

30. Virología Molecular

Patogenicidad viral de cepas del virus de arteritis equina en la activación de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis.

Autor: Colina, Santiago Emanuel; santiago_07colina@hotmail.com

Orientador: Metz, Germán Ernesto; germanmetz@fcv.unlp.edu.ar

Laboratorio de Virología/Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Resumen

La apoptosis se considera un componente vital de varios procesos fisiológicos normales de las células. Se ha encontrado que un gran número de virus modulan el proceso de muerte celular programada o apoptosis de las células que infectan. Las dos vías mejor caracterizadas y estudiadas son la vía intrínseca y la vía extrínseca de apoptosis celular. Dentro de los virus que han encontrado una ventaja en la inducción de este mecanismo, se destacan los de genoma ARN (Archambault & St-Laurent, 2000; Koyama, 1995; Lin *et al.*, 2002; Maestre *et al.*, 2011; St-Louis *et al.*, 2007; Sur *et al.*, 1998; Thomson, 2001).

El virus de arteritis equina (VAE) es un virus ARN de importancia en medicina veterinaria equina en el cual se ha asociado la infección *in vitro* por este virus con la inducción del proceso de muerte celular (Archambault & St-Laurent, 2000).

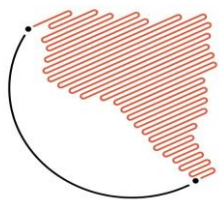
El siguiente trabajo busca analizar los cambios morfológicos observados *in vitro* y correlacionarlos con cambios moleculares ocurridos en las células infectadas durante el proceso de muerte celular programada o apoptosis.

Palabras claves: Patogenicidad, Apoptosis, Virosis Veterinaria.

Introducción

La apoptosis se considera un componente vital de varios procesos fisiológicos normales de las células, como ser el recambio celular o la activación de

diversos procesos patológicos ante la exposición a diversos agentes biológicos como los virus (Kvansakul, 2017; Norbury & Hickson, 2001).



En general la muerte de las células luego de las infecciones virales se cree que es consecuencia de la usurpación de la maquinaria celular por parte de los virus en su intento de generar una progenie viral tras la consecuente ruptura de la membrana plasmática y la liberación de estas partículas virales al medio. Sin embargo, se ha encontrado que un gran número de virus modulan el proceso de muerte celular programada o apoptosis de las células que infectan.

Independiente de la causa que da origen a la apoptosis, se han identificado diversos cambios morfológicos en las células en las cuales se ha iniciado dicho proceso (Hacker, 2000; Jayakiran, 2015). En el comienzo, se observa una contracción celular y una condensación nuclear o picnosis. Por otro lado, en estadios finales se observa un proceso de fragmentación celular en cuerpos apoptóticos (*budding*) (Kerr *et al.*, 1972). Estos últimos consisten en estructuras citoplasmáticas con o sin organelas, delimitados por una membrana plasmática intacta.

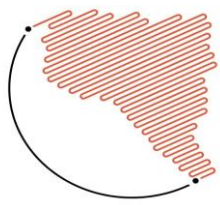
Entre los numerosos cambios a nivel molecular que ocurren en las células en apoptosis, la activación de diversas enzimas denominadas caspasas, es uno de los cambios moleculares característicos de este proceso. Dicha activación lleva a una cascada enzimática

de reacciones químicas que conduce a la muerte celular (Jayakiran, 2015).

El proceso de señalización y reacciones químicas que lleva a la muerte celular por apoptosis tiene varios caminos bien definidos. Cabe destacar que las dos vías mejor caracterizadas y estudiadas son la vía intrínseca y la vía extrínseca de apoptosis celular.

La vía de señalización extrínseca implica interacciones mediadas por receptores transmembrana o “receptores de la muerte” (Kolb *et al.*, 2017; Locksley *et al.*, 2001). La unión del ligando de Fas al receptor Fas, resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD, y la unión del factor de necrosis tumoral (TNF) a su receptor da como resultado la unión de la proteína adaptadora TRADD (Grimm *et al.*, 1996; Wajant, 2002). La proteína FADD, se asocia con la procaspasa-8 a través de la dimerización del dominio de la muerte. En este punto está formado el complejo de señalización de inducción de la muerte (DISC), lo que resulta en la activación autocatalítica de la procaspasa-8 (Kischkel *et al.*, 1995). La caspasa-8 activa puede iniciar la fase ejecutora de la apoptosis.

