

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por el virus de
pseudorrabia en células 3T3, MDCK y C6**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
PRESENTA FELÍCITAS ALCÁNTAR MEZA**

**Asesor Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate
Coasesor M. en C. Crisóforo Mercado Márquez
Cuautitlán Izcalli, Mex., agosto de 2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Cátedra “Morfología veterinaria y biología celular” (clave GVC-10) que forma parte del programa PACIVE de la FES Cuautitlán

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios porque me dio la oportunidad de llevar a término la carrera de M.V.Z.

A la U.N.A.M., campus F.E.S. Cuautitlán por adoptarme como alumna y poner a mi disposición todo lo referente a la carrera, como las prácticas y libros.

A mi asesor Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate por la gran paciencia que me tuvo y el valioso tiempo brindado y los conocimientos sobre Biología Celular, para llevar a cabo esta tesis.

A mis hijos Rubén, Germán, Edith y Luis Gabriel Valencia Alcántar por el gran apoyo y ayuda que siempre estuvieron dispuestos a darme.

A mi esposo Emiliano Valencia Lucas por su comprensión y apoyo económico.

A los perros que dieron su vida para adquirir los conocimientos sobre Anatomía comparada, Anatomía Topográfica y Cirugía.

Al ganado vacuno, caprino, ovino, y equino, propiedad de la F.E.S. Cuautitlán, ellos me sirvieron para prácticas en todo lo relacionado a la carrera de M.V.Z.

A todos los maestros de las materias que comprende la carrera porque, todos sin excepción me trataron con amabilidad y respeto.

A mis compañeros y amigos por alentarme a seguir adelante.

Gracias a todos por la ayuda para terminar mi carrera.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Características del virus.....	5
2.2. Ciclo viral.....	7
2.3. Mecanismos de infección <i>in vitro</i>	9
2.4. Citoesqueleto de las células eucariontas.....	10
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Virus y cultivos celulares.....	16
4.2. Marcaje de actina.....	16
4.3. Ensayo de infección para las células C6.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células 3T3.....	18
5.2. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células MDCK	20
5.3. Las células C6 son altamente refractarias al desarrollo viral.....	22
5.4. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células C6.....	24
6. DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Resumen

El virus de pseudorrabia o de la enfermedad de Aujeszky, es un herpesvirus de la subfamilia Alphaherpesviridae cuyo único huésped natural es el cerdo. Se ha reportado que algunos virus utilizan el citoesqueleto de las células del huésped con el fin de facilitar aspectos importantes de su ciclo de vida como es la entrada, egreso y difusión intercelular. Así, existen múltiples evidencias de que los herpesvirus son capaces de modificar el citoesqueleto de actina durante su ciclo infeccioso. Sin embargo, la importancia biológica de estos eventos no está totalmente entendida. En este trabajo se investigaron las modificaciones que los filamentos de actina de las líneas celulares 3T3, MDCK y C6 desarrollan por la interacción con el virus de pseudorrabia. Las células fueron infectadas con 50 μ l de una suspensión viral (TCID₅₀ $\times 10^{-2.92}$), marcadas con faloidina rodaminada y las modificaciones encontradas fueron observadas y documentadas en un microscopio de epifluorescencia. Se encontró que al ser infectadas con el virus de pseudorrabia, las líneas celulares utilizadas (3T3, MDCK y C6) desarrollaron rearrreglos del citoesqueleto de actina, de los cuales los filopodios fueron la forma más sobresaliente. En relación al tiempo transcurrido, la línea celular 3T3 fue la más receptiva a la interacción con el virus originando modificaciones del citoesqueleto de actina a las 15 horas postinfección (hpi), mientras que en las células MDCK se empezaron a observar hasta las 21 hpi. Por lo que respecta a la línea celular C6, uno de los efectos más sobresaliente fue el redondeo celular que desarrollaron inicialmente estas células. Asimismo las células C6, fueron las más refractarias ya que los efectos citopáticos y los rearrreglos del citoesqueleto de actina inducidos por la infección viral se presentaron hasta las 46-48 hpi. Adicionalmente, es importante señalar que las modificaciones del citoesqueleto tuvieron diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares utilizadas. Se sabe que el desarrollo del ciclo viral depende del tipo celular y que durante la interacción del virus con las células intervienen una gran cantidad de proteínas tanto celulares como virales, aunque a la fecha aún se desconocen los factores que probablemente están provocando esta variación. Finalmente se puede señalar que este estudio conforma un modelo adecuado en el cual profundizar el estudio de la interacción viral con el citoesqueleto de las células eucariotas.

