



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

Efecto de las proteínas de virus Andes (*Hantaviridae*) sobre la apoptosis mediada por TRAIL.

Seminario de Título

Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de **Ingeniería en Biotecnología Molecular**

Raúl Emilio Segovia Pavez

Marzo – 2018

Santiago – Chile

Dra. Nicole Tischler

Directora del Seminario de Título

Dr. Jonas Klingström

Codirector del Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono

Patrocinante del Seminario de Título



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por el Sr. Raúl Emilio Segovia Pavez:

“Efecto de las proteínas de virus Andes (*Hantaviridae*) sobre la apoptosis mediada por TRAIL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Nicole Tischler

Directora Seminario de Título

Dr. Jonas Klingström

Codirector Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono

Patrocinante

Comisión de Evaluación

Dra. Daniela Sauma

Presidenta Comisión

Dr. Álvaro Lladser

Evaluador

Santiago de Chile. Marzo 2018.

Este seminario de título fue financiado a través del proyecto FONDECYT 1140050.

Biografía

Nací en Talca el 23 de diciembre de 1989, sin embargo, viví toda mi infancia en Putú, un pequeño pueblo ubicado 20 Km al norte de Constitución. Hijo único de María Eugenia Pavez Ramírez y Ramón Segovia Letelier tuve una infancia tranquila en este pueblo, en donde viví hasta los 13 años cuando terminé mi enseñanza básica en el Liceo Rural Putú.

A los 14 años, me trasladé a Talca, a estudiar en el Liceo Abate Molina. Mientras me encontraba cursando mi educación media, realicé un programa de intercambio estudiantil a los 16 años, por el cual estuve 1 año viviendo en Moerbeke–Waas, Bélgica, con Yvonne de Clerq, Marcus Peeters y sus 5 hijos, Sara, Mattias, Simon, Heleen y Kasper asistiendo además al colegio Heilige Familie, en Sint–Niklaas. Luego de este período volví a terminar mi enseñanza media en Talca.

A los 19 años me trasladé a Santiago a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, luego de lo cual realicé la investigación para mi seminario de título en el laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Ciencia & Vida.

*“Aunque los vientos de la vida soplen fuerte, soy como el junco que se dobla,
pero siempre sigue en pie”*

Manuel de la Calva y Ramón Arcusa.

A mis padres y a la Luz de mi vida.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, María Eugenia Pavez Ramírez y Ramón Segovia Letelier por todo el apoyo incondicional que siempre me han dado en todas las etapas de mi vida, especialmente a mi madre por empujarme e incentivarme desde niño a ser cada día mejor.

También quisiera agradecer afectuosamente a la Dra. Nicole Tischler por apoyarme siempre y no darse por vencida conmigo. De igual forma, un agradecimiento de todo corazón a los integrantes del laboratorio de Virología Molecular, a Eduardo, Meli, Nico Mueña, María Pía, Felipe, Gabo, Gabriel, Fermín, Nico Castillo, Vicente, Rodrigo y Fenna por ayudarme, enseñarme a trabajar en laboratorio, apoyarme y también por hacer del laboratorio un lugar demasiado agradable para trabajar con alegría y buena onda.

Finalmente quiero agradecer desde lo más profundo de mi corazón a lo mejor que me ha pasado en la vida, gracias Luz María Letelier Castañón, por ser un apoyo incondicional, estar conmigo en las buenas y en las malas, pero por sobre todo, gracias amor por hacerme feliz y una mejor persona.

Índice de Contenido

Índice de Tablas	vi
Índice de figuras	vii
Lista de Abreviaturas	viii
1.- Resumen	ix
1.- Abstract	x
2.- Introducción.....	1
2.1.- Aspectos generales de los hantavirus.....	1
2.2.- Estructura genómica y morfología de los hantavirus.....	2
2.3.- Ciclo replicativo de los hantavirus.....	4
2.4.- Respuesta de la célula huésped ante una infección por hantavirus.....	8
2.5.- Apoptosis en relación con hantavirus.....	9
2.6.- Aspectos generales de TRAIL y sus receptores.....	10
3.- Hipótesis.....	15
4.- Objetivos	16
4.1.- Objetivo General	16
4.2.- Objetivos Específicos.....	16
5.- Materiales y Métodos.....	17
5.1.- Células y anticuerpos.....	17
5.2.- Plasmidios.....	18
5.3.- Expresión de proteínas virales.....	18
5.4.- Análisis y cuantificación de DR5 y proteínas virales.....	19
5.4.1.- Western blot	19
5.4.2.- Citometría de flujo.....	20
5.5.- Análisis y cuantificación de ARNm de DR5 y genes virales.....	20
5.5.1.- Extracción de ARN total.....	20
5.5.2.- Tratamiento con ADNasas y cuantificación de ARN total.....	21
5.5.3.- Transcripción reversa	21
5.5.4.- RT-PCR.....	22
5.5.5.- qPCR.....	23
5.6.- Determinación de tasa de apoptosis.....	23
5.7.- Análisis estadístico.....	24

6.- Resultados	25
6.1.- Detección de DR5 en distintos tipos celulares.....	25
6.2.- Transcripción genómica de DR5 en dependencia de proteínas de ANDV.....	26
6.2.1.- Transcripción de DR5 en células A549 controles tratadas.....	26
6.2.2.- Transcripción de DR5 en células A549 en dependencia de proteínas virales.	28
6.3.- Expresión de DR5 y su localización en la superficie celular en dependencia de proteínas de ANDV.	29
6.3.1.- Expresión de DR5 y su localización en superficie de células A549 en condiciones controles	29
6.3.3.- Expresión de DR5 y su localización en células que expresan una proteína heteróloga viral.	33
6.3.4.- Expresión de DR5 y su localización en células tratadas con ANDV Gn/Gc.	34
6.3.5.- Expresión de DR5 y su localización en superficie de células tratadas con ANDV N.....	37
6.3.6.- Cambio en la expresión y localización en superficie de DR5 en función de ANDV GPC y N.	41
6.4.- Apoptosis mediada por TRAIL en función de proteínas de ANDV.	42
6.4.1.- Inducción de apoptosis en células A549.	42
6.4.2.- Apoptosis mediada por TRAIL en células A549.	43
7.- Discusión.....	45
8.- Conclusiones.....	50
9.- Bibliografía	51

Índice de Tablas

Tabla I: Partidores utilizados en las reacciones de PCR.	22
--	----

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la estructura de los hantavirus.....	3
Figura 2: Modulación viral de la apoptosis mediada por los receptores de muerte.....	13
Figura 3: Hantavirus causa translocación nuclear de DR5.....	14
Figura 4: Detección de DR5 en distintas líneas celulares.	26
Figura 5: Transcripción relativa de DR5 en células controles.....	27
Figura 6: Transcripción relativa de DR5 en función de proteínas virales.	28
Figura 7: Expresión total de DR5 y su localización en superficie en células A549, en condiciones controles.	31
Figura 8: Expresión y localización de DR5 en células A549 controles.	32
Figura 9: Expresión y localización de DR5 en células A549 transfectadas con pVSVg.	33
Figura 10: Evaluación de la transfección de ANDV Gn/Gc en células A549.....	35
Figura 11: Expresión y localización de DR5 en células A549 transfectadas con pl.18/ANDV-GPC.....	36
Figura 12: Expresión de DR5 y su localización en superficie de células A549 transfectadas con plasmidio que codifica ANDV N.	39
Figura 13 : Resumen de los porcentajes de DR5 observados mediante citometría de flujo en las distintas condiciones analizadas.	41
Figura 14: Inducción de apoptosis en células A549 inducida por estaurosporina.....	43
Figura 15: Detección de apoptosis mediada por TRAIL en células que expresan ANDV N.....	44

Lista de Abreviaturas

ANDV: Virus Andes.

BSA: Albúmina de suero de bovino.

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades.

DAF: Factor de aceleración de la degradación.

DcR1: Receptor señuelo 1.

DcR2: Receptor señuelo 2.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DOBV: Virus Dobrava.

DR4: Receptor de muerte 4.

DR5: Receptor de muerte 5.

gC1qR: Dominio globular de cabeza del receptor del complemento C1q.

GPC: Precursor de glicoproteína.

HBV: Virus hepatitis B.

HFRS: Síndrome renal con fiebre hemorrágica.

HHV-7: Herpesvirus humano 7.

HMVEC-L: Células endoteliales microvasculares de pulmón humanas.

HPS: Síndrome pulmonar por hantavirus.

HRP: Peroxidasa de rábano.

HTNV: Virus Hantaan.

HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humanas.

M-MLV: Virus Murina Moloney de leucemia.

N: Nucleoproteína viral.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NK: Células asesinas naturales.

NSCLC: Células cancerígenas de pulmón no pequeñas

NSs: Proteína no estructural pequeña.

ORF: Marco abierto de lectura

PBS: Solución tamponante en base a fosfato.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PHV: Virus Prospect Hill.

PUUV: Virus Puumala.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RdRp: polimerasa de ARN dependiente de ARN.

RSV: Virus respiratorio sincicial.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

SEOV: Virus Seúl.

SFB: Suero fetal bovino.

SNV: Virus Sin Nombre.

TBS: Solución tamponante en base a Tris.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral.

TULV: Virus Tula.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VLP: Partículas virales basadas en las glicoproteínas Gn y Gc.

VSVg: Proteína G del virus de la estomatitis vesicular.

1.- Resumen

El virus Andes (ANDV) pertenece al género *Orthohantavirus* (familia *Hantaviridae*, orden *Bunyvirales*). En humanos la infección por ANDV produce el síndrome pulmonar asociado a hantavirus, el cual presenta una tasa de mortalidad de alrededor de un 35%. Estos virus se caracterizan por poseer una envoltura lipídica y un genoma de ARN de hebra simple tri-segmentado, de polaridad negativa que codifica para al menos 4 proteínas, entre ellas la proteína de nucleocápside (N) multifuncional y un precursor proteico denominado GPC, que tras ser procesado resulta en las glicoproteínas Gn y Gc que se encuentran ancladas en la envoltura viral.

La apoptosis es una respuesta celular común frente a una infección viral. Sin embargo, en el ciclo replicativo de los hantavirus aún es controversial si inducen o inhiben apoptosis.

La apoptosis celular puede ser inducida extrínsecamente mediante receptores de muerte específicos, que pueden ser activados por un ligando de la familia del factor de necrosis tumoral, como TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés) a través de una cascada de señalización, mediante un dominio de muerte.

En este seminario de título, se buscó determinar si la expresión o localización del receptor de TRAIL, específicamente DR5 (receptor de muerte 5, por sus siglas en inglés) se ve alterada por la expresión de proteínas Gn, Gc y N de ANDV en células humanas, y si una posible variación podría afectar la tasa de apoptosis mediada por TRAIL. En primer lugar, se analizó la expresión de DR5 en distintos tipos celulares, y se determinó que éste receptor se expresa en mayor medida en células A549, por lo que para el resto

de los análisis se continuó con esta línea celular. A continuación, se midió la expresión, tanto a nivel transcripcional como traduccional de DR5 en dependencia de ANDV Gn, Gc y N, frente a lo cual, no hubo una variación significativa en la expresión general de este receptor; sin embargo, en donde sí se encontró un incremento significativo fue en la localización de DR5 en la superficie de las células A549 en presencia de ANDV N. De todas formas, no se logró detectar inducción de apoptosis en células humanas transfectadas con ANDV N, lo cual no es posible interpretar debido a la carencia de un control positivo de apoptosis celular.

En resumen, estos datos en conjunto muestran que a pesar de que la expresión de ANDV N indujo un aumento en la localización de DR5 en la superficie de células A549, sin embargo, queda por determinar si este aumento podría inducir apoptosis mediada por TRAIL.

1.- Abstract

Andes virus (ANDV) belongs to the *Orthohantavirus* genus (*Hantaviridae* family, *Bunyvirales* order). In humans ANDV infection causes hantavirus pulmonary syndrome, which has a fatality rate around 35%. These viruses are featured by a lipid envelope and a tri-segmented, single stranded, negative sense RNA genome, that encodes at least four proteins, among them, the multifunctional nucleocapsid protein (N) and a glycoprotein precursor termed GPC, which after being proteolytically cleaved, results in the mature glycoproteins Gn and Gc, which are anchored to the viral envelope.

Apoptosis is a common cellular response against a viral infection. However, in the hantavirus replicative cycle, there is still controversy whether these viruses induce or rather block apoptosis.

Apoptosis can be triggered extrinsically, through specific death receptors, that can be activated by a ligand belonging to the tumor necrosis factor family, such as TRAIL (tumor necrosis factor–related apoptosis inducing ligand), through a death domain mediated signaling cascade.

During this degree seminary, we aimed to determine whether the expression or location of the TRAIL receptor DR5 (death receptor 5), is altered by ANDV Gc, Gn and N expression in human cells, and if any possible variation could affect TRAIL mediated apoptosis. First, we analyzed DR5 expression in different cell types and found that there is a higher extent of DR5 expression in A549 cells, that is why, for the rest of this seminary, we continued the work with this cell line. Next, we measured DR5 expression in these cells at a transcriptional and translational level, after being transfected with

plasmids encoding ANDV Gc, Gn or N. We did not find any significant variation in the total amount of DR5 expression; nevertheless, we detected a significant increase in the location of DR5 on the surface of A549 cells in the presence of ANDV N. Although, we were unable to detect apoptosis in human cells transfected with ANDV N due to the lack of a positive control of apoptosis. Finally, all together, our results show that the expression of ANDV N induces an increase in DR5 on the surface of A549 cells, however, it has yet to be determined whether or not, this is enough to induce apoptosis mediated by TRAIL.

2.- Introducción

2.1.- Aspectos generales de los hantavirus.

Los hantavirus son patógenos humanos que se encuentran distribuidos en gran parte del mundo y están clasificados por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, E.E.U.U.) como patógenos de categoría C (*Centers for Disease Control and Prevention, 2017*). Pertenecen a la familia *Hantaviridae* del orden *Bunyavirales* (*International Committee of Taxonomy of Viruses, 2017*) y están asociados a dos severos síndromes: En Europa y Asia algunos de los miembros más representativos de la familia, como virus Hantaan (HTNV), virus Puumala (PUUV) o virus Dobrava (DOBV) pueden ocasionar el síndrome renal con fiebre hemorrágica (HFRS), que, dependiendo del virus, presenta una tasa de mortalidad que varía entre 0,3% y 10%; mientras que en América, ciertos miembros de la familia, como virus Sin Nombre (SNV) y virus Andes (ANDV), pueden ocasionar el síndrome pulmonar por hantavirus (HPS) cuyas tasas de mortalidad varían entre 30% y 40% (revisado en Jonsson y col., 2010).

A diferencia del resto del orden *Bunyavirales*, cuya transmisión es a través de artrópodos, los miembros de la familia *Hantaviridae* persisten en roedores e insectívoros (revisado en Heyman y col., 2009; Vaheri y col., 2011), cuya transmisión al humano ocurre principalmente por inhalación de aerosoles provenientes de las heces, orina y saliva de roedores portadores (Lee & van der Groen, 1989). Otras posibles vías de infección del humano son las mucosas conjuntivales, nasales o bucales, además del contacto íntimo o estrecho con un paciente, que presenta los síntomas generales de la enfermedad (Padula y col., 1998; Martínez-Valdebenito y col., 2014). Excepcionalmente, la infección puede ser adquirida mediante la ingesta de alimentos o agua contaminada

con secreciones infectadas o por la mordedura del roedor (revisado en Meyer & Schmaljohn, 2000).

ANDV, tiene como principal hospedero al ratón *Oligoryzomys longicaudatus*, comúnmente denominado ratón de cola larga, el cual fue descubierto primero en un brote de HPS en Argentina en 1995 (Lopez y col., 1996). Investigaciones posteriores han mostrado que este virus es la principal causa de HPS en Sudamérica (Martínez y col., 2010). En contraste a los otros hantavirus, ANDV es el único que ha sido asociado a una transmisión de humano a humano (Wells y col., 1997; Martínez-Valdebenito y col., 2014). Además, para este virus existe un modelo animal que, tras ser infectado, presenta síntomas similares a HPS (Hooper y col., 2001).

2.2.- Estructura genómica y morfología de los hantavirus.

Los hantavirus han sido descritos como partículas esféricas de tamaño heterogéneo, que varían entre 120 nm y 160 nm de diámetro (figura 1) (Battisti y col., 2011). Se ha observado que contienen espículas en su superficie, las cuales presentan una simetría local tetramérica; estas espículas están insertas en una envoltura de bicapa lipídica de entre 5 nm y 7 nm de espesor. (Huiskonen y col., 2010; Battisti y col., 2011). Contienen un genoma de ARN de hebra simple y sentido negativo el cual se replica en el citosol y que comprende tres segmentos: pequeño (S), mediano (M) y grande (L) (revisado en Schmaljohn & Elliott 2014). El segmento S codifica la nucleoproteína viral (N); su tamaño varía entre 1,6 Kb y 2 Kb. En el caso de algunos hantavirus puede haber un segundo marco abierto de lectura (ORF) en este segmento que se encuentra en parte superpuesto con el primero el cual codifica una proteína no estructural pequeña (NSs). El segmento M tiene un tamaño aproximado de 3,6 Kb y codifica las glicoproteínas Gn y Gc dentro de un solo ORF, dando origen a un precursor de glicoproteína (GPC). El

segmento L posee una longitud aproximada de 6,5 Kb y codifica una ARN – polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (revisado en Schmaljohn & Elliott 2014).

