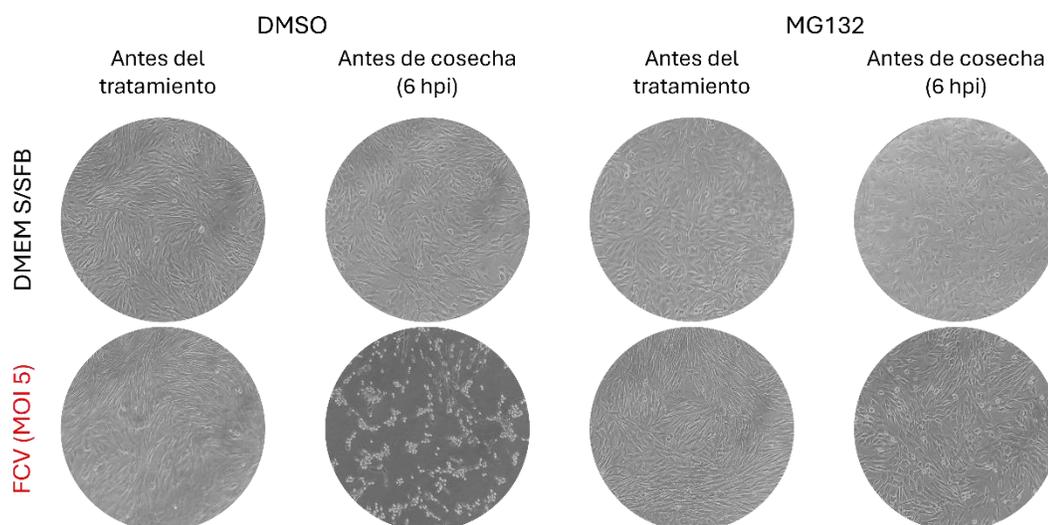


Figura 8 El tratamiento preinfección con 25 μM de *MG132* retrasa el CPE de los CCs infectados con el FCV.

Imágenes de los CCs sujetos al tratamiento preinfección. Se incluyen fotografías de cada CC antes del comienzo de su tratamiento preinfección y a las 6 hpi. Estas fotografías son representativas de un total de tres experimentos independientes.

Niveles de las proteínas virales *VP1* (~60 kDa) y *NS3* con el *tratamiento preinfección*

Para determinar el efecto de *MG132* en la replicación eficiente del FCV (Urbana) *in vitro*, se evaluaron los niveles de proteínas virales *VP1* y *NS3* por *Wb*, y la liberación de la progenie viral infecciosa por *TCID50* a partir de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*. Para este fin, luego de evaluar el progreso del *CPE*, se cosecharon los CCs a las 6 hpi, se realizó la extracción total de sus proteínas y se recolectaron los sobrenadantes de los CCs.

Los extractos proteicos totales de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección* con *MG132* se analizaron por *Wb* para evaluar el posible papel del proteasoma en la

replicación del FCV (Urbana) *in vitro*. Para esto, se determinaron y compararon los niveles de las proteínas virales *VPI* y *NS3* de los extractos de los CCs infectados tratados y no tratados con el *PI* (**Figura 9**). Además, la inhibición del proteasoma se evaluó a través de la detección de *Hsp70*, lo que permitió verificar que el proteasoma se inhibió únicamente en los CCs tratados con *MG132* (**Figura 9**, panel A). En cuanto a las proteínas virales *VPI* y *NS3*, estas se detectaron en los extractos proteicos de los CCs infectados independientemente de si se trataron o no con *MG132* (**Figura 9**, panel A). No obstante, se observó una reducción en los niveles de ambas proteínas provenientes de los extractos tratados con 25 mM de *MG132*. Al respecto, se encontró una reducción del 32.5574% en el nivel de *VPI* y del 57.2246% en el de *NS3* de extractos proteicos provenientes de CCs tratados con *MG132* en comparación con los niveles correspondientes de los extractos de los CCs expuestos únicamente al *vehículo*. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa en la cantidad relativa promedio normalizada de *VPI* (banda de ~60 kDa) (**Figura 9**, panel B; $p = 0.02279$) y de *NS3* (**Figura 9**, panel C; $p = 0.0474$). Por ende, el análisis de los extractos proteicos totales de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección* indica que el *MG132* (25 μ M) tiene un efecto negativo sobre la producción de proteínas virales, lo que sugiere que el proteasoma es un componente celular importante para la replicación del FCV (Urbana) *in vitro*.

A

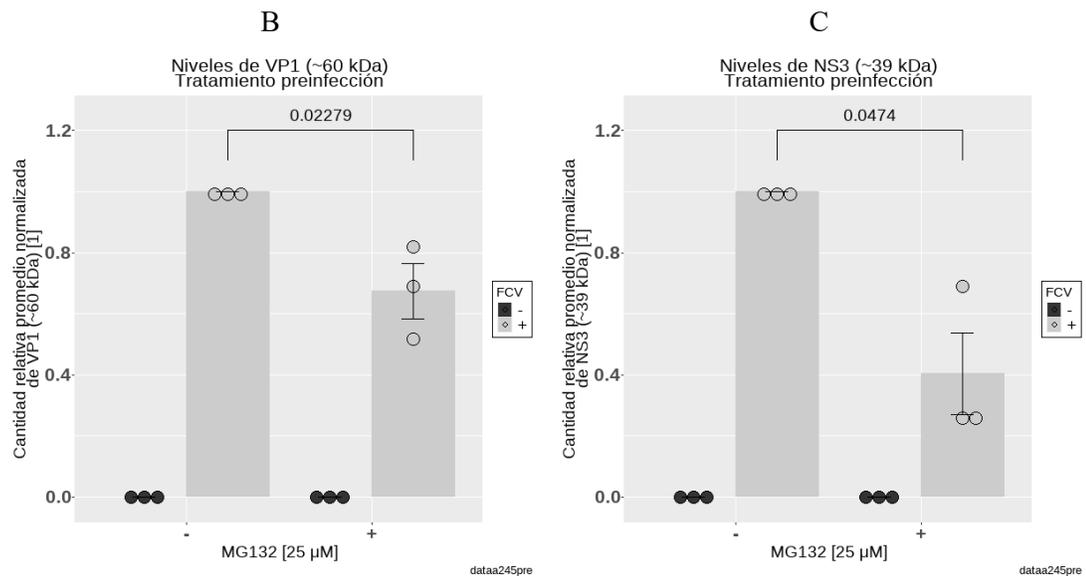
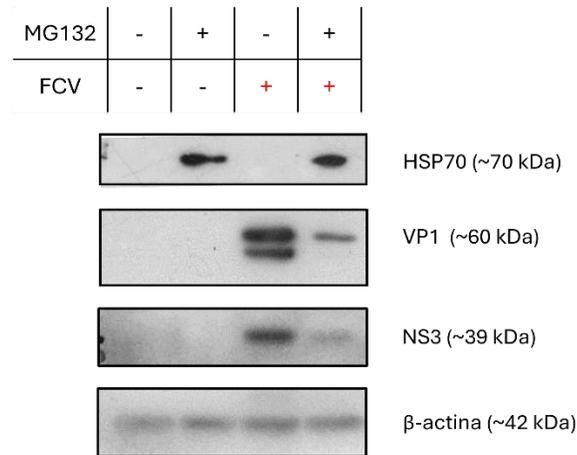


Figura 9 Los niveles de las proteínas virales VP1 (~60 kDa) y NS3 se reducen significativamente con el tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.

