

00322

205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"MODULACION DEL ANTIGENO VIRAL DE LA MEMBRANA CELULAR POR EL ANTICUERPO ANTI-RSV"

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
LAURA ELENA VALVERDE ISLAS



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS:
DR. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION 2903LAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MODULACION DEL ANTIGENO VIRAL
DE LA MEMBRANA CELULAR POR EL
ANTICUERPO ANTI-RSV”.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
LAURA ELENA VALVERDE ISLAS
D I R E C T O R D E T E S I S :
DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA
2003



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Modulación del antígeno viral de la membrana celular por el
anticuerpo anti-RSV".

realizado por Valverde Islas Laura Elena

con número de cuenta 09455622-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Beatriz Gómez García.

Beatriz Gómez García

Propietario

M en C. Rosa Elena Sarmiento Silva.

Rosa Elena Sarmiento Silva

Propietario

M en C. Enrique Hernández Hernández.

Enrique Hernández Hernández

Suplente

M en C. Mirza Gabriela Romero Valdovinos.

Mirza Gabriela Romero Valdovinos

Suplente

M en C. Emilio Joaquín Cordova Alarcón.

Emilio Joaquín Cordova Alarcón

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

C

JURADO

**DIRECTOR DE TESIS
PROPIETARIO:**

DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA.

PROPIETARIO:

M en C. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA.

PROPIETARIO:

M en C. ENRIQUE HERNANDEZ HERNANDEZ.

SUPLENTE:

**M en C. MIRZA GABRIELA ROMERO
VALDIVINOS.**

SUPLENTE:

**M en C. EMILIO JOAQUIN CORDOVA
ALARCON.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE
LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNAM.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZO CON EL APOYO DE LA DIRECCIÓN
GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA)
PROYECTO IN 206400.**

AGRADECIMIENTOS:

A la **Dra. Beatriz Gómez García** por la dirección y consejos durante el desarrollo del proyecto.

Al jurado **M en C. Rosa Elena Sarmiento Silva, M en C. Enrique Hernández Hernández, M en C. Mirza Gabriela Valdovinos** y al **M en C. Emilio Joaquín Cordova Alarcón** por su colaboración en el escrito del proyecto.

A **Xochitl Álvarez** del Instituto de Biotecnología de la UNAM por el apoyo brindado con el uso del microscopio confocal.

A Rosa Elena, Rocío y Rafael por haberme brindado su amistad.

A Gerardo.

A Jesús Núñez e Ignacio Palacios por su colaboración en el laboratorio.

A mis padres **Martha Islas León** y **Jorge Valverde Hernández** a quienes les debo un agradecimiento extenso por el apoyo y confianza que me brindaron durante todos estos años.

A mis hermanos **"Mary" cruz, Estela, Guadalupe y Jorge.**

A la pequeña **Diana.**

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MODULACIÓN ANTIGÉNICA POR ANTICUERPO | 1 |
| <i>In vitro</i> | |
| Leucemia | 1 |
| Influenza A | 1 |
| Parainfluenza | 2 |
| Sarampión | 2 |
| Rubéola | 3 |
| Pseudorabia | 4 |
| Varicela zoster | 4 |
| <i>In vivo</i> | |
| Sindibis | 5 |
| Influenza A | 5 |
| Sarampión | 5 |
| Hepatitis | 6 |
| Aleutian | 6 |
| GENERALIDADES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO | 6 |
| PROTEÍNAS DEL RSV | 8 |
| REPLICACIÓN | 10 |
| EPIDEMIOLOGÍA | 11 |
| HIPÓTESIS | 13 |
| OBJETIVOS | 13 |
| MÉTODOS | 14 |
| RESULTADOS | 20 |
| DISCUSIÓN | 32 |
| CONCLUSIONES | 36 |
| APÉNDICE | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 41 |

INTRODUCCIÓN

MODULACIÓN ANTIGÉNICA

La modulación antigénica por anticuerpo, se define como la interacción del anticuerpo antiviral con el antígeno expresado en la membrana plasmática de células infectadas y se caracteriza por: reducción en la expresión de los antígenos virales, redistribución (aglomeración y "capping") de las glicoproteínas y pérdida por endocitosis o exocitosis de los antígenos de la membrana celular. La pérdida de los antígenos virales de la membrana de células infectadas favorece la evasión por el sistema inmune al no ser detectada como extraña, por lo que se ha propuesto como un mecanismo de escape al sistema inmune (1).

Este fenómeno se ha reportado tanto *in vitro* como *in vivo* para virus envueltos de RNA y DNA (1).

IN VITRO

Retroviridae (Virus de leucemia)

Genovesi *et al.* reportó que células infectadas con el virus de leucemia tratadas con suero inmune, abaten la expresión de los antígenos de la membrana celular, así como su susceptibilidad a la lisis inmune por anticuerpos y complemento (2).

Orthomyxoviridae (Influenza A)

La incubación de células MDCK infectadas con influenza A cepa Udorn en presencia de anticuerpo (14C2) anti-M2, resulta en una reducción significativa en los niveles de producción de partículas virales. Se sugiere que este efecto está relacionado con la reducción de la expresión y

redistribución de la proteína M2 en la membrana celular inducida por el tratamiento con el anticuerpo (3, 4).

Otros estudios reportan que células HeLa infectadas con una mutante del virus de Influenza A, que carece del dominio citoplásmico de la proteína de hemaglutinina (HA), no forman "cap" en presencia de anticuerpos específicos. El mismo virus presenta un comportamiento diferente en células CV-1, en esta línea celular se observa aglomeración de los antígenos por acción del anticuerpo antiviral aunque pocas células forman "cap". Mientras que en ambas líneas celulares el virus de influenza silvestre, con la proteína HA completa, se observó formación de "capping" en la mayoría de las células en respuesta a la exposición de los anticuerpos (5).

Paramixoviridae (Parainfluenza)

Resultados similares a los reportados para influenza A se han obtenido con el virus de parainfluenza tipo 3. La carencia del dominio citoplasmático de la proteína F también disminuye la formación de "cap" en comparación con F completa, indicando que HA y F experimentan redistribución en respuesta a anticuerpos monoclonales anti-HA y anti-F, y esta se ve alterada por la carencia del dominio citoplasmático de las glicoproteínas, lo que sugiere que para la formación del "capping", es necesaria la interacción entre los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas y componentes celulares del hospedero (5).

Paramixoviridae (Sarampión)

Estudios en sarampión muestran que en células HeLa infectadas con este virus y tratadas con anticuerpos monoclonales y policlonales reducen la expresión de las proteínas F, M y P, mientras que la incubación con

anticuerpos específicos inducen redistribución de los antígenos de la membrana (6, 7).

La aplicación de anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina (HA) a células de neuroblastoma de ratón (NS20Y/MS) infectadas persistentemente con virus de sarampión reducen significativamente, la síntesis de proteínas virales (8).

El tratamiento de células de glioma de rata C6 persistentemente infectadas con virus de sarampión con anticuerpos policlonales anti-HA suprime la expresión de esta proteína y, eventualmente todos los antígenos del virus, el uso de 9 anticuerpos monoclonales anti-HA son capaces de inducir "capping" e eliminar los antígenos de la membrana de las células C6 (9, 10).

En macrófagos infectados persistentemente con el virus del sarampión, y tratados con anticuerpos policlonales se reduce la síntesis de antígenos virales internos y expresados en la membrana de las células infectadas (11).

Togaviridae (Rubéola)

En la infección de células linfoides de humano con el virus de rubéola (RV) el efecto del anticuerpo anti-RV, mostró supresión en la síntesis de proteínas y en la replicación, ya que no se detecta progenie viral intracelular y extracelularmente en las células tratadas, sin embargo al eliminar el anticuerpo, la síntesis de proteínas se reinicia (12).

En células VERO infectadas persistentemente con rubéola en presencia de anticuerpos específicos con un alto título neutralizante, se observó reducción en la eficiencia para inducir efecto citopático y en la replicación viral (13).

Herpesviridae (Pseudorabia)

La modulación antigénica para el virus de pseudorabia (PrV) se ha estudiado en células de riñón SK y monocitos. En células SK infectadas con PrV en presencia de anticuerpos específicos, se observó que aproximadamente el 47% de las células infectadas forman aglomeraciones y "capping" de todas las glicoproteínas en la membrana celular, de los caps aproximadamente el 18 % son eliminados al medio extracelular (14).

Monocitos infectados con PrV y tratados con 0.25 mg de IgG policlonales anti-PrV induce aglomeración y posterior internalización de las glicoproteínas virales en el 65% de los monocitos infectados, así como la co-endocitosis del complejo de histocompatibilidad de clase I. Se ha reportado que los componentes celulares como clatrina, dineína y los microtubulos son importantes durante la internalización de las glicoproteínas inducida por el anticuerpo (15, 16 y 17).

Herpesviridae (Varicela zoster)

Células MRC-5 infectadas con el virus de varicela zoster (VZV) en presencia de anticuerpos monoclonales contra las glicoproteínas virales gpl y gpII presentan aglomeración y "capping" seguida de endocitosis. Los complejos formados se encuentran homogéneamente distribuidos, inmediatamente después de la adición de los anticuerpos, con una posterior endocitosis que podría evitar el reconocimiento por el sistema inmune, y así favorecer la persistencia del virus en ganglios sensores humanos (18).

IN VIVO

Alphavirus (Virus sindibis)

El tratamiento del cultivo primario de neuronas de rata infectadas con el virus de sindibis, con anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína E2, resulta en la disminución de la síntesis de proteínas virales seguida por una terminación gradual de la maduración de virus infectivo (1).

Orthomyxoviridae (Influenza A)

La proteína M2 de influenza A se expresa en la membrana de las células infectadas, la presencia de anticuerpo monoclonal contra esta proteína reduce la replicación del virus en pulmones de ratones BALB/c (19).

Paramixoviridae (Sarampión)

La administración de anticuerpos neutralizantes específicos para la proteína HA del virus de sarampión a ratas Lewis inyectadas con este virus cepa CAM/RBH, ejercen un efecto de modulación restringiendo la expresión de genes virales al nivel de transcripción. Se ha observado que este fenómeno contribuye en la infección persistente en el sistema nervioso central (20).

En ratones BALB/c que reciben anticuerpos de suero hiperinmune, después de la inoculación con el virus, produce una encefalitis aguda y persistencia viral (21).