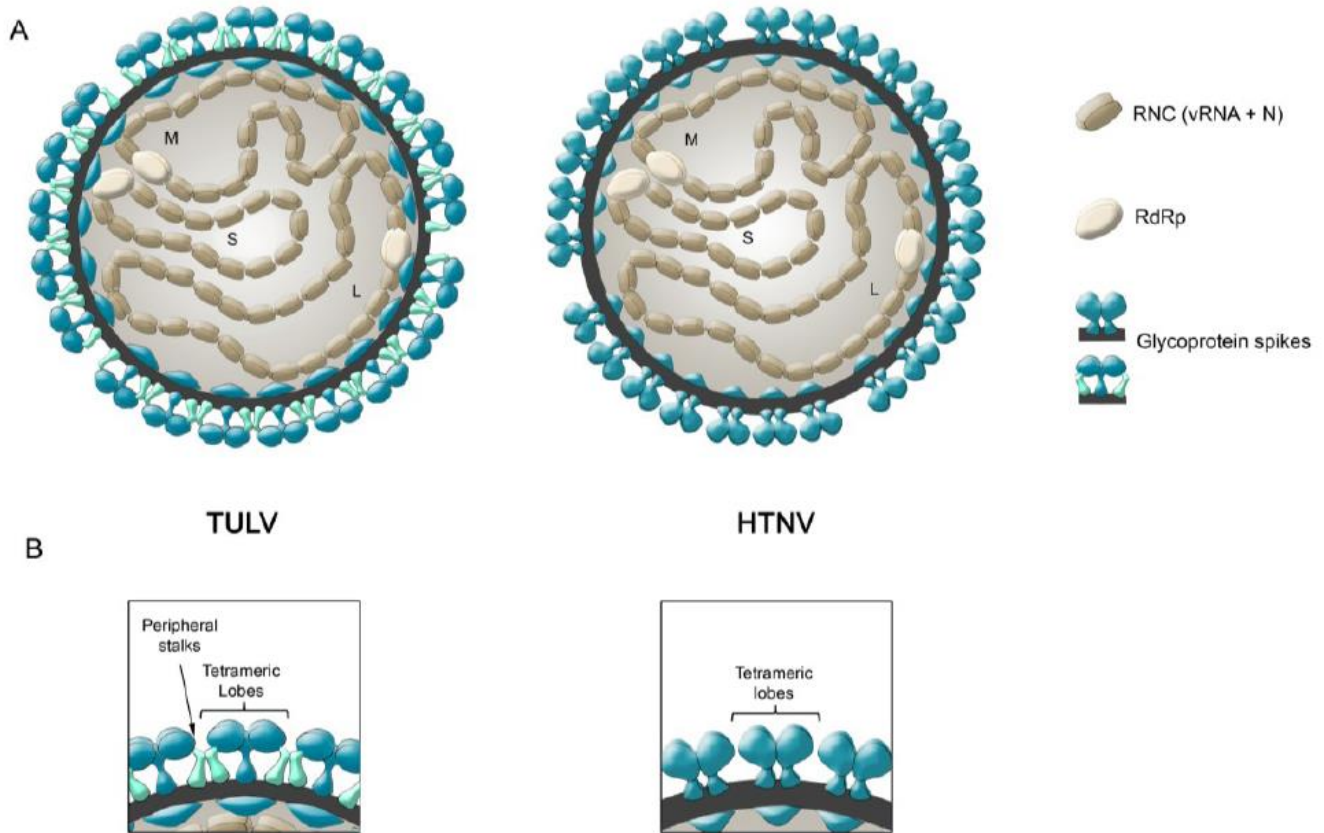


Figura 1: Esquema de la estructura de los hantavirus.

(A) Representación esquemática de una partícula de hantavirus en donde se muestran las tres ribonucleocápsides de los segmentos genómicos (L, M y S) que consisten de ARN viral, nucleoproteína y polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp); estas ribonucleocápsides están envueltas por una bicapa lipídica en donde se proyectan las glicoproteínas virales Gn y Gc. (B) Vista ampliada del arreglo de espículas de TULV y HTNV representados en (A). El diámetro promedio del virión es de 135 nm, mientras que la proyección de las espículas es de 12 nm desde la envoltura viral (imagen extraída desde Cifuentes-Muñoz y col., 2014).

Las glicoproteínas Gn y Gc están ancladas en la membrana viral y son clave para mediar tanto la entrada, como la salida del virus desde la célula huésped (revisado en

Cifuentes-Muñoz y col., 2014). Predicciones basadas en la secuencia de GPC indican la presencia de 4 dominios transmembrana, dos de los cuales servirían como péptidos señal para la translocación al lumen del retículo endoplasmático, mientras que los otros dos, estarían sirviendo como dominios transmembrana para anclar cada proteína a la membrana viral (Schmaljohn y col., 1987). Dentro de la secuencia de GPC, existe un motivo aminoacídico altamente conservado (WAASA), que es reconocido por una peptidasa celular, lo que da origen a Gn y Gc derivadas de los extremos N y C terminales de GPC, respectivamente (Lober y col., 2001). Una vez que se completa su procesamiento proteolítico, se cree que Gn y Gc están ancladas a la membrana fosfolipídica por sus dominios transmembranas, dirigiendo sus N-terminales hacia el lumen de la vía secretora y subsecuentemente hacia el espacio extracelular. Luego de su procesamiento proteolítico, se produce una heteromultimerización de Gn y Gc, requerida para la salida de las glicoproteínas del ER (revisado en Cifuentes-Muñoz y col. 2014; Schmaljohn & Elliott 2014).

2.3.- Ciclo replicativo de los hantavirus.

El ciclo de vida de los hantavirus comienza con la unión del virus a sus receptores celulares. Los hantavirus utilizan integrinas para ingresar a las células y los hantavirus patogénicos como ANDV dependen, entre otros, de integrina β_3 como receptor (Matthys y col., 2010). Sin embargo, la susceptibilidad de la célula huésped no sólo depende de la expresión de integrina β_3 ; anticuerpos contra integrina β_1 disminuyen específicamente la infección de células Vero E6, por parte de virus Tula (TULV) y virus Prospect Hill (PHV) (Gavrilovskaya y col., 1998; Gavrilovskaya y col., 1999). Además, se ha sugerido a integrina β_2 en neutrófilos como receptor de HTNV y como responsable de la patogénesis relacionada a estos hantavirus (Raftery y col., 2014). Otros factores celulares como

factor de aceleración de la degradación (DAF) y el dominio globular de cabeza del receptor del complemento C1q (gC1qR) también son importantes en la entrada de los hantavirus a la célula (Choi y col., 2008; Krautkrämer y col., 2008; revisado en Albornoz y col., 2016). También se ha detectado una proteína celular de 70 KDa en células CHO que expresan integrina β_3 que interactúa con HTNV (Mou y col., 2006), sin embargo, la identidad de este factor aún es desconocida (revisado en Albornoz y col., 2016). De todas formas, aún se desconoce el rol específico que juega cada uno de estos receptores en la entrada de los hantavirus a la célula.

Luego de unirse a la membrana celular, los virus deben ser endocitados por las células. Se ha confirmado que otros virus del orden *Bunyvirales* agrupan receptores en el sitio de contacto, generando un microdominio rico en receptores en la membrana plasmática (revisado en Albornoz y col., 2016). El colesterol en conjunto con otros lípidos posee un rol particularmente importante en estos mecanismos promoviendo la formación de sitios de acoplamiento para proteínas específicas (Petersen y col., 2014; revisado en Albornoz y col., 2016).

Existen estudios que señalan que la entrada a las células difiere entre los hantavirus que causan HFRS y HPS; los que generan HFRS utilizan endocitosis dependiente de clatrina (Jin y col., 2002), mientras que otros estudios proponen que aquellos que causan HPS como SNV y ANDV utilizan una ruta de endocitosis alternativa que no requiere clatrina (Ramanathan y col., 2008; Buranda y col., 2013). Sin embargo, un estudio reciente señala que ANDV puede emplear una endocitosis mediada por clatrina para entrar a células endoteliales microvasculares de pulmón humanas (HMVEC-L), además de una ruta independiente de clatrina, la cual comparte ciertas características con el proceso de macropinocitosis (Chiang y col., 2016).

Luego de la internalización del virión a vesículas endocíticas los hantavirus son transportados a endosomas tempranos. A continuación, en algún compartimento endocítico, producto de una disminución en el pH, se activa la proteína viral de fusión Gc, lo que desencadena el proceso la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal, lo que finalmente resulta en la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula (Tischler y col., 2005; Cifuentes-Muñoz y col., 2011; Acuña y col., 2015).

Para la replicación y transcripción de los hantavirus se produce ARNm y ARN viral de polaridad negativa por acción de RdRp (revisado en Kukkonen y col., 2005). La hebra de ARN viral de polaridad negativa es transformada en una hebra complementaria de ARN de polaridad positiva, la cual se utiliza como templado para generar hebras de ARN viral de polaridad negativa. Para producir nuevas proteínas virales, se transcribe el ARN viral de polaridad negativa a ARNm lo cual conlleva a la posterior traducción de proteínas virales (revisado en Jonsson & Schmaljohn, 2001; Vaheri y col., 2013; McAllister & Jonsson, 2014).

Las proteínas N y RdRp juegan roles fundamentales en la transcripción y replicación del virión. La proteína N es multifuncional, una de sus funciones es proteger el ARN viral de la degradación por nucleasas celulares, a través de la formación de la ribonucleocápside (Mir y col., 2008).

Los ARNs genómicos y antígenómicos pueden formar estructuras en forma de “mango de sartén” o “*panhandle*”, debido a la complementariedad de sus extremos 5' y 3'. Se ha demostrado que estas estructuras en forma de *panhandle*, que los ARNm no poseen, son necesarias para la unión eficiente y específica de N (Mir y col., 2004; Mir y col., 2006). La proteína N juega un rol clave en la transcripción del ARN viral, al proteger y secuestrar las caperuzas del extremo 5' del ARNm celular en los cuerpos de

procesamiento, lo que resulta en un aumento de la transcripción (Mir & Panganiban, 2008). RdRp a su vez, funciona como transcriptasa, replicasa y endonucleasa; estas funciones son vitales para la transcripción del ARNm viral, replicación y la adquisición de los extremos 5' cubiertos de los partidores de los ARNm del huésped (Reguera y col., 2010).

Aún se desconoce el mecanismo mediante el cual el virus deja de transcribir su ARN y comienza a replicarse, pero se cree que para este proceso se requieren concentraciones crecientes de N, lo que conduce a una encapsidación más eficiente del ARN. Esta interacción permite que la polimerasa lea las señales de término de la transcripción y sintetice copias completas de los templados de ARN antigenómico. A su vez, los ARN antigenómicos encapsidados pueden servir como templados para la síntesis de ARN genómico (revisado en Macneil y col., 2011).

Posteriormente, debe ocurrir el ensamblaje de las partículas virales, para lo que se requiere el ARN viral más las proteínas N y RdRp, que son envueltos por las glicoproteínas Gn y Gc ancladas a la membrana bicapa. Para los hantavirus, aún se desconoce el sitio de ensamblaje; se ha sugerido que puede ocurrir en la membrana del aparato de Golgi, de manera similar a lo que sucede con otros miembros del orden *Bunyavirales* (revisado en Petterson & Melin, 1996); sin embargo, también se han detectado glicoproteínas de ANDV en la membrana plasmática, por lo que se ha sugerido que el virus puede madurar en distintos compartimentos (revisado en Cifuentes-Muñoz y col., 2014). En contraste a lo observado en muchos otros virus de ARN, los hantavirus carecen de una proteína matriz, por lo que se cree que la cola citoplasmática de Gn reemplaza la función de la matriz al mediar la interacción de los multímeros de Gn/Gc con N para facilitar el ensamblaje viral (Hepojoki y col., 2010; Wang y col., 2010).

Una vez que todos los componentes estructurales interactúan entre sí, se produce la gemación del virus, que requiere de una evaginación de la membrana plasmática y de una escisión para permitir la separación del virus de esta membrana, lo cual conduce a la liberación de nuevas partículas virales (revisado en Cifuentes-Muñoz y col., 2014).

2.4.- Respuesta de la célula huésped ante una infección por hantavirus.

Para la mantención de los virus en el medio ambiente, éstos deben infectar a sus células blanco y replicar una alta cantidad de progenie para luego comenzar nuevos ciclos de infección. Los virus codifican proteínas altamente eficientes para optimizar su replicación, sobre todo aquellos con un genoma pequeño de 5 Kb – 20 Kb, como es el caso de los hantavirus. Por su parte, los organismos blanco poseen defensas tanto sistémicas, como celulares para limitar las infecciones virales, que incluyen respuestas inmunes e inflamatorias además de la eliminación de las células infectadas. Ante estos mecanismos de defensa del huésped, la mayoría de los virus ha evolucionado de forma de inhibir o retrasar estas acciones antagonistas hasta que se ha producido suficiente progenie viral. Estas proteínas virales, de respuesta antagonista, que han sido desarrolladas, ya sea por evolución convergente o mediante captura de secuencias del huésped que codifican proteínas completas o dominios funcionales individuales, bloquean la respuesta inmune del huésped, al atacar puntos estratégicos en los mecanismos de defensa. A veces estos mecanismos virales son nuevos, sin embargo, a menudo son inherentes a la regulación normal de la célula. Por otra parte, algunos virus codifican proteínas que inducen activamente la apoptosis como parte de una estrategia de salida para aumentar la expansión viral. En estos casos, se lleva a cabo

un delicado balance entre la inducción e inhibición de la apoptosis mediante una combinación de los productos virales (revisado en Roulston y col., 1999).

2.5.- Apoptosis en relación con hantavirus.

En la actualidad es bastante poco lo que se sabe acerca del rol de la apoptosis sobre el ciclo de vida de los hantavirus. Existen diversos estudios acerca de una posible inducción de apoptosis por parte de los hantavirus, en los cuales se han obtenido resultados contradictorios. Un estudio señaló que la infección de HTNV y PHV en células Vero E6 induce en gran medida la apoptosis celular, aunque no se mostró si eran las células infectadas o aquellas en la vecindad, las que estaban apoptóticas (Kang y col., 1999). En otro estudio se mostró que la apoptosis es inducida en las células HEK-293 próximas a las infectadas, aunque el mecanismo de inducción quedó sin determinar (Markotic y col., 2003). Además, se ha reportado que TULV, que no es patogénico, induce niveles significativos de apoptosis en células infectadas, lo cual ha sido atribuido al estrés del retículo endoplasmático, e involucra la activación de caspasa 8 (Li y col., 2004; Li y col., 2005)

En otro estudio se muestra que el número de células apoptóticas no difiere entre el control sin infectar y aquellas infectadas con PHV o SNV (Khaiboullina y col., 2004). También se ha reportado que los hantavirus que producen HFRS inducen un nivel bajo de apoptosis en células en división, pero no en células confluentes (Hardestam y col., 2005). Por su parte, se ha observado que la proteína N de PUUV interactúa con Daxx, un conocido potenciador de apoptosis mediada por Fas (Li y col., 2002) y se ha sugerido que N estaría interfiriendo con las funciones de Daxx y, por lo tanto, retrasando la apoptosis (Khaiboullina y col., 2013; revisado en Hussein & Mir, 2013). Otra estrategia por la cual se sugiere que los hantavirus estarían bloqueando la apoptosis es

secuestrando el factor NF- κ B en el citoplasma, el cual posee un rol clave en iniciar la señalización antiviral del huésped vía interferón y la respuesta apoptótica. Este factor puede ser activado por citoquinas inflamatorias a través de receptores de la familia de TNF; una vez activado se transloca al núcleo en donde funciona como factor de transcripción para diversos genes involucrados en tanto la respuesta inmune innata como adaptativa (Beg y col., 1992; Wajant y col., 2003; Hayden & Ghosh, 2004). Al respecto, se ha reportado que las nucleoproteínas de HTNV, DOBV y SEOV inhiben la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (Taylor y col., 2009a; Taylor y col., 2009b; Ontiveros y col., 2010; revisado en Hussein & Mir, 2013), sin embargo, las nucleoproteínas de PUUV, así como también de SNV y ANDV no producen este efecto (Taylor y col., 2009b) lo cual evidencia que los hantavirus difieren en sus mecanismos de intervención con la respuesta inmune innata del huésped. En un reporte más reciente se ha mostrado que si bien, en pacientes con HFRS y HPS la infección viral produce una fuerte activación de linfocitos T CD8 y células NK, no se ha observado una destrucción evidente de las células endoteliales infectadas, lo cual se debe a que la proteína de nucleocápside de los hantavirus inhibe la actividad enzimática de tanto granzima B como caspasa 3 (Gupta y col., 2013).

2.6.- Aspectos generales de TRAIL y sus receptores.

La familia de TNF tiene gran influencia sobre diversas funciones inmunológicas, tales como activación y muerte celular. Dentro de los miembros de esta familia se encuentra el ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL, por sus siglas en inglés), una proteína homotrimérica, que puede estar anclada a la membrana de células efectoras del sistema inmune, o en forma soluble (revisado en Gonzalez & Ashkenazi, 2010). Desde el descubrimiento de TRAIL en 1995, se ha

aprendido bastante acerca de la proteína, sus receptores, la cascada de señalización que induce y la regulación de su expresión. Sin embargo, el rol o roles fisiológicos que TRAIL pueda cumplir *in vivo* aún siguen sin esclarecerse completamente. La expresión de TRAIL en células T efectoras y el hecho de que induzca apoptosis en células infectadas por virus proveen ciertas pistas acerca del papel activo que juega en la respuesta inmune generada por el huésped frente a una infección viral. Evidencia creciente señala que TRAIL podría tener una doble función en el sistema inmune, por un lado, como medio para eliminar las células infectadas y por otro, para regular la producción de citoquinas (revisado en Cummins & Badley, 2009). TRAIL ha sido implicado en la respuesta inmune frente a infecciones virales, así como también en la patogénesis de múltiples infecciones por virus. Más aún, diversos virus han evolucionado mecanismos para manipular la señalización de TRAIL e incrementar la replicación viral (figura 2) (revisado en Cummins & Badley, 2009; Zhou y col., 2017).

TRAIL puede interactuar con cinco receptores distintos: dos receptores de muerte (TRAIL-R1 / DR4 y TRAIL-R2 / DR5), dos receptores señuelo (TRAIL-R3 / DcR1 y TRAIL-R4 / DcR2), los cuales se encuentran anclados a membrana plasmática, además de Osteoprotegerina (OPG), que es soluble. Tanto DR4, como DR5 contienen dominios de muerte citoplasmáticos y su sobreexpresión es capaz de inducir apoptosis en células sensibles; en contraste, ni DcR1 ni DcR2 contienen un dominio de muerte citoplasmático completo por lo que no pueden inducir apoptosis al momento de unirse a TRAIL (revisado en Gonzalez y Ashkenazi, 2010). OPG, también es capaz de unirse a TRAIL *in vitro*, sin embargo, su afinidad por TRAIL a temperatura fisiológica es menor que la de los otros receptores (Emery y col., 1998). Se ha observado que TRAIL tiene un rol muy importante en inducir apoptosis de células infectadas con virus (revisado en Gyurkovska &

Ivanovska, 2016). Células infectadas con citomegalovirus humano, adenovirus, reovirus, sarampión, virus de la encefalomiocarditis, hepatitis C, virus respiratorio sincicial, influenza, o virus de inmunodeficiencia humana han revelado niveles proteicos aumentados de TRAIL y sus receptores de muerte, lo cual las hace más sensibles a apoptosis mediada por TRAIL (Clarke y col., 2000; Vidalain y col., 2000; Lum y col., 2001; Sato y col., 2001; Sträter y col., 2002; Kotelkin y col., 2003; Spierings y col., 2004; Brincks y col., 2008; Deng y col., 2012). Por otra parte, también hay algunos virus que han evolucionado estrategias para evadir la apoptosis inducida por TRAIL, por ejemplo, hepatitis B bloquea la expresión del receptor de TRAIL, DR5 (Du y col., 2009).