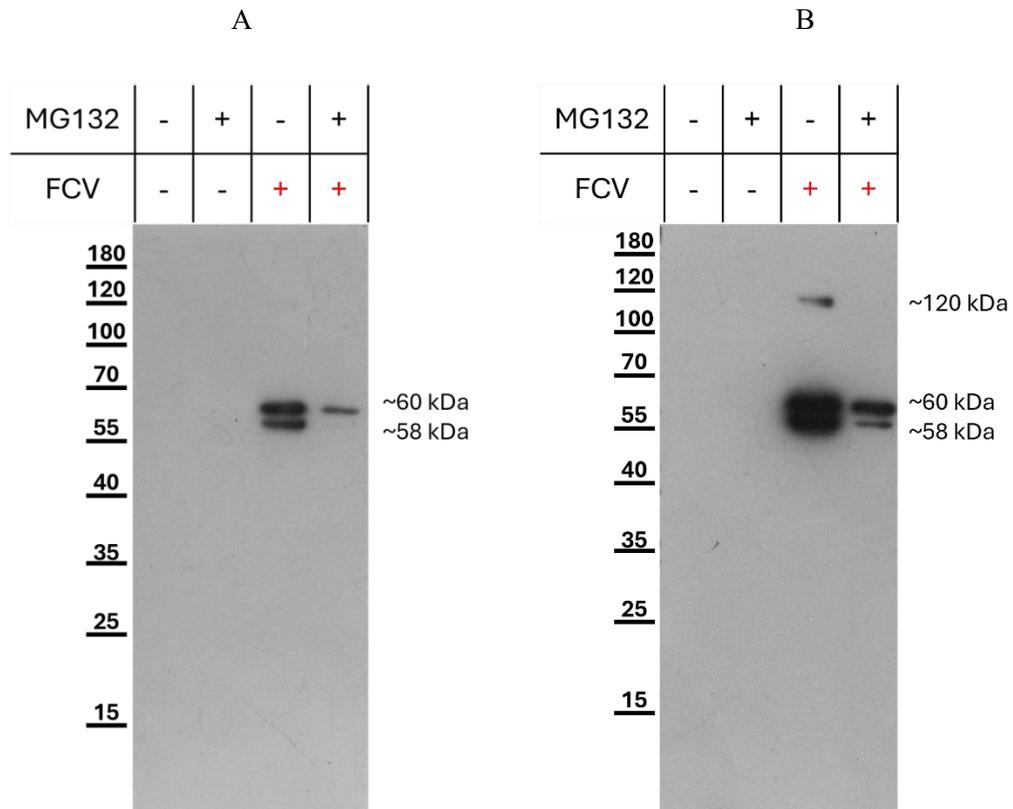
(A) Wb de extractos proteicos totales de CCs sujetos al tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132. Se analizaron los niveles de las proteínas virales VP1 y NS3 como indicadores de la replicación viral a las 6 hpi; así como de las proteínas celulares HSP70 y β -actina como indicador de la inhibición del proteasoma con MG132 y como control de carga, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (B) Cantidad relativa promedio normalizada de VP1 (~60 kDa) y (C) de NS3 en células CRFK sujetas al tratamiento preinfección. El análisis densitométrico se realizó con ImageJ (Davarinejad, 2015; C. A. Schneider et al., 2012), y el análisis

estadístico se llevó a cabo con R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y el paquete Remdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para graficar los datos (Kassambara, 2023).

Para determinar si el tratamiento con *MGI32* afecta otras formas de la proteína *VPI*, se decidió realizar un análisis por *Wb* incubando las membranas completas con suero α -*VPI*. Las formas de interés de *VPI* que se buscaron fueron: el producto de ~40 kDa derivado del corte por caspas (Al-Molawi et al., 2003), el precursor *LC-VPI* de ~73 kDa (Sosnovtsev et al., 1998) y el homodímero de ~116 kDa (Sosnovtsev et al., 1998). Este análisis surge de suponer que otras formas de *VPI* pudieran ser blanco del proteasoma, recordando que algunos precursores proteicos del CVB3 son procesados por el *UPS* durante la infección *in vitro* con este virus (Voss et al., 2021). Además, este análisis permitió la identificación de un total de tres bandas de diferentes pesos moleculares: una de ~58 kDa, otra de ~60 kDa y que corresponde a la banda de la proteína *VPI* madura y que se muestra en el *Wb* de la **Figura 9** (panel A), y una más a ~120 kDa y que solo se pudo detectar en los extractos de los CCs infectados y expuestos al *vehículo* cuando se extendió el tiempo de exposición usado para la detección de las otras dos bandas (**Figura 10**, paneles A-C). Con base en los pesos moleculares de estas bandas y los de las formas de interés de *VPI*, se asume que la banda de 120 kDa corresponde a la forma homodimérica de *VPI*. Por otra parte, se observó que la intensidad de las tres bandas encontradas fue mayor en los extractos de los CCs infectados y expuestos a *DMSO* que en los extractos de los CCs infectados y tratados con *MGI32*.

Luego de identificar las bandas obtenidas tras la incubación de las membranas únicamente con el suero α -*VPI*, se incubaron las mismas membranas con el anticuerpo α - β -*actina* y se determinó que no hubo una disminución estadísticamente significativa de la cantidad relativa promedio normalizada de la especie proteica correspondiente a la banda de ~58 kDa (**Figura 10**, panel D; $p = 0.05084$) al comparar este parámetro de los CCs infectados y expuestos a *DMSO* con los de los CCs infectados y tratados con *MGI32*. A pesar de que no es significativa esta reducción del 53.3738%, se observó una tendencia a la baja para esta banda. Por consiguiente, la reducción del nivel de la proteína *VPI* (banda de ~60 kDa) en los CC tratados con *MGI32* que se muestra en la

Figura 9 está acompañada de la reducción del nivel de las especies detrás de las bandas de ~58 y ~120 kDa que se muestran en la **Figura 10** y que pudieran corresponder respectivamente a una forma de *VPI* que no ha sido identificada (~58 kDa) y al homodímero de *VPI* (~120 kDa). Esta tendencia a la baja apoya la propuesta del requerimiento del proteasoma para la replicación del FCV.



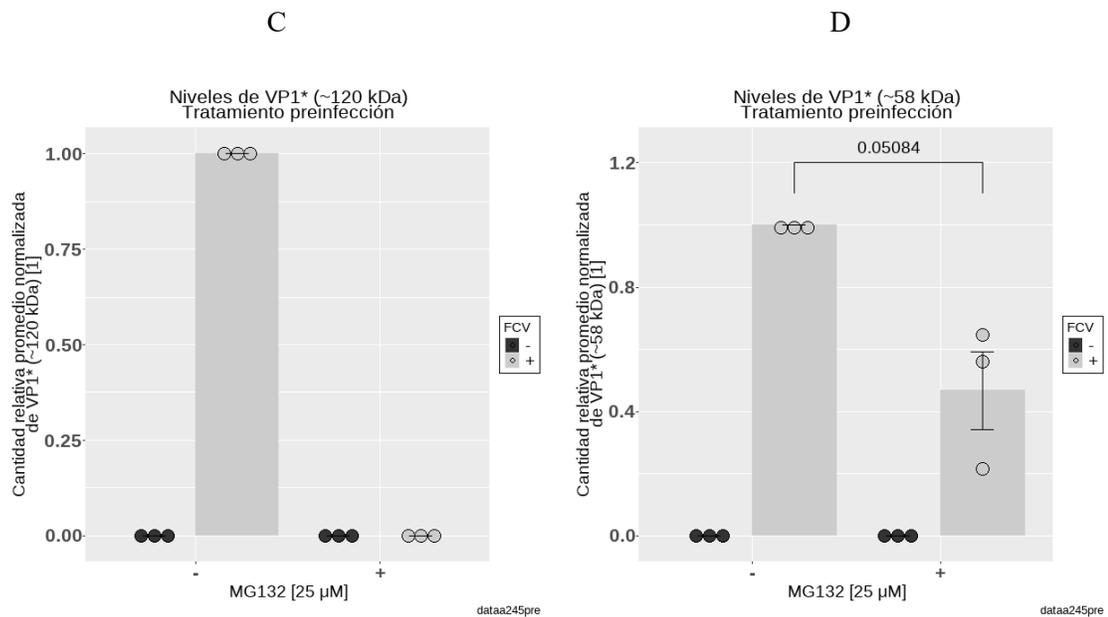


Figura 10 Los niveles de otras especies proteicas detectadas con el suero α -VP1 también se comparten a la baja en los CCs infectados con el FCV (Urbana) y sujetos al tratamiento preinfección con 25 μ M de MG132.

(A) Wb de los extractos proteicos totales de los CCs sujetos al tratamiento preinfección y cosechados a las 6 hpi. Se analizó la presencia de otras formas de la proteína VP1 con base en la incubación de membranas completas con el suero α -VP1. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (B) Cantidad relativa promedio normalizada de la banda de ~120 kDa detectada con el suero α -VP1 y (C) de la banda de ~58 kDa también detectada con el suero α -VP1. Para estas cuantificaciones relativas, se incubaron al final las membranas completas con el anticuerpo α - β -actina (control de carga, no mostrado). El análisis densitométrico se realizó con ImageJ (Davarinejad, 2015; C. A. Schneider et al., 2012), y el análisis estadístico se llevó a cabo con R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y el paquete Rcmdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para graficar los datos (Kassambara, 2023).

Cuantificación de las partículas virales infectivas en los sobrenadantes de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*

Además del análisis del CPE y de los niveles de proteínas virales de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*, se determinó el título viral de los sobrenadantes de estos CCs. Para ello, los sobrenadantes recolectados de los CCs infectados y sujetos a este esquema de tratamiento se titularon por TCID₅₀ y se determinó que el título promedio

de los sobrenadantes de los CCs infectados y tratados con *MG132* fue de $\text{Log}_{10}(2.78 \text{ TCID}_{50}/\text{mL})$, mientras que para los de los CCs infectados y expuestos a *DMSO* fue de $\text{Log}_{10}(5.76 \text{ TCID}_{50}/\text{mL})$ (**Figura 11**), lo cual significa una caída del 41.6055%. Esta diferencia en los niveles de partículas virales fue estadísticamente significativa ($p = 0.008151$) y se traduce en que hubo una menor cantidad de progenie viral en los medios de cultivo de los CCs infectados y tratados con *MG132* en comparación con sus pares expuestos al *vehículo*.