Coronaviridae (Virus de hepatitis)

La adición de anticuerpos monoclonales contra dos distintos epitopes de la glicoproteína E2 del virus de hepatitis de murino MHV-4 a neuronas de ratones BALB/c infectadas con este virus, protege a los ratones bloqueando la encefalitis y convierte la infección que normalmente es fatal en una desmelinización (22).

Parvoviridae (Virus aleutian)

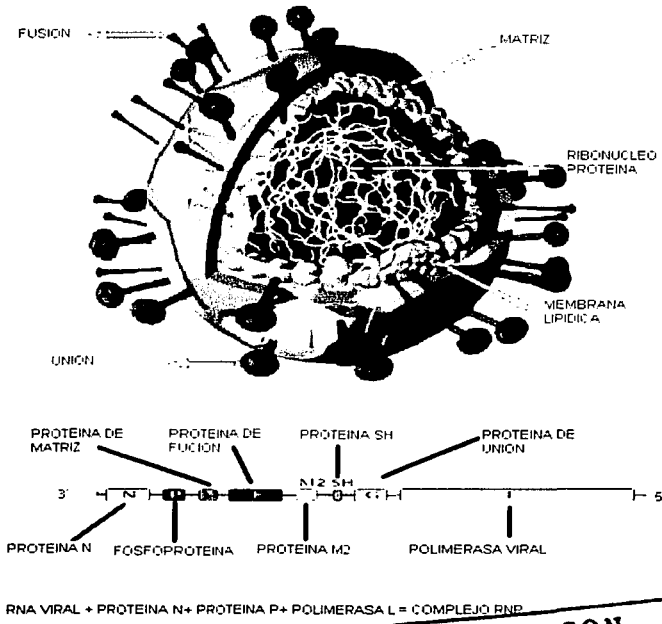
La administración de anticuerpos para la enfermedad de virus de Aleutian (ADV) a crías de mink, permite la sobrevivencia a la neumonía aguda pero en estos animales se desarrolla una forma crónica de la enfermedad mediada por complejos inmunes. Se ha observado que la presencia de estos anticuerpos reduce los niveles de RNAm de ADV resultando en la restricción de la replicación viral (23, 24).

Con base en estos antecedentes, se decidió estudiar en este trabajo la posibilidad de que el fenómeno de modulación antigénica inducida por anticuerpos antivirales se presente en células infectadas con el Virus Sincitial Respiratorio (RSV).

GENERALIDADES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

RSV es un miembro del género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Su genoma comprende una cadena sencilla de RNA de sentido negativo, el cual está asociado con tres proteínas virales para formar la nucleocápside. La envoltura viral está compuesta de una membrana derivada de la bicapa lipídica del hospedero. El virión tiene un diámetro de 150-300 nm de

morfología irregular. El genoma del RSV esta compuesto de 15,222 nucleótidos, el RNA codifica para 10 proteínas: tres proteínas transmembranales (F, G y SH), dos proteínas de matriz (M y M2), tres proteínas asociadas al ARN genómico formando la nucleocápside (N, P y L) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) Fig. 1 (25, 26).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Esquema de RSV mostrando las diferentes proteínas (tomado de www.all virology).

PROTEÍNAS DE RSV

PROTEÍNA F

La glicoproteína de fusión (F) de RSV, media la fusión de membranas y facilita la entrada del virus a la célula, es altamente conservada, y es el principal antígeno viral neutralizante (25). La proteína se sintetiza como un precursor inactivo de 574 aminoácidos (denotado como F0) el cual durante su migración hacia la membrana celular se activa por el corte proteolítico de furina en dos subunidades F1 y F2 las cuales permanecen unidas por un enlace disulfuro (27). Análisis de la proteína de fusión en células VERO infectadas con RSV muestran la presencia de una sola subunidad F1 y dos diferentes formas de la subunidad F2, designadas como F2a (21 kDa) y F2b (16kda) (28,29).

PROTEÍNA G

La Proteína de unión G es una glicoproteína de tipo II con un dominio hidrofóbico entre los residuos 38 y 66 que sirven para el anclaje a la membrana y como secuencia señal. El ectodominio C-terminal tiene una región central (164 a 176 residuos) que es conservada en las cadenas, siendo este un sitio candidato para la unión al receptor. El precursor de 32kd de la proteína de unión se modifica extensivamente por la adición de cadenas de oligosacáridos produciendo una molécula madura de 80 a 90 kd (30). La proteína G es altamente glicosilada y no es esencial para la replicación viral *in vitro* (31). Una de las formas de la glicoproteína G está asociada a la membrana y la otra es secretada (Gs) (32). La proteína Gs (soluble) es claramente evidente en sobrenadantes de cultivos después de 6 horas de infección, mientras que la forma asociada al virión no es detectada hasta después de 12 horas de infección (33).

PROTEÍNA SH

Junto con las dos anteriores SH es una proteína de envoltura, consiste de 64 aminoácidos en el grupo A o 65 en el grupo B, es altamente conservada entre las distintas cepas virales aisladas, es una proteína hidrofóbica. En células infectadas se encuentran cuatro formas, Sho la forma más abundante y no glicosilada, SHg es la forma que contiene unida una cadena de carbohidratos, SHp es una versión modificada de SHg en la cual las cadenas de carbohidratos son modificadas por la adición de polilactosaminoglucano y finalmente SHt es una forma no glicosilada y se diferencia de las demás formas por no ser transportada a la superficie celular (34).

La coexpresión de estas tres glicoproteínas F, G y SH aumenta la fusión celular (formación de sincitios) en monocapas de células infectadas (40), Además se ha demostrado que estas tres proteínas forman complejos oligoméricos con mayor afinidad a heparina, que para las proteínas G y F individualmente sugiriendo un posible mecanismo en la propagación de RSV célula a célula (35).

PROTEÍNAS N, P y L

Las proteínas N, P y L del virus sincitial respiratorio, son esenciales para una eficiente transcripción y replicación del RNA viral, además de estar asociadas con el genoma viral de RSV formando la nucleocápside.

La proteína P de RSV (241 aminoácidos) actúa como un factor de elongación para la RNA polimerasa dependiente de RNA (25).

La proteína L es un polipéptido de 2162 aminoácidos, contiene seis segmentos altamente conservados y se le asigna la función de RNA

polimerasa dependiente RNA. La proteína N de 391 aminoácidos, contiene tres segmentos de secuencias similares presentes en los virus no segmentados y de sentido negativo, estas regiones conservadas, tal vez están involucradas en una o más funciones, tales como la unión al RNA (25).

PROTEÍNAS NS1 Y NS2

NS1 y NS2L son proteínas no estructurales y sus RNAm de estas son los más abundantes de los transcritos de RSV por su localización proximal al promotor. La función de las proteínas NS1 y NS2 aún no se conoce (25, 36).

PROTEÍNA M

En el RSV existen dos proteínas de matriz M Y M2, la función de la proteína M es estabilizar la envoltura viral y participar en el ensamble, así como mantener inactiva la nucleocápside antes del empaquetamiento, M está constituida por 256 aminoácidos, mientras que M2 por 194 (25).

REPLICACIÓN

Los glicosaminoglicanos (GAGs) están implicados con el inicio de la infección de RSV en cultivos celulares, estos se encuentran en la superficie celular. Así la presencia de los GAGs que contienen ácido idurónico, heparan sulfato y chondroitin sulfato B, son requeridos para una eficiente infección de RSV, en donde interactúan con G y F facilitando la unión y entrada de RSV (38, 39). Otro factor que posiblemente interviene en la entrada del virus a las células, es ICAM-1 a través de su unión con la proteína F (41). Después de la fusión de membranas se da la liberación del genoma viral en el citoplasma. Todos los procesos de replicación del material genético viral se llevan a cabo en el citoplasma celular sin

involucrar el núcleo. Los eventos llevados a cabo durante la replicación y transcripción se muestran en la figura 2 (42), Fearnls mostró que los promotores para la transcripción y replicación se encuentran en los nucleótidos de 3' del genoma y que la preferencia de nucleótidos para los dos procesos no son idénticos (25, 29).

El proceso de ensamble y liberación del RSV comienza con el ensamble de la nucleocápside en el citoplasma en dos pasos: primero la asociación de N y P libres con el RNA (-) para formar la ribonucleoproteína (RNP) y segundo la asociación de P y L. Las glicoproteínas F, G Y SH son transportadas a la membrana celular para formar la envoltura viral y por ultimo para la maduración se adquiere el RNP y las proteínas de matriz. El mecanismo bioquímico por el cual RNP es transportado dentro de la cápside no está claramente definido, pero tal vez están involucrados elementos de citoesqueleto. Finalmente el virión es liberado por gemación (43, 44 y 45).

EPIDEMIOLOGÍA

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) en conjunto con la neumonía e influenza continúan ocupando los primeros lugares dentro de las causas de mortalidad de infantes mundialmente. Las IRA se presentan en todas las edades, aunque su frecuencia y gravedad es mayor entre menores de cinco años y mayores de 65.

Los agentes relacionados con las IRA son múltiples, pero se considera que predominan los virus hasta en el 95 % de los casos. En México se reportan con mayor frecuencia el **Virus Sincitial Respiratorio**, Adenovirus, Parainfluenza B e Influenza A. En el país las IRA ocuparon el segundo lugar dentro de las principales causas de mortalidad infantil y en edad preescolar en el 2000 (46, 47).

Las epidemias por el RSV ocurren anualmente durante las estaciones de invierno y principios de primavera en climas templados y durante las estaciones de lluvia en algunos climas tropicales. El humano es el único

reservorio conocido. El contagio de RSV se lleva a cabo por contacto directo con las secreciones nasales del individuo infectado y las reinfecciones ocurren durante toda la vida aún en presencia de altos niveles de anticuerpos neutralizantes, sin que haya todavía una vacuna efectiva para el Virus Sincitial Respiratorio (48, 49).