La señalización que produce TRAIL es compleja, se conocen al menos seis cascadas que convergen y divergen y que presumiblemente contribuyen a un ambiente pro- o anti-apoptótico generalizado (figura 2) (revisado en Cummins & Badley, 2009; Zhou y col., 2017). Esta complejidad presenta muchas oportunidades de regulación por parte del hospedero, y de manipulación por parte de un virus. El que un virus evolucione para iniciar o prevenir la apoptosis de una célula huésped depende de si la máxima replicación y diseminación posible se alcanza con la muerte o preservación y latencia celular. La cantidad de cascadas a su vez puede permitir al huésped superar los intentos del virus por manipular dichas cascadas (revisado en Cummins & Badley, 2009; Gyurkovska & Ivanovska, 2016).

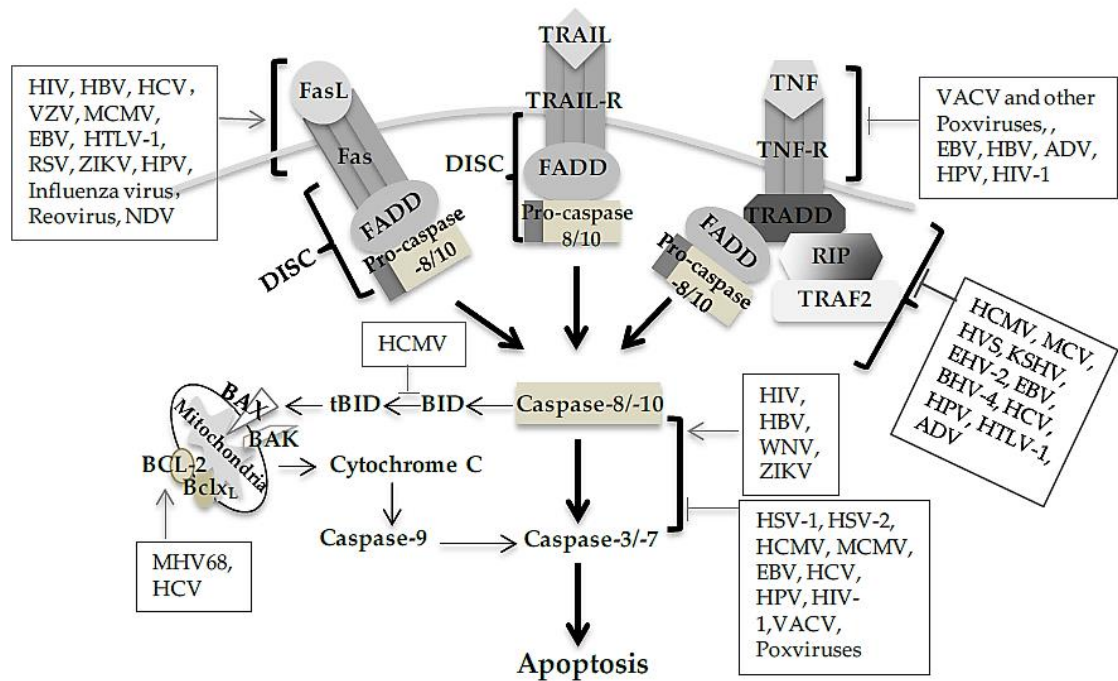


Figura 2: Modulación viral de la apoptosis mediada por los receptores de muerte. Las infecciones virales regulan la apoptosis extrínseca mediada por los receptores de muerte a través de proteínas codificadas por los virus. Las flechas negras representan una inducción de la señal apoptótica; las barras grises en forma de T representan una inhibición de la señal por parte de los virus (Imagen modificada desde Zhou y col., 2017).

De acuerdo a resultados previos de nuestros colaboradores, se ha observado que en células endoteliales HUVEC infectadas por HTNV, se produce una relocalización del receptor de TRAIL, DR5, hacia el núcleo de la célula, lo cual confiere un efecto protector de la apoptosis inducida por TRAIL a las células infectadas por HTNV (datos no publicados del laboratorio del Dr. Jonas Klingström, Karolinska Institutet).

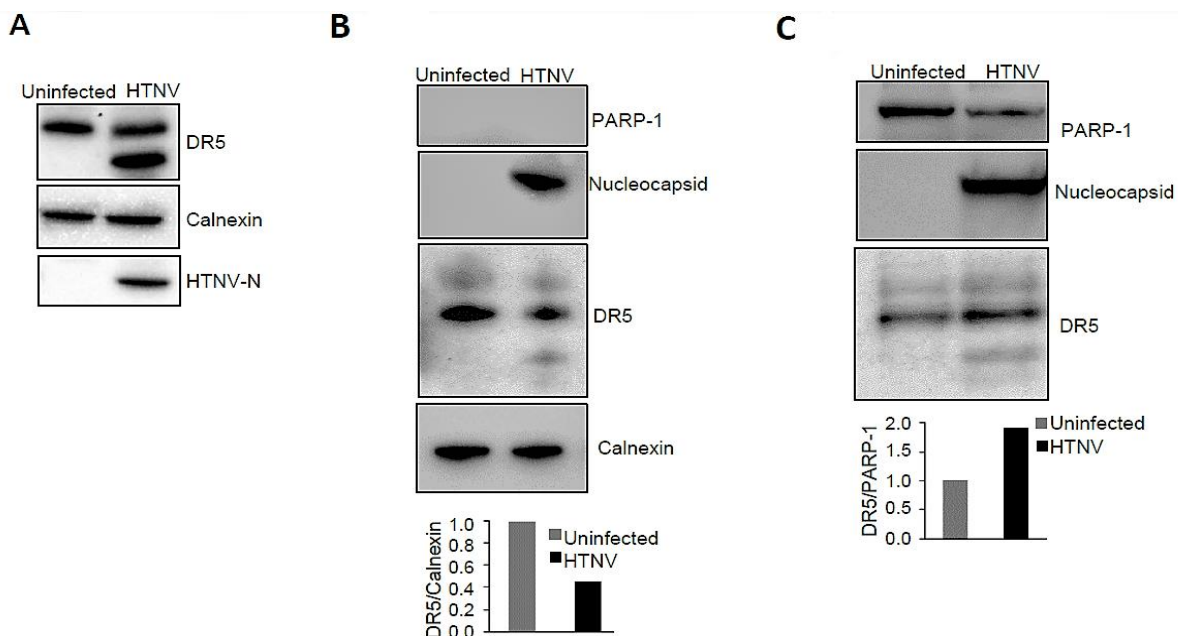


Figura 3: Hantavirus causa translocación nuclear de DR5.

Células endoteliales HUVEC fueron infectadas con HTNV o se dejaron sin infectar. Las células fueron colectadas 96 h post-infección. **A)** Análisis de *western blot* en donde se muestra la cantidad total de DR5 en células endoteliales sin infectar o infectadas con HTNV. Se utilizó calnexina como control interno de carga. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. **B)** Análisis de *western blot* en donde se muestra DR5 en la fracción citoplasmática de células endoteliales sin infectar o infectadas con HTNV. Se utilizó calnexina como control interno de carga. Se utilizó PARP-1 para mostrar que la fracción citoplasmática no está contaminada con material nuclear. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. **C)** Análisis de *western blot* en donde se muestra DR5 en la fracción nuclear. Se utilizó PARP-1 como control de carga interna del núcleo. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. (Datos no publicados, laboratorio Dr. Jonas Klingström, Karolinska Institutet).

En el presente seminario de título se pretende determinar si la expresión o localización del receptor de TRAIL, DR5, en células humanas se ve alterada por la expresión por separado de las proteínas N, o GPC de ANDV. Posteriormente, se estudiará el efecto que dicha variación pueda tener sobre la tasa de apoptosis mediada por TRAIL en estas células.

3.- Hipótesis

La expresión de las proteínas N, Gc y/o Gn de ANDV disminuyen la apoptosis mediada por el receptor DR5 de TRAIL en células humanas.

4.- Objetivos

4.1.- Objetivo General

Determinar el efecto de la expresión de las proteínas N, Gc y/o Gn de ANDV sobre la apoptosis mediada por el receptor DR5 de TRAIL.

4.2.- Objetivos Específicos

- Analizar la expresión y localización de DR5 en células A549 transfectadas con plasmidios que codifican N, Gc y/o Gn de ANDV en comparación con la expresión y localización de este mismo receptor en células controles.
- Determinar la tasa de apoptosis inducida por TRAIL en células A549 transfectadas con plasmidios que codifican N, Gn y/o Gc de ANDV, en comparación con células controles.

5.- Materiales y Métodos

5.1.- Células y anticuerpos.

Células HEK 293 FT aisladas de riñón embrionario humano (Invitrogen) y HeLaS3 de cáncer cérvico uterino humano (ATCC CCL-2.2) fueron crecidas en medio DMEM (Gibco). Las células A549 de epitelio basal humano con adenocarcinoma (ATCC CCL-185) y CHO de ovario de hámster chino (ATCC CCL-61) fueron crecidas en medio de cultivo F-12K (Gibco). Las células Vero E6 de riñón de *Chlorocebus sp* (mono verde africano) (ATCC CRL-1586) fueron crecidas en medio MEM (Gibco). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco).

Anticuerpos monoclonales contra antígenos de ANDV fueron previamente desarrollados en el laboratorio: anti-Gc 2H4/F6 (Godoy y col., 2009), anti-VLPs (partículas virales basadas en las glicoproteínas Gn y Gc, por sus siglas en inglés) 1B6/E7, 1E11/D3 y 4G7/E10 (tesis doctoral de Nicolás Muena Castillo, programa de doctorado en Biotecnología, Universidad Andrés Bello, en desarrollo) además de anti-N, 7B3/F7 (Tischler y col., 2008). Para detectar específicamente DR5 humano, en las técnicas de *western blot* y citometría de flujo, se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial desarrollado en conejo D4E9 (Cell Signaling Technology). Como control de carga para *western blot* se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial anti- β actina (Sigma-Aldrich). Para revelar la señal de unión de anticuerpos primarios en *western blots* se utilizaron los anticuerpos secundarios de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a Poli-HRP (HRP por sigla en inglés para peroxidasa de rábano) (Thermo Scientific) y anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a HRP (Invitrogen); para citometría de flujo se emplearon los anticuerpos secundarios anti-

inmunoglobulina de ratón conjugado a Alexa-Fluor® 488 (Invitrogen) y anticuerpo de burro anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a Dylight 649 (BioLegend).

5.2.- Plasmidios.

El plasmidio *pl.18* fue amablemente cedido al laboratorio por Dr. Jim Robertson, del *National Institute for Biological Standards and Control*, Hertfordshire, Reino Unido. Los plasmidios *pl.18/ANDV-GPC* y *pCMVBios/ANDV-N* fueron generados previamente en el laboratorio (Cifuentes-Muñoz y col., 2010; Gupta y col., 2013), estos dos últimos codifican al precursor de glicoproteínas, GPC y a N, respectivamente, bajo el control del promotor de citomegalovirus. El plasmidio *pVSVg* que codifica la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) fue amablemente cedido al laboratorio por Dr. Luigi Naldini (Cifuentes-Muñoz y col., 2010).

5.3.- Expresión de proteínas virales.

Las células A549 fueron sembradas 1 día antes de ser transfectadas en una placa de cultivo celular de 10 cm. Las células fueron tratadas con 15 µg de ADN más 30 µL de lípido catiónico (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent - Invitrogen) y fueron incubadas con esta mezcla durante 3 – 6 h a 37 °C, en medio de cultivo Opti-MEM (Gibco) con 5% CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron incubando con medio de cultivo F12K fresco suplementado con 10% SFB.

5.4.- Análisis y cuantificación de DR5 y proteínas virales.

Los análisis para evaluar la expresión de DR5 y de las proteínas virales fueron realizados luego de 24 h post-transfección, mediante las técnicas que se detallan a continuación.

5.4.1.- Western blot

En primer lugar, las células fueron lisadas con buffer de lisis RIPA (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP_40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%) al que se le agregó inhibidor de proteasas (Roche), manteniendo constantemente la temperatura entre 0 y 4 °C.

Posteriormente se procedió con el análisis de *western blot*, para lo cual se utilizaron los anticuerpos primarios anti-DR5 (D4E9; 1:1.000), anti-Gc (2H4/F6; 1:2.500) y anti- β -actina (1:5.000), además de los anticuerpos secundarios de cabra anti-inmunoglobulina de ratón Poli-HRP (1:5.000) y anti-inmunoglobulina de conejo HRP (1:5.000). Para el anticuerpo anti-DR5 la dilución fue hecha en TBS – BSA 5%, mientras que para el resto de los anticuerpos se utilizó PBS – leche 1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados en agitación, a 4 °C, durante 16 h, mientras que los secundarios se incubaron en agitación, a temperatura ambiente, por 1 h.

Para revelar se utilizó el sustrato quimioluminiscente Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific).

5.4.2.- Citometría de flujo

El cultivo en monocapa de células fue soltado de la placa con buffer Tris-EDTA (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM); posteriormente las células fueron lavadas con PBS y tratadas con LIVE/DEAD® Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) por 30 min, a 4 °C, en oscuridad. A continuación, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído 2%. En los casos en que se permeabilizó este proceso fue realizado con Tritón X-100 0,1%. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-DR5 (D4E9; 1:100), anti-N (7B3/F7; 1:500), anti-VLPs (mezclando los clones 1B6/E7, 1E11/D3 y 4G7/E10; 1:500) y anti Gc (2H4/F6; 1:500). Estos anticuerpos fueron incubados en PBS – BSA 0,5%, en oscuridad, a 4 °C. Como anticuerpo secundario se utilizó Alexa-Fluor® 488 anti-ratón (1:500) y Dylight 649 anti-conejo (1:500). Cada ronda de centrifugación fue realizada a una aceleración de 700 G, durante 5 minutos.

Finalmente, las muestras fueron analizadas por citómetro de flujo (FACSCanto II, Becton Dickinson). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software FlowJo (v.10.0.7).

5.5.- Análisis y cuantificación de ARNm de DR5 y genes virales.

5.5.1.- Extracción de ARN total

En primer lugar, se extrajo el medio de cultivo de las células sembradas en monocapa y se lavó con PBS. El cultivo en monocapa de células fue despegado y solubilizado en Trizol (Life Technologies). Luego se trató con cloroformo, se agitó en vórtex por 15 s y se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12.000 G por 15 min a 4 °C. Se rescató el sobrenadante, se depositó en

un tubo limpio y se incubó con isopropanol a temperatura ambiente por 10 min. Luego se centrifugó a 12.000 G por 10 min a 4 °C, y el precipitado se lavó con etanol 75%. Se centrifugó a 12.000 G por 5 min a 4 °C. Se repitió el paso de lavado, pero esta vez con un volumen menor de etanol 75%. Finalmente se dejó secar el precipitado, se resuspendió en agua libre de ARNasas (Promega) y se depositó en hielo.

5.5.2.- Tratamiento con ADNasas y cuantificación de ARN total.

El material genómico obtenido previamente fue tratado con 1 U de DNAsa I *amplification grade* (Invitrogen) por 15 min a temperatura ambiente, luego se agregó EDTA 25 mM (Invitrogen), se calentó a 65 °C por 10 min y se enfrió rápidamente en hielo.

A continuación, se procedió a cuantificar el ARN total obtenido mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000 - ThermoScientific) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. El ARN total obtenido se llevó a una concentración final de 250 ng/μL.

5.5.3.- Transcripción reversa

Al ARN total previamente obtenido se le agregaron 300 ng de partidores azarosos (Invitrogen) y 10 mM de dNTPs. A continuación, cada muestra se calentó a 65 °C durante 5 min y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se trató con Ditríoteitol (DTT) 100 mM (Invitrogen), 20 U de inhibidor de ARNasas (Ambion), y 100 U de transcriptasa reversa del virus Murina Moloney de leucemia (M-MLV por siglas en inglés) (Invitrogen). Finalmente, cada muestra fue depositada en un termociclador (Peltier Thermal Cycler. PTC-200), donde se siguió el siguiente programa: 37 °C por 2 min; 25 °C por 10 min; 37 °C por 50 min; 70 °C por 15 min.

5.5.4.- RT-PCR

Los partidores empleados son lo que se describen en la tabla I.

Para cada reacción se utilizó una concentración de 10 μ M de cada partidador. Los ADNc fueron tratados con Master Mix (Promega) a una concentración 2X por cada reacción.

Las muestras fueron depositadas en un termociclador (Veriti®), en donde el programa que se siguió incluye una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, posteriormente 35 ciclos, cada uno con 30 s de desnaturalización a 95 °C, 1 min de alineamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C; luego de terminados los ciclos se incluye una extensión final de 5 min a 72 °C.

Tabla I: Partidores utilizados en las reacciones de PCR.

Gen (ID)	Tipo de secuencia	Secuencia nucleotídica	Región del gen abarcada
DR5 (8795)	Secuencia <i>forward</i>	5' TGCTCTGATCACCCAACAAG 3'	Nucleótidos 158 al 343
	Secuencia <i>reverse</i>	5' GCAAGCAGAAAAGGAGGTCA 3'	
β -actina (11461)	Secuencia <i>forward</i>	5' GATCTGGCACCCACACCTTCT 3'	Nucleótidos 336 al 473
	Secuencia <i>reverse</i>	5' GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA 3'	

Los productos de PCR fueron visualizados realizando una electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) 0,01%.

5.5.5.- qPCR

Los ADNc fueron tratados con Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Se emplearon los partidores para DR5 y β -actina previamente descritos en la tabla I, a una concentración de 10 μ M por reacción. Las muestras fueron depositadas en un termociclador (Stratagene Mx3000), en donde el programa que se siguió consta de una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos que incluyen 30 s de desnaturalización a 95 °C, a continuación 1 min de alineamiento a 55 °C y 30 s de extensión a 72 °C; una vez finalizados los ciclos el programa prosigue con una elevación de la temperatura a hasta 95 °C por 1 min, luego 55 °C por 30 s y finalmente 95 °C por 30 s.