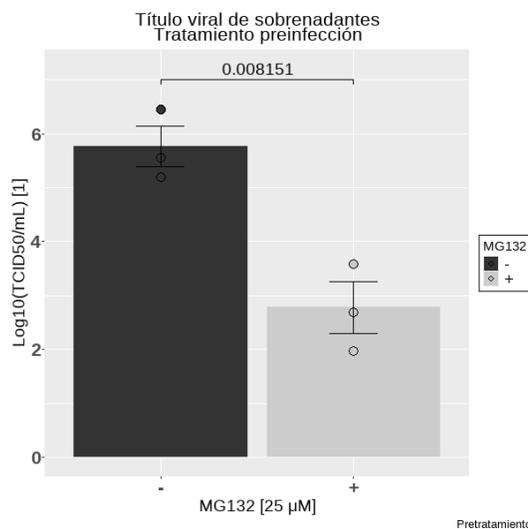


Figura 11 El tratamiento preinfección con 25 μM de *MG132* causa una reducción de la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes de los CCs infectados.

Título viral promedio de los sobrenadantes de los CCs sujetos al tratamiento preinfección con *MG132* (25 μM) e infectados con FCV a una MOI de 5. Los sobrenadantes se recolectaron a las 6 hpi. El título viral se determinó por medio del ensayo de TCID₅₀. El análisis estadístico se realizó a partir de tres experimentos independientes, y se ocupó el software R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y su paquete Rcmdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para realizar las gráficas de los datos (Kassambara, 2023).

En síntesis, el *tratamiento preinfección* con *MG132* a 25 μM dio lugar a: (1) un retraso del *CPE* en los CCs infectados, (2) menores niveles de dos proteínas virales codificadas en *ORFs* diferentes (*VP1* y *NS3*) y (3) una menor cantidad de progenie viral infectiva en los medios de cultivo con relación a los de los CCs infectados pero expuestos al *vehículo*. Estos tres puntos sugieren que el proteasoma es un componente celular necesario para la replicación eficiente *in vitro* del FCV (Urbana). No obstante, para descartar que lo observado sea el resultado de la posible inhibición de una o más enzimas celulares que participen en eventos tempranos del ciclo replicativo, se

realizaron experimentos en los que el tratamiento con *MG132* comenzó después de la adsorción viral (*tratamiento posinfección*).

El *tratamiento posinfección* de células CRFK con 25 μ M de *MG132* causa una reducción estadísticamente significativa de los niveles de las proteínas virales *VP1* (~60 kDa) y *NS3*, y del título viral de los sobrenadantes de los cultivos infectados

Así como se reportó para los CCs sujetos al *tratamiento preinfección* el efecto sobre el progreso del *CPE*, los niveles de proteínas virales y sobre el título viral de los sobrenadantes de los CCs infectados; en esta parte del trabajo se presenta el efecto del *tratamiento posinfección* estos tres parámetros. A diferencia del *tratamiento preinfección* (**Figura 7**), en el *tratamiento posinfección* se añade el *MG132* a 25 μ M o el vehículo después de que el inóculo viral ha sido retirado y este compuesto permanece durante las seis horas en las que transcurre la infección (**Figura 12**).

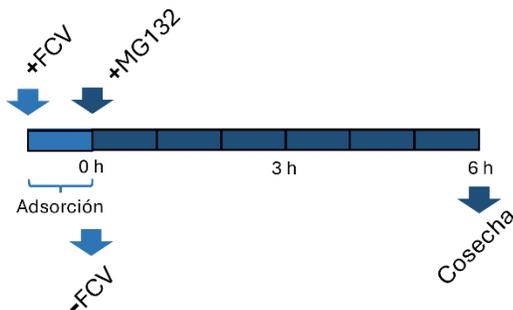


Figura 12 El tratamiento posinfección con 25 μ M de *MG132*.

Línea temporal del tratamiento posinfección de los CCs CRFK. Este tratamiento consistió en una hora de incubación de los CCs con el inóculo viral (FCV, cepa Urbana, MOI de 5) más seis horas de exposición al *MG132* después de la remoción del inóculo. Durante el periodo de adsorción viral (1 h), no se trataron los CCs con *MG132*. Los CCs se observaron con el microscopio invertido antes de la adición del inóculo a usar y al final del tratamiento (6 hpi), y se tomaron fotografías de los campos observados. Una vez finalizado el tratamiento posinfección, se cosecharon todos los CCs y se prosiguió

a recolectar sus sobrenadantes para su titulación por medio del ensayo de TCID₅₀, así como a analizar sus extractos proteicos totales por Wb.

Análisis del CPE con el *tratamiento posinfección*

CCs CRFK se infectaron con el FCV (Urbana) bajo el esquema del *tratamiento posinfección* para evaluar el progreso del CPE. Como parte del análisis, se observaron los CCs antes de que se expusieran al inóculo correspondiente (FCV o DMEM sin SFB) y antes de que se cosecharan a las 6 hpi. Los CCs que no se infectaron prácticamente no presentaron señales de estrés a lo largo del tiempo; sin embargo, los CCs que sí se infectaron sí cambiaron con el tiempo, como era de esperarse. Al respecto, al observar a las 6 hpi los CCs infectados, se observó que, tanto los CCs infectados y tratados con el MG132 como los CCs infectados y expuestos al DMSO, presentaron más células redondas y refringentes en comparación de cuando se observaron previo a ser infectados (**Figura 13**). Al comparar la apariencia de los CCs infectados y expuestos al *vehículo*, se notó el típico CPE con células redondas y refringentes, así como una disrupción en la integridad de monocapa. En el caso de los CCs sometidos al tratamiento con MG132, encontramos la presencia de células redondeadas y la integridad de la monocapa alterada; sin embargo, un gran porcentaje de las células todavía conservan su fenotipo alargado, lo cual sugiere un retraso de la progresión de la infección (**Figura 13**). Cabe mencionar que en este ensayo no resulta tan evidente la diferencia entre los CCs infectados y expuestos al *vehículo* y los infectados y tratados con el MG132, en comparación con lo observado con el *tratamiento preinfección*.

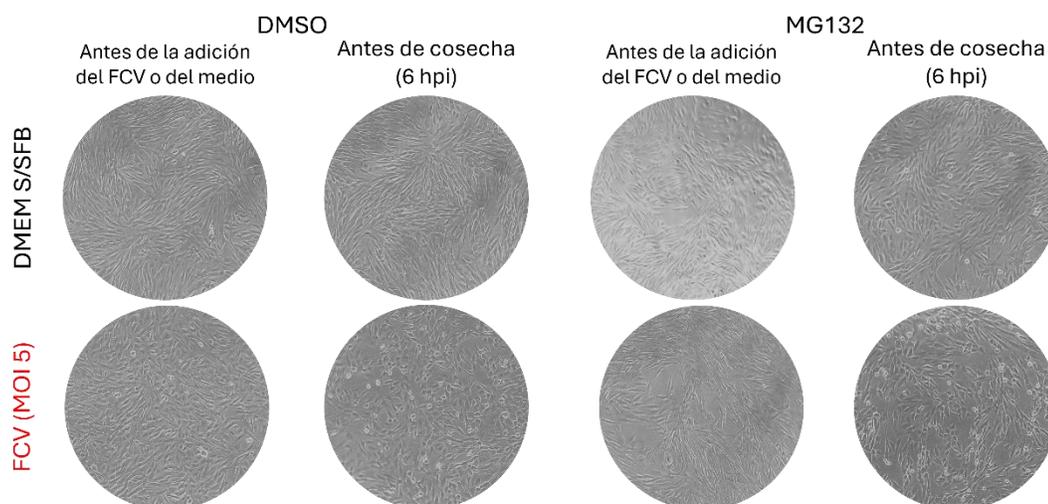


Figura 13 CPE en CCs infectados con el FCV y sujetos al tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132.

Imágenes de los CCs sujetos al tratamiento posinfección con FCV a una MOI de 5. Se incluyen fotografías de cada CC antes de que se añadiera su inóculo correspondiente y a las 6 hpi. Estas fotografías son representativas de un total de tres experimentos independientes.

Niveles de las proteínas virales VP1 (~60 kDa) y NS3

Luego de observar los CCs sujetos al *tratamiento posinfección* con 25 μ M de MG132 por 6 h, las células se cosecharon y se realizó la extracción de sus proteínas totales para su análisis por *Wb*. Inicialmente se verificó la inhibición de la actividad del proteasoma en los CCs tratados con MG132, a juzgar por la detección de *Hsp70* (**Figura 14**, panel A). Por otro lado, se determinó que hubo una reducción del 73.9692 y 80.8747% en la cantidad de VP1 y NS3 de los extractos tratados con 25 mM de MG132 en comparación con los tratados con el *vehículo*, respectivamente. La reducción de la cantidad relativa promedio normalizada de VP1 (banda de ~60 kDa) (**Figura 14**, panel B) y de NS3 (**Figura 14**, panel C) es estadísticamente significativa ($p = 0.001274$ para VP1 y $p = 0.002781$ para NS3). Considerando que con el *tratamiento posinfección* con MG132 no se afecta la entrada viral, estos resultados sugieren que el proteasoma es un componente celular importante para la replicación del FCV (Urbana) *in vitro*.