Por otro lado, la vía intrínseca requiere la existencia de estímulos originados dentro de las mismas células siendo la mitocondria el eje central de dichas señales (Kolb *et al.*, 2017). Estas señales



intracelulares pueden actuar tanto de manera positiva como negativa.

Existen muchas proteínas que regulan esta vía siendo la familia de proteínas Bcl-2 una de las más importantes (Siddiqui *et al.*, 2015). Con actividad proapoptótica, algunos miembros importantes son el citocromo c, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi (Cai *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2006; van Loo *et al.*, 2002). El citocromo c se une a Apaf-1 formando el apoptosoma cuya finalidad es activar a la procaspasa-9 (Hill *et al.*, 2004), mientras que Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis mediante la inhibición de la actividad de IAP (proteínas inhibitoras de la apoptosis) (Jayakiran, 2015; van Loo *et al.*, 2002).

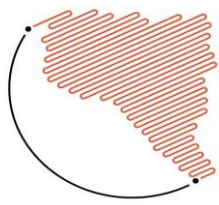
Tanto la vía extrínseca como la intrínseca, terminan en un punto común denominado "fase de ejecución", considerada la ruta final de la apoptosis. Esta fase comienza con la activación de las caspasas efectoras -3, -6, y -7. Estas caspasas activan endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material nuclear, como así también proteasas que degradan las proteínas nucleares y del citoesqueleto. De esta manera se manifiestan los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas (Nagata, 2018; Slee *et al.*, 2001).

Los virus al ingresar en las células han desarrollado diversos mecanismos a partir

de los cuales modulan la vía de muerte celular por apoptosis. Dentro de los virus que han encontrado una ventaja en la inducción de este mecanismo, se destacan los de genoma ARN (Thomson, 2001; Maestre *et al.*, 2011; St-Louis *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2002; Archambault & St-Laurent, 2000; Sur *et al.*, 1998; Koyama, 1995). La ventaja para una partícula viral de inducir esta muerte celular luego de la infección sería permitir la rápida fagocitosis de las células infectadas por parte del sistema inmune innato, evitando así una respuesta inflamatoria en el sitio de la infección y retrasando la respuesta inmune específica hacia el virus (Koyama *et al.*, 2000).

El virus de arteritis equina (VAE) es un virus ARN de importancia en medicina veterinaria equina en el cual se ha asociado la infección *in vitro* con la inducción del proceso de muerte celular (Archambault & St-Laurent, 2000). Incluso en virus de la misma familia viral como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) se ha asociado al fenómeno de inducción de apoptosis con la patogenia de este virus tanto *in vivo* como *in vitro* (Costers *et al.*, 2008; Karniychuk *et al.*, 2011; Labarque *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Sur *et al.*, 1998).

Las infecciones *in vivo* del VAE generan lisis de las pequeñas arteriolas y vénulas



de los animales que infectan. Este signo clínico característico y que da nombre a la enfermedad arteritis viral equina (AVE), podría ser consecuencia de la inducción de la apoptosis en las infecciones por el VAE (Abeyá *et al.*, 2018).

Por ello, nuestro trabajo será estudiar cambios morfológicos y moleculares asociados a la apoptosis con dos cepas de diferente patogenicidad del VAE.

Objetivos

El objetivo del trabajo es analizar si existen diferencias morfológicas y moleculares asociados a la apoptosis en cultivos de células BHK-21 infectados con una cepa patogénica y no patogénica del VAE.

Materiales y Métodos

Titulación viral.

En los diferentes ensayos se emplearon dos cepas del VAE de diferente patogenicidad: cepa de referencia Bucyrus de alta patogenicidad y la cepa LP01 de baja patogenicidad aislada en nuestro laboratorio.

Se realizaron diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} a 10^{-8} , de los inóculos virales de ambas cepas en Medio Esencial Mínimo (MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se sembraron 50 μ l de cada una de las diluciones por sextuplicado en microplaca de cultivo de 96 pocillos,

adicionando luego a cada dilución viral 100 μ l de células RK13 ($1,5 \times 10^5$ células). En los pocillos utilizados como controles de células se reemplazó el inóculo viral por medio MEM.

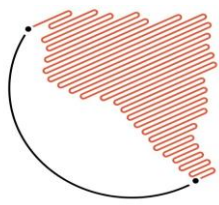
Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ y se realizó la lectura del ECP a las 72 horas. El título viral se determinó mediante el método de Reed y Muench.