5.6.- Determinación de tasa de apoptosis.

Luego de que fuesen transfectadas las células, al momento de realizarles el cambio de medio de cultivo correspondiente a las 5 h post-transfección, las células fueron tratadas durante 24 h con TRAIL recombinante humano (*carrier-free*) (BioLegend), reconstituido en PBS – BSA 1%, el cual fue utilizado a una concentración de 100 ng/mL. Como control positivo de la tasa de apoptosis las células fueron incubadas con estaurosporina (BioVision) a concentraciones variadas, durante 4 h a 37 °C en 5% CO₂.

Para evaluar la tasa de apoptosis se utilizó una tinción con anexina V (BioLegend) a través de citometría de flujo. Para ello se soltaron las células de la placa de cultivo con buffer Tris-EDTA, éstas fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas en solución amortiguadora de unión (Hepes 100 mM, pH 7,4, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) y tratadas

con anexina V conjugada a APC (BioLegend) por 15 min en oscuridad a temperatura ambiente.

Posteriormente, estas muestras fueron llevadas al citómetro de flujo (FACS Canto II, Becton Dickinson), en donde, justo antes de adquirir, fueron tratadas con yoduro de propidio (1:150) (Sigma), con el fin de descartar las células necróticas.

5.7.- Análisis estadístico

Para comprobar si efectivamente las diferencias observadas en la expresión general de DR5 o su localización en la superficie celular en función de las distintas condiciones analizadas corresponden o no a diferencias estadísticamente significativas, cada condición fue evaluada al menos en dos experimentos independientes entre sí, luego de lo cual se procedió a realizar un análisis estadístico mediante un test de ANOVA de una cola, para lo cual se utilizó el software GraphPad Prism (v 7.00). Se determinó que una diferencia era estadísticamente significativa cuando el valor p calculado fue menor a 0,05, y se marcó dicha diferencia con un asterisco (*); a su vez cuando el valor p obtenido fue menor a 0,01, se determinó que esta diferencia fue muy significativa y se marcó con dos asteriscos (**).

6.- Resultados

6.1.- Detección de DR5 en distintos tipos celulares.

Para poder medir el efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de DR5, en primera instancia se buscó elegir una línea celular adecuada para este estudio, con niveles de DR5 detectables. Para ello se procedió a determinar la presencia de DR5 en distintas líneas celulares HEK 293FT, A549, CHO, HeLaS3 y Vero E6. En primer lugar, se evaluó la transcripción del gen *TNFRSF10B* que codifica para DR5 (*Genecards. Human Gene Database*), para lo cual, se extrajo ARN total de estas líneas celulares y se realizó un RT-PCR, con partidores específicos para DR5 humano (tabla I), además de actina, como control positivo. Los resultados obtenidos indican que el gen que codifica DR5 está siendo transcrito en las células 293FT, A549 y HeLaS3, mientras que no ha sido detectado en las células CHO ni tampoco en células Vero E6 (figura 4A). Por su parte, el gen control que codifica la proteína de β -actina fue detectado en todas las líneas celulares analizadas, corroborando el ensayo.

A su vez, también se analizó la presencia de la proteína DR5 en lisados celulares totales mediante *western blot*. Para ello, luego de sembrar las células y esperar a que alcanzasen una confluencia de ~90%, éstas fueron lisadas con buffer de lisis RIPA más inhibidor de proteasas. En los resultados del *western blot*, se observa que las células A549 expresan abundantemente las 2 isoformas de DR5 de 40 KD y 48 KD respectivamente que, con menor intensidad, también se detectan en las células HeLaS3 y HEK 293FT (figura 4B). En comparación, las bandas correspondientes a DR5 se encuentran completamente ausentes en las células CHO y Vero E6, lo que coincide con los resultados observados mediante RT-PCR (figura 4A y 4B).

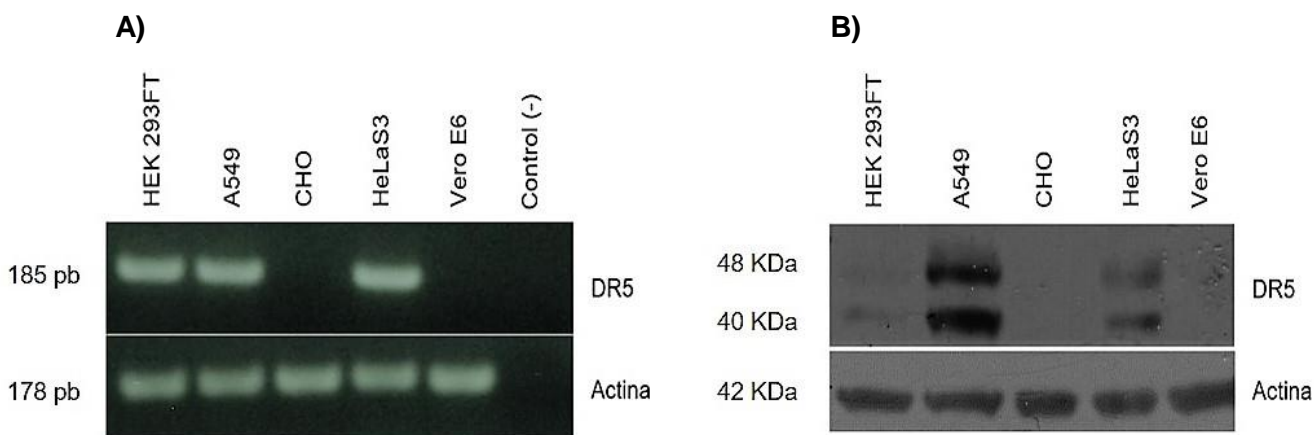


Figura 4: Detección de DR5 en distintas líneas celulares.

Se evaluó si las líneas celulares HEK 293FT, A549, CHO, HeLaS3 y Vero E6 expresan DR5. **A)** Análisis mediante RT-PCR. Se extrajo el ARN total de cada línea celular y posteriormente fueron analizadas por RT-PCR. **B)** Análisis mediante *western blot*. Se hizo un lisado total de cada tipo celular y se detectó DR5 con un anticuerpo anti-DR5 humano específico; en cada carril se cargaron 100 µg de proteína total. En ambos casos, se utilizó β-actina como control positivo.

Debido a la mayor expresión de DR5 en células A549, durante el resto de este trabajo se analizó la expresión de DR5 solamente en estas células.

6.2.- Transcripción genómica de DR5 en dependencia de proteínas de ANDV.

6.2.1.- Transcripción de DR5 en células A549 controles tratadas.

En primer lugar, se buscó medir la variación a nivel transcripcional de DR5 en función de las proteínas de hantavirus Andes en la línea celular A549, para la cual ya se ha detectado la presencia del gen que codifica DR5 (figura 4A).

En primera instancia, se analizó si el nivel de transcripción de DR5 varía al agregar los lípidos catiónicos utilizados para transfectar, o por acción de un ADN exógeno añadido a las células, para lo cual un grupo de células se mantuvo sin tratar, mientras que otras células fueron tratadas sólo con Lipofectamine 2.000 en ausencia de

ADN o con plasmidio control *pl.18*. Luego de 24 h post-tratamiento se realizó una extracción de ARN total, y mediante el proceso de transcripción reversa, se obtuvo el ADNc correspondiente, en donde se detectó el nivel relativo de transcripción del gen que codifica DR5 en células A549 bajo las distintas condiciones analizadas, siguiendo las especificaciones detalladas en la sección Materiales y Métodos. Se pudo observar una diferencia no significativa entre el nivel de transcripción de DR5 en las células sin tratar y aquellas a las que solo se les agregó el lípido catiónico (figura 5); sin embargo, en donde sí se observó una diferencia estadísticamente significativa fue al comparar estos dos grupos con las células tratadas con plasmidio control, en donde se muestra que el nivel de transcripción de DR5 en las células transfectadas con *pl.18* es aproximadamente 3,4 veces mayor al de las células que se mantuvieron sin tratar.

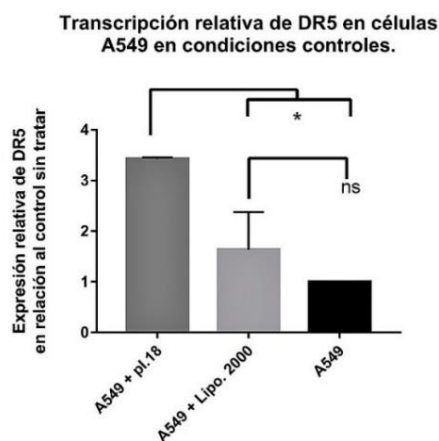


Figura 5: Transcripción relativa de DR5 en células controles.

Se midió el nivel de transcripción relativo de DR5 mediante qPCR en células A549 transfectadas con plasmidio control *pl.18*, tratadas con Lipofectamine 2.000, o sin tratar. El ARN total de las células fue extraído luego de 24 h post-tratamiento. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes entre sí. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de una cola. * representa un valor de $p < 0,05$.

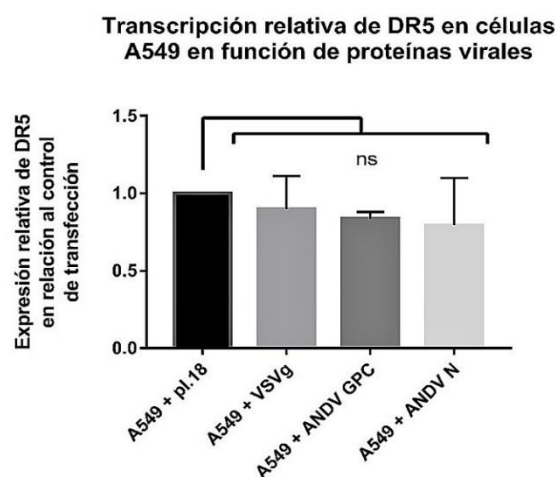
Esta diferencia observada en el nivel de transcripción de DR5 luego de transfectar con plasmidio control *pl.18*, probablemente se deba al estrés propiamente tal que significa agregar y expresar un ADN exógeno en las células, por lo que, para los análisis posteriores se utilizará *pl.18* como control del efecto de la transfección sobre los parámetros en estudio.

6.2.2.- Transcripción de DR5 en células A549 en dependencia de proteínas virales.

Una vez establecido el control de transfección, se procedió a analizar el nivel de transcripción relativa de DR5 en función de las proteínas virales. Al examinar el efecto de cada proteína viral sobre la transcripción relativa de DR5 se observa que en ningún caso hubo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de células transfectadas con plasmidio control (figura 6).

Figura 6: Transcripción relativa de DR5 en función de proteínas virales.

Se midió el nivel de transcripción relativo de DR5 mediante qPCR en células A549 transfectadas con plasmidio control *pl.18*, *pVSVg*, *pl.18/ANDV-GPC* y *pCMV/ANDV-N*. El ARN total de las células fue extraído luego de 24 h post-tratamiento. Se utilizó *pVSVg* como control de proteína viral heteróloga. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes entre sí. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de una cola. En todos los casos el valor de p calculado fue $> 0,05$, por lo que se determinó que ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa.



Estos resultados indican que la expresión de ninguna de las proteínas de hantavirus Andes, por sí sola, altera la producción de DR5 a nivel transcripcional. A continuación, se analizará si alguna de estas proteínas virales puede producir algún cambio en la expresión, o en la localización en membrana plasmática de este receptor en células A549.

6.3.- Expresión de DR5 y su localización en la superficie celular en dependencia de proteínas de ANDV.

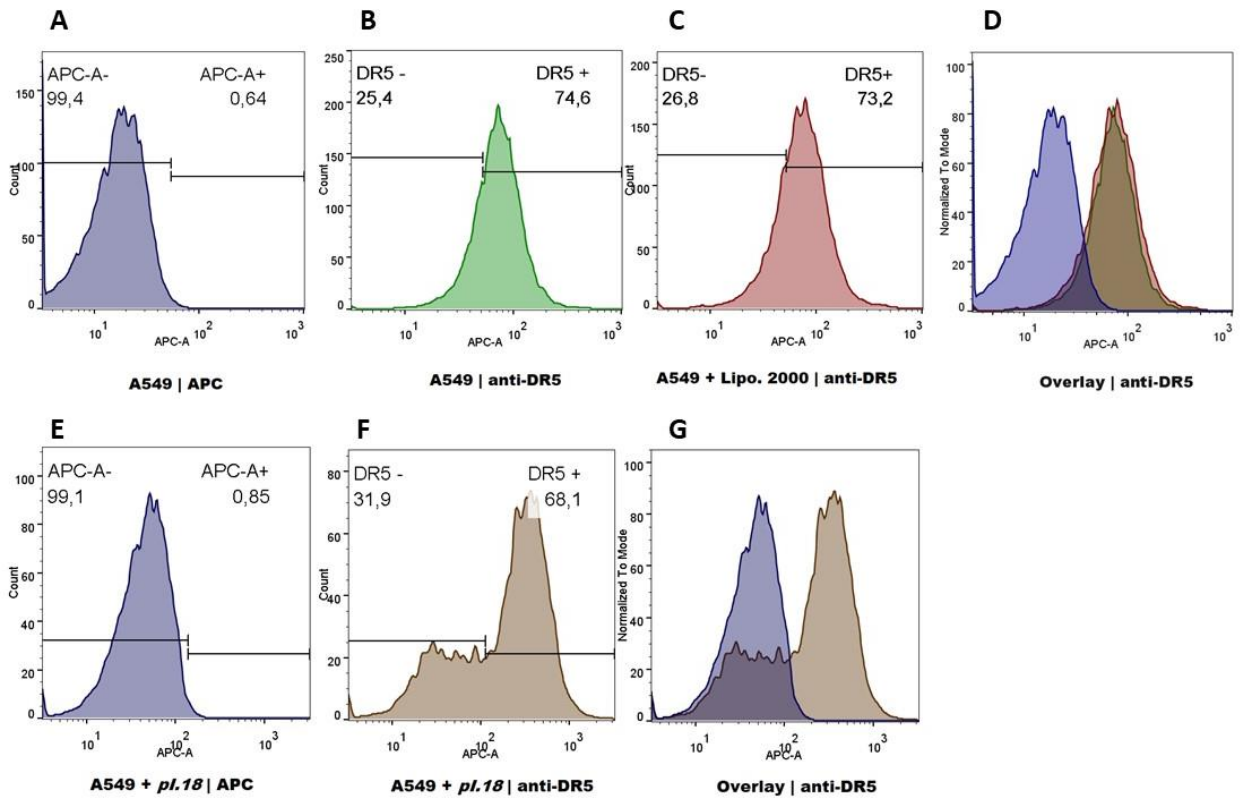
6.3.1.- Expresión de DR5 y su localización en superficie de células A549 en condiciones controles

A continuación, mediante citometría de flujo, en primer lugar, se analizó la expresión de DR5 en células A549 sin tratar permeabilizadas y no permeabilizadas (figura 7B, 7I). En este análisis se observó que un 74% de la población celular expresa DR5, mientras que un 25% de los eventos analizados presenta DR5 en su superficie, lo cual indica que del 74% que representa el total de eventos positivos para esta proteína, aproximadamente un 34% lo presenta en la superficie celular.

Posteriormente, antes de analizar los posibles efectos de las proteínas virales sobre DR5, fue necesario descartar la posibilidad de que los lípidos catiónicos empleados para transfectar (Lipofectamine 2.000) o el ADN exógeno ocasionen alguna variación.

Para ello las células fueron tratadas con lipofectamina 2.000, en ausencia de ADN o con plasmidio control *pl.18*; 24 h post-tratamiento nuevamente se analizó la expresión de DR5 y su localización en la superficie de células A549. Al tratar las células sólo con lípido catiónico fue posible observar que ambos parámetros se mantienen constantes en relación al control sin tratar, al agregar solamente el reactivo de transfección en ausencia de ADN exógeno (figura 7C y D, 7J y K).

Células permeabilizadas



Células no permeabilizadas

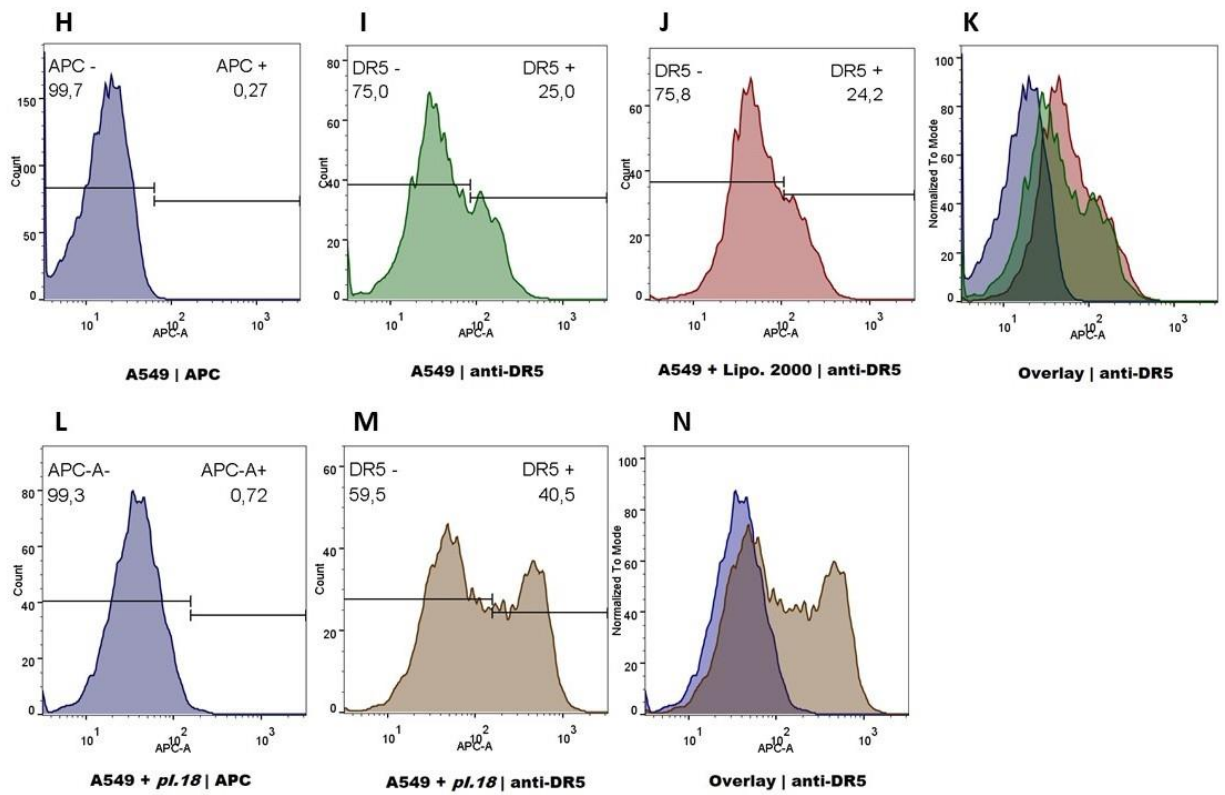


Figura 7: Expresión total de DR5 y su localización en superficie en células A549, en condiciones controles.