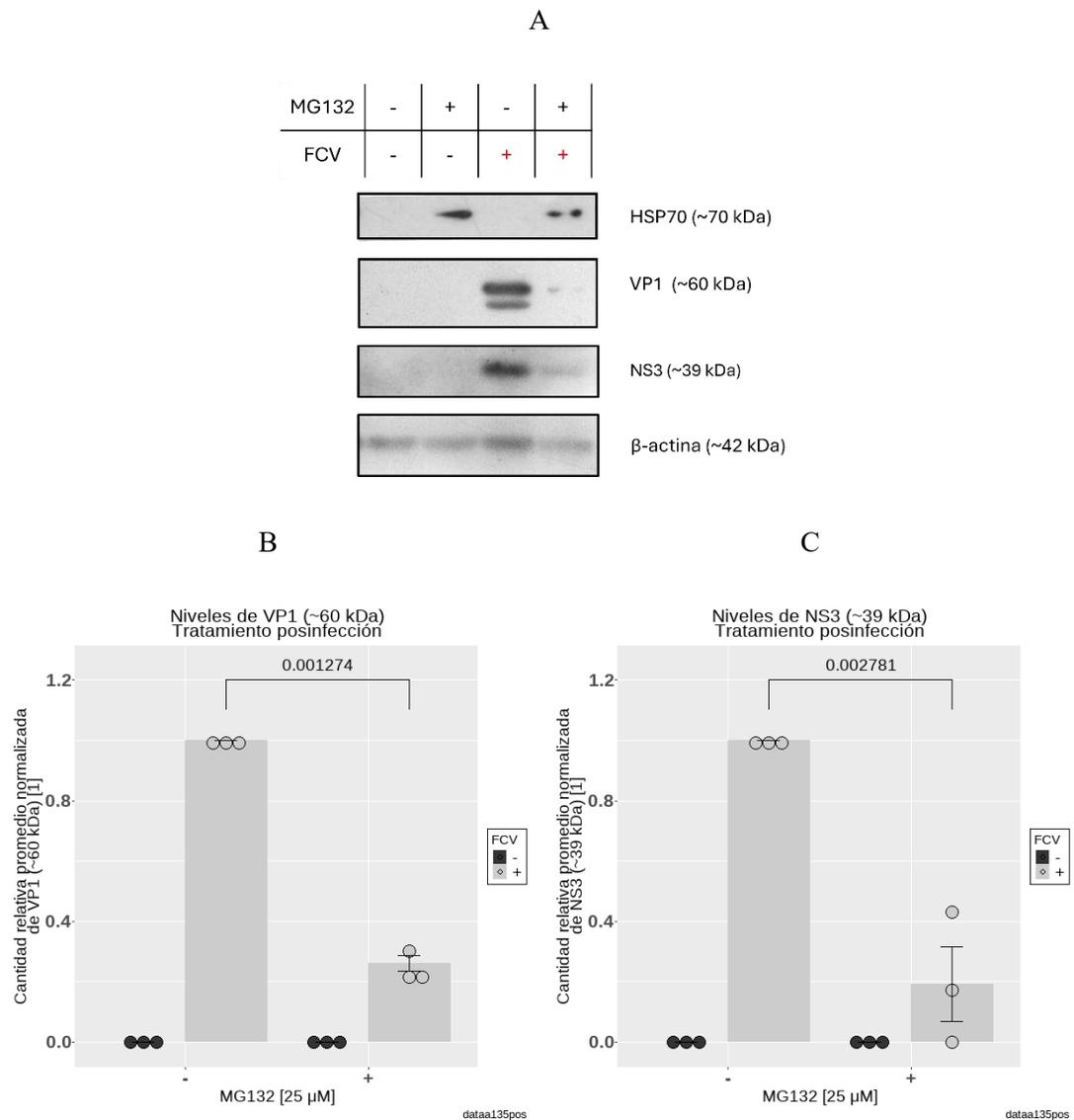


Figura 14 Los niveles de las proteínas virales VP1 (~60 kDa) y NS3 se reducen significativamente con el tratamiento *posinfección* con 25 μM de MG132.

(A) Wb de los extractos proteicos totales de CCs sujetos al tratamiento *posinfección* y cosechados a las 6 hpi. Se analizaron los niveles de las proteínas virales VP1 y NS3 como indicadores de la replicación viral; así como de las proteínas celulares HSP70 y β-actina como indicador de la inhibición del proteasoma con MG132 y como control de carga, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (B) Cantidad relativa promedio normalizada de VP1 (~60 kDa) y (C) de NS3 en células CRFK sujetas al tratamiento *posinfección*. El análisis densitométrico se realizó con ImageJ (Davarinejad, 2015; C. A. Schneider et al., 2012), y el análisis

estadístico se llevó a cabo con R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y el paquete Remdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para graficar los datos (Kassambara, 2023).

La caída en los niveles de las proteínas *VPI* y *NS3* con el *tratamiento posinfección* con *MG132*, sugieren que lo observado no se debe a la inhibición de la *cathepsina L*, dado que, con este esquema de adición del *inhibidor*, se exponen los CCs al *MG132* hasta después de la entrada viral. Lo anterior también se puede extender a otras enzimas susceptibles al *MG132* y que pudieran participar en la entrada del *FCV* (Urbana).

Por otra parte, se complementó el análisis de las diferentes formas de la proteína *VPI* de manera similar a como se realizó con los extractos de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*. De igual manera, solo se detectaron tres formas proteicas de ~58, ~60 y ~120 kDa en las membranas completas incubadas con el suero α -*VPI* (**Figura 15**). Además, la banda de ~120 kDa solo se detectó en los extractos de los CCs infectados y expuestos al *vehículo* cuando se ocupó un tiempo de exposición más prolongado que el usado para la detección de las otras dos bandas (**Figura 15**, compárese panel B con C). Además, la intensidad de las bandas de ~58 y ~60 kDa fue menor en los extractos de los CCs infectados y tratados con *MG132* (**Figura 15**, paneles A, B y D). De hecho, se concluyó que la caída del 84.782% en el nivel de la banda de ~58 kDa es estadísticamente significativa (**Figura 15**, panel D; $p = 0.0003375$); aunque, en general, la tendencia a la baja de las tres bandas recién mencionadas apoya la propuesta del requerimiento del proteasoma para la replicación del *FCV*.