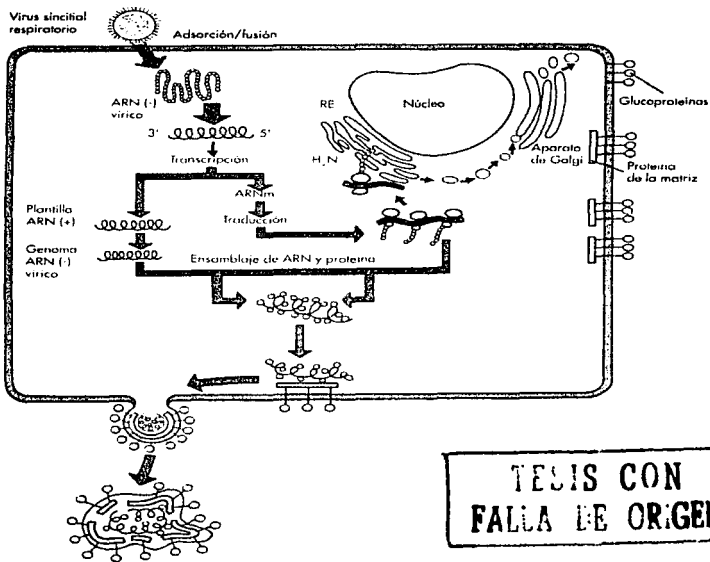


Figura. 2. Replicación del RSV. (Figura tomada de Murray 1997.)

HIPÓTESIS

Anticuerpos antivirales inducen modulación antigénica en células HEp-2 infectadas con el Virus Sincitial Respiratorio.

OBJETVO GENERAL

Estudiar el efecto del anticuerpo anti-RSV en la localización en la célula de los antígenos virales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar por microscopia confocal la distribución de los antígenos virales en la membrana de las células infectadas con RSV y tratadas con el anticuerpo anti-RSV.
2. Determinar el porcentaje de células en las que se presenta el fenómeno de capping.
3. Determinar la localización intracelular de los antígenos virales en células HEp-2 infectadas con RSV en presencia de anticuerpos
4. Confirmar la internalización de las glicoproteínas virales en las células HEp-2 infectadas con RSV en presencia de anti-RSV.

MÉTODOS

PROPAGACIÓN DE CÉLULAS HEp-2.

Células HEp-2 se propagaron en D-MEM complementado con 1% de glutamina y 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB) a 56°C por 30 min en botellas de 25 cm², se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Se subcultivaron 2 veces por semana, para lo cual se lavaron 3 veces con PBS y se agregó 1 ml de tripsina 5mg/ml, se resuspendieron en 2 ml para su duplicación.

A las células HEp-2 se les realizó una prueba de detección de micoplasma para descartar contaminación (kit de detección de micoplasma B).

CONGELACIÓN DE CÉLULAS HEp-2

Células HEp-2 se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, se recuperó el botón y se resuspendió en medio para congelar, conservándolas así a -70 °C.

ENSAYO DE DETECCIÓN DE MICOPLASMA

El ensayo de detección de micoplasma se realizó con el sobrenadante de células HEp-2.

1. Solución de anticuerpo

-Depositar 0.25 ml del anticuerpo 1a) anti-Marginini, 1b) anti-M.hyorhinitis, 1c) anti-A.laidlawii, 1d) anti-M. orale, dentro de 4 pozos en una placa E.I.A., e incubar 2 hrs a 37°C.

2. Bloqueo

-Remover la solución de los pozos decantando sobre un lienzo limpio, pipetear 0.25 ml de la solución de bloqueo a todos los pozos con anticuerpos e incubar por 30 min a 37°C.

3. Lavados

-Remover la solución de los pozos decantando, lavar 3 veces con la solución de lavado.

4. Aplicación de la muestra y controles (negativo/positivo)

-Agregar 0.2 ml del sobrenadante de las células HEp-2; agregar 0.2 ml del control negativo y del control positivo en cada pozo correspondiente.

5. Lavados

-Realizar los lavados como se describe en el paso 3

6. Aplicación del anticuerpo de detección

-Depositar 0.2 ml de los anticuerpos para cada especie de micoplasma en los 4 pozos correspondientes e incubar por 2 hrs a 37°C.

7. Lavados

-Cómo se describe en el paso 3.

8. Aplicación de estreptavidina-peroxidasa

-Agregar 0.2 ml de estreptavidina-peroxidasa en cada uno de los 16 pozos cubrir la placa e incubar por 1 hr a 37°C

9. Lavados

-Como se describe en el paso 3.

10. Reacción con el sustrato

-Agregar 0.2 ml de la solución del sustrato en los 16 pozos e incubar por 1 hr a 18-25°C.

11. Evaluación

-Se cuantificaron las muestras a 405 nm.

PROPAGAR EL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO

Monocapas de células HEp-2 con confluencia entre el 80 -100% se infectaron con el RSV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.0, después de dos hrs de adsorción a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, se retiró el inoculó y se reemplazó por medio para infectar, se desprendidas por efecto del virus se recuperaron con el sobrenadante en un tubo cónico de 50 ml, se sonicó (Branson ultrasonic clear mod. 452E) por 10 min y se centrifugó a 1,500 rpm a 4°C durante 10 min en una centrifuga sorval RT 6000d para eliminar restos celulares, se recuperó el sobrenadante y añadió 0.1 M de MgSO₄ para mantener la infectividad del virus, se hicieron alicuotas de 1 ml para su congelación a -70°C y posterior titulación.

TITULACIÓN DEL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO

Células HEp-2 se crecieron en placas de 96 pozos y se infectaron con 50 µl de cada una de las diluciones seriadas 1:10 de la suspensión viral por cuadruplicado, el inoculó se dejó por dos horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, transcurrido el tiempo de incubación se sustituyó por medio para infectar dejándose así hasta observar efecto citopático (EPC).

El cálculo del TCID₅₀ se realizó utilizando el método de Kärber (50).

$$TCID_{50} = -A - \delta (S - 0.5)$$

En donde:

A = \log_{10} donde el 100% de pozos presentaron efecto citopático.

δ = \log_{10} del factor de dilución.

S = suma de los pozos que presentan efecto citopático incluyendo aquella donde el 100% también lo presentan.

- -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8 -9 -10 -11

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| A | * | * | * | | | | | | | | | |
| B | * | * | | | | | | | | | | |
| C | * | * | * | | | | | | | | | |
| D | * | * | * | * | | | | | | | | |
| E | * | * | | | | | | | | | | |
| F | * | * | | | | | | | | | | |
| G | * | * | * | | | | | | | | | |
| H | * | * | * | | | | | | | | | |

Con efecto citopático

Sin efecto citopático

Usando los valores del esquema anterior, tenemos que:

$$A = -2$$

$$\delta = \log_{10} 10 = 1$$

$$S = 1.750 \text{ o la suma de}$$

$$-2: 8/8 = 1.000$$

$$-3: 5/8 = 0.625$$

$$-4: 1/8 = 0.125$$

$$-5: 0/8 = 0.000$$

$$1.750$$

Remplazando los valores en la ecuación:

$$TCID_{50} = A - \delta (S - 0.5)$$

$$= -2 - (1) (1.75 - 0.5)$$

$$= -2 - 1.250$$

$$= -3.25$$

$$= 10^{-3.25} / 50 \mu l$$

PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG DEL SUERO POR COLUMNA DE SEFAROSA

Las IgG del suero preinmune se purificaron por columna de sefarosa, la proteína A se reconstituyó en 1 ml de agua desionizada y se colocó con una pipeta en una jeringa con la punta tapada con fibra de vidrio, dejándola así por 15 minutos, se lavó la columna con 6 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 8.0, seguido por un lavado de 2 ml con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 8.0. Posteriormente se colocó 1 ml de muestra de suero preinmune dejándola por dos horas a temperatura ambiente. La columna se lavó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8.0 colectándose fracciones de 1 ml y se determinó la densidad óptica a 280 nm hasta obtener valores de cero. Se comenzaron a eluir las IgG de la columna con ácido acético 0.1 M y NaCl 0.15 M pH 2.0 colectándose fracciones de 1 ml en tubos de eppendorf nuevos que contenían 100 μ l de tris-HCl 1 M pH 8.0, y se cuantificó la concentración de proteína a 280 nm en un espectrofotometro, las fracciones obtenidas con densidades ópticas de 0.9-2.172 se mezclaron y dializaron contra PBS 1x pH 4, y se determinó la concentración de anticuerpos neutralizantes.

CUANTIFICACIÓN DE IgG INMUNE Y PREINMUNE

Para cuantificar la cantidad de IgG inmune y preinmune por el método de Bradford, se realizaron 10 diluciones seriadas de albúmina sérica bovina (ASB) 1:10 tomando 40 μ l de cada una de las diluciones para mezclar con 10 μ l de las muestras de IgG preinmune e inmunes por separado y por duplicado en placas para ELISA de 96 pozos, añadiendo en cada una 160 μ l de la solución de Bradford 1:5 esperando 5 minutos para leer a 480 nm.

CUANTIFICACIÓN DEL TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Se realizaron seis diluciones seriadas 1:3 de las inmunoglobulinas anti-RSV lo mismo se realizó para las inmunoglobulinas preinmunes por duplicado se tomaron 60 μ l y se incubaron 30 min a 37°C con 60 μ l de virus con un título de 1×10^5 , transcurrido este tiempo se inocularon con 50 μ l de esta mezcla, monocapas de células HEp-2 crecidas con anterioridad en placas de 96 pozos, después de 2 hrs de absorción a 37°C, se retiró el inóculo sustituyéndolo con medio para infectar el calculo se hizo por el método de Kärber, tomando en cuenta, que en esta ocasión el título se expresó como la última dilución en donde no se observa efecto citopático.

DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTÍGENOS POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA RSV.

DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES EN LA MEMBRANA CELULAR EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-RSV

Se crecieron 1×10^4 células Hep-2 en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina [$1\mu\text{g}/\text{ml}$] (durante 30 min a temperatura ambiente y lavados 2 veces con PBS) para aumentar la adhesión celular, infectándose por 12 hrs con el RSV Long a MOI de 100 y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-RSV e IgG de suero preinmune 1:5 durante una cinética de 1hr y media a 37°C , se lavaron tres ocasiones con PBS 1% de ASB e incubaron con el anticuerpo 1:50 anti-RSV conjugado con FITC por una hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS 1% de ASB y fijaron con paraformaldehído al 0.4 % por 15 min, finalmente se lavaron con PBS para su posterior análisis, por microscopía confocal

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS INTRACELULARES

Se sembraron 1×10^4 células Hep-2 en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina se dejaron así por 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , se inocularon 12 hrs con RSV Long a una MOI de 100, transcurrido este tiempo se incubaron a diferentes tiempos (10, 20, 30, 40, 50 y 60 min.) con IgG 1:5 (obtenidas de la purificación de suero inmune y preinmune) se lavaron 3 veces con PBS 1% de albúmina sérica bovina (ASB), se fijaron y permeabilizaron las células con metanol frío (-20°C) por cinco minutos y acetona (-20°C) por 30 segundos, se realizaron 3 lavados con PBS 1% ASB y bloquearon toda la noche a 37°C con PBS 0.1% de ASB + 2% de SFB, se lavaron tres veces, cada uno de cinco minutos con PBS 1% de ASB, tween20 al 0.05% e incubaron con el anticuerpo anti-RSV 1:50 durante una hora a 37°C . Se lavaron con PBS 1% ASB, finalmente se incubaron con FITC-conejo anti-Cabra 1:50 por una hora a temperatura ambiente y se lavaron una vez con PBS y dos con agua destilada, para su posterior análisis en microscopía confocal.

INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS

Células Hep-2 (1×10^4) se crecieron en cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina con anterioridad, e infectaron por 12 hrs a MOI de 100 con RSV. Para el ensayo de inhibición de endocitosis las células se incubaron con D-MEM al 2 % de SFB y 0.3 M de sacarosa por 30 min a 37°C ; Al termino de este tiempo se realizó un lavado con D-MEM, 2% de SFB e incubaron en

medio hipertónico por diferentes tiempos (10 min a 60 min) las células se fijaron, permeabilizaron y se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para detectar los antígenos virales.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal MRC600 de Bio Rad (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) adaptado a un Axioskop Zeiss con un objetivo Plan-Neofluar 40X/0.75 PH 2. Se colectaron series de cortes ópticos utilizando el filtro de excitación blue 488 nm y un filtro de emisión de BHS para observar fluoresceína. Los datos confocales fueron colectados utilizando el software CoMOS de Bio-Rad con un Z-step de 1.08 nm.

VIABILIDAD

Células de HEp-2 (1×10^4) se crecieron sobre cubreobjetos preparados con poli-L lisina, se infectaron con RSV a una MOI de 100 por 12 hrs e incubaron con el anticuerpo anti-RSV por 1.5 hrs, 48 hrs y 72 hrs. Posteriormente, a las células se les añadió 200 μ l de EDTA por 5 min, se resuspendieron con 15 μ l de tripsina [5 μ g/ml], 5 μ l de medio para infectar y 5 μ l de azul tripano para el conteo celular.

*la preparación de medios y soluciones se describe en apéndice.

RESULTADOS

PROPAGACIÓN DE CÉLULAS HEp-2

Para el ensayo de modulación antigénica era importante que las células HEp-2 estuvieran libres de contaminantes, puesto que el contaminante más común en las líneas celulares es el micoplasma se determinó mediante un ensayo de ELISA (Mycoplasma detection kit) Tabla I.

| Especies de Micoplasma | Sobrenadante de células HEp-2 | | Control - | Control + |
|------------------------|-------------------------------|-------|-----------|-----------|
| | D.O | D.O | D.O | D.O |
| <i>M. arginini</i> | 0.492 | 0.562 | 0.545 | 1.557 |
| <i>M. hyorhinis</i> | 0.398 | 0.386 | 0.386 | 0.695 |
| <i>A. laidlawii</i> | 0.454 | 0.439 | 0.441 | 1.519 |
| <i>M. orale</i> | 0.362 | 0.345 | 0.360 | ***** |

D.O densidades ópticas

TABLA I. Detección de micoplasma en células HEp-2.

Observamos que los valores de D.O de los sobrenadantes de las células HEp-2 son negativos con respecto a los presentados por los controles positivos del kit de detección de micoplasma, por lo que se decidió trabajar con estas células para la propagación del Virus Sincitial Respiratorio (RSV) y posteriores ensayos de inmunofluorescencia.

PROPAGACIÓN DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

Las células HEp-2 se infectaron con el RSV a una MOI de 1, los sobrenadantes se cosecharon cuando el efecto citopático fue claramente visible (Fig. 3).

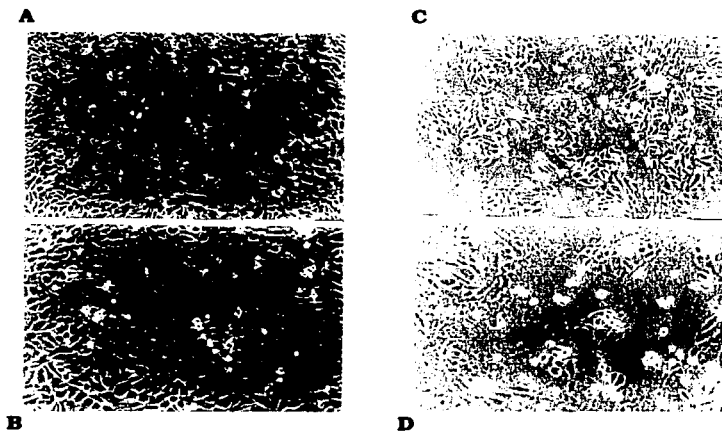


FIG.3. Sincitias característico producido por el Virus Sincitial Respiratorio. A) Células HEp-2 10 X, B) 40x, C) Células Infectadas a MOI de 1 con RSV y D) 40 X.

TITULACIÓN DEL VIRUS

Para obtener un stock del Virus Sincitial Respiratorio en células HEp-2 se realizaron varios pases, los resultados se muestran en la TABLA II.

| Núm. de pase | TCID ₅₀ |
|--------------|----------------------------|
| 1 | 6.3 X 10 ² /ml |
| 2 | 6.32 X 10 ³ /ml |
| 3 | 6.3 X 10 ⁵ /ml |
| 4 | 6.3 X 10 ⁶ /ml |
| 5 | 1.1 X 10 ⁷ /ml |

Tabla II. Pases realizados al Virus Sincitial Respiratorio en células HEp-2.

En el pase 5 se obtuvo un virus con alto título (1x 10⁷ TCID₅₀/ml) y que producía un efecto citopático claro en células HEp-2 (Fig.3).

El virus obtenido de este pase se utilizó para todos los ensayos posteriores.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

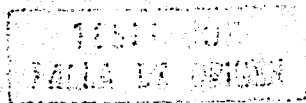
DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL EN CÉLULAS INFECTADAS CON RSV POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para determinar las condiciones óptimas para la detección de antígenos virales, se infectaron células HEP-2 a una MOI de 1 a diferentes tiempos (8 y 24 hrs) paralelamente se hizo un control de células sin infectar. Los anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia (anti-RSV y anti-IgG fluoresceinado) se diluyeron 1:250 y 1:50 respectivamente, en estas condiciones, en las células infectadas se observó que la intensidad de fluorescencia fue baja y de una distribución homogénea en el citoplasma, sin embargo, al observar las células sin infectar la intensidad de fluorescencia fue semejante a la de las células infectadas por lo que no se fue posible distinguir las células infectadas de las no infectadas.

Con los resultados anteriores se decidió cambiar las diluciones de los anticuerpos 1:250 del anti-RSV y 1:250, 1:500 del conjugado, a 8 hrs de infección debido a que en ese el tiempo aún no hay liberación del virión. Usando la dilución 1:250 de ambos anticuerpos se observó una intensidad de fluorescencia mayor, tampoco fue posible distinguir claramente las células infectadas de las no infectadas, lo que nos hizo pensar que el anticuerpo fluoresceinado se estaba uniendo inespecíficamente.

Para comprobar si había unión inespecífica del anticuerpo fluoresceinado, se infectaron las células a una MOI de 1 por 8 hrs y se incubaron sólo con el anticuerpo fluoresceinado (1:250) y se observó que efectivamente se unía inespecíficamente. Para eliminar el ruido producido por el anticuerpo fluoresceinado, se usó otro amortiguador de bloqueo, PBS con 1 % de ASB y 2 % SFB, también se cambió la multiplicidad de infección así como la concentración de los anticuerpos y los tiempos de infección.

Células HEP-2, se infectaron a una MOI de 100 durante 12 hrs los anticuerpos anti-RSV e IgG- FITC se usaron a una dilución 1:50, observándose los siguientes resultados analizados en un microscopio confocal (Fig. 4).



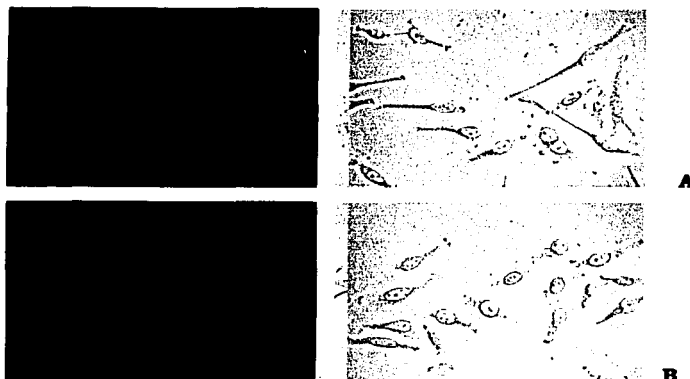


Fig.4. Detección de antígenos virales en células Hep-2 infectadas con RSV a una MOI de 100 12 hrs p.i. A) Células infectadas, B) Células sin infectar. (Panel izquierdo luz UV, panel derecho luz visible).

En la Fig.4 se muestra que los antígenos virales se encuentran homogéneamente distribuidos en el citoplasma de células infectadas y que en el control no se observa fluorescencia inespecífica.

Los resultados anteriores nos permitieron determinar las condiciones óptimas de MOI, tiempo de infección y concentración de los anticuerpos que permitieron identificar claramente los antígenos virales en las células infectadas.

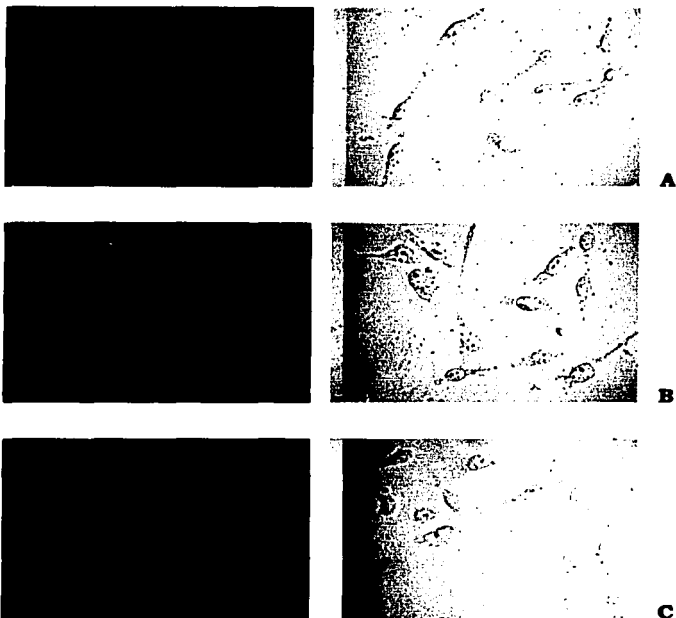
Estas condiciones se utilizaron posteriormente para los ensayos de modulación antigénica por anticuerpo anti-viral.

DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES EN LA MEMBRANA CELULAR EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-RSV

La distribución de los antígenos virales en la membrana de células Hep-2 infectadas e inducida por la incubación con [0.03 mg /ml] el anticuerpo

anti-RSV, se determinó durante una cinética de 1 hr fijándose con paraformaldehído al 0.4% cada 10 min del tratamiento.

En la figura 5 se muestra que los antígenos virales están distribuidos en la membrana celular al tiempo cero y 10 min después de incubarse con el anticuerpo anti-RSV, mientras que a los 20 min de incubación se observó que los antígenos virales se encuentran aglomerados o formando "capping" en el 10 % de las células infectadas. Mientras que en el resto de las células se observó una distribución homogénea de la fluorescencia en la membrana.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

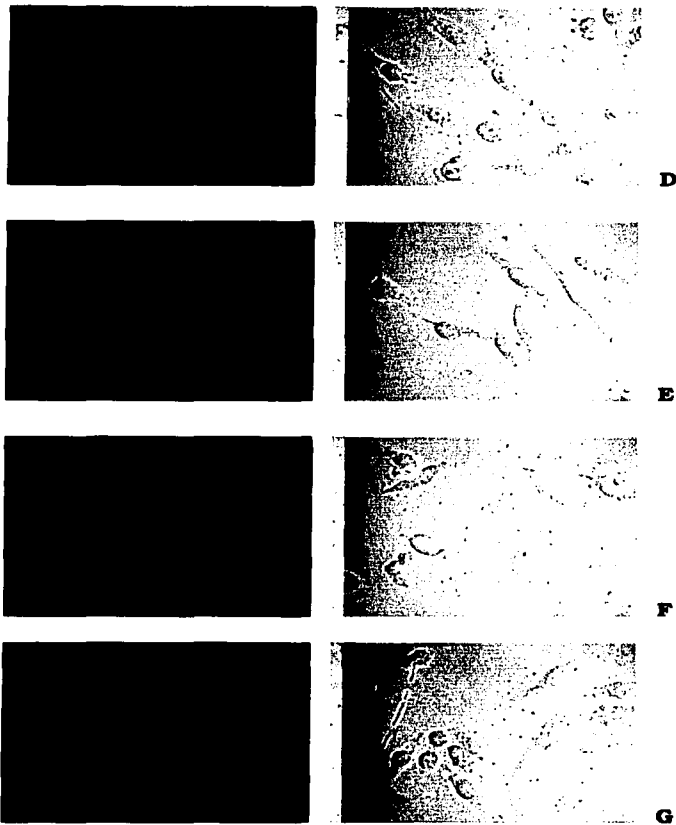
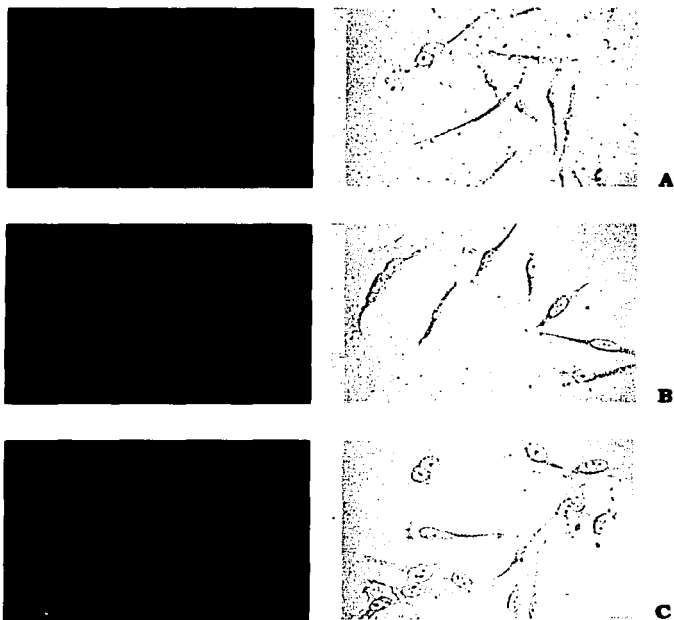


Fig.5. Detección de los antígenos virales en la membrana de células HEp-2 infectadas en presencia del anti-RSV a A)0, B)10, C) 20, D) 30, E) 40, F) 50 y G) 60 min de la incubación con el anticuerpo. (Panel izquierdo luz UV, Panel derecho luz visible)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS INTRACELULARES

Para determinar que los antígenos virales posiblemente fueron internalizados por la incubación en presencia de anti-RSV en células HEP-2 infectadas, las células se fijaron y permeabilizaron a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min de incubación con el anticuerpo anti-RSV (Fig.6) y se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta en las condiciones anteriormente mencionadas.



TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

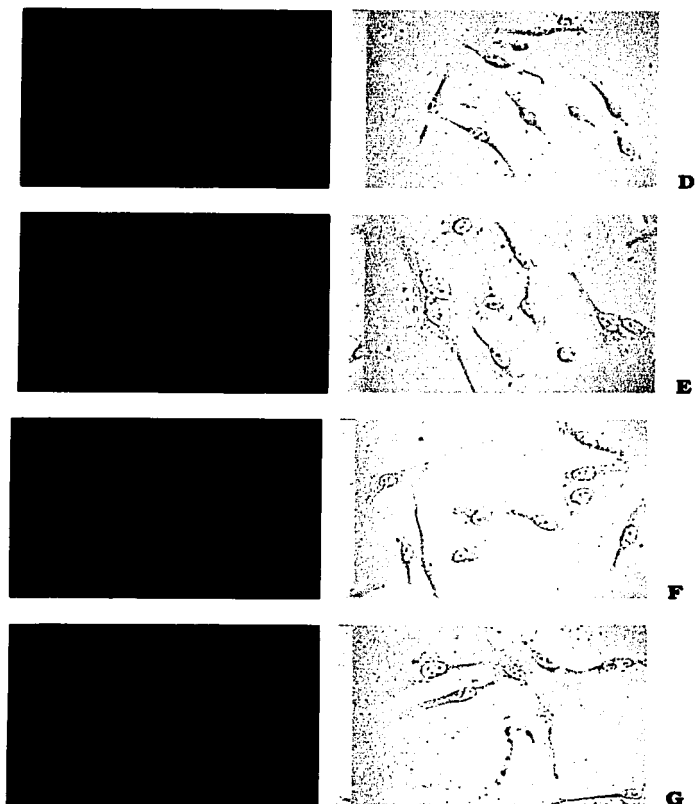


Fig.6. Distribución de los antígenos virales en el citoplasma de células HEp-2 infectadas e incubadas con el anticuerpo anti-RSV a diferentes tiempos A) 0, B) 10, C) 20, D) 30, E) 40, F) 50, G) 60 min. (Panel izquierdo luz UV, panel derecho luz visible).

Durante la cinética se mostró que a los tiempos 20, 40 y 60 min hay disminución en la intensidad de la fluorescencia detectada en el

citoplasma, sin embargo, a los tiempos 10, 30 y 50 min, se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia por la incubación con el anti-RSV.

Para confirmar la especificidad del efecto se usó como control IgG de suero preinmune y se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

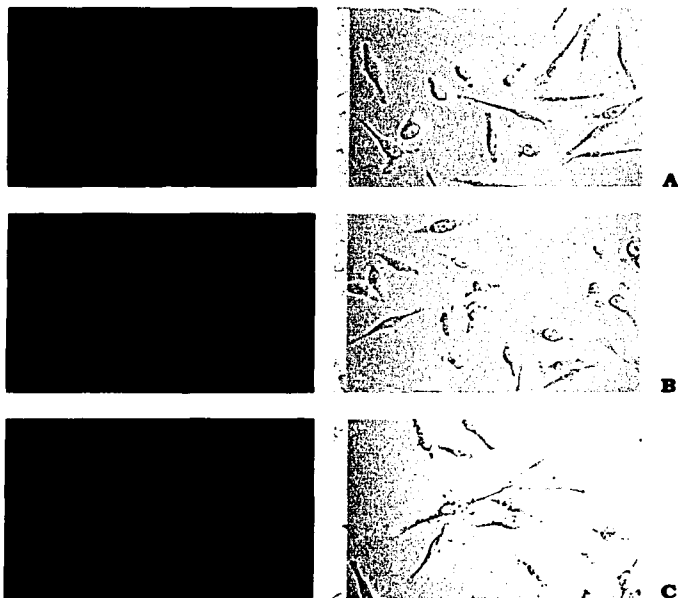


Fig.7.Células HEP-2 infectadas con RSV 12 hrs e incubadas con anticuerpo preinmune durante una cinética de 1hr. A) 0, B) 10, C) 20 min. (Panel izquierdo luz UV, panel derecho luz visible)

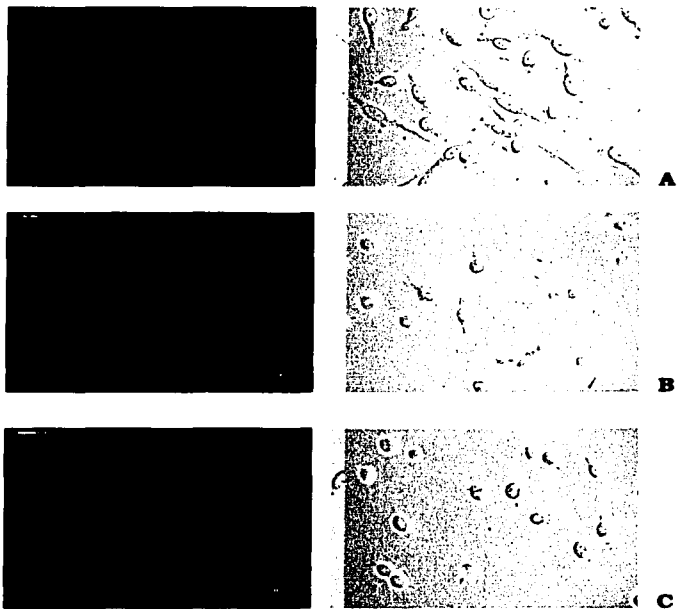
El uso de IgG preinmune (Fig. 7) no alteró la expresión de los antígenos en las células, lo que confirma que el efecto esta dado por la unión del anti-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RSV con los antígenos virales, lo que sugiere que el fenómeno de modulación antigénica por anticuerpo es específico. Además de mostrar que a tiempos cortos de incubación con el anti-RSV puede inducirse aglomeración e internalización de los antígenos virales.

INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES.

Para determinar la internalización inducida por el anti-RSV de las glicoproteínas de la membrana en las células infectadas se incubaron en medio hipertónico (0.3 M de sacarosa).



TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

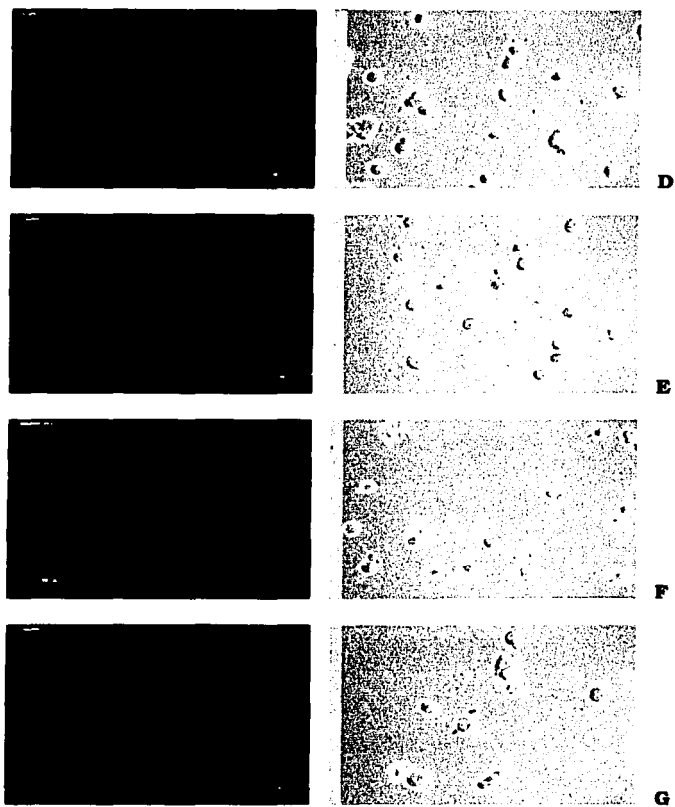


Fig. 8. Inhibición de la internalización de los antígenos virales en medio hipertónico a diferentes tiempos de incubación con el anti-RSV A) 0, B) 10, C) 20, D) 30, E) 40, F) 50 y G) 60 min. (Panel izquierdo luz UV, panel derecho luz visible).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados mostraron que al incubar en medio hipertónico se inhibió la internalización de los antígenos virales, lo que sugiere que posiblemente la disminución en la intensidad de fluorescencia que se observó a los 20, 40 y 60 min (Fig.6) fuera debido a una endocitosis

VIABILIDAD

Para evaluar si la presencia de anticuerpos específicos para el virus tienen efecto sobre la viabilidad de las células infectadas a MOI de 100 con RSV, células HEp-2 se incubaron con 0.03 mg/ ml del anticuerpo anti-RSV a diferentes tiempos (1.5, 48 y 72 hrs) y se determino la viabilidad celular por exclusión con azul tripano (tiñe específicamente a las células muertas) (Fig.9).

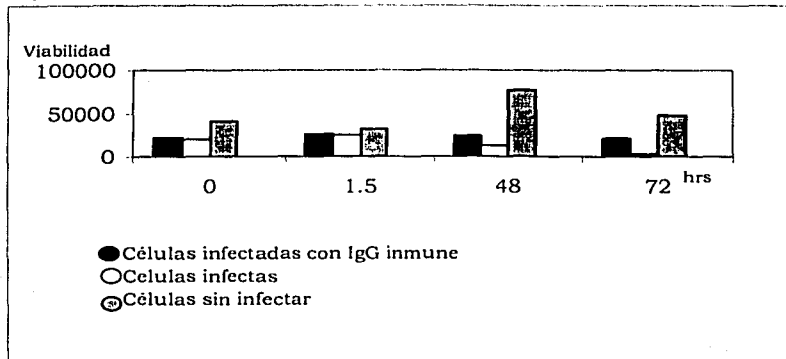


Fig.9. Viabilidad de células HEp-2 durante la incubación con anti-RSV. Los datos son el promedio de ensayos por triplicado.

Se observó que la viabilidad no es alterada significativamente entre los tiempos 0 y 1.5 hrs comparados entre la presencia o ausencia del anticuerpo. Alrededor de las 48 hrs, la viabilidad comienza a decrecer, independientemente de la presencia del anticuerpo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el fenómeno de modulación antigénica, inducido por el anticuerpo anti-RSV en células HEp-2 infectadas con el Virus Sincitial Respiratorio.

I. Redistribución.

La interacción entre los antígenos virales y el anticuerpo antiviral inducen la redistribución de las glicoproteínas virales de la membrana celular, resultados similares se reportan para los virus de sarampión, influenza, parainfluenza y varicela zoster (5, 18, 14 y 15).

Nosotros observamos que el anticuerpo anti-RSV en tiempos cortos es capaz de modificar la distribución de los antígenos virales en la membrana, la presencia de "capping" a los 20 min es semejante a lo reportado para el virus de pseudorabia en donde a los 10 min del tratamiento con anticuerpo antiviral, los antígenos virales forman "cap", sin embargo en un mayor porcentaje (47 %) en las células SK-6 infectadas con el PrV, que en los resultados obtenidos por nuestro sistema (14). El tratamiento con IgG preinmune en células infectadas y bajo las mismas condiciones, confirma que este fenómeno es específico y solo se presenta con anticuerpos anti-RSV.

Joshep y Oldstone (1974) describen que el fenómeno de "capping" y redistribución de los antígenos virales, no es un requerimiento esencial para el mecanismo de modulación (7, 10). Con lo que podríamos explicar el bajo porcentaje de células infectadas que presentaron "capping" en nuestro sistema.

II. Internalización.

Los resultados en las células permeabilizadas después de la incubación con el anti-RSV, mostraron que la intensidad de fluorescencia en el citoplasma aumentaba y disminuía en forma cíclica con respecto al tiempo del tratamiento en el citoplasma de las células.

Lo que sugiere que efectivamente los antígenos virales fueron internalizados y que el fenómeno observado al parecer es cíclico.

La internalización de antígenos virales se ha reportado para el virus de pseudorabia al adicionar anticuerpos policlonales anti-PrV a monocitos infectados con PrV, la endocitosis se presentó en el 65 % de las células infectadas a los 10 min de la adición del anticuerpo (15).

Olson *et. al* (1997) demuestran que la adición de anticuerpo monoclonal anti-gE de varicela zoster induce endocitosis de la glicoproteína E (gE) en células HeLa infectadas (51).

Para confirmar la internalización de los antígenos virales se inhibió la endocitosis de las glicoproteínas utilizando el método reportado para varicela zoster.

Encontramos que al incubar con medio hipertónico (0.3 M de sacarosa), las glicoproteínas se localizaron en la membrana de las células infectadas, lo cual posiblemente podríamos explicarlo porque las vesículas son responsables de la transferencia de receptores desde la membrana plasmática hacia endosomas tempranos. Ya que se ha reportado que la internalización vía vesículas es perturbado por soluciones hipertónicas (52, 53 y 54).

Otros reportes apoyan nuestras observaciones 1) Dukas and Zigmond muestran que la exposición de leucocitos polimorficos a medio que contiene 0.43 M de sacarosa causa la rápida y reversible inhibición de la internalización de los péptidos quimiotácticos mediada por receptores, sugiriendo que la función de las vesículas cubiertas de clatrina es inhibida por hipertonidad (52). 2) Hansen *et. al.* encuentran que la incubación en medio hipertónico remueve la clatrina de la membrana y esta se acumula en el citoplasma (53). 3) Heuser *et. al.* encuentran que la incubación con medio hipertónico interfiere con la interacción entre la clatrina y el adaptador HA2, los cuales proveen el aparato molecular para una selectiva y eficiente internalización de las proteínas que contienen una secuencia de reconocimiento en su tallo citoplásmico (54).

El proceso de endocitosis mediada por receptor, esta regulada por citoesqueleto, secuencias señal y clatrina.

A) Citoesqueleto

Van de Walle *et. al.* han reportado que elementos de citoesqueleto (actina, miosina, dineína y microtubulos) participan en la internalización de los antígenos virales de pseudorabia (16, 17).

La importancia de la actina durante el proceso de la internalización o endocitosis aún no es clara, sin embargo se ha reportado que el uso de inhibidores de la polimerización, reduce significativamente la endocitosis.

Los microtubulos funcionan como vía de transporte de las vesículas hacia el interior de las células, la adición de colchicina inhibidor de la polimerización de los microtubulos resulta en la reducción en la internalización de las glicoproteínas, lo cual sugiere la importancia de estos durante el proceso. La dineína que media el transporte de las vesículas, es co-localizada en glicoproteínas endocitadas, por lo tanto los componentes celulares microtubulos y dineína son importantes durante el proceso de internalización de los antígenos virales inducido por el anticuerpo (16, 17).

La posible participación del citoesqueleto en nuestro modelo aún esta por determinarse.

B) Secuencias señal

Se ha reportado que el motivo **YXX ϕ LL** en el tallo citoplásmico de receptores celulares muestran ser cruciales para su endocitosis, donde **Y** representa una tirosina, **X** un aminoácido, ϕ es un aminoácido hidrofóbico y **LL** es una doble leucina.

La endocitosis mediada por receptores permite la entrada de macromoléculas vitales para el apropiado funcionamiento de las células.