Se analizó mediante citometría de flujo la tasa de expresión de DR5, así como su localización en la superficie de células A549. **A – G** células permeabilizadas; **H – N** células no permeabilizadas. **A y H)** Controles negativos para medir DR5 en células sin tratar y tratadas con Lipofectamina 2.000, donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **B e I)** Detección de DR5 en células A549 sin tratar. **C y J)** Detección de DR5 en células tratadas con Lipofectamina 2.000. **C y J)** Superposiciones de los controles negativos (azul), con las muestras en donde se detecta DR5 en las células sin tratar (verde) y tratadas con lipofectamina 2.000 (rojo). **E y L)** Controles negativos para medir DR5 en células transfectadas con plasmidio *pl. 18*, en donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **F y M)** Detección de DR5 en células A549 tratadas con plasmidio *pl. 18*. **G y N)** Superposiciones de los controles negativos para DR5 en las células transfectadas con *pl. 18* (azul) con las muestras en donde se detecta DR5 en las células transfectadas con *pl. 18* (marrón). Se muestran resultados representativos de 2 experimentos independientes entre sí.

En el caso de la transfección con plasmidio control se observó que hay alrededor de un 6% menos de expresión de DR5 que en el caso de las células a las que sólo se les agregó lípido catiónico (figura 7F). Ello sugiere que la disminución en la expresión de este receptor se debe exclusivamente a la adición de un ADN exógeno a las células, aun así, ésta no es una diferencia estadísticamente significativa (figura 8A).

Por otra parte, se observó que cerca de un 40% de las células transfectadas con plasmidio control presentan DR5 en su superficie (figura 7M), lo cual representa alrededor de un 15% más que para el caso de aquellas que no fueron tratadas con lípidos catiónicos; esto efectivamente constituye una diferencia estadísticamente significativa entre las células tratadas con ADN exógeno y aquellas tratadas con lípido catiónico y sin tratar (figura 8B).

Para facilitar la comprensión de los datos obtenidos hasta ahora en donde se muestran los valores obtenidos para la expresión y localización de DR5 en células controles, es que se ha confeccionado un resumen con los resultados conseguidos hasta el momento (figura 10), en donde es posible observar que para el caso de la expresión general de DR5 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con ADN exógeno y aquellas sin tratar o tratadas con lípidos catiónicos (figura 10A); sin embargo estas diferencias sí se observan al analizar DR5 en la superficie celular, en donde hay un incremento significativo de este receptor en aquellas células transfectadas con el plasmidio control (figura 10B).

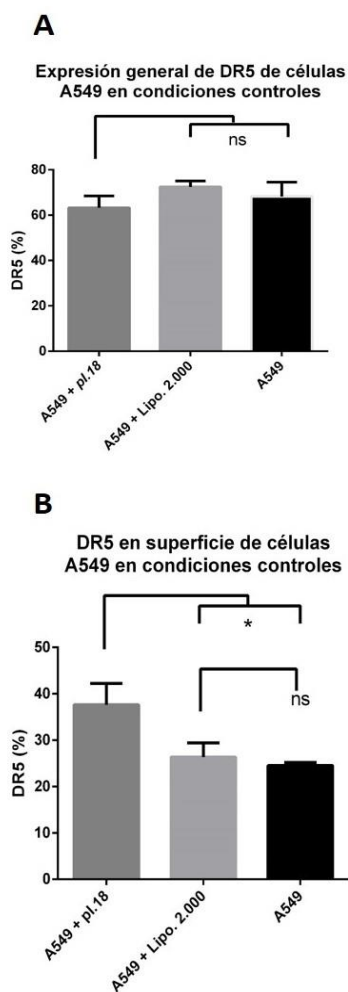


Figura 8: Expresión y localización de DR5 en células A549 controles.

Resumen de datos obtenidos mediante citometría de flujo para la expresión general de DR5, así como su localización en la superficie de las células en condiciones controles. **A)** Análisis en células permeabilizadas en donde se muestra la expresión general de DR5. **B)** Análisis en células no permeabilizadas en donde se muestra la presencia de DR5 en la superficie celular. Tanto para las células sin tratar como para aquellas tratadas con lípido catiónico se muestran los resultados de 2 experimentos independientes entre sí; para las células transfectadas con plasmidio control se muestran los resultados de 6 experimentos independientes entre sí. Los análisis estadísticos se realizaron a través de un test de ANOVA de una cola. Las diferencias estadísticamente significativas fueron marcadas con *, que indica que el valor p calculado es $< 0,05$.

Un efecto similar también pudo observarse al analizar el nivel relativo de transcripción de DR5 en las células controles (figura 5), en donde también se aprecia un aumento significativo en la transcripción del gen este receptor en las células transfectadas con plasmidio control en comparación a las células tratadas sólo con lípidos catiónicos y aquellas que se dejaron sin tratar.

Es debido a esta diferencia, que probablemente se debe al estrés que implica para las células la expresión de un ADN exógeno, que, para los análisis posteriores, se utilizarán las células transfectadas con el plasmidio *pl.18* como control del efecto de la transfección sobre la expresión de DR5 y su localización en superficie de las células A549.

6.3.3.- Expresión de DR5 y su localización en células que expresan una proteína heteróloga viral.

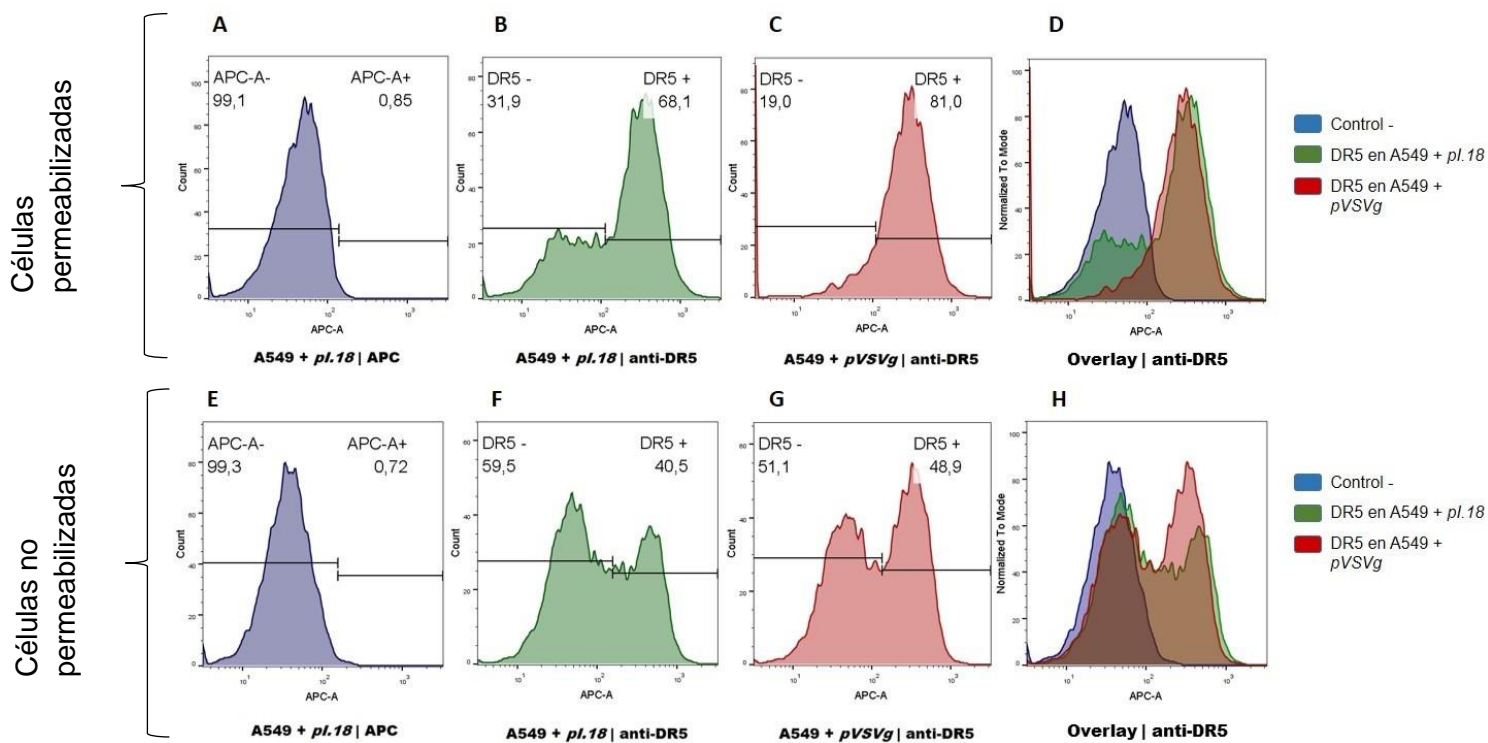


Figura 9: Expresión y localización de DR5 en células A549 transfectadas con pVSVg.

Se analizó mediante citometría de flujo la tasa de expresión de DR5, así como su localización en la superficie de células A549 transfectadas con plasmidio *pVSVg*. **A – D** células permeabilizadas; **E – H** células no permeabilizadas. **A y E)** controles negativos para DR5, en donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **B y F)** Detección de DR5 en células A549 transfectadas con *pl.18*. **C y G)** Detección de DR5 en células A549 transfectadas con *pVSVg*. **D y H)** Superposiciones del control negativo (azul), con las muestras en donde se detecta DR5 en células transfectadas con *pl.18* (verde) y *pVSVg* (rojo). Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes entre sí.

Para evaluar si la expresión de una proteína heteróloga de origen viral puede afectar la expresión de DR5, o su localización en la superficie celular se procedió a transfectar células con el plasmidio *pVSVg* que codifica la proteína de envoltura G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se apreció un incremento de 13% en la expresión total de DR5 en relación a las células transfectadas con plasmidio control (figura 9B, C, D), mientras que en la superficie celular se observó un aumento de 8% respecto a las células transfectadas con el plasmidio control (figura 9F, G, H).

De todas formas, estas variaciones no son estadísticamente significativas (figura 13) por lo que, cualquier efecto de la proteína VSVg sobre la expresión general de DR5 o su localización en la superficie celular es en realidad despreciable.

6.3.4.- Expresión de DR5 y su localización en células tratadas con ANDV Gn/Gc.

A continuación, se procedió a determinar el efecto de la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc de ANDV sobre tanto la expresión total de DR5 como su localización en la superficie celular. Para ello, en primer lugar, se evaluó la eficiencia de transfección y expresión de Gn/Gc en las células A549 (figura 10). Por citometría de flujo no ha sido posible detectar la presencia de ANDV Gn/Gc (figura 10B), sin embargo, a través de un ensayo de *western blot* con lisados del mismo grupo de células analizadas por citometría de flujo ha sido posible detectar la presencia de ANDV Gc (figura 10C). Esta evidencia señala que el hecho de que no se detecte GPC por citometría flujo, no se debe a la transfección, sino que a que posiblemente los anticuerpos utilizados no reconocen ANDV Gn/Gc expresado en estas células mediante citometría de flujo.

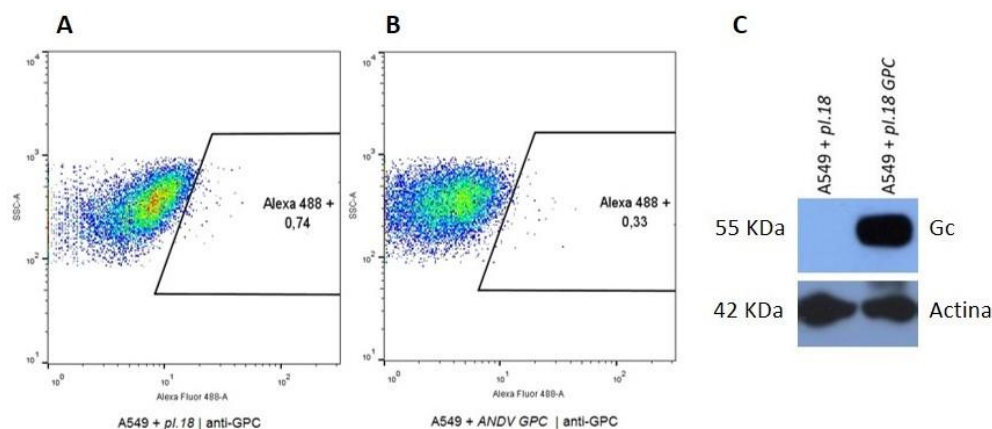


Figura 10: Evaluación de la transfección de ANDV Gn/Gc en células A549.

Se evaluó la presencia de Gn/Gc mediante citometría de flujo (**A y B**) y *western blot* (**C**). **A)** Control negativo para Gn/Gc; las células fueron transfectadas con *pl.18* e incubadas con anticuerpos anti-VLPs y anti-Gc (clones 1B6/E7, 1E11/D3, 4G7/E10 y 2H4/F6). **B)** Células transfectadas con *pl.18 / ANDV-GPC* e incubadas con anticuerpos anti-VLPs y anti-Gc (clones 1B6/E7, 1E11/D3, 4G7/E10 y 2H4/F6). **C)** Detección de Gc en lisados celulares. Se utilizó actina como control positivo de la técnica. Estos resultados son representativos de 4 experimentos independientes entre sí.

A continuación, a pesar de no detectar ANDV Gn/Gc por citometría de flujo, se evaluó la expresión de DR5, así como su localización en la superficie de células transfectadas con *pl.18/ANDV-GPC* (figura 11). En este análisis se observa que las células transfectadas con el plasmidio que codifica para ANDV GPC presentan un incremento en la expresión total de DR5 en relación a lo que se observa en las células transfectadas con plasmidio control (figura 11B, C, D). Lo mismo ocurre con DR5 en la superficie de las células; también se observa un aumento en comparación con las células transfectadas con plasmidio control (figura 11F, G, H). Cabe destacar que estos resultados son muy similares a los observados en células transfectadas con *pVSVg* (comparar figura 9H con 11H).

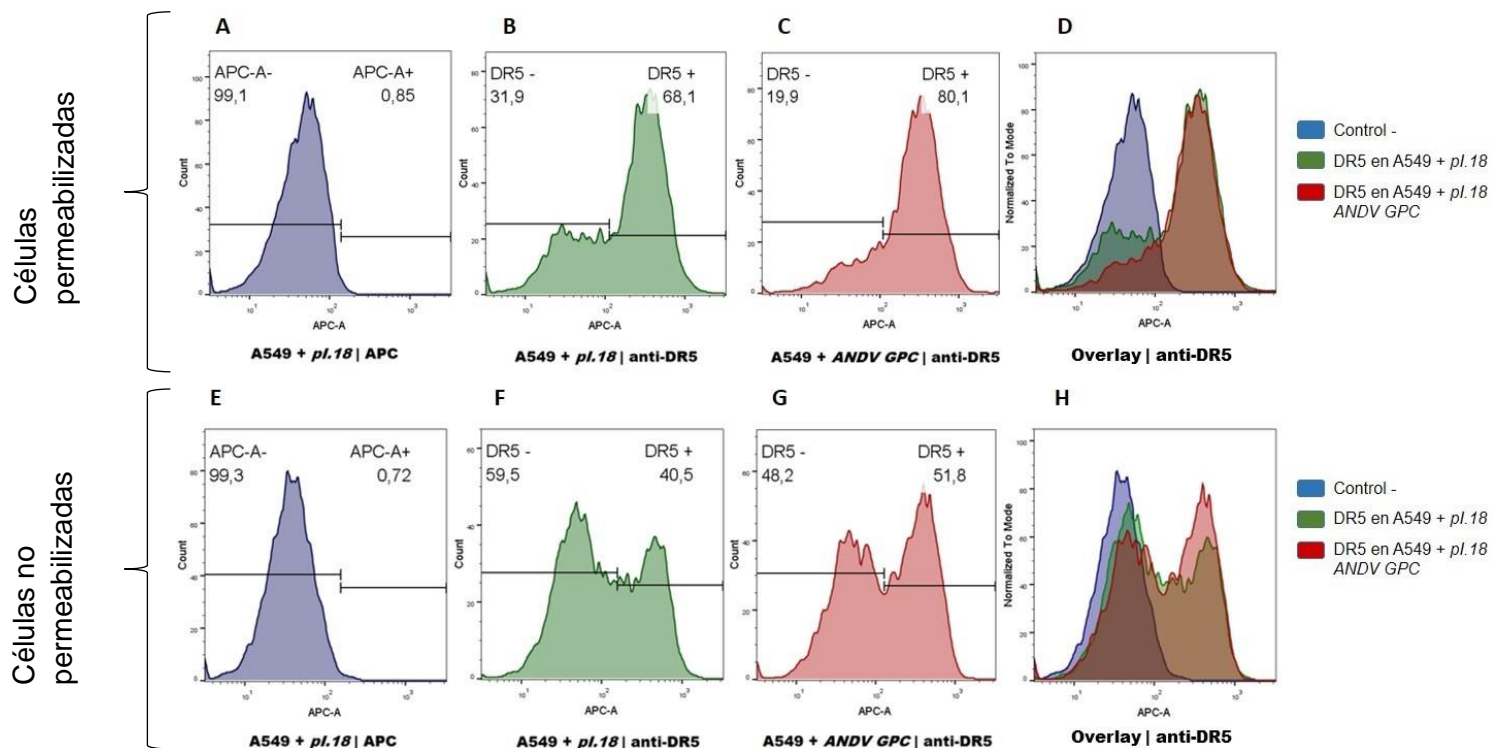


Figura 11: Expresión y localización de DR5 en células A549 transfectadas con *pl.18/ANDV-GPC*.