Infecciones virales.

Se emplearon monocapas de células BHK-21 crecidas en placas de 6 pocillos infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 5 para ambas cepas. Las muestras para cada una de las experiencias se obtuvieron a las 24 y 48hs posinfección (hpi) dependiendo la prueba. Como controles negativos se utilizaron monocapas de células BHK-21 sin infectar mientras que como controles positivos se emplearon cultivos inducidos a la apoptosis con Staurosporina (1 μ g/ml).

Western Blot.

Se utilizaron dos pocillos de una placa de seis con células BHK-21 y se infectaron como lo mencionado anteriormente. Luego de un tiempo de infección de 48 hpi, se recogieron las células y se procesaron para ser sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%. El gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m. La misma fue incubada con un anticuerpo policlonal



positivo a arteritis del banco de sueros del laboratorio a una dilución de 1/500 por un período de 1,5hs a 37°C. Se incubó luego en las mismas condiciones con un anticuerpo secundario anti-equino conjugado con peroxidasa a una dilución de 1/1000. Se reveló la presencia de bandas características al VAE mediante el empleo de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno como sustratos de la enzima.

Cambios morfológicos asociados a apoptosis mediante tinción con Naranja de Acridina (NA) y Bromuro de Etidio (BE).

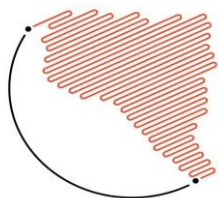
Se prepararon cubreobjetos sobre los cuales se hicieron crecer monocapas de células BHK-21. Se realizaron infecciones con ambas cepas a una MOI de 5. A las 48hpi se analizaron los diferentes cultivos (infectados, control positivo y negativo) mediante tinción con NA/BE. Brevemente, los cubreobjetos se lavaron con 1ml de PBS y posteriormente se incubaron por 5 minutos con una dilución 1/10 de una solución de NA/BE (100 mg/ml NA y 100 mg/ml BE en PBS). Se retiró el exceso de solución de coloración y se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjeto con solución de montar. Las evidencias de cambios morfológicos se observaron en microscopio de fluorescencia (Modelo BHS; Olympus System Microscope, Bio Analítica, Buenos Aires, Argentina)

El colorante BE, debido a su alto peso molecular, solo ingresa a las células cuya membrana plasmática tenga soluciones de continuidad, confiriendo una coloración anaranjada, por lo tanto su presencia es evidenciada en las células necróticas. El colorante NA es muy difusible y penetra en todas las células dotándolas de una coloración verde.

La combinación NA/BE permite caracterizar los tres estadios importantes de muerte celular: células viables (NA+/BE-: células verdes, morfología normal), células apoptóticas (NA+/BE-: células verdes, morfología típica de apoptosis) y células necróticas (NA+/BE+: células con contenido anaranjado). Es importante recalcar que, debido a que se trata de un cultivo celular, las células apoptóticas no pueden ser fagocitadas (como ocurriría en un organismo vivo), es por ello que sufren necrosis secundaria, tomando su contenido citosólico la coloración anaranjada del BE. Estas últimas células serán consideradas como apoptóticas siempre que expresen la morfología típica de esta muerte celular.

Citometría de flujo.

Las diferentes muestras se procesaron para citometría de flujo siguiendo el protocolo comercial (Thermo Fisher Scientific). El pellet celular de cada una de las condiciones de trabajo se resuspendió



en el buffer comercial, y las células fueron marcadas con 5µl Anexina V-FICT (100µg/ml, BioLegend) y 1µl Ioduro de propidio -IP- (50µg/ml, Thermo Fisher Scientific) y sometidas a citometría. Luego de 10 minutos de incubación en la oscuridad, se detectaron las señales fluorescentes emitidas por Anexina V-FITC e IP mediante un clasificador de células activadas por fluorescencia. Las señales emitidas por Anexina V-FICT fueron captadas por el filtro FL1-H, mientras que las propias del IP por el filtro FL2-H (FACScan, Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, FCE-UNLP-CONICET). Los desechos celulares fueron excluidos de los análisis por el método Scatter. Luego de analizar 10.000 eventos, los resultados se graficaron utilizando el programa informático Flow Jo.

Cuantificación de la expresión de las caspasas-3, caspasa-8 y caspasa-9 mediante qPCR.