La fase de entrada de este proceso es iniciada por el agrupamiento de los receptores en regiones de la membrana, para su posterior internalización, vía vesículas cubiertas de clatrina. Estos cambios favorecen la unión de casein cinasa al tallo del receptor, fosforilando a tirosina en la secuencia

YXXL. Esta primera fosforilación induce una cascada de fosforilación y desfosforilación, enviando una señal al núcleo y finalmente comenzar la endocitosis del receptor. Se ha reportado que la carencia de los tallos citoplásmicos en receptores de baja densidad (LDLR) y transferrin (TR) disminuye su internalización. (55, 56 y 58).

Favoreel *et. al.* demostraron que la mutación de un residuo de tirosina localizada en un motivo YXX ϕ en la proteína gB del virus de Pseudorabia resulta en un decremento en la internalización de la glicoproteína inducida por el anticuerpo, resultados similares son reportados por Olsons *et. al.* para la glicoproteína gE de varicela zoster, demostrando que la secuencia antes mencionada es esencial para la endocitosis (55, 57 y 51).

De posible interés en este contexto tal vez es la presencia de una secuencia **YXX ϕ** y **LL** en el tallo citoplásmico de las glicoproteínas virales (F, G y SH) expresadas en la membrana de células infectadas con RSV.

En la proteína G observamos la siguiente secuencia **YKLNL**, en F **YDPL** y **LL** y en SH **YFTL** y **LL** (59) por lo que posiblemente la presencia de estas secuencias esté interviniendo en la internalización de los antígenos virales observados en nuestros resultados.

Una característica importante en nuestro sistema es la reproducibilidad del mismo ya que en todos los ensayos realizados se obtuvieron resultados similares.

Nuestros resultados muestran que la redistribución e internalización de los antígenos virales de la membrana celular son inducidas por el anticuerpo antiviral y posiblemente represente una estrategia de evasión del sistema inmune, mecanismo usado por el virus para favorecer que su información genética permanezca en el hospedero.

CONCLUSIONES

La interacción del anticuerpo anti-RSV con los antígenos virales de la membrana celular inducen:

- 1) "Capping" del 5 al 10 % de las células.
- 2) Distribución homogénea de los antígenos virales en el citoplasma.
- 3) Internalización de los antígenos virales.
- 4) No se afecta la viabilidad celular.

APÉNDICE

MATERIAL DE PLÁSTICO

- Botella de cultivo de 25 cm² (NUNC, Roskilde denmark Cat no. 163371)
- Botella de cultivo de 75 cm² (NUNC, Roskilde denmark Cat no. 147589)
- Botella de cultivo de 150 cm² (NUNC, Roskilde denmark Cat no. 144881)
- Cajas de petri para cultivo de tejidos (NUNC, Roskilde denmark Cat no. 172931)
- Criotubos de 1.8 ml (SIMPART Cat no. R1725-9)
- Cubreobjetos de vidrio de 10 mm (Knittel gläser Alemania)
- Raspador celular de 32 cm (NUNC, Roskilde denmark, Cat no. 179707)
- Portaobjetos de vidrio (SLIDES China., Cat no. 7102)
- Placas de cultivo de 96 pozos (NUNC, Roskilde denmark Cat no. 167008)
- Placas de 96 EIA/RIA (COSTAR, Broadway, Cambridge., Cat no. 3590)

REACTIVOS QUIMICOS

- Acetona (MERCK, Darmstadt, Alemania., Cat no. 9070457)
- Ácido acético (J.T. Baker, Danvers, MA., Cat no 9705-05)
- Ácido etilendiaminotetracético EDTA (J.t Baker, Inc, Danvers, MA., Cat no 8993)
- Albumina serica bovina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no A-4503)
- Azul tripano (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. T-5526)
- Carbonato de sodio (J.T Baker, Inc, Danvers, MA., Cat no. 3602)
- Cloruro de potasio (J.T Baker, Inc, Danvers, MA., Cat no. 106570N)
- Cloruro de sodio (REPROQUIFIN Cat no. RA 20115)
- Fosfato de potasio dibásico (Química dinámica analítica, México, Mex., Cat no. 325220)
- Fosfato de potasio monobásico (J.T Baker, Inc, Danvers, MA., Cat no. 3246-01)
- Glucosa
- Metanol (MERCK, Darmstadt, Alemania., Cat no. MX0488-1)
- Poli-l-lisina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no P-1399)
- Polietilenglicol (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. P-2139)
- Solución Bradford (BIO-RAD, Laboratories, Hercules, Cal., Cat no 500-0006)
- Sacarosa (MERCK, Darmstadt, alemania., Cat no. 7651)
- Sulfato de magnesio (J.T Baker, Inc, Danvers, MA., Cat no. 2500-01)
- Tris HCl (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. T-3253)
- Trizma Base (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. T-1503)
- Tripsina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. T-2395)
- Tween₂₀ (BIO-RAD, Laboratories, Hercules, Cal., Cat no. 159728A)

ANTICUERPOS

-Anticuerpo policlonal de conejo anti-cabra conjugado con FITC (ZYMED Laboratories, San Francisco., Cat.no 61- 1611)

-Anticuerpo policlonal de cabra anti-RSV (Chemicon, Cat no. AB1128)

-Anticuerpo de cabra anti-conejo IgG-FITC (Santa Cruz, Santa Cruz CA., Cat no)

La dilución de los anticuerpos se realizó en PBS 1x, 1% de albúmina sérica bovina inactivada.

-kIT DETECCION de micoplasma (Boehringer mannheim, Cat no. 1296 744)

MATERIAL BIOLÓGICO

CELULAS HEp-2

-Células HEp-2 derivadas de carcinoma epidermis de laringe inicialmente obtenidas de ATTC (American Type Culture Collection CL23) y donada al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina por el Doctor Trudel del Instituto Armand Frappie de Montreal Canadá.

VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

-Virus sincicial respiratorio cepa Long (ATTC VR 26) donada al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina por el Doctor Trudel del instituto Armand Frappie, Montreal Canadá.

MEDIO DE CULTIVO

-Dubelco's modified eagle medium D-MEM (GIBCO-Laboratories, Grand Island, NY., Cat no. 12100-038)

SUPLEMENTOS

-Suero fetal bovino (GIBCO-Laboratories, Grand Island, NY., Cat no. 16 000 004)

-Bicarbonato de sodio (Productos Químicos Monterrey, Monterrey, Méx.,

-HEPES (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no. H-0763)

-L-glutamina (GIBCO-Laboratories, Grand Island, NY., Cat no. 25030-081)

-Penicilina G (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO., Cat no P-3032)

PREPARACIÓN DE D-MEM

D-MEM se disuelve en un litro de agua esterilizada se agrega 2.2 g de bicarbonato de sodio y 2.2 g de HEPES ajustando el pH a 7.4 y se filtra a través de una membrana con un poro de 0.22 μm (Millipore corporation , Bedford, massachusetts 01730., Cat no GSWP 047 00).

MEDIO COMPLETO

Al D-MEM se le adiciona 5% de suero fetal bovino inactivado (a 56°C durante 30 minutos) 1% de glutamina y 100 UI/ml de penicilina, 100 μg de estreptomocina y se filtra con una membrana de 0.22 μm .

MEDIO PARA INFECTAR

Al D-MEM se le agrega 2% de suero fetal bovino inactivado, 1% de glutamina y se filtra con una membrana de 0.22 μm .

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

A un litro de agua destilada se le adiciona

-Cloruro de sodio 0.8g

-Cloruro de potasio 0.2g

-Fosfato de sodio dibásico anhidro 0.96g

-Fosfato de potasio monobásico 0.2g

Se ajusta a pH 7.4 con HCl 1M y se esteriliza a 121°C por 30 minutos.

PREPARACIÓN DE MEDIO PARA CONGELAR

10% de suero fetal inactivado. 1% de DMSO se filtra y se guarda a -20°C.

SOLUCION EDTA

-NaCl 0.9g

-EDTA 0.2g

En 1000 ml y se filtra con una membrana de 0.22 μm .

SOLUCION DE LAVADOS PARA LA INMUNOFLUORESCENCIA

-Albúmina serica bovina al 1% en 100 ml de PBS

-0.1% de albúmina serica bovina y 0.05% de tween₂₀ en 100 ml de PBS

SOLUCION PARA BLOQUEAR

-Albúmina serica bovina al 0.1% y 2% de Suero Fetal Bovino en 100 ml de PBS.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.5 M pH 8.0

-Fosfato de sodio monobásico 34.49g

-Fosfato de sodio dibásico 35.39g

En 500 ml de agua destilada.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.1 M pH 8.0

-Fosfato de sodio monobásico 4.13g

-Fosfato de sodio dibásico 4.25g

En 300 ml de agua destilada.

Tris-HCl 1M pH8.0

-Tris-HCl 15.76g

En 100ml de agua destilada.

ACIDO ACETICO 0.1 M NaCl 0.15 M pH 8.0

-Ácido acético 0.60 ml

-Cloruro de sodio 0.876 g

En 100 ml de agua destilada.

MEDIO HIPERTONICO

A 100 ml de D-MEM se le adiciono 0.3 M de sacarosa.

GLUCOSA PARA DILUIR LA TRIPSINA

A un litro de agua destilada se le adiciona

-Cloruro de sodio 0.8g

-Cloruro de potasio 0.4g

-NaHCO₃ 0.58g

-Glucosa 1g.

TRIPSINA

5µg/ml de tripsina en 10 ml de glucosa

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Oldstone, B. A., Fujinami, S. R. and Lampert, W. P. 1980. Membrane and cytoplasmic changes in virus-infected cells induced by interactions of antiviral antibody with surface viral antigen. *Prog. Med. Virol.* 26:45-93.
- 2) Genovesi, V. E., Maarx, A. P., and Wheelock F. 1977. Antigenic modulation of friend virus erythroleukemic cells in vitro by serum from mice with dormant erythroleukemia. *The Journal of Experimental Medicine.* 146:520-534.
- 3) Zebedee, L. S., and Lamb, A R. 1989. Growth restriction of influenza A virus by M₂ protein antibody is genetically linked to the M₁ protein. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1061-106.
- 4) Hughey, G. P. Roberts, C. P., Holsinger, J. L., Zebedee, L. S., Lamb, A. R., and Compans, W. R. 1995. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on surface expression and virus assembly. *Virology.* 212:411-421.
- 5) Lydy, L. S., and Compans, W. R. 1993. Role of the cytoplasmic domains of viral glycoproteins in antibody-induced cell surface mobility. *Journal of Virology.* 67:6289-6294.
- 6) Fujinami, S. R., Norrby, E., and Oldstone, B. A. 1984. Antigenic modulation to measles virus hemagglutinin alters expression of other viral polypeptides in infected cells. *The Journal of Immunology.* 132:2618-2621.
- 7) Joseph, S. S., and Oldstone, B. A. 1974. Antibody-induced redistribution of Measles virus antigens on the cell surface. *The Journal of Immunology.* 113:1205-1209.
- 8) Schneider-Schaulies, S., Liebert, G. U., Segev, Y., Rager-Zisman, B., Wolfson, M., and Ter, M. V. 1992. Antibody-dependent transcriptional regulation of Measles virus in persistently infected neural cells. *Journal of Virology.* 66:5534-5541.
- 9) Zinnheimer-Dreikorn, J., and Koschel, P. K. Antigenic modulation of measles subacute sclerosing panencephalitis virus in a persistently infected rat glioma cell line monoclonal anti-hemagglutinin antibodies. *Journal of General Virology.* 71:1391-1394.

