

MECANISMOS INDUCTORES Y VÍAS DE LA APOPTOSIS EN LA DIARREA VÍRICA BOVINA

M. PEDRERA^{1*}, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS¹, V. MOLINA¹, M.A. RISALDE¹, F. ROMERO-PALOMO¹, B. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ², E. RUIZ-VILLAMOR³, P.J. SÁNCHEZ CORDÓN¹

RESUMEN

La apoptosis es una forma de muerte celular inducida por una gran variedad de estímulos, considerada como el resultado final de una cascada en la que intervienen una serie de enzimas denominadas caspasas, inducidas tanto por estímulos externos como internos. Entre éstas destacan las denominadas caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y las caspasas ejecutoras o efectoras (3, 6 y 7). Existen dos vías principales reguladoras de la apoptosis: la vía extrínseca, inducida y mediada por receptores, la cual se inicia cuando un ligando apropiado se une a receptores de muerte localizados en la superficie celular, de modo que estas uniones ligando-receptor hacen que los dominios de muerte celular intracelulares y su unión a ciertas proteínas del citosol activen a las caspasas iniciadoras de esta vía (pe: caspasa 8), y la vía intrínseca o mitocondrial, gobernada por proteínas de la familia del Bcl-2 que agrupa un grupo de moléculas involucradas en la permeabilidad de la mitocondria, pudiéndose distinguir entre moléculas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. El desequilibrio en la expresión de estas moléculas incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial, favoreciendo

¹Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, España.

³Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España.*

E-mail: v72pemam@uco.es

la liberación de proteínas al citosol y la activación de las caspasas iniciadora de esta vía (pe: caspasa 9). Una vez activadas las caspasas iniciadoras, éstas ejercerán su actividad proteolítica sobre las denominadas caspasas efectoras o ejecutoras (3, 6 y 7), las cuales, una vez activadas ejecutarán la muerte de forma irreversible. Junto a aspectos generales relacionados con los mecanismos y vías de la apoptosis, en este trabajo se abordan aspectos relacionados con dichos mecanismos en el transcurso de la diarrea vírica bovina, donde la apoptosis parece ser la responsable de la depleción linfóide y la leucopenia que caracterizan a esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La vida de un linfocito virgen oscila entre los 3 y 6 meses en algunos animales como los ratones, llegando a permanecer incluso años en los seres humanos. Estas células están programadas para morir a menos que reciban estímulos de supervivencia. Gracias a estímulos débiles producidos por antígenos propios se mantienen con vida, aunque estos estímulos antigénicos no son suficientes para activarlos y hacer que se diferencien hacia células efectoras. Cada linfocito virgen está programado genéticamente para reconocer un único tipo de antígeno. Cuando un antígeno se une a las escasas células capaces de reconocerlo, éstas inician un proceso de proliferación masiva, conocido como selección clonal, alcanzando en pocos días un número suficiente de clones para poder ejercer una respuesta inmunitaria eficaz (1). Las células, una vez seleccionadas, expresarán receptores para ciertas citoquinas sintetizadas por los linfocitos T activados, así como por células del estroma como las células reticulares y las células dendríticas foliculares, esenciales no sólo para la proliferación sino también para la supervivencia de las células vírgenes. Sin embargo, las células que no entran en contacto con un antígeno no son seleccionadas para vivir y mueren por apoptosis, proceso que afecta tanto a las células B como a las T (1,2). Parte de las poblaciones seleccionadas se transformarán en células efectoras mediante el proceso de diferenciación celular, dando lugar a los linfocitos T cooperadores y a los linfocitos T citotóxicos; asimismo, las células B terminarán por madurar, dando lugar a células plasmáticas productoras de anticuerpos, siendo la función última de todas estas poblaciones celulares la eliminación del antígeno (2,3). Algunas de estas células perdurarán como células de memoria (centroblastos o centrocitos), las cuales se localizarán en los centros germinales, siendo responsables de la inmunidad a largo plazo y de una pronta respuesta frente a reinfecciones (3,4).