La cuantificación se realizó mediante la técnica de qPCR. Las diferentes muestras se tomaron a partir de las infecciones con cada una de las cepas a los diferentes tiempos posinfección. Se extrajo el ARN mediante la retrotranscripción con la enzima MMLV. Se cuantificó el ARN mediante espectrometría y a partir de 1µg

de ARN con cada una de las muestras se procedió a la obtención del ADNc, con el cual se realizó la cuantificación de los diferentes genes relacionados con el proceso de apoptosis. La cuantificación se llevó a cabo empleando Syber Green y primers específico para los genes de la caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9. Se empleó la β-actina para la normalización de la cuantificación mediante el método de doble delta CT.

Resultados y Discusión

A partir de monocapas de células BHK-21 infectadas con cada una de las cepas virales, se recogió el sobrenadante, se fraccionó y se tituló mediante el método de Reed y Muench. Se obtuvieron los siguientes títulos virales para cada una de las cepas:

Título cepa Bucyrus: $10^{5.75}$ DICC50%/50µl
Título cepa LP01: $10^{4.70}$ DICC50%/50µl

A partir de los títulos obtenidos se realizaron los cálculos para utilizar en los diferentes ensayos una MOI de 5. A su vez se realizó la toma de fotografías de los cultivos de BHK-21 sin infectar e infectados con la cepa patogénica Bucyrus y la cepa no patogénica LP01 para un tiempo de 48 hpi, figura 1.

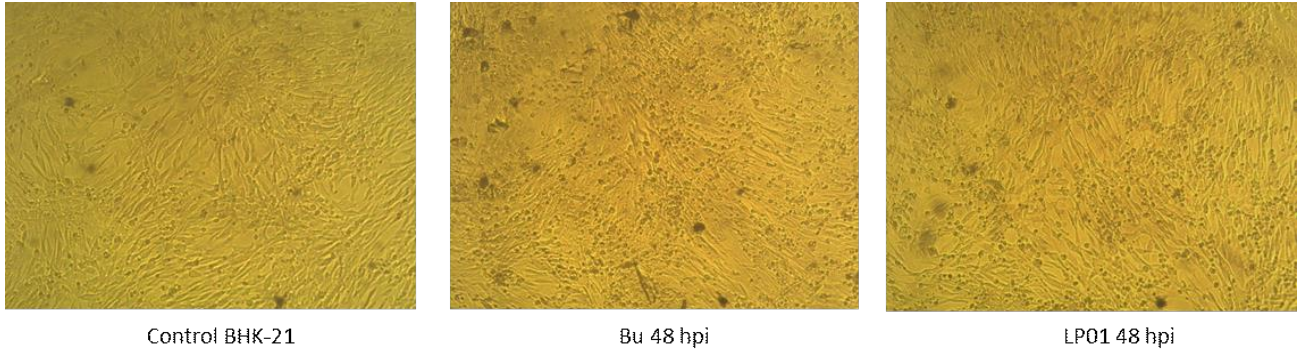


Figura 1: Cultivos de células BHK-21 control e infectados con la cepa Bucyrus y LP01 a una MOI de 5 a las 48 hpi. Microfotografías a 10X de aumento.

Se observa la morfología fibroblástica normal de las células BHK-21 en los cultivos control, mientras que en los cultivos infectados se observan pequeños focos de lisis a lo largo de la monocapa compatibles con el efecto lítico del VAE.

Para confirmar la infección viral, los cultivos control e infectados fueron sometidos a una corrida electroforética en geles de poliacrilamida y transferidos a una membrana de nitrocelulosa sobre las cuales se realizó el revelado mediante el uso de un suero policlonal positivo a AVE. Los resultados se observan en la figura 2.

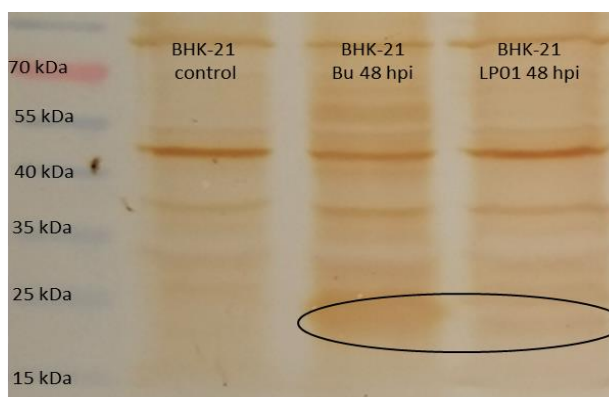


Figura 2: Western blot con muestras de las células control e infectados utilizando un suero policlonal positivo al VAE.