Introducción

La enfermedad de Aujeszky fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1813, observándose que el ganado vacuno padecía un intenso prurito y finalmente moría; por lo tanto la enfermedad fue llamada “locura prurítica”. En Suiza, en 1849, se le nombró “pseudorrabia” ya que los signos clínicos que presentaba el ganado vacuno eran similares a los de la rabia. En 1902 Aujeszky estableció que el agente etiológico no era bacteria, mientras que Schmiedhofer (1910) confirmó que era un virus. Sabin y Wrigth (1934) lo identificaron como un herpes virus, inmunológicamente relacionado con el herpes simple. Otras características biológicas de los *alfaherpesvirus* son los ciclos de replicación lítica de menos de 24 horas y la capacidad de establecer infecciones latentes en los ganglios sensitivos del sistema nervioso y en el tejido linfóide de las tonsilas (Wheeler y Osorio, 1991).

El cerdo es el único huésped natural del virus de pseudorrabia (PRV) aunque algunas especies pueden ser infectadas de forma natural o experimental. El PRV es infeccioso para bovinos, ovinos, cabras, perros, gatos y conejos. Por otra parte es muy difícil infectar equinos y aves, y los primates superiores, incluyendo el hombre, no son susceptibles a la infección (Pejsak y Truszczynsky, 2006). También existen animales silvestres que son susceptibles a la infección mortal de PRV, los más comunes son ciervo, coatí, coyote, jabalí, mapache, rata, ratones, tejón, zarigüeya y zorro (Stevely, 1975).

La Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2003) ha reportado brotes de pseudorrabia en poblaciones porcinas de todo el mundo, resultando esto en grandes pérdidas económicas para los países afectados (Pomeranz y col., 2005). La distribución geográfica es amplia y abarca a los Estados Unidos, Gran Bretaña, Europa, norte de África, Sudamérica, Nueva Zelanda e Irlanda (Radostits y col., 2007).

Por su parte, en nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica), reportó en octubre de 2010; que 18 entidades federativas son libres de esta enfermedad, hay escasa prevalencia en cinco estados (Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Oaxaca) y seis estados están en fase de erradicación (Coahuila, Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Nayarit, Región Lagunera y Tabasco) (Senasica-SAGARPA, 2010, URL: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2840>)

En cerdos, la morbilidad y mortalidad de PRV son dependientes de la edad del animal (Pejsak y Truszczynski, 2006). Típicamente la enfermedad se propaga con rapidez a lo largo de un período de 1 a 2 semanas y la fase aguda del brote dura de 1 a 2 meses. En cerdos lactantes, la morbilidad y mortalidad se aproxima al 100%, pero en cerdos adultos puede no haber signos clínicos y los animales afectados suelen recuperarse. La máxima mortalidad se produce inicialmente en lechones sin destetar, pero a medida que el brote continúa y las nuevas crías logran inmunizarse pasivamente por el calostro de la madre, la mayor incidencia puede ocurrir en destetados (Radostits y col., 2007).

El factor de riesgo más importante para la persistencia del virus es el tamaño de la piara y la densidad de población de las cerdas en reproducción en la granja. El virus puede sobrevivir durante 2-7 semanas en un medio infectado dependiendo de las fluctuaciones de temperatura y nivel de pH (Pejsak y Truszczynski., 2006).

El virus está presente en la secreción nasal y en la cavidad oral de los cerdos afectados desde el primer día de la enfermedad y hasta 17 días después. La transmisión en el seno de las piaras se produce por contacto directo entre los cerdos infectados y susceptibles, y por los aerosoles que se proyectan durante los estornudos, pero también se puede transmitir a través del agua o del alimento contaminado. Por lo general, la transmisión de una piara a otra ocurre por la introducción de animales infectados (Pensaert y Kluge, 1989).

La vía de entrada son abrasiones de la piel o la mucosa nasal intacta. Si bien se produce viremia con localización del virus en muchas vísceras, la multiplicación se realiza fundamentalmente en las vías respiratorias superiores. La diseminación al encéfalo se produce a través de los nervios olfatorio, glossofaríngeo o trigémino. Cuando el virus penetra en el cuerpo por una abrasión de la piel invade rápidamente los nervios periféricos locales, se desplaza por transporte retrógrado axonal y lesiona a las neuronas. Es esta forma de progresión la que causa prurito local en las primeras fases de la enfermedad y encefalomiелitis en una etapa posterior. El virus puede estar presente en el ganglio trigémino de una cerda infectada naturalmente sin historia de enfermedad clínica. Asimismo, la tonsila palatina es un lugar de replicación del virus y sirve como zona de vigilancia de la liberación del virus durante la infección aguda y la reactivación (Mettenleiter, 2000). Los cerdos que se recuperan de la infección son portadores latentes del virus de por vida. Se puede producir reactivación, seguida de la liberación y

diseminación del virus, cuando los animales son sometidos a situaciones de estrés como el transporte, los partos o por la administración de corticosteroides (Kluge y col., 1999).