MECANISMOS INDUCTORES Y VÍAS DE LA APOPTOSIS

La apoptosis, por tanto, es una forma de muerte celular reconocida como un mecanismo esencial en la morfogénesis y la homeostasis de los órganos y tejidos, que equilibra el desarrollo y la división celular con la muerte celular. Así, en los órganos linfoides centrales o primarios, la apoptosis interviene en los procesos de selección clonal de los linfocitos autorreactivos, participando además en los mecanismos que regulan la expansión y la maduración de los linfocitos (B y T) en los órganos linfoides periféricos tras el proceso de reconocimiento antigénico. La apoptosis puede ser inducida por una gran variedad de estímulos entre los que destacan el daño en el ADN, la privación de distintos factores de crecimiento celular, la acción de los linfocitos T citotóxicos y las infecciones inducidas por virus de distinta naturaleza (3,5,6).

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, las principales características morfológicas de la apoptosis son la contracción celular, la vesiculación de la membrana, la condensación periférica de la cromatina nuclear y la fragmentación del núcleo, cambios que conducen a la formación de cuerpos apoptóticos sin la aparición de una respuesta inflamatoria (7,8). Estos cambios morfológicos son el resultado final de una cascada en la que intervienen una serie de enzimas proteasas denominadas caspasas que son inducidas tanto por estímulos externos como internos (etapa de iniciación) (6,9). Al menos 14 caspasas han sido identificadas en mamíferos, pero sólo algunas de ellas están directamente implicadas en la apoptosis. Entre éstas destacan las denominadas caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y las caspasas ejecutoras o efectoras (3, 6 y 7) (10,11).

Distintos mecanismos pueden favorecer la activación de la apoptosis dependiendo de la expresión de moléculas específicas. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de dos vías principales reguladoras de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca (12,13). También se ha apuntado la existencia de una tercera vía, activada por la caspasa 12, que provocaría la apoptosis por inducción de estrés al retículo endoplásmico (14,15) (Figura 1).

La vía extrínseca de la apoptosis está inducida y mediada por receptores. Esta vía se inicia cuando un ligando apropiado, como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α) o el Fas-ligando (FasL), se une a receptores de muerte localizados en la superficie celular, que incluyen aquellos pertenecientes a la superfamilia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R) tales como el TNF-R1 (p55 o CD120a), el Fas (también conocido como Apo-1 o CD95) y el CD40 (16,17,18,19). Estas uniones ligando-receptor hacen que los dominios de muerte celular intracelulares y su unión a ciertas proteínas

del citosol activen a las caspasas iniciadoras de esta vía como la caspasa 8, que a su vez será responsable de la activación de la caspasa 3 (caspasa ejecutora) (9,19, 20).

Por otro lado, las células que se ven privadas de estímulos de supervivencia sufren un tipo de muerte celular pasiva que se produce por la denominada vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, la cual se encuentra gobernada por proteínas de la familia del Bcl-2. Esta familia agrupa un grupo de moléculas involucradas en la permeabilidad de la mitocondria, pudiéndose distinguir entre moléculas anti-apoptóticas (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xL, bfl-1, brag-1, mcl-1 y NR13) y pro-apoptóticas (bad, bak, bax, bcl-xs, bik, bid, bim y hrk (9,21,22,23,24,25). El desequilibrio en la expresión de estas moléculas incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que favorece la liberación de proteínas al citosol, como el Citocromo *c* (Apaf-2), capaz de activar a las caspasas. Esta proteína es un cofactor del factor activador de la apoptosis 1 (Apaf-1; *apoptotic protease-activating factor 1*) y juntas, promoverán la activación de las caspasas iniciadora de esta vía como la caspasa 9, que a su vez favorecerá la activación de la caspasa 3 ejecutora (26,27,28,29,30,31,32).

Una vez que están activadas, la caspasa 8 (vía extrínseca) y 9 (vía intrínseca) consideradas como dos de las principales caspasas iniciadoras, ejercen su actividad proteolítica sobre las denominadas caspasas efectoras o ejecutoras como la señalada caspasa 3, así como sobre la caspasa 6 o la caspasa 7, las cuales, una vez activadas ejecutarán la muerte de forma irreversible (29,33,34). En este sentido cabe destacar la importancia de la caspasa 3, cuya detección permite identificar el inicio de la etapa de ejecución (el “punto de no retorno” en la cascada de la apoptosis), siendo este el punto en el que ambas vías de la apoptosis convergen y prosiguen una vía común que desembocará en la ejecución irreversible de la muerte celular (9,13,35). Estas caspasas efectoras inician la fragmentación del ADN y de la membrana nuclear, favoreciendo la progresión irreversible de la cascada de la apoptosis, desencadenándose así una serie de eventos que finalizan con la formación de cuerpos apoptóticos (8).