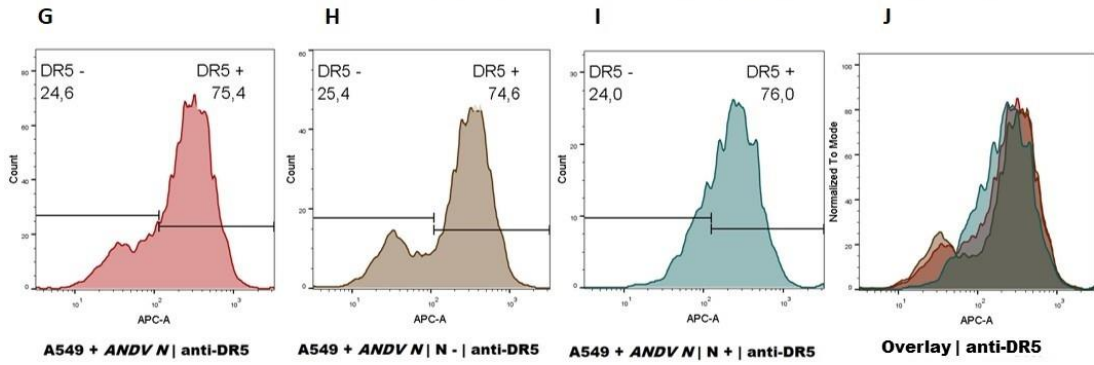
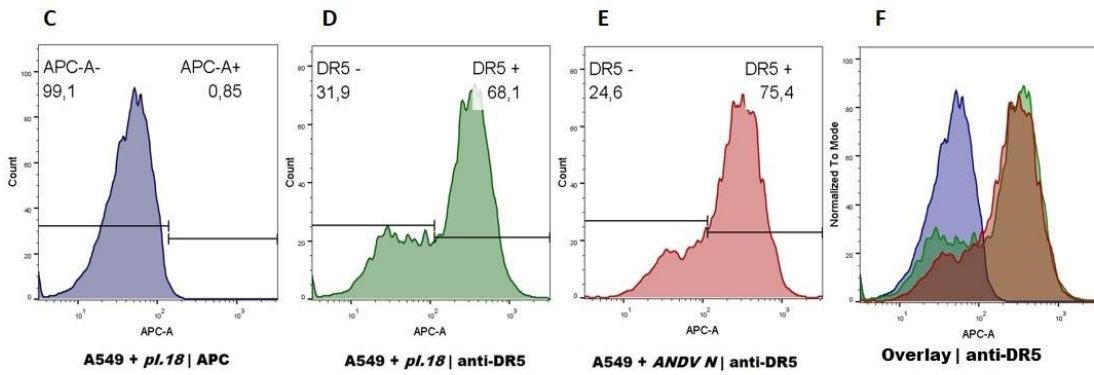
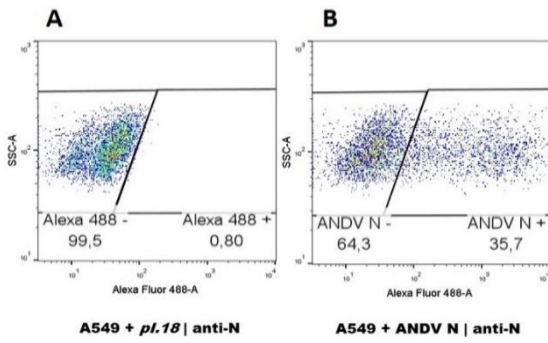
Se analizó mediante citometría de flujo la tasa de expresión de DR5, así como su localización en la superficie de células A549 transfectadas con plasmidio *pl.18/ANDV-GPC*. **A – D** células permeabilizadas; **E – H** células no permeabilizadas. **A y E**) controles negativos para DR5, en donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **B y F**) Detección de DR5 en células A549 con *pl.18*. **C y G**) Detección de DR5 en células A549 con *pl.18/ANDV-GPC*. **D y H**) Superposiciones del control negativo (azul), con las muestras en donde se detecta DR5 en células transfectadas con *pl.18* (verde) y *pl.18/ANDV-GPC* (rojo). Resultados representativos de 3 experimentos independientes entre sí.

6.3.5.- Expresión de DR5 y su localización en superficie de células tratadas con ANDV N.

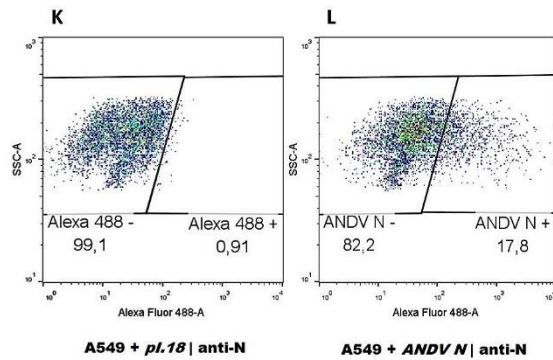
En primer lugar, antes de analizar la expresión general de DR5, se midió la eficiencia de transfección y expresión de la nucleoproteína N de ANDV en las células A549 transfectadas con *pCMV/ANDV-N*. (figura 12B). En este resultado, se ha podido observar que un 35% de la población celular efectivamente expresa la proteína ANDV N. Una vez establecido este resultado, se analizó variación en la expresión de DR5 en la población total de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*, junto con las subpoblaciones que expresan y no expresan ANDV N. Al igual que como se observa en los casos de transfección con VSVg y ANDV Gn/Gc (figuras 9C y 11C, respectivamente), existe un incremento, en la expresión general de DR5 en la población total de células tratadas con *pCMV/ANDV-N*, que en este caso es de un 7%, en relación a las células transfectadas con plasmidio control (figura 12D, E, F). Además, no se observa una diferencia significativa en la presencia de DR5 entre las subpoblaciones que no expresan y que expresan ANDV N (figura 12H, I, J). Tomando en cuenta estos resultados, pareciera ser que ANDV N no afecta en mayor medida la expresión de DR5 total en las células A549.

Estos datos están en concordancia con aquellos obtenidos al observar la transcripción relativa de DR5 en función de las proteínas virales analizadas (figura 6), en donde se puede observar que tampoco hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las distintas condiciones analizadas.

Células permeabilizadas



Células no permeabilizadas



Células no permeabilizadas

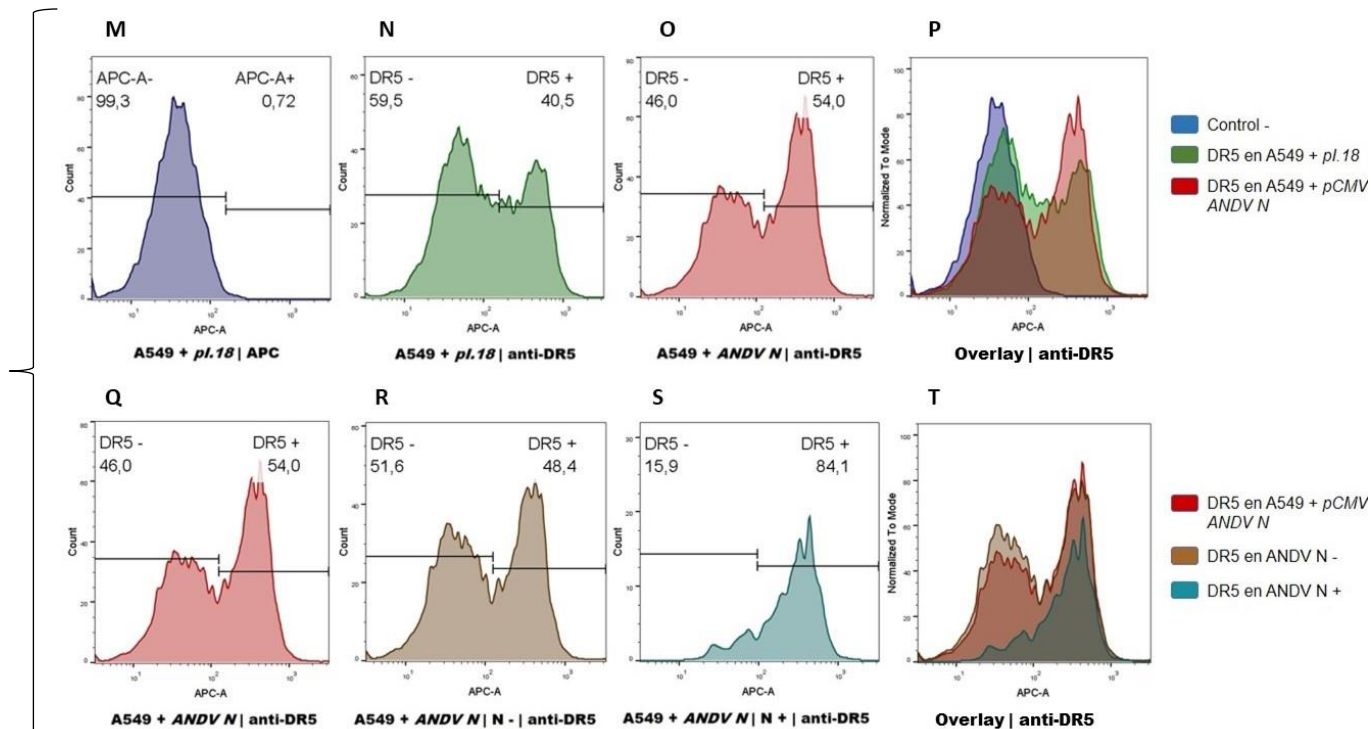


Figura 12: Expresión de DR5 y su localización en superficie de células A549 transfectadas con plasmidio que codifica ANDV N.

Se analizó mediante citometría de flujo la expresión de ANDV N y DR5, así como su localización en superficie de células A549 transfectadas con *pCMV/ANDV N*. **A – J** Células permeabilizadas. **K – T** Células no permeabilizadas. **A)** Control negativo para ANDV N; las células fueron transfectadas con *pl.18* e incubadas con anticuerpo anti-ANDV N. **B)** Expresión general de ANDV N en células transfectadas con *pCMV/ANDV N*. **C)** Control negativo para DR5, en donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **D)** Expresión general de DR5 en células transfectadas con plasmidio *pl.18*. **E)** Expresión general de DR5 en células A549 transfectadas con *pCMV/ANDV N*. **F)** Superposición del control negativos (azul), con las muestras en donde se detecta DR5 al agregar *pl.18* (verde) y *pCMV/ANDV-N* (rojo). **G)** Nuevamente, expresión general de DR5 en la población total de células transfectadas con *pCMV/ANDV N*. **H)** Expresión de DR5 en la subpoblación de células transfectadas con *pCMV/ANDV N*, que no expresan ANDV N. **I)** Expresión de DR5 en la subpoblación de células transfectadas con *pCMV/ANDV N*, que sí expresan ANDV N. **J)** Superposición de la población total de células transfectadas con *pCMV/ANDV N* (rojo), junto con las subpoblaciones negativa (marrón) y positiva para ANDV N (cian). **K)** Control negativo para ANDV N en la superficie celular; las células fueron transfectadas con *pl.18* e incubadas con anticuerpo anti-ANDV N. **L)** Detección de ANDV N en superficie de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*. **M)** control negativo para DR5, en donde las células no fueron incubadas con anticuerpo primario. **N)** Detección de DR5 en superficie de células A549 transfectadas con *pl.18* **O)** Detección de DR5 en superficie de células A549 transfectadas con *pCMV/ANDV-N*. **P)** Superposición del control negativo (azul), con las muestras en donde se detecta DR5 al agregar *pl.18* (verde) y *pCMV/ANDV-N* (rojo). **Q)** Nuevamente, DR5 en la superficie de población total de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*. **R)** DR5 en la superficie de

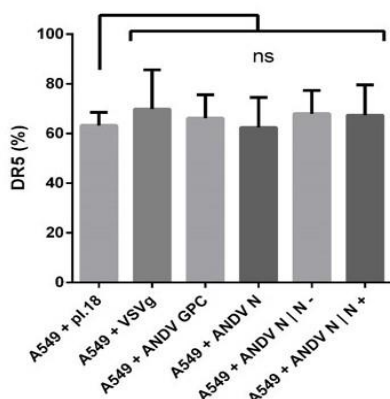
subpoblación de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*, donde no se detecta ANDV N. **S)** DR5 en la superficie de subpoblación de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*, donde sí se detecta ANDV N. **J)** Superposición de la población total de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N* (rojo), junto con las subpoblaciones negativa (marrón) y positiva para ANDV N (cian). Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes entre sí.

A continuación, se evaluó si es que la presencia de ANDV N afecta la localización de DR5 en la superficie celular (figura 12M – T); para ello se repitió el mismo análisis que para las células permeabilizadas (figura 12C – J). En primer lugar, fue posible observar la presencia de ANDV N en la superficie de las células, en donde fue detectado en cerca de un 17% de los eventos analizados (figura 12B). Luego se midió la presencia de DR5. Se puede observar que en la población general de células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*, existe un aumento cercano a 14% en la localización de DR5 en la superficie celular en comparación a las células transfectadas con plasmidio control (figura 12N, O, P). Sin embargo, al comparar DR5 entre las subpoblaciones que no expresan y que sí expresan ANDV N, es posible observar una diferencia importante, que en este caso corresponde a alrededor de un 36% más DR5 en la superficie de las células en donde también se está detectando ANDV N, en comparación con aquellas en donde no se detecta (figura 12R, S, T). Este resultado indica que, si bien ANDV N no afecta la expresión general de DR5, sí produce un incremento en su localización en la superficie de aquellas células en donde ANDV N también se encuentra en la superficie.

6.3.6.- Cambio en la expresión y localización en superficie de DR5 en función de ANDV GPC y N.

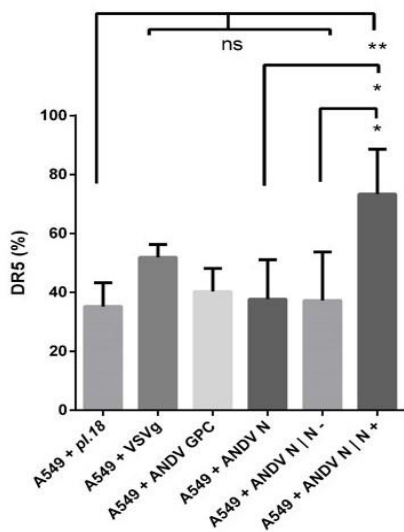
A

Expresión general de DR5 en células A549 en función de distintas proteínas virales



B

DR5 en superficie de células A549 en función de distintas proteínas virales



Para una mejor comparación de los datos obtenidos en cuanto a la expresión y localización de DR5, se muestra un resumen de los porcentajes de DR5 detectados, ya sea, en el extracto celular total (figura 13A), o sólo en la superficie (figura 13B), bajo las distintas condiciones analizadas. En donde se puede observar la diferencia significativa existente en la presencia de DR5 en la superficie de la población de células transfectadas con plasmidio control, en conjunto con aquellas transfectadas con el plasmidio pCMV/ANDV-N, pero que no presentan ANDV N y aquellas en donde efectivamente sí se detecta ANDV N en su superficie.

Figura 13 : Resumen de los porcentajes de DR5 observados mediante citometría de flujo en las distintas condiciones analizadas.

A) Porcentajes de eventos en donde se detecta DR5 en cada una de las condiciones analizadas previamente en células permeabilizadas (expresión general de DR5). **B)** Porcentajes de eventos en donde se detecta DR5 en cada una de las condiciones analizadas previamente en células no permeabilizadas (DR5 en la superficie celular). Los resultados observados en esta imagen corresponden a 2 experimentos independientes entre sí. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante un test de ANOVA de una cola. Las diferencias significativas fueron marcadas con (*) cuando el valor de p calculado fue < 0,05, mientras que las diferencias muy significativas fueron marcadas con (**), cuando el valor de p obtenido fue < 0,01.

En conjunto, los resultados mostrados hasta ahora indican que el incremento observado en la superficie celular en presencia de ANDV N, no se debe a una regulación a nivel transcripcional ni traduccional, sino que probablemente, a una modulación en el tráfico de esta proteína hacia la membrana plasmática. Dicha regulación estaría sugiriendo que hantavirus Andes podría estar induciendo apoptosis.

6.4.- Apoptosis mediada por TRAIL en función de proteínas de ANDV.

6.4.1.- Inducción de apoptosis en células A549.

Luego de detectar que la localización de DR5 en la superficie celular es incrementada frente a la expresión de la nucleoproteína de ANDV, se buscó determinar si es que dicha variación puede afectar la tasa de apoptosis mediada por TRAIL en células A549 que expresan ANDV N. Para ello, en primer lugar, se estudió si era posible inducir apoptosis en estas células, con estaurosporina, un conocido inductor de apoptosis (Wang y col., 2009).

Las células A549 fueron incubadas con concentraciones crecientes de estaurosporina de 0 a 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h a 37 °C y posteriormente fueron visualizadas en el microscopio óptico (figura 12). Se pudo ver que las células no tratadas tienen una morfología relativamente triangular y características similares a las de células epiteliales (figura 12A). Al tratar las células con DMSO, solvente de la estaurosporina, se observó que muchas tenían una morfología similar al control sin tratar, aunque también se muestran algunas células de menor tamaño y que gradualmente se vuelven redondas (figura 12B). Al analizar las células tratadas con estaurosporina, se observó que, en todas las concentraciones utilizadas, prácticamente la totalidad de las células presentó

una morfología redonda y un tamaño menor al de las células sin tratar (figura 12C-E), lo que sugiere que estas células parecen haber sufrido el proceso de apoptosis, lo cual coincide con reportes previos en donde efectivamente se utiliza esta droga como control positivo de apoptosis en células A549 (Yamamoto y col., 2003; Cummings y col., 2004; Schnitzer y col., 2006; Wang y col., 2009)

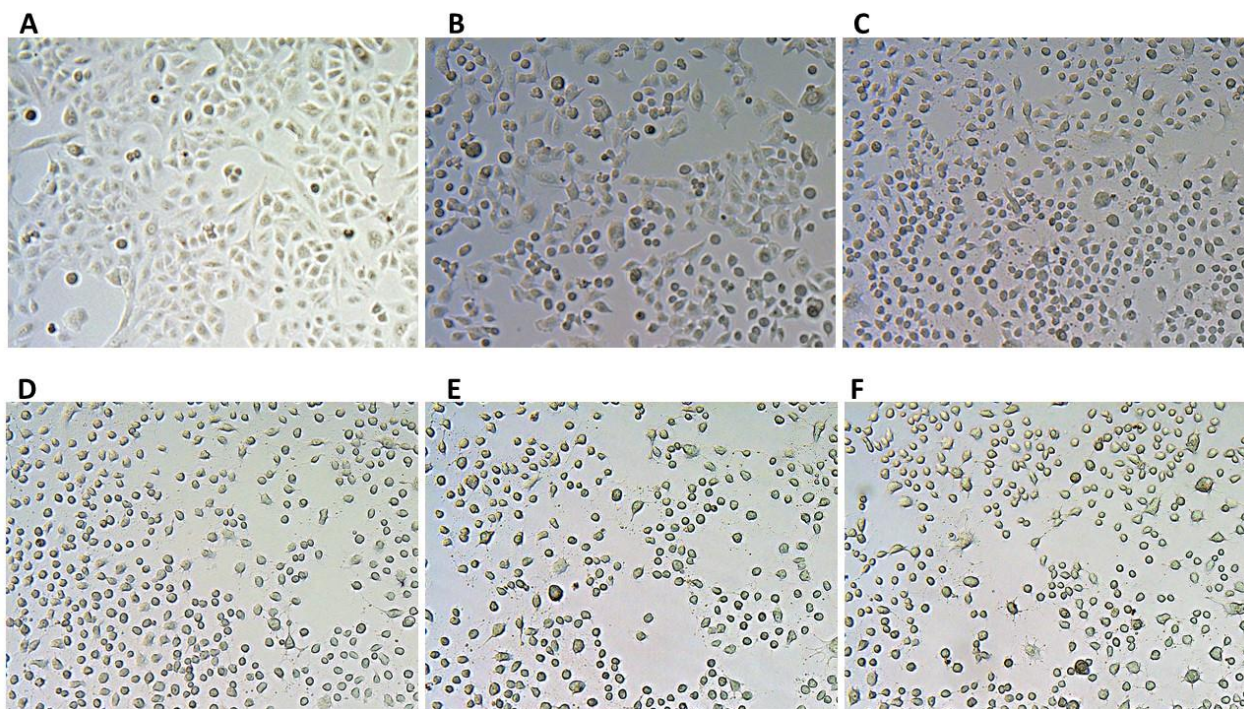


Figura 14: Inducción de apoptosis en células A549 inducida por estaurosporina.