- 10) Barret, N. P., Koschel, K., Carter, M., and Meulen, T. V. 1985. effect of measles virus antibodies on a measles sspe virus persistently infected C6 rat glioma cell line. *Journal of General Virology*. 66:1411-1421.
- 11) Goldman, B. M., O'brain, A. T., Buckthal, J. D., Tetor, M. L., and Goldman, N.J. 1995. Supression of measles virus Expression by nocitolytic antibody in an inmortalized macrofage cell line. *Journal of Virology*. 69:734-740.
- 12) Chantler, K. J., and Davies, A. M. 1987. The effect of antibody on rubeolla virus infection in human lymphoid cells. *Journal of General Virology*. 68:1277-1288.
- 13) Abernathy, S. E., Wnag, Y. C., and Frey, K. T. 1990. Effect of antiviral antibody on maintenance of long-term rubeolla virus persistent infetion in Vero cells. *Journal of Virology*. 64:5183-5187.
- 14) Favoreel, W. H., Nauwynck, J. H., Oostveldt, V. P., Mettenleiter, C. T., and Pensaert, B. M. 1997. Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. *Journal of Virology*. 71:8254-8261.
- 15) Favoreel, W. H., Nauwynck, J. H., Halewyck, M. H., Oostveldt, V. P., Mettenleiter, C. T., and Pensaert, B. M. 1999. Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *Journal of Virology*. 80:1283-1291.
- 16) Van de Walle, R. G., Nauwynck, J. H., Oostveldt, V. P., and Pensaert, B. M. 2002. Antibody-induced internalizzation of viral glycoproteins in pseudorabies virus-infected monocytes and role of the cytoskeleton: a confocal study. *Veterinary Microbiology*. 86:51-57.
- 17) Van de Walle, R. G., Nauwynck, J. H., Oostveldt, V. P., and Pensaert, B. M. 2001. Involvement of cellular cytoskeleton components in antibody-induced internalization of viral glycoproteins in pseudorabies virus infected monocytes. *Virology*. 288:129-138.
- 18) Sadzot-Delvaux, C., Marc, P., Lebon, L., Merville-louis, P. M. Piette, J Rrentier, Bernard. 1992. Antibodies to varicella zoster virus modulate antigen distribution but fail to induce viral persistence in Vitro. *Journal of Virology*. 66:7499-7504.
- 19) Treanor, J. J., Tierney, L. E., Zebedee, L. S., Lamb, A. R., and Murphy, R. B. 1990. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *Journal of Virology*. 64:1375-1377.

- 20) Liebert, G. U., Schneidr-Schaulies, S. Baczko, K., and Meulers, V. 1990. Antibody- induced restriction of viral gene expression in measles encephalitis in rats. *Journal of Virology*. 64:706-713
- 21) Remmohan, W. K., Mc Farland, F. H., and McFarlin, E. D. 1981. Induction of subacute murine measles encephalitis by monoclonal antibody to virus hemagglutinin. *Nature*. 290:588-589.
- 22) Buchmeier, J. M., Lewicki, A. H., Talbot, J. P., and Knobler, L. R. 1984. Murine hepatitis virus -4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated *in vivo* by monoclonal antibody. *Virology*. 132:261-270.
- 23) Alexandersen, S., Larsen, S., cohn, A., Uttenthal, A., Race, E. R., Assted, B., Hansen, M., and Bloom, E. M. 1989. Passive transfer of antiviral antibodies restricts replication of aleutian mink disease parvovirus *in Vivo*. *Journal of Virology*. 63:9-17.
- 24) Alexandersen, S., Storgaard, T., Kamstrup, N., Assted B., and Porter, D.1994. Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus infection: Effects of suppression of antibody response on viral mRNA levels and on development of acute disease. *Journal of Virology*. 68:738-749.
- 25) Collins, P. L., k. McIntosh, and R. M. Chanock. 1996. Respiratory syncytial virus, p . 1313-1351. *In* B. N. Fields (ed.), *Fields Virology*. Raven Press, New York, N.Y.
- 26) Dudas, R. L., and Karron R. A.1998. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 11:430-9.
- 27) Bolt, G., Pedersen, L.O. and Birkeslund, H. H. 2000. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Research* 68 :25-33.
- 28) Rixon, W. McL. H., Brown, C. Brown, G. and Sugrue, J. R.2002. Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cells. *Journal of General Virology*.83:61-66.
- 29) Fearn, R., Peeples, E. M. and Collins, L. P. 2002. Mapping the trnascrption and replication promoters of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*. 76:1663-1672.
- 30) Palomo, C., Cane P. A. and Melero J. A. 2000. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: Influence of strain variation and carbohydrate side chains. *Journal of Medical Virology* 60:468-474.

- 31) Karron, R. A., buonagurio, D. A., Georgiu, A. F., Whitehead, S. S., Adamus, J. E., Clements- Mann, M. L., Harris, D. O., Randolph, V. B., Udem, S. A., Murphy, B. R., Sidhu, M. S. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for replication viral in vitro: evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13961-13966.
- 32) Ray, R., Hoft, D. F., Meyer, K., Brown, R., Lagging, M., and Belshe, R. B. 2001. Immunoregulatory role of secreted glycoprotein G from respiratory syncytial virus. *Virus Research*. 75:147-154.
- 33) Hendricks, D. A., McIntosh, K., Patterson, J. L. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*. 62:2228-2233.
- 34) Burkreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, R. B., and Collins, L. P. 1997. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and site specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *Journal of Virology*. 71:88973-8982.
- 35) Feldman, S. A., Crim , R. L., Audet, S. A. and Beeler, J. A. 2001. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. *Archives of Virology*. 146: 2369-2383.
- 36) Atreya, L. P., Peeples, E. N. and Collins, L. P. 1998: The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcriptio and RNA replication. *Journal of virology*. 72:1452-1461.
- 37) Fearn, R. and Collins, L. P. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of Virology*. 73: 5852-5864.
- 38) Hallak, K. L., Collins, P.L., Knudson, W. and Peeples E. M. 2000. Iudoric acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 271:264-275.
- 39) Techaarppornkul, S., Collins, L. P. and Peeples, E. M. 2002. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycoaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology*. 294:296-304.
- 40) Heminway, B. R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine K. G., Gustafson, E., Berstein, J. M. and Galinski, M. S. 1994. Analysis of respiratory

- syncytial virus F, G and SH proteins in cell fusion. *Virology*. 200:801-805.
- 41) Behera, K. A., Matsuse, H., Kumar, M., Kong, X. Lockey, F. R. and Mohapatra, S. S. 2001. Blocking intracellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochemic and Biophysical Research Communications*. 280:188-195.
 - 42) Murray, R. P., Kobayashi, S. G., Pfaller, A. M., and Rosenthal, S. K. 1997. *Microbiología médica*. Harcourt Brace. págs.631.
 - 43) Brown, g., Aitken, J., Mcl. Rixon, W. H. and Sugrue, J. R. 2002. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus during virus assembly on the surface of virus-infected cells. *Journal of General Virology*. 83 611-621.
 - 44) Fields, N. B., Knipe, M. D., and Howley, M. P. 1996. *Fundamental virology*. Lippincott-Raven. 1340. pp.
 - 45) Barreno, G. B., Delgado, T. and Melero, A. L. 1996. Identification of the regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *Journal of Virology*. 70: 801-808.
 - 46) Vaca-Marin, M. A., et al. 1999. Panorama epidemiológico de las infecciones respiratorias agudas en niños menores de cinco años de los Estados Unidos Mexicanos. *INER*. 12:120-128.
 - 47) Secretaria de Salud México. 2000. www.ssa.gob.mx
 - 48) Coates, H. V., D. W. Alling and R. M: Chanock. 1966. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am. J. Epidemiol*. 83:299-313.
 - 49) Wyde, R. P. 1998. Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral research*. 39: 63-79.
 - 50) Trudel, M., and p, Payment. 1993. *Methods and techniques in virology*. Ed. marcel Dekker. USA. 31-35 pps.
 - 51) Favoreel, W. H., V. G., Nauwynck, J. H., Oosvtveldt, V. P., and Pensaert, B. M. 2000. Role of anti-gB and -gD antibodies in antibody-induced endocytosis of viral and cellular cell surface glycoproteins

- expressed on pseudorabies virus-infected monocytes. *Virology*. 267:151-158.
- 52) Daukas, G., and Zigmond, S. H. 1985. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell. Biol.* 101:1673-1679.
- 53) Hansen, H. S., Sandvig, K., and Deurs, V. B. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: Effects of potassium depletion, Hypertonic medium and cytosol acidification. *The Journal of Cell Biology*. 121:61-72.
- 54) Heuser, E. J., and Anderson, W. R. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coat pit formation. *The Journal of Cell Biology*. 108:389-400.
- 55) Olson, K J. and Grose, Ch. 1997. Endocytosis and recycling of varicella zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: Internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail. *Journal of Virology*. 71:4042-4054.
- 56) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and D. Watson J. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland. 1294. pp.
- 57) Favoreel, W. H., Minnebruggen, V. G., Nauwynck, J. H., Enquist, W. L., and Pensaert, B. M. 2002. A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *Journal of Virology*. 76:6845-6851.
- 58) Sandoval, I., and Bakke, O. 1994. Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends in Cell Biology*. 4:292-297.
- 59) www.PubMed.com/ Nucleotide.