APOPTOSIS EN LA DIARREA VÍRICA BOVINA

Las infecciones víricas pueden modular la apoptosis tanto favoreciendo como inhibiendo tales procesos, estando ambos mecanismos encaminados a evadir la respuesta inmune del hospedador (36,37). En este sentido, numerosos virus han desarrollado estrategias para prevenir o bloquear la apoptosis, siendo ésta uno de los mecanismos empleados por el sistema inmune en la defensa frente a las infecciones víricas (5,38). Entre estas estrategias cabe destacar las centradas en la modulación de

la vía bcl-2/bax en estadios tempranos de la apoptosis (39), o bien las que interfieren en la cascada de las caspasas (40).

Por el contrario, otros virus han desarrollado estrategias orientadas a la activación de la apoptosis, principalmente como una forma de evadir la respuesta inmune mediante la destrucción de células inmunocompetentes. En estos casos, la apoptosis estuvo directamente relacionada con la replicación vírica en células inmunocompetentes (37,41) o bien, con mecanismos indirectos relacionados con la liberación de ciertos mediadores químicos como las citoquinas (42,43,44).

El virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) es un virus ARN clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* junto con otros pestivirus como el virus de la peste porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera de la oveja (45). El vDVB se ha dividido tradicionalmente en base a sus diferencias genéticas en 2 genotipos o especies distintas, conocidas como genotipo 1 y 2 (vDVB1 y vDVB2), habiéndose podido tipificar genéticamente distintos aislados de ambos genotipos. Independientemente del genotipo al que pertenezcan, los virus se clasifican en función del efecto que producen sobre ciertos cultivos de células epiteliales bovinas en 2 biotipos: biotipo citopático (CP) y biotipo no citopático (NCP), el más frecuente en la naturaleza.

Biotipos citopáticos (CP)

Los **biotipos CP**, aislados únicamente de animales con Enfermedad de las Mucosas, provocan efecto citopático sobre cultivos de células epiteliales bovinas, lo que se traduce en vacuolización citoplasmática y muerte por apoptosis (46,47,48,49). Asimismo, los biotipos CP inducen efecto citopático en cultivos de monocitos de sangre periférica (50) y de líneas celulares linfoides (51), aunque este fenómeno no es necesario para la multiplicación del virus CP (5).

Los estudios *in vitro* que existen hasta el momento sobre los mecanismos involucrados en los fenómenos de apoptosis, apuntan hacia la implicación de la **vía intrínseca** (48,52), no descartando la extrínseca (53), y especulando con la posibilidad de que el detonante para la inducción de la vía intrínseca sea la gran acumulación de ARN que se produce en las células infectadas con cepas CP del virus (54). También se ha asociado la apoptosis al estrés ejercido sobre el retículo endoplásmico, vía en la que aparecería involucrada la caspasa 12 (14,15,55) y a la activación de la polimerasa ADP-ribosa, una enzima nuclear implicada en el mantenimiento del genoma (47,51).

Las cepas CP son capaces de inducir la producción de $TNF\alpha$ en las células infectadas (56). Además, el efecto citopático que presentan las cepas CP se ve potenciado cuando se añade en el cultivo de forma simultánea $TNF\alpha$ e interferón (IFN)- α (57), por lo que no se descarta, pese a desempeñar posiblemente un papel secundario, la implicación de la **vía extrínseca** en la ejecución de apoptosis (53,56).

Biotipos no citopáticos (NCP)

Los **biotipos NCP** replican en las células epiteliales sin provocar cambios morfológicos evidentes en estos cultivos, lo que no descarta que los biotipos NCP no sean patogénicos. Las cepas NCP, especialmente las pertenecientes al genotipo 1 (vDVB1), dan lugar a procesos agudos y transitorios con sintomatología moderada (que en la mayoría de las ocasiones pasa desapercibida), así como a una leucopenia transitoria debida en parte a una disminución de los linfocitos circulantes y a la depleción linfoide causada por apoptosis, especialmente intensa en tejidos linfoides asociados a la mucosa gastrointestinal (35,58,59,60). Cabe recordar que estas cepas NCP, al contrario que las cepas CP (61), son capaces de atravesar la placenta e infectar al feto, pudiendo dar lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (62).