Se utilizó estaurosporina como control positivo de inducción de apoptosis. (A) Control de células sin tratar. (B) Células tratadas con DMSO, control de solvente de estaurosporina. (C – F) Tratamiento con estaurosporina. Las células fueron tratadas con (C) 0,5 µg/mL, (D) 1 µg/mL, (E) 2 µg/mL o (F) 5 µg/mL de estaurosporina durante 4 h a 37 °C, luego de lo cual fueron observadas mediante microscopía óptica. Todas las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 200X.

6.4.2.- Apoptosis mediada por TRAIL en células A549.

Una vez que se determinó que pareciera ser posible inducir apoptosis en células A549 *in vitro*, se procedió a analizar el efecto de TRAIL sobre células A549 que expresen la nucleoproteína de hantavirus Andes. Para ello las células fueron transfectadas con

plasmidio control *pl.18* o *pCMV/ANDV-N*; 5 h post-transfección, una muestra de células transfectada con la nucleoproteína viral fue tratada con 100 ng/mL de proteína TRAIL recombinante humana, mientras que otra muestra de células transfectadas con ANDV N, además de aquellas células transfectadas con el plasmidio control se dejaron sin tratar. Luego se dejó incubando las células en las distintas condiciones durante 24 h a 37 °C. Para medir la tasa de apoptosis, las células fueron marcadas con anexina V, además de yoduro de propidio para descartar las células necróticas, tal como se describe en la sección Materiales y Métodos, luego de lo cual se analizó la apoptosis celular mediante citometría de flujo (figura 13). De acuerdo a los resultados obtenidos no es posible concluir si TRAIL induce o inhibe la apoptosis en células A549 presencia de ANDV N, debido a que se carece de un control positivo para el marcaje con anexina V, como, por ejemplo, estaurosporina. (figura 13C).

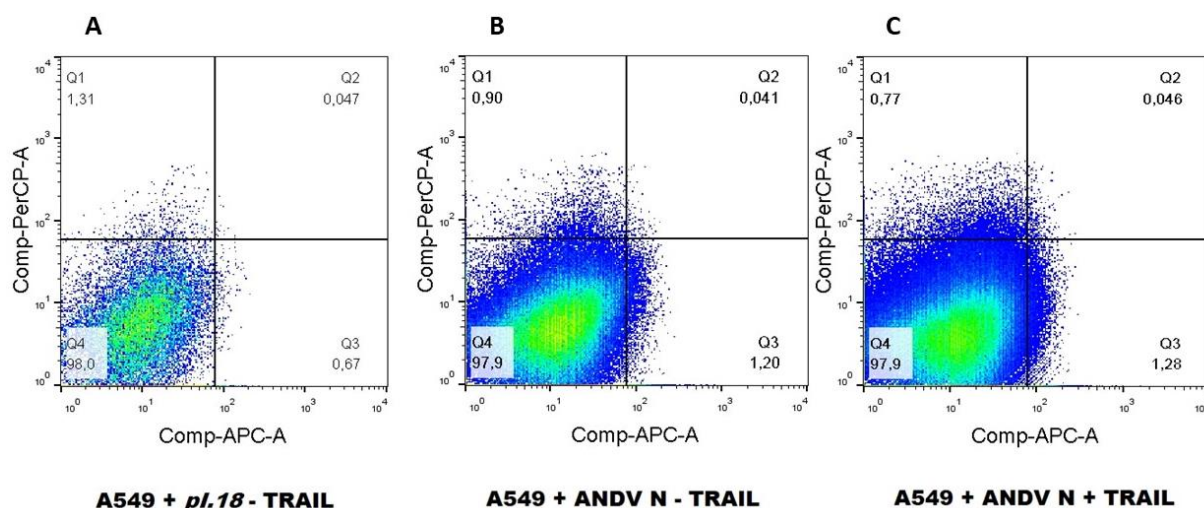


Figura 15: Detección de apoptosis mediada por TRAIL en células que expresan ANDV N.

Se estudió el efecto de TRAIL sobre la tasa de apoptosis en células A549 en presencia de ANDV N mediante tinción con anexina V/yoduro de propidio. Las células fueron transfectadas con (A) plasmidio control o (B, C) ANDV N. (A) Células transfectadas con plasmidio control en ausencia de TRAIL. (B) Células transfectadas con *pCMV/ANDV-N* en ausencia de TRAIL. (C) Células transfectadas con *pCMV/ANDV-N*, luego de 5 h post-transfección, las células fueron incubadas con 100 ng/mL de TRAIL por 24 h a 37 °C.

7.- Discusión

Las infecciones virales pueden inducir o inhibir la apoptosis celular, dependiendo de su relación con el hospedero, en lo cual influye directamente si la infección es crónica o aguda. Para muchas infecciones virales agudas, la inducción de apoptosis al final del ciclo replicativo puede ser un proceso ventajoso. Durante la apoptosis, la célula es desensamblada mediante la gemación de vesículas membranosas (blebs) y la fragmentación celular, lo cual produce cuerpos apoptóticos, que contienen la progenie viral, los que son rápidamente ingresados a células vecinas fagocíticas (revisado en Elmore, 2007); este proceso limita en gran medida la respuesta inflamatoria y permite que la infección se esparza sin ser detectada por el organismo huésped. Además, los virus encerrados dentro de los cuerpos apoptóticos están protegidos de ser inactivados por las proteasas y anticuerpos del huésped (revisado en Roulston y col., 1999). Por otro lado, en muchas infecciones crónicas, la inhibición de la apoptosis resulta crucial para prevenir la muerte prematura de la célula huésped infectada, lo que en muchos casos se relaciona con una progenie viral reducida o ausente, contribuyendo al establecimiento de una infección persistente o latente. Esto a su vez, permite escapar la vigilancia inmune del huésped. Es en este contexto que la inducción o inhibición de la apoptosis puede favorecer directamente al establecimiento de la infección y patogénesis viral (revisado en O'Brien, 1998; Roulston y col., 1999; Thomson, 2001; Zhou y col., 2017).

Los receptores de muerte ubicados en la membrana plasmática de las células transmiten señales apoptóticas de la respuesta inmune innata frente a infecciones virales. Entre estas señales se ha reconocido que TRAIL posee un rol importante en la inducción de apoptosis de células infectadas, pero no en las células sanas, mediante su

unión a sus receptores de muerte, como DR5 (revisado en Cummins & Badley, 2009; Gyurkovska & Ivanovska 2016). Como contra-respuesta los virus han evolucionado mecanismos para contraatacar la respuesta apoptótica inducida por TRAIL, ya sea bloqueando la expresión de DR5, el receptor como tal, o la cascada de señalización de DR5 unido a su ligando TRAIL (Thome y col., 1997; Benedict y col., 2001; Garnett y col., 2006; Du y col., 2009; Cummins & Badley, 2009; Smith y col., 2013; Gyurkovska & Ivanovska 2016; Zhou y col., 2017) inhibiendo de esta forma la apoptosis mediada por TRAIL en células infectadas. Por otro lado, se ha demostrado que virus como HBV pueden modular la inducción de apoptosis mediada por TRAIL en células no infectadas, específicamente en linfocitos T CD8 contra HBV (Peppia y col., 2013), induciendo de esta manera positivamente a la apoptosis de células sanas y a su vez bloqueando la respuesta inmune contra HBV.

En cuanto a los hantavirus, no existe consenso acerca de si las infecciones inducen o inhiben apoptosis, pues se ha reportado data que afirma ambos escenarios (Kang y col., 1999; Markotic y col., 2003; Khaiboullina y col., 2004; Li y col., 2004; Li y col., 2005; Hardestam y col., 2005; Klingström y col., 2006; Taylor y col., 2009a; Taylor y col., 2009b; Ontiveros y col., 2010; Khaiboullina y col., 2013; Gupta y col., 2013; Hussein & Mir, 2013). Es en este contexto que en este seminario de título se buscó analizar si infecciones por hantavirus, simuladas por la expresión de las proteínas virales, producen un efecto sobre DR5 y su respuesta apoptótica mediada por TRAIL.

Los resultados obtenidos en células epiteliales de pulmón humano A549, muestran que la expresión de las proteínas estructurales de hantavirus, N, Gn y Gc no alteraron la expresión total de DR5 a nivel transcripcional ni tampoco a nivel traduccional (figuras 6, 11D – 12F, 13A). Sin embargo, la expresión de la nucleoproteína viral indujo

un aumento significativo de DR5 en la superficie celular (figuras 12S–T, 13B). Este efecto fue altamente específico puesto que no se observó con la expresión de otras proteínas de los hantavirus, tales como las glicoproteínas Gn y Gc, ni tampoco con la expresión de proteínas de otros virus (VSVg).

En cuanto a la modulación de la localización de DR5 en la superficie celular mediada por virus, se ha observado un incremento en la presencia de este receptor en la superficie de linfocitos T CD4+ de pacientes infectados con VIH en comparación con pacientes no infectados, con lo cual se induce la apoptosis mediada por TRAIL y DR5 (Lum y col., 2001), más aún, se ha mostrado que dicho aumento de DR5 en la superficie requiere de la interacción de la glicoproteína 120 (gp120) con el linfocito CD4 (Herbeuval y col., 2005).

A su vez, se ha reportado que el virus respiratorio sincicial (RSV) produce un aumento de DR4 y DR5 en la superficie de células A549, en el mismo estudio posteriormente se agregó una alta concentración de TRAIL exógeno (500 ng/mL), en conjunto con un anticuerpo específico para TRAIL que aumenta su actividad mediante *cross-linking* e incrementa su concentración local; con ello se logró inducir apoptosis mediada por TRAIL en estas células (Kotelkin y col., 2003).

Por otra parte, las proteínas E3 de los adenovirus regulan negativamente los receptores de muerte DR4 y DR5 en la superficie de células de adenocarcinoma colorrectal humano HT29, bloqueando de esta manera la apoptosis mediada por TRAIL. (Benedict y col., 2001).

En el caso del herpesvirus humano 7 (HHV-7), se ha demostrado que induce una regulación negativa de DR4 en la superficie de linfocitos CD4+ infectados, sin afectar la

expresión de DR5, además de producir un aumento en la expresión de TRAIL, lo cual contribuye a la inducción de apoptosis mediada por TRAIL en los linfocitos CD4+ circundantes, pero no en aquellos infectados (Secchiero y col., 2001).

El hecho de que en este trabajo se haya observado que la sobreexpresión de la nucleoproteína de ANDV incrementó la presencia de DR5 en la membrana plasmática de células A549 sugiere que, en presencia de señales apoptóticas extrínsecas podría inducirse apoptosis en células infectadas por hantavirus. Sin embargo, en este seminario de título, no se logró dar respuesta a esta interrogante, puesto que la detección de apoptosis celular careció de un control positivo que permitiese una correcta interpretación de los resultados.

En el caso hipotético de que no se haya inducido apoptosis en células A549 que sobre-expresan ANDV N, esto se podría comparar con estudios previos que muestran que a pesar de haber un incremento en la expresión o localización de DR5, no necesariamente se va a desencadenar la apoptosis celular (Gomez-Benito y col., 2007; Song y col., 2007; Ouyang y col., 2011). Por otra parte, recientemente se han identificado rutas de señalización no canónicas para TRAIL y sus receptores de muerte; además de la ruta de muerte celular, se ha mostrado que DR5 puede activar cascadas de señalización que tienen que ver con proliferación y supervivencia celular (revisado en Azijli y col., 2013). A su vez, el análisis de un conjunto de células cancerígenas de pulmón no pequeñas (NSCLC), muestra que la mayoría de estas células son parcial o completamente resistentes a TRAIL, entre ellas las células A549 (Song y col., 2007; Chen y col., 2017). Es en este contexto, si en un futuro no se llegase a detectar inducción de apoptosis mediada por TRAIL, los próximos experimentos se deberían realizar con una concentración de TRAIL exógeno de 100 a 500 ng/mL y combinarlo con un

anticuerpo anti-TRAIL que aumente su concentración local. Alternativamente, los experimentos futuros deberían realizarse en otro tipo celular, como, por ejemplo, en células primarias tales como HUVEC.

En este trabajo se escogieron las células A549 que corresponden a células epiteliales de pulmón humano, perteneciendo al grupo de células cancerígenas de pulmón no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), debido a su alto nivel de expresión de DR5 comparado con otras líneas celulares en las cuales se encontró un menor nivel de expresión (células HeLaS3 y HEK293FT) o no detectable por *western blot* con un anticuerpo anti-DR5 humano, ni por RT-PCR (células Vero E6 y CHO) (figura 4). Además, las células A549 pueden ser infectadas por hantavirus (Levine y col., 2010), por lo que son comúnmente utilizadas como modelo de infección, mientras que las células HeLaS3 y HEK293FT no son susceptibles ante una infección por hantavirus (Cifuentes y col., 2010; datos del laboratorio aún no publicados).

En un estudio previo realizado por nuestros colaboradores, se ha observado que en células HUVEC infectadas por el hantavirus HTNV, ocurre una disminución de DR5 en membrana plasmática, con lo cual se observó una inhibición de la apoptosis mediada por TRAIL.

Sin embargo, de acuerdo a la revisión bibliográfica presentada aquí en relación a la respuesta de las células frente a TRAIL, ésta puede variar dependiendo de distintos factores, tales como las células, la especie de hantavirus y los procedimientos (infección o transfección) que se realicen para llevar a cabo el estudio. Además, es importante destacar es que la expresión y localización de DR5 son elementos necesarios, pero no suficientes para provocar apoptosis mediada por TRAIL.

8.- Conclusiones

- La sobreexpresión de la nucleoproteína del virus Andes en células A549 aumenta la localización de DR5 en la superficie celular.
- La falta de un control positivo de apoptosis en células A549 no permite concluir si la sobreexpresión de la nucleoproteína de virus Andes influye en la inducción o en la inhibición de la apoptosis mediada por TRAIL.

9.- Bibliografía

- Acuña R., Bignon E.A., Mancini R., Lozach P.Y., Tischler N.D. 2015. Acidification triggers Andes hantavirus membrane fusion and rearrangement of Gc into a stable post-fusion homotrimer. *Journal of General Virology*. 96: 3192–3197.
- Albornoz A., Hoffman A.B., Lozach P.Y., Tischler N.D. 2016. Early Bunyavirus-Host Cell Interactions. *Viruses*. 8 (5): 143.
- Azijli K., Weyhenmeyer B., Peters G.J., de Jong S., Kruyt F.A. 2013. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death and Differentiation*. 20 (7): 858–868.
- Battisti A.J., Chu Y.K., Chipman P.R., Kaufmann B., Jonsson C.B., Rossmann M.G. 2011. Structural studies of Hantaan virus. *Journal of Virology*. 85: 835–841.
- Beg A.A., Ruben S.M., Scheinman R.I., Haskill S., Rosen C.A., Baldwin Jr A.S. 1992. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes & Development*. 6(10): 1899–1913.
- Benedict C.A., Norris P.S., Prigozy T.I., Bodmer J.L., Mahr J.A., Garnett C.T., Martinon F., Tschopp J., Gooding L.R., Ware C.F. 2001. Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 3270–3278.
- Brincks E.L., Katewa A., Kucaba T.A., Griffith T.S., Legge K.L. 2008. CD8 T Cells Utilize TRAIL to Control Influenza Virus Infection. *The Journal of Immunology*. 181 (7): 4918–4925.
- Buranda T., BasuRay S., Swanson S., Agola J., Bondu V., Wandinger-Ness A. 2013. Rapid parallel flow cytometry assays of active GTPases using effector beads. *Analytical Biochemistry*. 442: 149–157.
- Centers for Disease Control and Prevention [en línea]. <<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>> [Consulta: octubre de 2017].
- Chen Y., Zhou X., Qiao J., Bao A. 2017. Autophagy is a regulator of TRAIL-induced apoptosis in NSCLC A549 cells. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 11 (3): 219–226.
- Chiang C.F., Flint M., Lin J.M., Spiropoulou C.F. 2016. Endocytic Pathways Used by Andes Virus to Enter Primary Human Lung Endothelial Cells. *PLoS ONE* 11 (10): e0164768.
- Choi Y., Kwon Y.C., Kim S.I., Park J.M., Lee K.H., Ahn B.Y. 2008. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology*. 25; 381(2):178-83.
- Cifuentes-Muñoz N., Darlix J.L., Tischler N.D. 2010. Development of a lentiviral vector system to study the role of the Andes virus glycoproteins. *Virus Research*. 153 (1): 29–35.

Clarke P., Meintzer S.M., Gibson S., Widmann C., Garrington T.P., Johnson G.L., Tyler K. L. 2000. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *Journal of Virology*. 74: 8135–8139.

Cifuentes-Muñoz N., Darlix J.L., Tischler N.D. 2010. Development of a lentiviral vector system to study the role of the Andes virus glycoproteins. *Virus Research*. 153 (1): 29–35.