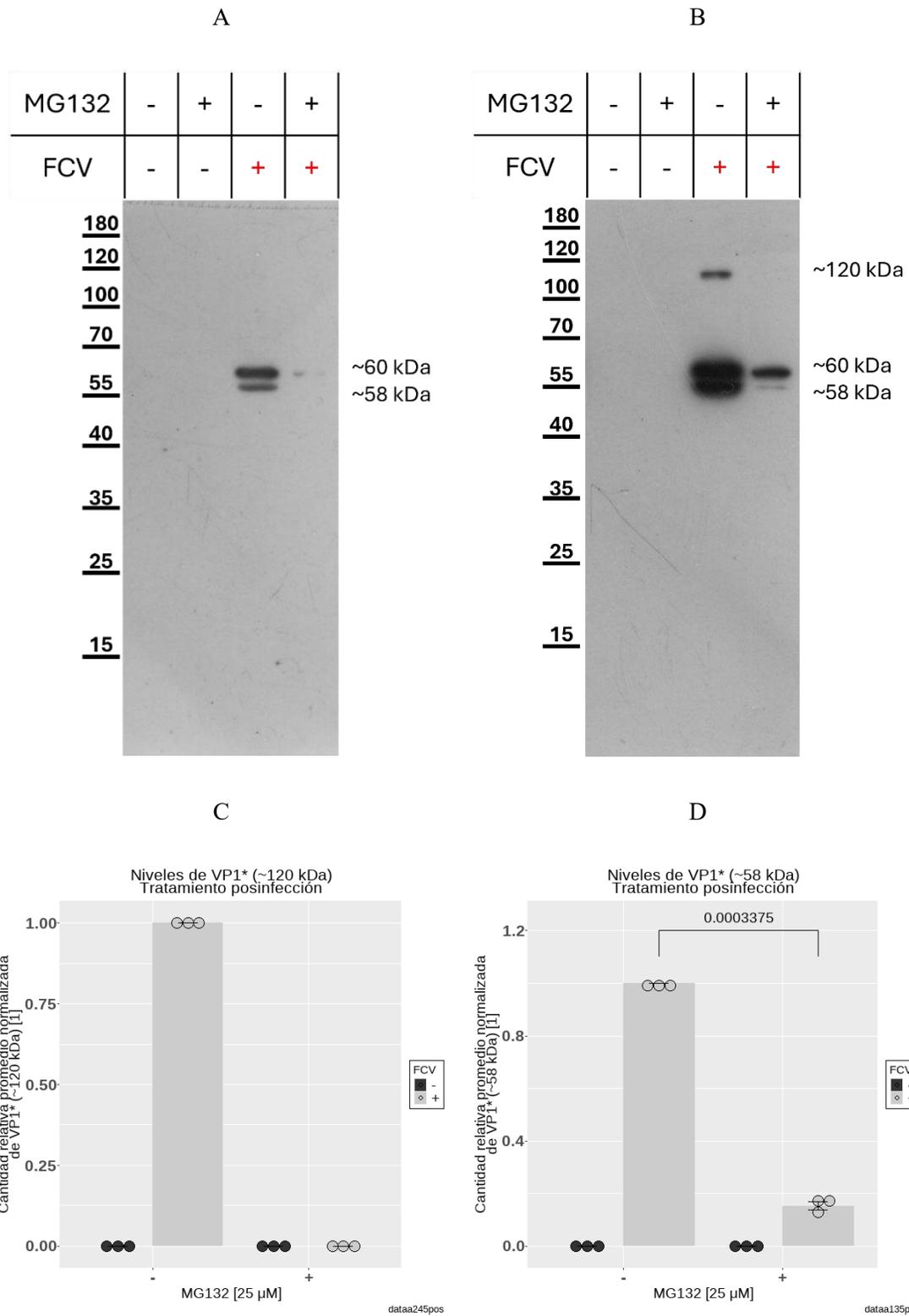


Figura 15 Los niveles de otras especies proteicas detectadas con el suero α -VP1 también se comparten a la baja en los CCs sujetos al tratamiento posinfección con 25 μ M de MG132.

(A) Wb de los extractos proteicos totales de CCs sujetos al tratamiento posinfección y cosechados a las 6 hpi. Para revelar las bandas mostradas en el Wb del panel (A), se usó un tiempo de exposición corto en comparación al tiempo de exposición usado para el Wb del panel (B). Independientemente del tiempo de exposición, se analizó la presencia de otras formas de la proteína VP1 con base en la incubación de membranas completas únicamente con el suero α -VP1. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (C) Cantidad relativa promedio normalizada de la banda de ~120 kDa detectada con el suero α -VP1 y (D) de la banda de ~58 kDa detectada también con el suero α -VP1. Para estas cuantificaciones relativas, se incubaron al final las membranas completas con el anticuerpo α - β -actina (control de carga, no mostrado). El análisis densitométrico se realizó con ImageJ (Davarinejad, 2015; C. A. Schneider et al., 2012), y el análisis estadístico se llevó a cabo con R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y el paquete Remdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para graficar los datos (Kassambara, 2023).

Para corroborar el impacto del *MG132* en la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes, se compararon los títulos virales de los sobrenadantes de los CCs infectados y sujetos al *tratamiento posinfección*. Con este último análisis, se podrá esclarecer si el proteasoma es un componente celular necesario para la replicación *in vitro* del virus, como sugieren los resultados de los análisis anteriores.

Cuantificación de las partículas virales infectivas en los sobrenadantes de los CCs sujetos al *tratamiento posinfección*

Además del análisis del *CPE* y de los niveles de proteínas virales descrito anteriormente, se determinó el título viral de los sobrenadantes de los CCs sujetos al *tratamiento posinfección* mediante ensayos de *TCID50* (**Figura 16**). Este análisis se realizó para los sobrenadantes de tres experimentos independientes y arrojó que el título viral promedio de los sobrenadantes de los CCs infectados y expuestos a *DMSO* fue de $\text{Log}_{10}(3.98 \text{ TCID}_{50}/\text{mL})$, mientras que el título viral promedio de los sobrenadantes de los CCs infectados y tratados con *MG132* fue de $\text{Log}_{10}(2.76 \text{ TCID}_{50}/\text{mL})$, por lo que hubo una caída del 26.5008% en el título viral de los sobrenadantes. Además, se determinó que esta reducción fue estadísticamente significativa ($p = 0.03734$). Esta caída en el título viral se puede interpretar como una menor cantidad de progenie viral en los CCs infectados y tratados con *MG132* en comparación con sus pares expuestos al *vehículo*.

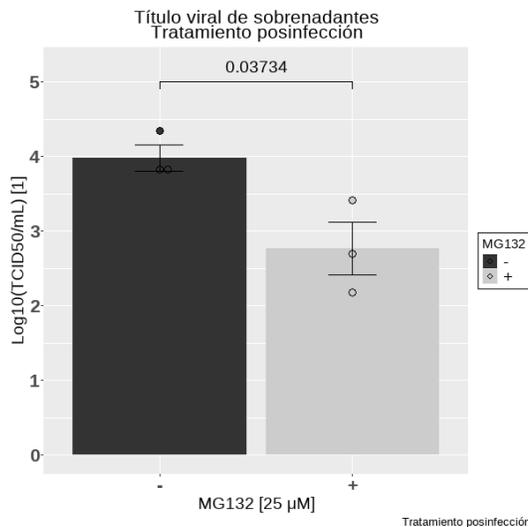


Figura 16 El tratamiento posinfección con 25 μM de MG132 causa una reducción en la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes de los CCs infectados.

Título viral promedio de los sobrenadantes de los CCs sujetos al tratamiento posinfección con MG132 e infectados con FCV a una MOI de 5. Los sobrenadantes se recolectaron a las 6 hpi. El título viral se determinó por medio del ensayo de TCID₅₀. El análisis estadístico se realizó a partir de tres experimentos independientes, y se ocupó el software R (versión 4.4.1) (R Core Team, 2021) y su paquete Rcmdr (Fox et al., 2024). Se usó el paquete ggpubr para realizar las gráficas de los datos (Kassambara, 2023).

En resumen, los resultados del *tratamiento posinfección* sugieren que el proteasoma es un componente celular importante para la replicación del FCV (*in vitro*), particularmente en eventos posteriores a la entrada del virus a las células.

Discusión

Previamente en nuestro laboratorio, la Dra. Pérez Ibáñez y cols. encontraron que la proteína mayoritaria de la cápside, *VPI*, del FCV (Urbana) es una proteína cliente de *Hsp90*, y que, cuando la actividad de esta chaperona celular es inhibida con geldanamicina, los niveles de la proteína *VPI* caen tal y como ocurre con las proteínas clientes de esta chaperona cuando se inhibe su actividad (Pérez-Ibáñez et al., 2024). En dicho trabajo también se evaluó el posible papel de las dos vías de degradación principales de las proteínas clientes de *Hsp90*. Estas vías son la vía autofágica-lisosomal y el UPS. Al abordar el papel de la vía autofágica-lisosomal, se descartó que

esta vía estuviera implicada en la degradación de *VPI* cuando la actividad de *Hsp90* se encuentra inhibida. Luego, al abordar el *UPS*, se encontró que la inhibición del proteasoma con 25 μ M de *MG132*, lejos de recuperar los niveles de la proteína *VPI* en las células tratadas con geldanamicina, dio lugar a una reducción en los niveles de todas las proteínas virales estudiadas (*i.e.* *VPI*, *NS6/7* y *LC*), incluyendo aquellas que previamente se había determinado que no eran clientes de *Hsp90* (*i.e.* *NS6/7* y *LC*). Por consiguiente, no se pudo adjudicar en ese entonces al proteasoma en la degradación de *VPI* cuando la actividad de *Hsp90* se encontraba inhibida. Sin embargo, el trabajo de la Dra. Pérez Ibáñez y cols. sugiere fuertemente que el proteasoma es un componente celular importante para la replicación del FCV (Urbana) *in vitro*. No obstante, dado que los CCs se trataron con *MG132* desde dos horas antes de que se inocularan con el FCV, el referido trabajo dio pie a la duda de la magnitud de la contribución del proteasoma en la replicación del FCV, ya que el *MG132* podría haber reducido la actividad de otros factores celulares relevantes para los eventos tempranos del ciclo replicativo, como pudiera ser el caso de la *cathepsina L*, implicada en la entrada del FCV (Shivanna et al., 2014) e identificada como un blanco del *MG132* (Sasaki et al., 1990).

Con lo anterior en mente, en la presente tesis se propusieron dos estrategias: (1) la inhibición del proteasoma utilizando *MG132* a concentraciones inhibitorias del proteasoma que, en teoría, no afectarían la actividad de *cathepsina L* y (2) la adición de *MG132*, para la inhibición del proteasoma, después de la entrada viral para evitar la inhibición de enzimas implicadas en la entrada del virus a las células.

Elección de 25 μ M como concentración a usar de *MG132* para los tratamientos *pre-* y *posinfección*

Para determinar la concentración de *MG132* que no inhibiera la actividad de la *cathepsina L*, pero que fuera capaz de inhibir al proteasoma de las células CRFK, se realizaron tratamientos por nueve horas con concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10 y 25 μ M. Estas concentraciones se eligieron considerando que: (1) la inhibición del proteasoma 20S purificado y del proteasoma de células PC12 puede lograrse con 100 y 20 nM de *MG132*, respectivamente, (Tsubuki et al., 1996), y (2) que se utilizó *MG132*

a 25 μM para inhibir el proteasoma de células CRFK en (Pérez-Ibáñez et al., 2024). Adicionalmente, estas concentraciones de los tratamientos por nueve horas se ocuparon por dicho periodo para así cubrir el tiempo que tardaría el tratamiento más largo que posteriormente se llevó a cabo para el presente trabajo (*i.e.* tratamiento preinfección, ver **Figura 7**).