Las cepas NCP son capaces de bloquear la apoptosis inducida por las cepas CP sobre las células de los cultivos (63). Asimismo, distintos trabajos *in vitro* han demostrado que las cepas NCP son capaces de inhibir la apoptosis de las células de los cultivos en estadios iniciales (52). Este proceso de inhibición tendría lugar a nivel mitocondrial, previo a la activación de la cascada de las caspasas y estaría relacionado con la ausencia de un incremento de la caspasa 3 efectora y con la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2, mecanismo que podría favorecer el establecimiento de infecciones persistentes (63). Sin embargo, recientes trabajos *in vivo* llevados a cabo sobre muestras de tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal de terneros inoculados con cepas NCP de genotipo 1 demostraron una marcada activación de la caspasa 3 (35), la cual podría estar directamente relacionada con la masiva apoptosis de linfocitos observada en esta localización en el transcurso de la enfermedad (60). Estos resultados sugieren la existencia de unos mecanismos de apoptosis distintos de los identificados en los estudios *in vitro* (63). En línea con estos trabajos *in vivo*, trabajos *in vitro* recientes han demostrado que, junto a las cepas CP, las cepas NCP de alta virulencia poseen la capacidad de inducir apoptosis en cultivos celulares linfoides, mecanismo de muerte celular que pese a ser distinto (51,64), muestra ciertas similitudes como la activación de las caspasas y la implicación de la mitocondria (64).

Sin embargo, los estímulos responsables de favorecer la cascada de la apoptosis linfocitaria durante la DVB permanecen sin aclarar. Distintos trabajos *in vivo* han señalado la **acción directa del virus de la DVB** sobre los linfocitos como causa responsable (58,65,66,67,68), un punto de vista apoyado por estudios *in vitro* que sugieren que la apoptosis es causada por la replicación y acumulación de ARN vírico (46,52,54). Sin embargo, trabajos recientes *in vivo* demostraron que la acción directa del virus sería responsable de la destrucción de un pequeño número de linfocitos. De este modo, aunque la infección de los linfocitos coincidió con el comienzo de los fenómenos de apoptosis, la intensidad de la infección no estuvo acorde con la masiva apoptosis linfocitaria observada, especialmente en los estadios iniciales de la enfermedad (35,60).

Otros trabajos, sin embargo, sugieren la implicación de **mecanismos indirectos** en la destrucción linfocitaria durante la DVB, mecanismos que aún permanecen sin aclarar (58,68,69,70). Así, trabajos *in vitro* demostraron que la liberación de citoquinas parece estar inhibida en el caso de las cepas NCP (5,56,57,71). En inoculaciones llevadas cabo en terneros con cepas NCP se observó que, pese al incremento de monocitos-macrófagos en folículos linfoides de la mucosa intestinal (áreas de células B), donde la apoptosis de linfocitos fue intensa, el número de macrófagos secretores de TNF α e IL-1 α , citoquinas con probada capacidad para inducir apoptosis, fue escaso. De esta manera se descartó que estos mediadores químicos fueran la causa principal en la apoptosis linfocitaria. Sin embargo, la liberación de citoquinas inductoras de apoptosis por parte de los macrófagos (infectados o no) si podría estar involucrada en la apoptosis observada en las áreas interfoliculares (áreas de células T), lo que pone de manifiesto *in vivo* la existencia de distintos mecanismos inductores o reguladores de apoptosis en función de la localización (folículos o áreas interfoliculares) o composición del tejido linfoide (linfocitos B o T). Asimismo, se ha demostrado que las células del entramado folicular con signos de infección vírica (células reticulares y dendríticas foliculares), fundamentales para el mantenimiento y homeostasis del folículo, mostraron alteraciones morfológicas que podrían estar relacionadas con la masiva apoptosis observada, quedando aún por determinar los mecanismos implicados (35,60). Sin embargo, *in vitro* se observó que el TNF α fue responsable del 15% de la apoptosis inducida por cepas CP y que las cepas NCP son capaces de inducir la expresión de elevados niveles de receptores de TNF α (56). Además, los bajos niveles de secreción de IL-1 por los macrófagos observada en los folículos linfoides durante infecciones con cepas NCP (35), también había sido demostrada *in vitro*, habiéndose sugerido que la infección de los monocitos tanto por cepas CP como NCP inhibía la producción de IL-1 (72). Por tanto, es evidente que el vDVB actúa de forma distinta