En la membrana de nitrocelulosa se evidencia una banda de aproximadamente 20 kDa correspondiente a la proteína M del VAE que no se observa en el cultivo control sin infectar. La detección de la banda es de mayor intensidad en la cepa patogénica Bucyrus con respecto a la cepa no patogénica LP01. La diferencia de intensidades observada podría deberse a que el suero empleado como anticuerpo primario es procedente de un animal positivo por vacunación en donde la cepa vacunal deriva de la cepa Bucyrus.

Una vez que se confirmó la infección de los cultivos por el VAE, se procedió a analizar la presencia de cambios morfológicos asociados a apoptosis en los diferentes cultivos.

Como primera medida, los diferentes cultivos se procesaron y tiñeron con NA/BE. Los resultados se muestran en la figura 3.

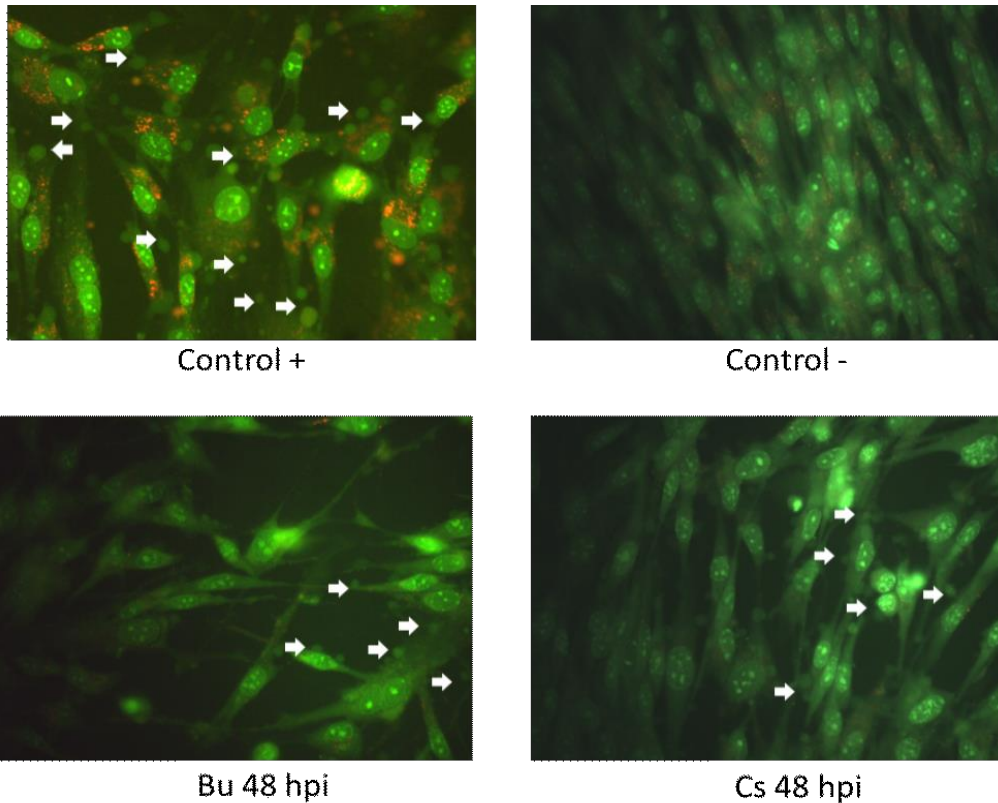


Figura 3: Tinción con NAVBE de los cultivos controles e infectados a las 48 hpi. Microfotografías a 20X de aumento.