Cifuentes-Muñoz N., Barriga G.P., Valenzuela P.D., Tischler N.D. 2011. Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andes virus Gc protein are essential for membrane fusion and infection. *Journal of General Virology*. 92: 552–563.

Cifuentes-Muñoz N., Salazar-Quiroz N., Tischler N.D. 2014. Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses* 6: 1801–1822.

Clarke P., Meintzer S.M., Gibson S., Widmann C., Garrington T.P., Johnson G.L., Tyler K.L. 2000. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *Journal of Virology*. 74 (17): 8135–8139.

Collison A., Foster P.S., Mattes J. 2009. Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 36: 1049–1053.

Cummings B.S., Kinsey G.R., Bolchoz L.J., Schnellmann R.G. 2004. Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 310 (1):126–134.

Cummins N., Badley A. 2009. The TRAIL to Viral Pathogenesis: The Good, the Bad and the Ugly. *Current Molecular Medicine*. 9 (4): 495–505.

Deng Z., Yan H., Hu J., Zhang S., Peng P., Liu Q., Guo D. 2012. Hepatitis C Virus Sensitizes Host Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Up-Regulating DR4 and DR5 via a MEK1-Dependent Pathway. *PLoS One* 7(5): e37700.

Du J., Liang X., Liu Y., Qu Z., Gao L., Han L., Liu S., Cui M., Shi Y., Zhang Z., Yu L., Cao L., Ma C., Zhang L., Chen Y., Sun W. 2009. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death & Differentiation*. 16: 219–229.

Dunn C., Brunetto M., Reynolds G., Christophides T., Kennedy P.T., Lampertico P., Das A., Lopes A.R., Borrow P., Williams K., Humphreys E., Afford S., Adams D.H., Bertolotti A., Maini M.K. 2007. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *Journal of Experimental Medicine*. 204 (3): 667–680.

Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35: 495–516.

Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M., Lee J.C., Young P.R. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 14363–14367.

- Falschlehner C., Schaefer U., Walczak H. 2009. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. 127: 145–154.
- Garnett T.O., Filippova M., Duerksen-Hughes P.J. 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 13: 1915–1926.
- Gavrilovskaya I.N., Shepley M., Shaw R., Ginsberg M.H., Mackow E.R. 1998. Beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 95 (12):7074–7079.
- Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R. 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *Journal of Virology*. 73 (5): 3951–3959.
- Genecards. Human Gene Database. [En línea] <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF10B&keywords=DR5>> [consulta: agosto de 2016].
- Godoy P., Marsac D., Stefan E., Ferrer P., Tischler N.D., Pino K., Ramdohr P., Vial P., Valenzuela, P.D.T., Ferrés M., Veas F., López-Lastra M. 2009. Andes virus antigens are shed in urine of patients with acute hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Journal of Virology*, 83(10): 5046–5055.
- Gómez-Benito M, Martínez-Lorenzo M.J., Anel A., Marzo I., Naval J. 2007. Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Experimental Cell Research*. 313 (11): 2378–2388.
- Gonzalez F., Ashkenazi A. 2010. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*. 29: 4752–4765.
- Gougeon M.L., Herbeuval J.P. 2012. IFN- α and TRAIL: a double edge sword in HIV-1 disease? *Experimental Cell Research* 318: 1260–1268.
- Gupta S., Braun M., Tischler N.D., Stoltz M., Sundström K.B., Björkström N.K., Ljunggren H., Klingström J. 2013. Hantavirus-infection Confers Resistance to Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003272.
- Gyurkovska V., Ivanovska N. 2016. Distinct roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in viral and bacterial infections: from pathogenesis to pathogen clearance. *Inflammation Research*. 65: 427–437.
- Hardestam J., Klingström J., Mattsson K., Lundkvist A. 2005. HFRS causing hantaviruses do not induce apoptosis in confluent Vero E6 and A549 cells. *Journal of Medical Virology*. 76 (2): 234–240.
- Hasegawa M., Kawase K., Inohara N., Imamura R., Yeh W.C., Kinoshita T., Suda T. 2007. Mechanism of ASC-mediated apoptosis: Bid-dependent apoptosis in type II cells. *Oncogene*. 26: 1748–1756.
- Hayden M.S., Ghosh S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*. 18(18): 2195–2224.

Hepojoki J., Strandin T., Vaheri A., Lankinen H. 2010. Interactions and oligomerization of hantavirus glycoproteins. *Journal of Virology*. 84: 227–242.

Herbeuval J.P., Grivel J.C., Boasso A., Hardy A.W., Chougnet C., Dolan M.J., Yagita H., Lifson J.D., Shearer G.M. 2005. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 106 (10): 3524–3531.

Heyman P., Vaheri A., Lundkvist A., Avsic-Zupanc T. 2009. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 7(2): 205–217.

Hooper J.W., Larsen T., Custer D.M., Schmaljohn C.S. 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*. 289: 6–14.

Huiskonen J.T., Hepojoki J., Laurinmaki P., Vaheri A., Lankinen H., Butcher S.J., Grunewald K. 2010. Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *Journal of Virology*. 84: 4889–4897.

Hussein I.T.M., Mir M.A. 2013. How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication?. *Frontiers in Bioscience, Elite*. 5: 154–166.

International Comitee of Taxonomy of Viruses. [En línea] <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Consultado en agosto de 2017.

Jin M., Park J., Lee S., Park B., Shin J., Song K.J., Ahn T.I., Hwang S.Y., Ahn B.Y., Ahn K. 2002. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*. 1; 294 (1): 60–69.

Jonsson C.B., Schmaljohn C.S. 2001. Replication of hantaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 256: 15–32.

Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 23: 412–441.

Kang J.I., Park S.H., Lee P.W., Ahn B.Y. 1999. Apoptosis is induced by hantaviruses in cultured cells. *Virology*. 264 (1): 99–105.

Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A., Otteson E., Miyazato A., Maciejewski J., Jeor S.S. 2004. Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by sin nombre and prospect hill viruses. *Viral Immunology*. 17 (2): 234–251.

Khaiboullina S.F., Morzunov S.P., Boichuk S.V., Palotás A., Jeor S.S., Lombardi V.C., Rizvanov A.A. 2013. Death-domain associated protein-6 (DAXX) mediated apoptosis in hantavirus infection is counter-balanced by activation of interferon-stimulated nuclear transcription factors. *Virology*. 443: 338–348.

Klingström J., Hardestam J., Stoltz M., Zuber B., Lundkvist A., Linder S., Ahlm C. 2006. Loss of cell membrane integrity in Puumala hantavirus-infected patients correlates with levels of epithelial cell apoptosis and perforin. *Journal of Virology*. 80 (16): 8279–8282.

Kohlhaas S.L., Craxton A., Sun X.M., Pinkoski M.J., Cohen G.M. 2007. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 12831–12841.

- Korteweg C., Gu J. 2008. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *The American Journal of Pathology*. 172: 1155–1170.
- Kotelkin A., Prikhod'ho E.A., Cohen J.I., Collins P.L., Bukreyev A. 2003. Respiratory Syncytial Virus Infection Sensitizes Cells to Apoptosis Mediated by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *Journal of Virology*. 77 (17): 9156–9172.
- Krautkrämer E., Zeier M. 2008. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). *Journal of Virology*. 82 (9):4257–4264.
- Kukkonen S.K., Vaheri A., Plyusnin A. 2005. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Archives of Virology*. 150 (3): 533–556.
- Lee H., van der Groen G. (1989) Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Progress in Medical Virology*. 36: 62–102.
- Levine J.R., Prescott J., Brown K.S., Best S.M., Ebihara H., Feldmann H. 2010. Antagonism of type I interferon responses by new world hantaviruses. *Journal of Virology*. 84 (22):11790–11801.
- Li X.D., Mäkelä T.P., Guo D., Soliymani R., Koistinen V., Vapalahti O., Vaheri A., Lankinen H. 2002. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *Journal of General Virology*. 83: 759–766.
- Li X.D., Kukkonen S., Vapalahti O., Plyusnin A., Lankinen H., Vaheri A. 2004. Tula hantavirus infection of Vero E6 cells induces apoptosis involving caspase 8 activation. *Journal of General Virology*. 85(11): 3261–3268.
- Li X.D., Lankinen H., Putkuri N., Vapalahti O., Vaheri A. 2005. Tula hantavirus triggers pro-apoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells. *Virology*. 333 (1):180–189.
- Lober C., Anheier B., Lindow S., Klenk H.D., Feldmann H. 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology*. 289: 224–229.
- Lopez N., Padula P., Rossi C., Lazaro M., Franze-Fernandez M. 1996. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology*. 220: 223–226.
- Lum J.J., Pilon A.A., Sanchez-Dardon J., Phenix B.N., Kim J.E., Mihowich J., Jamison K., Hawley-Foss N., Lynch D.H., Badley A.D. 2001. Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T cells by TRAIL/Apo2L. *Journal of Virology*. 75: 11128–11136.
- Macneil A., Nichol S., Spiropoulou C. 2011. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*. 162: 138–147.
- Markotic A., Hensley L., Geisbert T., Spik K., Schmaljohn C. 2003. Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *Journal of General Virology*. 84 (8): 2197–2202.

- Martinez V.P., Bellomo C.M., Cacace M.L., Suarez P., Bogni L., Padula P.J. 2010. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina, 1995–2008. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1853–1860.
- Martinez-Valdebenito C., Calvo M., Vial C., Mansilla R., Marco C., Palma R.E., Vial P.A., Valdivieso F., Mertz G., Ferrés M. 2014. Person-to-Person Household and Nosocomial Transmission of Andes Hantavirus, Southern Chile, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 20 (10): 1629–1636.
- Matthys V.S., Gorbunova E.E., Gavrilovskaya I.N., Mackow E.R. 2010. Andes virus recognition of human and Syrian hamster beta3 integrins is determined by an L33P substitution in the PSI domain. *Journal of Virology*. 84: 352–360.
- McAllister R.C., Jonsson C.B. 2014. Hantaviruses: past, present and future. *Future Virology*. 9 (1): 87–99.
- Meyer B. J., Schmaljohn C. S. 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends in microbiology*. 8 (2): 61–67.
- Mir M. A., Panganiban A. T. 2004. Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle. *Journal of Virology*. 78 (15): 8281–8288.
- Mir M.A., Brown B., Hjelle B., Duran W.A., Panganiban A.T. 2006. Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA panhandle. *Journal of Virology*. 80 (22): 11283–11292.
- Mir M.A., Duran W.A., Hjelle B.L., Ye C., Panganiban A.T. 2008. Storage of cellular 5' ARNm caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49): 19294–19299.
- Mir M.A., Panganiban A.T. 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO Journal* 27: 3129–3139.
- Miot C., Beaumont E., Duluc D., Le Guillou-Guillemette H., Preisser L., Garo E., Blanchard S., Hubert-Fouchard I., Creminon C., Lamourette P., Fremaux I., Cales P., Lunel-Fabiani F., Boursier J., Braum O., Fickenscher H., Roingard P., Deineste Y., Jeannin P. 2015. IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut*. 64: 1466–1475.
- Mou DL, Wang YP, Huang CX, Li GY, Pan L, Yang WS, Bai XF. 2006. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 13; 339 (2): 611–617.
- Muller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 264: 1918 – 1921.
- O'Brien V. 1998. Viruses and Apoptosis. *Journal of General Virology*. 79: 1833–1845.
- Ontiveros S.J., Li Q., Jonsson C.B. 2010. Modulation of apoptosis and immune signaling pathways by the Hantaan virus nucleocapsid protein. *Virology* 401 (2): 165–178.

Ouyang W., Yang C., Liu Y., Xiong J., Zhang J., Zhong Y., Zhang G., Zhou F., Zhou Y., Xie C. 2011. Redistribution of DR4 and DR5 in lipid rafts accounts for the sensitivity to TRAIL in NSCLC cells. *International Journal of Oncology*. 39 (6): 1577–1586.

Padula P. J., Edelstein A., Miguel S. D. L., López N. M., Rossi C. M., Rabinovich R. D. 1998. Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus. *Virology* 241: 323–330.

Peppas D., Gill U.S., Reynolds G., Easom N.J., Pallett L.J., Schurich A., Micco L., Nebbia G., Singh H.D., Adams D.H., Kennedy P.T., Maini M.K. 2013. Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *Journal of Experimental Medicine*. 210 (1): 99–114.

Petersen J., Drake M.J., Bruce E.A., Riblett A.M., Didigu C.A., Wilen C.B., Malani N., Male F., Lee F.H., Bushman F.D., Cherry S., Doms R.W., Bates P., Briley K. 2014. The major cellular sterol regulatory pathway is required for Andes virus infection. *PLoS Pathogens*. 10: e1003911.

Pettersson R.F., Melin L. 1996. S Synthesis, Assembly, and Intracellular Transport of Bunyaviridae Membrane Proteins. In: Elliot R.M. (ed) *The Bunyaviridae* pp 159–188. Plenum Press, New York.

Raftery M.J., Lalwani P., Krautkrmer E., Peters T., Scharffetter-Kochanek K., Krüger R, Hofmann J., Seeger K., Krüger D.H., Schönrich G. 2014. β 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*. 211: 1485–1497.

Ramanathan H.N., Jonsson C.B. 2008. New and OldWorld hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology*. 374: 138–150.

Reguera J., Weber F., Cusack S. 2010. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathogens* 6 (9): e1001101.

Roulston A., Marcellus R.C., Branton P. 1999. Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology*. 53:577–628.

Sato K., Hida S., Takayanagi H., Yokochi T., Kayagaki N., Takeda K., Yagita H., Okomura K., Tanaka N., Taniguchi T., Ogasawara K. 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN- α /beta. *European Journal of Immunology*. 31: 3138–3146.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K., Krammer P.H., Peter M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* 17 (6): 1675–1687.

Schmaljohn C.S., Schmaljohn A.L., Dalrymple J.M. 1987. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*. 157: 31–39.

Schmaljohn C., Elliott, R.M. 2014. Bunyaviridae. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe D.M., Howley P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. 1: 1244–1282.

Schnitzer S.E., Schmid T., Zhou J., Brüne B. 2006. Hypoxia and HIF-1 α protect A549 cells from drug-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 13 (9): 1611–1163.

Secchiero P., Mirandola P., Zella D., Celeghini C., Gonelli A., Vitale M., Capitani S., Zauli G. 2001. Human herpesvirus 7 induces the functional up-regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) coupled to TRAIL-R1 down-modulation in CD4(+) T cells. *Blood*. 98 (8): 2474–2481.

Smith W., Tomasec P., Aicheler R., Loewendorf A., Nemčovičová I., Wang E.C., Stanton R.J., Macauley M., Norris P., Willen L., Ruckova E., Nomoto A., Schneider P., Hahn G., Zajonc D.M., Ware C.F., Wilkinson G.W., Benedict C.A. 2013. Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. *Cell Host Microbe*. 13 (3): 324–335.

Song J.H., Tse M.C., Bellail A., Phuphanich S., Khuri F., Kneteman N.M., Hao C. 2007. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Research*. 67 (14): 6946–6955.

Spierings D.C., de Vries E.G., Vellenga E., van den Heuvel F.A., Koornstra J.J., Wesseling J., Hollema H., de Jong S. 2004. Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 52(6): 821–831.

Stegmann K.A., Bjorkstrom N.K., Veber H., Ciesek S., Riese P., Wiegand J., Hadem J., Suneetha P.V., Jaroszewicz J., Wang C., Schlaphoff V., Fyttili P., Cornberg M., Manns M., Geffers R., Pietschmann T., Guzmán C.A., Ljunggren H.G., Wedemeyer H. 2010. Interferon- α -induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 138: 1885–1897.

Sträter J., Walczak H., Pukrop T., Von Müller L., Hasel C, Kornmann M., Mertens T., Möller P. 2002. TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology*. 122: 659–666.

Taylor S.L., Frias-Staheli N., Garcia-Sastre A., Schmaljohn C.S. 2009a. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin α proteins and inhibits tumor necrosis factor α -induced activation of nuclear factor κ B. *Journal of Virology*. 83 (3): 1271–1279.

Taylor S.L., Krempel R.L., Schmaljohn C.S. 2009b. Inhibition of TNF- α -induced activation of NF- κ B by hantavirus nucleocapsid proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1171 (1): 86–93.

Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinel E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schröter M., Scaffidi C., Krammer P.H., Peter M.E., Tschopp J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 386 (6624): 517–521.

Thomson B.J. 2001. Viruses and Apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*. 82: 65–76.

- Tischler N.D., Gonzalez A., Perez-Acle T., Roseblatt M., Valenzuela P.D. 2005. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *Journal of General Virology*. 86: 2937–2947.
- Tischler N.D., Roseblatt M., Valenzuela P.D. 2008. Characterization of cross-reactive and serotype-specific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virus Research*. 135 (1): 1–9.
- Trinchieri G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *Journal of Experimental Medicine*. 207 (10): 2053–2063.
- Vaheri A., Mills J.N., Spiropoulou C., Hjelle B. 2011. Hantaviruses. *Zoonoses - biology, clinical practice and public health*. Oxford University Press. 2: 307–322.
- Vaheri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Mäkela S., Mustonen J. 2013. Uncovering the mysteries of hantavirus infection. *Nature Reviews | Microbiology*. 11: 539–550.
- Vidalain P.O., Azocar O., Lamouille B., Astier A., Rabourdin-Combe C., Servedelprat C. 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *Journal of Virology*. 74: 556–559.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell & Death Differentiation*. 10 (1): 45–65.
- Wang Y., Yang H., Liu H., Huang J., Song X. 2009. Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC Cancer*. 9: 174.
- Wang H., Alminaita A., Vaheri A., Plyusnin A. 2010. Interaction between hantaviral nucleocapsid protein and the cytoplasmic tail of surface glycoprotein Gn. *Virus Research*. 151: 205–212.
- Wells R.M., Young J., Williams R.J., Armstrong L.R., Busico K., Khan A.S., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Zaki S.R., Nichol S.T., Peters C.J. 1997. Hantavirus transmission in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 3: 361–365.
- Yamamoto N., Gupta A., Xu M., Miki K., Tsujimoto Y., Tsuchiya H., Tomita K., Moossa A.R., Hoffman R.M. 2003. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells. *Cancer Gene Therapy*. 10 (6): 445–450.
- Zhang Y., Yoshida T. Zhang B. 2009. TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 8: 917–922.
- Zhou X., Jiang W., Liu Z., Liu S., Liang X. 2017. Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*. 9 (11): 316.