dependiendo tanto del biotipo (CP o NCP) como del genotipo (1 o 2) que provoque la infección, así como de las células que resulten infectadas, activando diferentes vías de señalización en cada caso (64).

Otro aspecto que permanece sin aclarar es el relacionado con los mecanismos involucrados en la ejecución inicial de la cascada de la apoptosis y la secuencia precisa de eventos durante la DVB. Trabajos recientes *in vivo* sobre la regulación de las vías de la apoptosis (extrínseca o intrínseca) demostraron una intensa activación de la caspasa 8 (caspasas iniciadora de la vía extrínseca) y unos bajos niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2 en áreas B del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal de terneros inoculados con una cepa NCP del virus de la DVB (73). Estos cambios podrían estar relacionados con la activación de la caspasa 3 ejecutora y con la masiva apoptosis de linfocitos observada en dichas áreas (35,60). Asimismo, la menor activación de la caspasa 8 juntos a niveles elevados de la proteína anti-apoptótica bcl-2 en áreas T, estaría relacionada con una mayor protección de los linfocitos de estas localizaciones frente a la apoptosis. Estos resultados resaltan el mayor papel de la vía extrínseca y la escasa participación de la vía intrínseca, habiéndose observado además una inactivación progresiva de la caspasa 9 iniciadora (73).

Por tanto, a la hora de afrontar el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares de la apoptosis en la DVB se hace necesario considerar dos aspectos fundamentales: (1) que hay cambios moleculares en las células que pueden predisponer o pueden proteger a éstas frente a la apoptosis; (2) que se producen cambios a nivel molecular en las células cuando finalmente se desencadena la apoptosis. De esta forma, células con un perfil molecular característico estarán más predispuestas a sufrir apoptosis que otras células que no presenten ese perfil. Es importante conocer en que punto de la cascada de la apoptosis éste mecanismo es irreversible, lo que contribuiría a comprender cómo algunas cepas inducen o frenan la apoptosis. De esta manera, para entender los complejos mecanismos que regulan las vías de la apoptosis (intrínseca o extrínseca) durante la DVB y que finalmente inducen la muerte celular mediante la activación de la caspasa-3 efectora, los estudios sobre modelos *in vivo* se presentan como fundamentales.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) a través del proyecto AGL2006-01536 y por la Junta de Andalucía (PO9-AGR-4671). Pedro José Sánchez Cordón es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, (España).