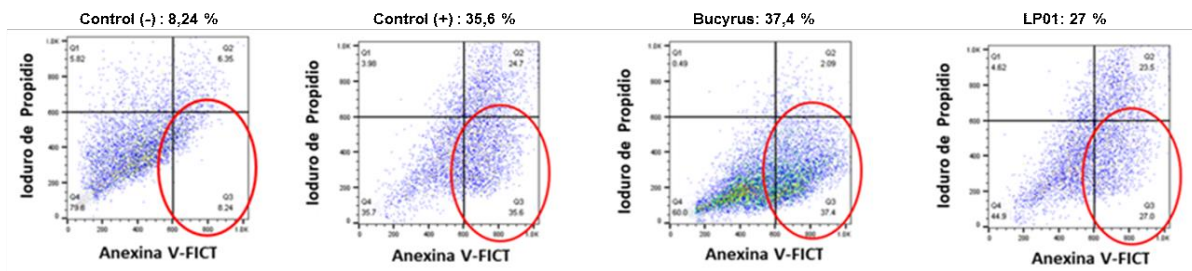
Las flechas blancas marcan los cuerpos apoptóticos característicos del proceso apoptótico. En el cultivo positivo inducido a la apoptosis con Staurosporina, se observa una mayor proporción de células apoptóticas. En los cultivos infectados se observan focos discretos de apoptosis a lo largo de los cultivos. No se registró evidencia de cuerpos apoptóticos en los cultivos negativos los cuales además presentan la morfología normal de las células BHK-21.

Mediante esta técnica se pudo evidenciar el efecto apoptótico del VAE mediante la

observación de los cambios morfológicos característicos. Sin embargo, no es posible inferir los niveles de apoptosis o estimar si existen diferencias entre ambas cepas respecto a la inducción de este proceso.

Para poder cuantificar de manera certera los niveles de células en apoptosis, se procedió a analizar las muestras mediante citometría de flujo. Siguiendo el protocolo antes descrito se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la figura 4.

24 hpi



48 hpi

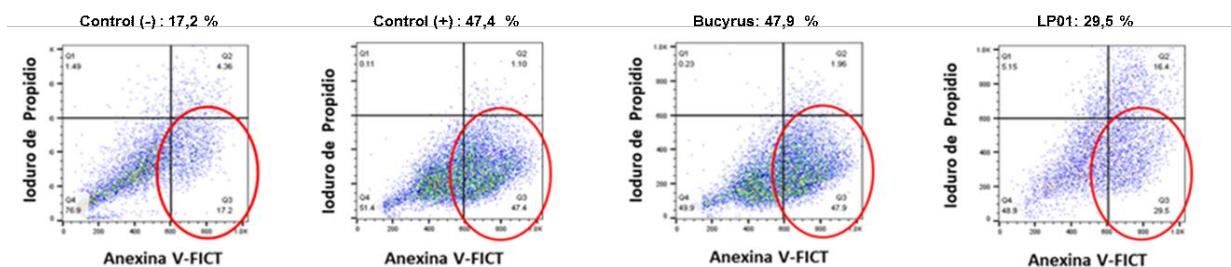


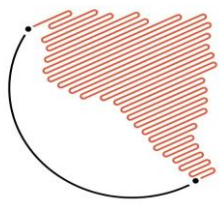
Figura 4: Citometrías de flujo de los cultivos controles e infectados a las 24 y 48 hpi.

En la figura 4 se muestran los valores correspondientes al cuadrante Q3 que corresponde a células en estadio de apoptosis temprana en cada uno de los cultivos. Los valores obtenidos reflejan una diferencia en la inducción de la apoptosis celular entre ambas cepas. Así, la cepa patogénica induce un mayor porcentaje de apoptosis en comparación con la cepa no patogénica a ambos tiempos ensayados. Incluso los valores de apoptosis en los cultivos infectados con la cepa patogénica son semejantes a los encontrados en los cultivos inducidos a la apoptosis con *Staurosporina*.

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran cambios morfológicos asociados a apoptosis en ambas cepas, mientras que los valores de citometría

evidencian un mayor nivel de apoptosis en los cultivos infectados con la cepa patogénica en comparación con la cepa no patogénica.

En un último estudio, se analizaron cambios moleculares asociados a la apoptosis. Para ello, se cuantificaron los niveles de las principales caspasas involucradas en el proceso de muerte celular mediante qPCR. El análisis de la expresión génica de los diferentes genes (caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-3) se determinaron mediante cuantificación relativa empleando el método del doble delta CT normalizado con la β -actina (Livak & Schmittgen, 2001). Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla 1.



Caspasa-8		Caspasa-9		Caspasa-3	
Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi	Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi	Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi
0.050	0.646	0.080	16.592	0.441	7.821
Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi	Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi	Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi
0.055	0.056	0.679	0.151	0.479	0.456

Tabla 1: Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de los genes de las caspasa-8, -9 y -3 a las 24 y 48 hpi.