Una vez finalizados los tratamientos con las diferentes concentraciones de *MG132*, se detectaron mediante *Wb* los niveles de la proteína *Hsp70*, dado que esta proteína indica la inhibición del proteasoma (**Figura 6**, panel A) (Oroń et al., 2022). Solamente los tratamientos por nueve horas con 10 y 25 μM de *MG132* inhibieron el proteasoma (**Figura 6**, panel B). Además, se determinó que la inhibición del proteasoma ocurrió en una magnitud similar en ambos casos. A pesar de que se ha reportado que el proteasoma de una línea celular animal puede ser inhibido con 20 nM de *MG132* (Tsubuki et al., 1996), en el presente trabajo no se detectó la inhibición del proteasoma de las células CRFK en los tratamientos por nueve horas realizados con concentraciones menores a 10 μM de *MG132*. Esta discrepancia podría deberse a las diferencias metodológicas entre el trabajo usado como referencia (Tsubuki et al., 1996) y el presente. Por ejemplo, se usaron diferentes: células animales (células PC12 contra CRFK), periodos de tratamiento (48 h contra 9 h) e indicadores biológicos de la inhibición del proteasoma (formación de nueritas contra inducción de *Hsp70*).

Con lo anterior en mente, se eligió la concentración de 25 μM de *MG132* para continuar con el trabajo. No obstante, para evitar la posible inhibición de componentes celulares implicados en la entrada del virus a las células (*e.g. catepsina L*), se utilizó el esquema de *tratamiento posinfección* con 25 μM de *MG132*. En este esquema, a diferencia del utilizado para el *tratamiento preinfección*, el *MG132* (25 μM) se añadió después de la remoción del inóculo de FCV para permitir que la adsorción de las partículas virales ocurriera libre de la influencia del *MG132*. Dicho de otra manera, los procesos de unión y entrada tuvieron lugar antes de que comenzar el tratamiento con *MG132*, por lo que se evitó el efecto inhibitorio de esta *droga* en la *catepsina L* durante la entrada viral.

Tratamiento preinfección de los CCs infectados con el FCV

A manera de resumen, al realizar el *tratamiento preinfección* (**Figura 7**) de los CCs CRFK, se corroboraron los resultados previamente obtenidos en el laboratorio con relación a los CCs infectados y tratados con *MGI32* en comparación con los CCs infectados y expuestos a *DMSO*:

1. Una menor disrupción de la monocapa y cantidad de células redondas y refringentes, con base en la comparación de la apariencia de los CCs infectados (**Figura 8**);
2. Una menor cantidad relativa promedio normalizada de las proteínas virales *VPI* (~60 kDa) (**Figura 9**, paneles A y B) y *NS3* (**Figura 9**, paneles A y C), con base en el análisis por *Wb* de los extractos proteicos totales de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*; y
3. Un menor título viral en los sobrenadantes, determinado por medio del ensayo de *TCID50* (**Figura 11**).

Además, se detectaron dos formas proteicas con pesos moleculares diferentes a la proteína *VPI* madura (~60 kDa): una forma a ~120 kDa y otra más a ~58 kDa. Estas dos formas mostraron una tendencia a la baja, como la proteína *VPI* madura (**Figura 10**). Con base en sus pesos moleculares, la forma de ~120 kDa corresponde al homodímero de la proteína *VPI*, mientras que la forma de ~58 kDa no corresponde a una forma conocida de la proteína *VPI*.

Para interpretar los resultados del *tratamiento preinfección* resulta importante considerar la posible inhibición de la actividad de otros componentes celulares, además del proteasoma, de las células CRFK, dado el uso de *MGI32* a 25 μ M desde antes de que se añadiera el inóculo viral. Esto lleva a tener presente la posible inhibición de la actividad de la *cathepsina L* de las células, que, en caso de ocurrir, reduciría la entrada viral, y por lo tanto los eventos posteriores (*i.e.* la traducción y replicación del ARN_g, el ensamblaje, y la liberación de la progenie viral). Esta afectación en el progreso del ciclo replicativo podría explicar la menor disrupción de la monocapa y de células redondas, de la cantidad de proteínas virales independientemente del *ORF* en el que se

encuentren codificadas y de la menor cantidad de partículas virales infecciosas en los sobrenadantes. Téngase en mente que el *MG132* es un *inhibidor* con múltiples blancos moleculares. Al respecto, la concentración de 10 μM de este *inhibidor* reduce prácticamente por completo la actividad de las cisteína proteasas de lisados celulares de diferentes líneas celulares animales (Pwee, 2022).

La inhibición propuesta de la actividad de la *cathepsina L* en los experimentos en los que se ocupó el *tratamiento preinfección* es un fenómeno que complica el comprobar si la replicación menos eficiente del FCV (Urbana) en las células CRFK tratadas con *MG132* (25 μM) se debe, al menos parcialmente, a la inhibición del proteasoma de las células. Después de todo, la *cathepsina L* y el proteasoma podrían ser necesarios para la replicación eficiente del FCV (Urbana) *in vitro*; aunque también pudiera ser que solo la *cathepsina L* lo sea. Es por ello por lo que se propusieron los experimentos en los que se utilizó el *tratamiento posinfección*. Con este esquema de tratamiento se deja a un lado la posible inhibición de la actividad de otros componentes celulares relevantes en la entrada viral.

Tratamiento posinfección de los CCs infectados con el FCV

Con el *tratamiento posinfección*, los CCs CRFK se trataron con *MG132* (25 μM) después del periodo de adsorción viral (1 h de exposición al inóculo), es decir cuando el virus ha logrado unirse y penetrar en la célula. Con este esquema de tratamiento, se observó lo siguiente en los CC infectados y tratados con *MG132* en comparación a los CCs infectados y expuestos al *DMSO*:

1. Un número de células redondas y refringentes semejantes (**Figura 13**), con base en la comparación de la apariencia de los CCs infectados (aunque el redondeamiento celular se observa más claramente en los CCs infectados y expuestos al *vehículo*);
2. Una menor cantidad relativa promedio normalizada de las proteínas virales *VPI* (~60 kDa) (**Figura 14**, paneles A y B) y *NS3* (**Figura 14**, paneles A y C), con base en el análisis por *Wb* de los extractos proteicos totales de los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*;

3. Un menor título viral en los sobrenadantes, determinado por medio del ensayo de *TCID50* (**Figura 16**).

Además de que se detectaron bandas de ~58 y ~120 kDa en los extractos proteicos totales de los CCs infectados cuando se ocuparon membranas completas incubadas con el suero α -*VPI* (**Figura 15**, paneles A y B). Al respecto, la cantidad relativa promedio de las especies proteicas de ~58 (**Figura 15**, panel D) y ~120 kDa (**Figura 15**, panel C) fue menor en los CCs infectados y tratados con *MG132* que en los CCs infectados y expuestos a *DMSO*; por lo que se sugiere que estas especies adicionales están sujetas a un procesamiento semejante al de la proteína *VPI* madura (~60 kDa).

Cabe mencionar que, si bien no observamos un claro retraso del *CPE* tras la infección en las células tratadas con *MG132*, esta discrepancia en el *CPE* con relación a los demás indicadores de la infección podría deberse a que elegimos y documentamos campos no representativos de los CCs infectados y sujetos al *tratamiento preinfección*. Esto podría haber ocurrido dado que en el trabajo se priorizó el procesamiento puntual (*i.e.* a las 6 hpi) de los CCs para la extracción de sus proteínas y la recolección de sus sobrenadantes. Sin embargo, es clara la reducción estadísticamente significativa en los niveles de las proteínas *VPI* y *NS3*, y en la cantidad de partículas virales en los sobrenadantes.

Con relación a la menor cantidad de proteínas virales y a la menor cantidad de progenie viral infectiva en el sobrenadante de las células infectadas y tratadas con *MG132*, considérese que estos fenómenos podrían deberse a que el ciclo replicativo transcurrió sin influencia del *MG132* durante la unión y la entrada, y en algunos eventos previos a la traducción del ARNg y la escisión de la poliproteína. Lo anterior se basa en que: (1a) en experimentos con infecciones sincronizadas, la mayoría de las partículas del FCV ya han entrado a las células después de diez minutos tras la adhesión a las células y, para una fracción de estas partículas, ya ha ocurrido la separación del ARNg de la cápside incluso al punto en el que el ARNg ya ha sido liberado al citoplasma; (1b) además de que, en una hora, a partir de la adsorción, ya es detectable un incremento significativo del ARNg (Sun et al., 2024); (2) y en que se permitió la

adsorción de las partículas virales en ausencia del inhibidor con el esquema del *tratamiento posinfección* (**Figura 12**).