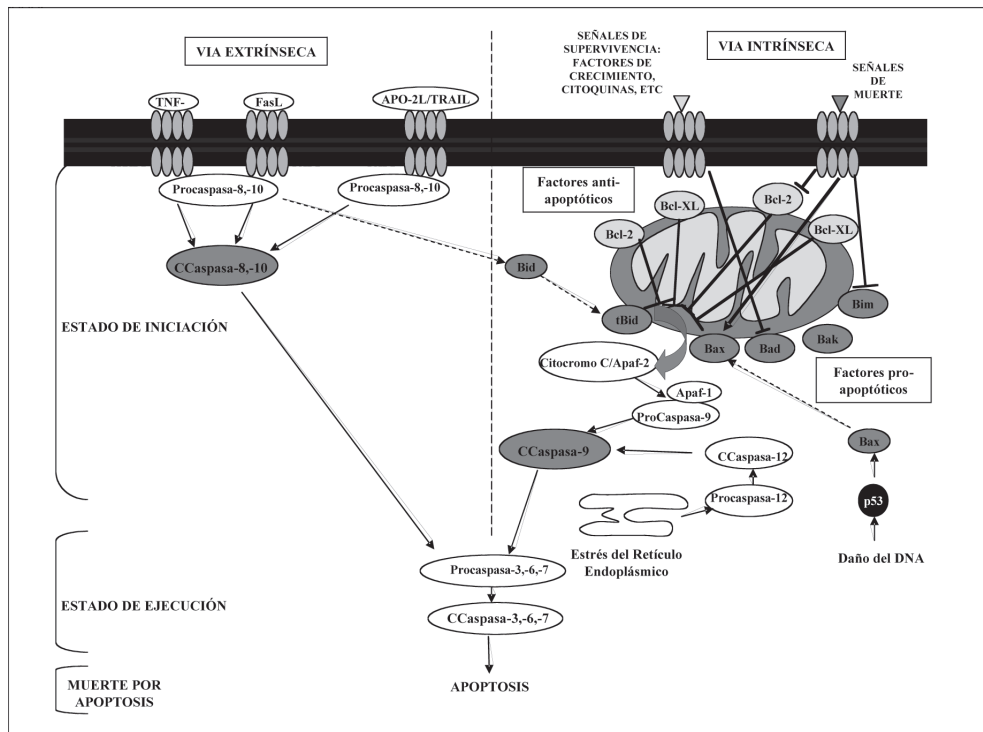


Figura 1
Representación esquemática de las vías de inducción de la apoptosis

REFERENCIAS.

[1] Klinman NR. The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. *Immunity* 5: 189-195 (1996).

[2] Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458 (2000).

[3] Abbas AK, Litchman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th edition. Abbas AK, Litchman AH (Eds). Saunders Elsevier Science (2003).

[4] Roitt IM, Burton DR, Martin SJ, Delves PJ. Roitt Inmunología: Fundamentos. 11ª Edición. Roitt IM, Burton DR, Martin SJ, Delves PJ. (Eds). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (2008).

[5] Schweizer M., Peterhans E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol* 80: 1147-1155 (1999).

[6] Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl S97-107 (2002).

[7] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 (1972).

[8] Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46: 1-27 (1995).

- [9] Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)* 200: 1-18 (1999).
- [10] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274: 20049-20052 (1999).
- [11] Pagliari LJ, Pinkoski MJ, Green DR. Apoptosis Signaling: A Means to an End. In: *Handbook of Cell Signaling*, Volumen 3, 2ª edición. Bradshaw RA, Dennis EA (Eds). Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 2535-2543 (2009).
- [12] Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192: 21-26 (2000).
- [13] Mitchell RN, Cotran RS. Cell injury, cell death, and adaptations. In: *Basic Pathology* (8th ed.). Kumar V, Cotran R, Robbins SL (Eds). Elsevier Science, Philadelphia, pp. 19-22 (2007).
- [14] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103 (2000).
- [15] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 33869-74 (2001).
- [16] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365 (1997).
- [17] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308 (1998).
- [18] Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 4: 271-288 (1998).
- [19] Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhon Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 273: 27084-27090 (1998).
- [20] Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 85: 781-4 (1996).
- [21] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619 (1993).
- [22] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805 (1994).
- [23] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6 (1994).
- [24] Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7834-7838 (1995).
- [25] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607 (2003).
- [26] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91: 479-489 (1997).
- [27] Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413 (1997).
- [28] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312 (1998).
- [29] Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 252: 1-15 (1998).
- [30] Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer D.D., Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase

- cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281-292 (1999).
- [31] Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 9239-9245 (2001).
- [32] Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84: 113-121 (2002).
- [33] Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76: 1-19 (1998).
- [34] Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, Fiocchi C, Levine AD. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 274: G1117-24 (1998).
- [35] Pedrera M, Gómez-Villamandos JC, Romero-Trejejo JL, Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordón PJ. Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. *J Gen Virol* 90: 2650-2659 (2009).
- [36] Thomson BJ. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 82: 65-76 (2001).
- [37] Costers S, Lefebvre DJ, Delputte, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch Virol* 153: 1453-1465 (2008).
- [38] O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79: 1833-1845 (1998).
- [39] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326 (1998).
- [40] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16 (1997).
- [41] Zhuang SM, Landegent JE, Verschueren CA, Falkenburg JH, van Ormondt, van der Eb AJ, Noteborn MH. Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus induces cell death in various human hematologic malignant cells in vitro. 1: S118-120 (1995).
- [42] Gómez-Villamandos JC, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sánchez CP, Sánchez-Cordón PJ, Salguero FJ, Jover A. Morphological and immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical swine fever. *J Comp Pathol* 125: 98-109 (2001).
- [43] Sánchez-Cordón PJ, Núñez A, Salguero FJ, Carrasco L, Gómez-Villamandos JC Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *J Comp Pathol* 132: 249-60 (2005).
- [44] Sánchez-Cordón PJ, Romanini S, Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Gómez-Villamandos JC Apoptosis of Thymocytes related to cytokine expression in experimental Classical Swine Fever. *J Comp Pathol* 127: 239-48 (2002).
- [45] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J. Classification and nomenclature of viruses. In *Virus taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds). Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 135-143, 981-998 (2005).
- [46] Zhang G, Aldridge S, Clarke MC, McCauley JW. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* 77: 1677-1681 (1996).
- [47] Hoff HS, Donis RO. Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res* 49:101-13 (1997).
- [48] Grummer B, Moening V, Greiser-Wilke I. Cytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105: 29-31 (1998).
- [49] Brock KV. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31: 133-135 (2003).