Los valores de cuantificación relativa de la caspasa-8 en los cultivos infectados con la cepa patogénica Bucyrus son casi nulos a ambos tiempos ensayados indicando la ausencia de activación de la vía extrínseca. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en donde tampoco se pudo detectar la activación de la vía extrínseca de apoptosis mediante tinción *in situ* con aminoetilcarbazol (Metz *et al.*, 2019). Sin embargo, no ocurre lo mismo para el caso de la cepa no patogénica en donde se detecta una activación inicial de caspasa-8 solo a las 24hpi. Cholleti y colaboradores si detectaron activación de la caspasa-8 en cultivos infectados una cepa no patogénica, sin embargo, dicha cepa era una cepa atenuada proveniente de la cepa Bucyrus (Cholletiet *al.*, 2013).

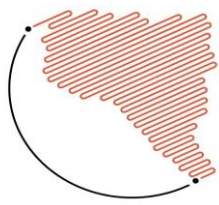
Estos resultados podrían deberse a componentes proteicos diferentes entre ambas cepas, lo que generaría interacciones diferenciadas con los receptores celulares. Por ello, la cepa patogénica no induce la vía extrínseca mientras que la cepa no patogénica si activa está vía de muerte celular. Las

proteínas gP5, M y E han sido implicadas en proceso de adsorción inicial (Lu *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2009) dentro de esta familia viral. Por lo cual sería interesante expresar estas proteínas de manera individual a partir de cada una de las cepas para analizar su efecto en el proceso de activación de la caspasa-8.

Respecto a la caspasa-9, se observa una activación de esta vía intrínseca de apoptosis para ambas cepas. Sin embargo, el patrón de activación es diferente ya que en la cepa patogénica se activa esta vía a 48 hpi, mientras que para la cepa no patogénica se observa a las 24 hpi.

La activación de la vía intrínseca se ha detectado en infecciones del VAE en varias líneas celulares estudiadas (Cholleti *et al.*, 2013; Metz *et al.*, 2016; St-Louis & Archambault, 2007). Por lo cual, es una vía de muerte clave para este virus.

Por último, analizando la caspasa-3 efectora, se observa una activación de la misma a ambos tiempos posinfección para las dos cepas en estudio consecuente con los resultados de activación de una o



ambas vías de muerte previas. Entre ambas cepas, la cepa no patogénica parece activar un mayor nivel de caspasa-3 efectora, consecuencia de su activación tanto de la vía intrínseca como extrínseca de apoptosis.

Conclusiones

En nuestro trabajo de investigación se observaron cambios morfológicos asociados a la apoptosis en los cultivos celulares infectados con ambas cepas. Si bien, a nivel cualitativo no fue posible observar diferencias, cuantificando por citometría se observó un mayor porcentaje de células apoptóticas en los cultivos infectados con la cepa patogénica.

Analizando la expresión de las diferentes caspasas, se observó una ausencia en la activación de la caspasa-8 (vía extrínseca) con la cepa patogénica, aunque si se detectó su activación inicial con la cepa no patogénica.

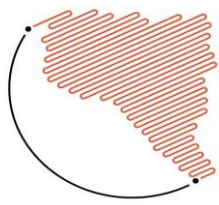
Respecto a la vía intrínseca de apoptosis, nuestro trabajo detectó activación de la caspasa-9 con ambas cepas. Dicha activación fue más apreciable con la cepa no patogénica que con la cepa patogénica.

Si bien, este trabajo fue realizado con la hipótesis de que a mayor patogenicidad de la cepa interviniente, mayores serían los niveles de apoptosis, es posible que estos resultados estén en relación con lo

que ocurre en las infecciones *in vivo*. Así, un mayor nivel de apoptosis inducido por la cepa no patogénica, generaría una mayor intervención del sistema inmune, y de esa manera un menor grado de signos clínicos en el animal infectado. Por el contrario, un menor grado de apoptosis inducido por cepas patógenas, genera menor participación del sistema inmune y por ende la posibilidad que el animal infectado desarrolle mayor signología clínica.

Referencias bibliográficas

- Abeyá, M.M., Metz, G.E., Cruz, R.F., Correas, I., Osorio, F.A., & Echeverría, M.G. (2018). Equine arteritis virus cytopathic effect: caspase-dependent cell death as the major consequence observed. *Journal of Microbiology & Experimentation*, (2): 171 – 173.
- Archambault, D., & St-Laurent, G. (2000). Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes*, 20: 143-147.
- Archambault, D., & St-Laurent, G. (2000). Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes*, 20(2):143-7.
- Cai, J., Yang, J., & Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1-2):139-149.
- Cholleti, H., Paidikondala, M., Munir, M., Hakhverdyan, M., & Baule, C. (2013).