A su vez, la propuesta de los eventos del ciclo replicativo que podrían ser los primeros en ser afectados por el *MGI32* se base en tres puntos principales. Primero, se plantea que la endocitosis no fue afectada por el *inhibidor*, dado que bastan 10 minutos a partir de la adsorción de las partículas virales para que la mayoría de ellas ya hayan entrado a las células en experimentos con infecciones sincronizadas (Sun et al., 2024). Segundo, la liberación del ARNg al citoplasma de un número indeterminado (pero significativo) de las partículas virales del inóculo podría haberse reducido con el uso del *MGI32*, ya que: (A) la salida del ARNg de dos coronavirus (*i.e.* el PEDV y el IBV) depende de proteasomas activos (Yuan et al., 2023); y (B) no todo el ARNg ha sido liberado al citoplasma diez minutos después de la adsorción en infecciones sincronizadas de CCs CRFK con el FCV (Sun et al., 2024). Tercero, la actividad proteolítica de la proteína *NS6/7* del FCV podría haber sido inhibida parcialmente por el uso del *MGI32* dado que esta proteasa es una cisteína proteasa [revisado en (Clarke & Lambden, 1997)]; y, como ya se ha mencionado, la actividad de cisteína proteasa de lisados celulares es inhibida con *MGI32* a 10 μ M (Pwee, 2022). Con relación a este tercer punto, si ocurrió la inhibición de la actividad de la *NS6/7*, el efecto debió de haber sido parcial, ya que en todos los *Wb* (**Figura 9** y **Figura 14**) se detectó a *NS3* y a *VPI* ya separadas del resto de la poliproteína y del resto de su precursor, respectivamente.

Adicionalmente, otros puntos del ciclo replicativo podrían haber sido afectados por el uso del *MGI32* en el *tratamiento posinfección*. Por un lado, el *MGI32* podría haber impedido parcialmente la formación de CR funcionales, lo cual podría también explicar los menores niveles de proteína y progenie viral encontrados. Se ha reportado que este *inhibidor* impidió la incorporación eficaz de algunos componentes virales a los viroplasmos del RRV *in vitro*, afectando la replicación del genoma y la producción de progenie infectiva (López et al., 2011). Aunado a lo anterior, podría ser que el *MGI32* a 25 μ M haya ocasionado una replicación deficiente del genoma viral debido a la incorporación parcial de componentes celulares que favorecen la replicación del

ARNg. Esto se basa en la observación de una pérdida de monómeros de ubiquitina y una acumulación de proteínas poliubiquitinadas en CCs tratados con *MG132* u otro *PI*, (o incluso con un inhibidor de la ubiquitinación) (M. Schneider et al., 2012; Yuan et al., 2023), lo cual a su vez podría haber impedido la ubiquitinación de componentes virales que, al estar ubiquitinados, podrían reclutar factores celulares que promueven la actividad de estos, como se ha hipotetizado que ocurre con la ubiquitinación de un componente de la replicasa viral de un tombusvirus y la proteína *Vps23p* de la vía endosomal (Barajas & Nagy, 2010). Por otro lado, la liberación de la progenie viral infectiva podría haber sido otro de los eventos que el *MG132* podría haber afectado bajo el esquema del *tratamiento posinfección* (aunque también bajo el esquema de *tratamiento preinfección*), dado que el *MG132* a 25 μ M podría haber inhibido la actividad de las *calpaínas*, las cuales se han implicado en la activación de la *caspara 3 in vitro* durante la infección con el FCV (cepa F9) como parte de la inducción de la apoptosis, la cual promueve la liberación al medio de la progenie viral infectiva (Brennan, 2008). No obstante, hay que precisar que, en caso de que haya ocurrido la inhibición de las *calpaínas* y la consecuente regulación a la baja de la activación de la apoptosis con el *tratamiento posinfección* (y con el *tratamiento preinfección*), esto no explicaría por qué se halló una menor cantidad de proteínas virales en los CCs infectados y tratados con *MG132* (**Figura 14**), aunque sí podría explicar el menor título viral de los sobrenadantes de estos CCs. Experimentos que comparen la cantidad de partículas virales infectivas asociadas a las células con la cantidad de estas que ya han sido liberadas a los sobrenadantes permitirían determinar si el tratamiento con *MG132* a 25 mM pudiera haber afectado la liberación de las partículas virales.

En síntesis, el uso de *MG132* a una concentración de 25 mM en el *tratamiento posinfección* podría haber afectado el progreso del ciclo replicativo del FCV (Urbana), posiblemente a partir de la liberación del ARNg al citoplasma hasta la traducción y escisión de la poliproteína. Se propone que, al afectar uno o más de estos eventos, habría una menor cantidad de proteínas virales y de progenie viral infectiva en los sobrenadantes, como se reportó para los CCs sujetos al *tratamiento posinfección* y como también pudiera haber ocurrido con los CCs sujetos al *tratamiento preinfección*. Algunos blancos moleculares que podrían haber sido afectados por el *MG132* y que, al

haber sido inhibidos, podrían explicar los fenómenos observados, son: el proteasoma y la proteína *NS6/7* del FCV. La inhibición del primero podría haber desencadenado un desequilibrio en la ubiquitinación celular, posiblemente afectando uno o más eventos tempranos posentrada; mientras que, la inhibición del segundo podría implicar que las células infectadas no contaran con suficientes CR funcionales para llevar a cabo una infección eficiente, dada una menor disponibilidad de las proteínas *NS*. Con relación a estos dos blancos moleculares, se agrega que su inhibición pudiera no ser mutuamente excluyente. Sin embargo, también se propone un tercer blanco molecular: las calpaínas; aunque la posible inhibición de su actividad únicamente acentuaría la reducción en la cantidad de partículas virales liberadas a los sobrenadantes, mas no explicaría la reducción de los niveles de las proteínas virales que se observó.

Conclusiones

La reducción estadísticamente significativa de los niveles de las proteínas virales y de la progenie viral en células tratadas con una concentración de 25 μM de *MG132* e infectadas con el FCV (Urbana), sugieren fuertemente que el proteasoma es esencial para la replicación eficiente del virus *in vitro*.

Prospectivas

Se recomienda descartar la relevancia de otros factores celulares y virales que pudieran haber sido blancos del *MG132* a 25 μM . Adicionalmente, se aconseja comprobar la relevancia del proteasoma para la replicación eficiente *in vitro* del FCV (Urbana), por ejemplo, midiendo la cantidad de ARN_g y ARN_{sg}, así como la cantidad de CR en las células infectadas tratadas y no tratadas con *MG132*. En caso de que el proteasoma sea relevante para la replicación *in vitro* de este virus, sería adecuado precisar las etapas del ciclo replicativo que dependen del proteasoma para dar lugar a infecciones

eficientes y determinar las relaciones moleculares entre el proteasoma y el FCV (Urbana).

Referencias

- Abcam. (2023). *Western blot sample preparation*. <https://www.abcam.com/protocols/sample-preparation-for-western-blot>
- Alhatlani, B., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2015). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Research*, 206, 134–143. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2015.02.002>
- Al-Molawi, N., Beardmore, V. A., Carter, M. J., Kass, G. E. N., & Roberts, L. O. (2003). Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 5), 1237–1244. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.18840-0>
- Bailey, D., Kaiser, W. J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., Sosnovtsev, S. V., & Goodfellow, I. G. (2010). Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *Journal of General Virology*, 91(3), 739–749.
- Barajas, D., & Nagy, P. D. (2010). Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology*, 397(2), 358–368.
- Bidawid, S., Malik, N., Adegbunrin, O., Sattar, S. A., & Farber, J. M. (2003). A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *Journal of Virological Methods*, 107(2), 163–167.
- Brennan, B. (2008). *The Molecular Mechanisms of Calicivirus-Induced Apoptosis*. <https://openresearch.surrey.ac.uk/esploro/outputs/99510942402346>
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Carter, M. J., Milton, I. D., Turner, P. C., Meanger, J., Bennett, M., & Gaskell, R. M. (1992). Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Archives of Virology*, 122(3), 223–235. <https://doi.org/10.1007/BF01317185>

- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. *Journal of General Virology*, 78(2), 291–301. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-291>
- Conley, M. J., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., Goodfellow, I. G., & Bhella, D. (2019). Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature* 2019 565:7739, 565(7739), 377–381. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0852-1>
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. B., & Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal*, 22(11), 2852–2859. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG251>
- Davarinejad, H. (2015). Quantifications of western blots with ImageJ. *University of York*.
- De la Peña, A. H., Goodall, E. A., Gates, S. N., Lander, G. C., & Martin, A. (2018). Substrate-engaged 26 S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6418). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV0725>
- Dikic, I., & Schulman, B. A. (2022). An expanded lexicon for the ubiquitin code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 24:4, 24(4), 273–287. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00543-1>
- Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry*, 157(1), 144–153. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90207-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90207-1)
- Elkin, S. R., Lakoduk, A. M., & Schmid, S. L. (2016). Endocytic Pathways and Endosomal Trafficking: A Primer. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, 166(7–8), 196. <https://doi.org/10.1007/S10354-016-0432-7>
- Ettayebi, K., & Hardy, M. E. (2003). 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*, 77(21), 11790 – 11797. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11790-11797.2003>

- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477–513. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.78.081507.101607>
- Fox, J., Marquez, M. M., & Bouchet-Valat, M. (2024). *Rcmdr: R Commander*. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Misc/Rcmdr/>
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., & Boyse, E. A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 11–15. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.1.11>
- Gooderham, K. (1984). Transfer techniques in protein blotting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1, 165–178. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:165>
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J. F., & Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports*, 6(10), 968. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400510>
- Goodfellow, I., & Taube, S. (2016). Calicivirus Replication and Reverse Genetics. *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*, 355–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00017-1>
- Green, K. Y. (2013). Volume 1. Section II: Specific Virus Families. In D. M. (David M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6th ed., p. 1305). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Green, K. Y., Mory, A., Fogg, M. H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., Mitra, T., Ehrenfeld, E., Cameron, C. E., & Sosnovtsev, S. V. (2002). Isolation of Enzymatically Active Replication Complexes from Feline Calicivirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 76(17), 8582–8595. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8582-8595.2002>
- Habib, J. A., Lesenfant, J., Vigneron, N., & Van den Eynde, B. J. (2022). Functional Differences between Proteasome Subtypes. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS11030421>

- Herbert, T. P., Brierley, I., & Brown, T. D. K. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *Journal of General Virology*, 78(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1033/CITE/REFWORKS>
- Kaiser, W. J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V., & Goodfellow, I. G. (2006). Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *Journal of General Virology*, 87(2), 363–368. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.81456-0/CITE/REFWORKS>
- Kassambara, A. (2023). *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots*. <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>
- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology*, 8(8), 739–758. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00056-4)
- Kreutz, L. C., & Seal, B. S. (1995). The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Research*, 35(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)00077-P](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)00077-P)
- Lawson, J. S., Syme, H. M., Wheeler-Jones, C. P. D., & Elliott, J. (2019). Characterisation of Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cells as mesenchymal in phenotype. *Research in Veterinary Science*, 127, 99–102. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2019.10.012>
- Lee, D. H., & Goldberg, A. L. (1996). Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27280–27284. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27280>
- López, T., Silva-Ayala, D., López, S., & Arias, C. F. (2011). Replication of the Rotavirus Genome Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System. *Journal of Virology*, 85(22), 11964–11971. <https://doi.org/10.1128/JVI.05286-11/ASSET/71A85EE7-A936-4838-8CF1-E38BFC27E386/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990952420008.JPEG>
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., & Akashi, H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *Journal of Virology*, 80(9), 4482–4490. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4482-4490.2006>

- Meyers, G. (2007). Characterization of the Sequence Element Directing Translation Reinitiation in RNA of the Calicivirus Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *Journal of Virology*, *81*(18), 9623. <https://doi.org/10.1128/JVI.00771-07>
- Neill, J. D., Reardon, I. M., & Henrikson, R. L. (1991). Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Journal of Virology*, *65*(10), 5440–5447. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.10.5440-5447.1991>
- Oroń, M., Grochowski, M., Jaiswar, A., Legierska, J., Jastrzębski, K., Nowak-Niezgoda, M., Kołos, M., Kaźmierczak, W., Olesiński, T., Lenarcik, M., Cybulska, M., Mikula, M., Żylicz, A., Miączyńska, M., Zettl, K., Wiśniewski, J. R., & Walerych, D. (2022). The molecular network of the proteasome machinery inhibition response is orchestrated by HSP70, revealing vulnerabilities in cancer cells. *Cell Reports*, *40*(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111428>
- Peñaflor-Téllez, Y., Miguel-Rodríguez, C. E., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2022). The Caliciviridae Family. In N. Rezaei (Ed.), *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 192–206). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00027-6>
- Perdue, K. A., Green, K. Y., Copeland, M., Barron, E., Mandel, M., Faucette, L. J., Williams, E. M., Sosnovtsev, S. V, Elkins, W. R., & Ward, J. M. (2007). Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *46*(4), 39–45.
- Pérez Ibáñez, C. (2023). *Análisis de la inhibición de la proteína de choque térmico de 90 kDa sobre los niveles de la proteína mayoritaria de la cápside VP1 durante el ciclo de replicación del calicivirus felino*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INTITUTO POLITECNICO NACIONAL.
- Pérez-Ibáñez, C., Peñaflor-Téllez, Y., Miguel Rodríguez, C. E., & Gutiérrez Escolano, A. L. (2024). The Feline calicivirus capsid protein VP1 is a client of the molecular chaperone Hsp90. *Journal of General Virology*, *105*(10), 2030.
- Pesavento, P. A., Chang, K. O., & Parker, J. S. L. (2008). Molecular Virology of Feline Calicivirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *38*(4), 775–786. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2008.03.002>

- Pickart, C. M. (1998). *Ubiquitin and the Biology of the Cell* (Peters, JM., Harris, JR, and Finley, D., eds) pp. 19--63. Plenum Press, New York.
- Pwee, D. K.-Y. (2022). *MG-132 is a broad-spectrum cysteine and aspartyl protease inhibitor*. University of California San Diego.
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*.
- Roos-Mattjus, P., & Sistonen, L. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway. *Annals of Medicine*, 36(4), 285–295. <https://doi.org/10.1080/07853890310016324>
- Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:11, 19(11), 697–712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
- Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N., & Murachi, T. (1990). Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *Journal of Enzyme Inhibition*, 3(3), 195–201. <https://doi.org/10.3109/14756369009035837>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schneider, M., Ackermann, K., Stuart, M., Wex, C., Protzer, U., Schätzl, H. M., & Gilch, S. (2012). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Is Severely Impaired by MG132 due to Proteasome-Independent Inhibition of M-Calpain. *Journal of Virology*, 86(18), 10112–10122. <https://doi.org/10.1128/jvi.01001-12>
- Shivanna, V., Kim, Y., & Chang, K. O. (2014). Endosomal acidification and cathepsin L activity is required for calicivirus replication. *Virology*, 464–465(1), 287–295. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.07.025>

- Sosnovtsev, S., & Green, K. Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology*, *210*(2), 383–390. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1995.1354>
- Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2003). IV, 2. Feline calicivirus as a model for the study of calicivirus replication. *Perspectives in Medical Virology*, *9*, 467–488. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(03\)09028-1](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(03)09028-1)
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the Feline Calicivirus Capsid Precursor Is Mediated by a Virus-Encoded Proteinase. *Journal of Virology*, *72*(4), 3051–3059. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.4.3051-3059.1998/ASSET/F4F1E2EF-4ECE-4D41-B327-56470774770F/ASSETS/GRAPHIC/JV0481499007.JPEG>
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *Journal of Virology*, *80*(15), 7500–7509. <https://doi.org/10.1128/JVI.02452-05>
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2007). Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *The Journal of General Virology*, *88*(Pt 1), 177–186. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.82158-0>
- Sun, W., Wang, M., Shi, Z., Wang, P., Wang, J., Du, B., Wang, S., Sun, Z., Liu, Z., Wei, L., & others. (2024). VP2 mediates the release of the feline calicivirus RNA genome by puncturing the endosome membrane of infected cells. *Journal of Virology*, *98*(5), e00350-24.
- Thermo Fisher. (n.d.). *Pierce™ BCA Protein Assay Kits*. Retrieved November 7, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/en/23225>
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H., & Kawashima, S. (1996). Differential Inhibition of Calpain and Proteasome Activities by Peptidyl Aldehydes of Di-Leucine and Tri-Leucine. *The Journal of Biochemistry*, *119*(3), 572–576. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A021280>
- Vashist, S., Urena, L., Gonzalez-Hernandez, M. B., Choi, J., Rougemont, A. de, Rocha-Pereira, J., Neyts, J., Hwang, S., Wobus, C. E., & Goodfellow, I. (2015). Molecular Chaperone

Hsp90 Is a Therapeutic Target for Noroviruses. *Journal of Virology*, 89(12), 6352.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00315-15>

Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., & White, P. A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *Journal of General Virology*, 100(11), 1469–1470.
<https://doi.org/10.1099/JGV.0.001332/CITE/REFWORKS>

Voss, M., Braun, V., Bredow, C., Kloetzel, P. M., & Beling, A. (2021). Coxsackievirus b3 exploits the ubiquitin-proteasome system to facilitate viral replication. *Viruses*, 13(7), 1360. <https://doi.org/10.3390/V13071360/S1>

Yuan, X., Zhang, X., Wang, H., Mao, X., Sun, Y., Tan, L., Song, C., Qiu, X., Ding, C., & Liao, Y. (2023). The Ubiquitin-Proteasome System Facilitates Membrane Fusion and Uncoating during Coronavirus Entry. *Viruses 2023, Vol. 15, Page 2001*, 15(10), 2001.
<https://doi.org/10.3390/V15102001>