- [50] Lambot M, Hanon E, Lecomte C, Hamers C, Letesson JJ, Pastoret PP. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* 79: 1745-1749 (1998).
- [51] Ridpath JF, Bendfeldt S, Neill JD, Liebler-Tenorio E. Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res* 118: 62-69 (2006).
- [52] Grummer B, Bendfeldt S, Wagner B, Greiser-Wilke I. Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res* 90: 143-153 (2002).
- [53] St-Louis MC, Massie B, Archambault D. The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Vet Res* 36: 213-227 (2005).
- [54] Vassilev VB, Donis RO. Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res* 69: 95-107 (2000).
- [55] Jordan R, Wang L, Graczyk TM, Block TM, Romano PR. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J Virol* 76: 9588-9599 (2002).
- [56] Yamane D, Nagai M, Ogawa Y, Tohya Y, Akashi H. Enhancement of apoptosis via an extrinsic factor, TNF- α in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Microbes and Infection* 7: 1482-1491 (2005).
- [57] Bielefeldt Ohmann H, Babiuk LA. Influence of interferons alpha I1 and gamma and of tumour necrosis factor on persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in vitro. *J Gen Virol* 69: 1399-1403 (1988).
- [58] Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J Vet Diagn Invest* 15: 221-232 (2003).
- [59] Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 31: 119-122 (2003).
- [60] Pedrera M, Sánchez-Cordón PJ, Romero-Trejejo JL, Risalde MA, Greiser-Wilke I, Núñez A, Gómez-Villamandos JC. Morphological Changes and Viral Distribution in the Ileum of Colostrum-Deprived Calves Inoculated with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotype-1. *J Comp Pathol* 141: 52-62 (2009).
- [61] Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 46: 307-11 (1989).
- [62] Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, Coria MF. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 46: 573-6 (1985).
- [63] Bendfeldt S, Grummer B, Greiser-Wilke I. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 96: 313-326 (2003).
- [64] Bendfeldt S, Ridpath JF, Neill JD. Activation of cell signaling pathways is dependant on the biotype of bovine viral diarrhoea viruses type 2. *Virus Res* 126: 96-105 (2007).
- [65] Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville NE, Kluge JP. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. *Vet Pathol* 27: 235-243 (1990).
- [66] Marshall DJ, Moxley RA, Kelling CL. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 33: 311-318 (1996).

- [67] Stoffregen B, Bolin SR, Ridpath JF, Pohlenz J. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol* 77: 157-162 (2000).
- [68] Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Nelly JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with highly virulent BVDV 2. *Am J Vet Res* 63: 1575-1584 (2002).
- [69] Ellis JA, West K, Cortese V, Myers SL, Carman S, Martin KM, Haines DM. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. *Can J Vet Res* 62: 161-169 (1998).
- [70] Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 16: 388-96 (2004).
- [71] Baigent SJ, Zhang G, Fray MD, Flick-Smith H, Goodbourn S, McCauley JW. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J Virol* 76: 8979-8988 (2002).
- [72] Jensen J, Schultz RD. Effect of infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 29: 251-265 (1991).
- [73] Pedrera M., Gomez-Villamandos JC, Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordon PJ. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. *J Gen Virol* (en prensa) (2011).