Equine arteritis virus induced cell death is associated with activation of the intrinsic apoptotic signaling pathway. *Virus Res*, 171(1):222-226.

Costers, S., Lefebvre, D.J., Delputte, P.L., & Nauwynck, H.J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch Virol*, 153 (8):1453-65.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102:33-42.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 13:1423-1433.

Grimm, S., Stanger, B.Z., & Leder, P. (1996). RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 10923-10927.

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 301:5-17.

Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., & Martin, S.J. (2004).

Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO Journal*, 23:2134-2145.

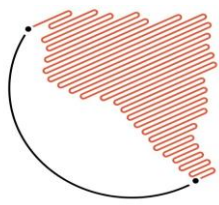
Jayakiran, M. (2015). Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. *Clinical and Experimental Pathology*, 5:1. doi: 10.4172/2161-0681.1000205.

Karniychuk, U.U., Saha, D., Geldhof, M., Vanhee, M., Cornillie, P., Van den Broeck, W., & Nauwynck, H.J. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb Pathog*, (3):194-202.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26:239-257.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., & Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal*, 14:5579-5588.

Kolb.J.P.,Oguin, T.H., Oberst, A., & Martinez, J. (2017). Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming. *Trends in Immunology*. Cell Press, 38(10):705-718.



Koyama, A.H. (1995). Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*, 37:285-290.

Koyama, A.H., Fukumori, T., Fujita, M., Irie, H., & Adachi, A. (2000). Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect*, 2(9):1111-1117.

Kvansakul, M. (2017). Viral Infection and Apoptosis. *Viruses*, 9 (12). pii: E356. doi: 10.3390/v9120356.

Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K., & Pensaert, M. (2003). Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet Res*, 34(3):249260.

Lee, S.M., & Kleiboeker, S.B. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology*, 365(2):419-434.

Lin, C., Holland, R.E., Donofrio, J.C., McCoy, M.H., Tudor, L.R., & Chambers, T.M. (2002). Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Veterinary Microbiology*, 84: 357-365.

Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2011). Analysis of Relative Gene Expression

Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT. *Method*. 25, 402–408.

Locksley, R.M., Killeen, N., & Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104:487-501.

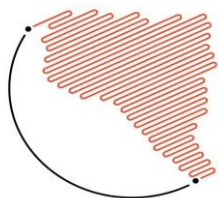
Lu, Z., Sarkar, S., Zhang, J., & Balasuriya, U.B. (2016). Conserved arginine residues in the carboxyl terminus of the equine arteritis virus E protein may play a role in heparin binding but may not affect viral infectivity in equine endothelial cells. *Arch Virol*, 161(4):873-86.

Maestre, A.M., Garzon, A., & Rodriguez, D. (2011). Equine Torovirus (BEV) induces caspase-mediated apoptosis in infected cells. *Cells PLoS ONE*, (6): 22972.

Metz, G.E., Abeyá, M.M., Serena, M.S., Panei, C.J., & Echeverría, M.G. (2019). Evaluation of apoptosis markers in different cell lines infected with equine arteritis virus. *Biotech Histochem*, 94(2):115-125.

Metz, G.E., Galindo, I., Abeyá, M.M., Echeverría, M.G., & Alonso, C. (2016). Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Res*, 213:219-223.

Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, 36:489-517.



Norbury, C.J., & Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41:367-401.

Siddiqui, W.A., Ahad, A., & Ahsan H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*, 89(3):289-317.

Slee, E.A., Adrain, C., & Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276:7320-7326.

St-Louis, M.C., & Archambault, D. (2007). The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology*, 367:147-155.

Sur, J.H., Doster, A.R., & Osorio, F.A. (1998). Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol*, 35(6):506-514.

Thomson, B.J. (2001). Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 82(2):65-76.

vanLoo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., & Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.

Cell Death and Differentiation, 9:1031-1042.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296:1635-1666.

Xia, P.A., Dang, Z.G., Qiu, H., Fan, X., Zhou, B., Cui, B.A., & Chen, P.Y. (2009). Function of PRRSV GP5 envelope protein by using pseudotyped virus. *J. Vet. Mic.*, 2: 4-13.