Los principales signos de la infección se encuentran en los sistemas respiratorio, nervioso y reproductor. La enfermedad del sistema nervioso es la manifestación principal, pero con algunas cepas, la afección respiratoria puede ser el rasgo más importante y de presentación inicial (Pejsak y Truszczynsky, 2006). Antes de la aparición de signos nerviosos se produce una reacción febril, con temperaturas de hasta 41.5°C. La falta de coordinación progresiva de las patas traseras va seguida de postración, temblores musculares finos y movimientos de pateo. En unos cuantos animales aparece desviación lateral de la cabeza, emisión de espuma por la boca, nistagmo, ligera secreción ocular y episodios convulsivos. Muchos cerdos afectados tienen una respiración con ronquidos y movimientos aparentes del abdomen, algunos presentan vómito y diarrea. La muerte se produce 12 horas después de la aparición de los primeros signos (Kluge y col., 1999). En adultos puede haber fiebre o no y la infección provoca sólo un síndrome leve de anorexia, embotamiento, agalactia y estreñimiento. Sin embargo, las cepas virulentas pueden provocar enfermedad aguda en adultos. La infección al principio del embarazo suele provocar muerte del embrión o aborto y retorno rápido al celo. La infección en las fases tardías de la gestación provoca aborto o el parto de fetos momificados. El aborto se produce por la fiebre o por la infección del feto (Pejsak y Truszczynsky, 2006).

No existen lesiones macroscópicas típicas de la enfermedad y el diagnóstico se basa en las pruebas de laboratorio como: aislamiento viral, considerado el método de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de PRV. Otras técnicas utilizadas, son; inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ensayo de la inmunoperoxidasa en monocapa, virus neutralización, aglutinación en látex, ELISA y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuando ha habido prurito, existen lesiones considerables en zonas localizadas de la piel y un abundante edema subcutáneo. A la necropsia, los pulmones muestran congestión, edema y hemorragias. También puede haber hemorragias bajo el endocardio y un exceso de líquido pericárdico. Se observa una discreta esplenomegalia, meningitis y pequeños focos necróticos en el bazo e hígado. Histológicamente, existe un daño grave y extenso de las neuronas de la médula espinal, los ganglios paravertebrales y el cerebro. En la sustancia

gris existen manguitos perivasculares y necrosis focal, sobre todo en la corteza del cerebelo. La presencia de lesiones necrosantes con formación de cuerpos de inclusión en las vías respiratorias superiores y en pulmones son altamente sugestivas de pseudorrabia (Radostits y col., 2007).

Cuando se infectan por una cepa virulenta, los cerdos desarrollan una respuesta inmune que puede evitar de forma completa o casi completa que el virus se replique si el cerdo se reinfecta. Después de la infección natural, las cerdas adquieren inmunidad, que transmiten a sus crías por el calostro y persiste en los lechones hasta la 5ª o 7ª semana de edad. La vacunación de los cerdos con virus atenuados de pseudorrabia evita la enfermedad clínica y la muerte. Sin embargo, la vacunación no evita la infección aguda o latente por el virus virulento (Pejsak y Truszczyński, 2006).

Características del virus

El nuevo orden de *herpesvirales*, recientemente establecido (Davison y col., 2009), incluye virus con una gran molécula de ADN y que exhiben una morfología común con una nucleocápside que contiene al genoma y una envoltura lipídica separadas por una matriz de naturaleza proteica llamada tegumento (Pellett y Roizman, 2007). Su secuencia genómica y el arreglo de los genes exhiben una significativa homología lo que permite la identificación de un “core” de casi 40 genes conservados, los cuales pueden intervenir en funciones relacionadas con el ciclo de replicación del virus respectivo (McGeoch y Rixon, 2006; Pellett y Roizman, 2007).

El virus de pseudorrabia es un virus de ADN envuelto que porta un genoma lineal de alrededor de 145 kb. Es lo suficientemente grande para codificar alrededor de 100 proteínas. Las dimensiones globales del virus son de 150 a 180 nm de diámetro y la nucleocápside mide 105-110 nm. La nucleocápside está compuesta de por lo menos 6 proteínas que varían de 11.5 a 146 kDa (Stevely, 1975). La envoltura del virus contiene por lo menos 11 proteínas estructurales con pesos moleculares que varían entre 16.5 a 100.2 kDa (Klupp y col., 1992); ocho de estas proteínas tienen residuos de azúcares y se denominan glicoproteínas (g) (Mettenleiter, 2000). Originalmente, se designaban con números romanos o por su peso molecular. En los últimos años este sistema de nomenclatura ha sido reemplazado por el sistema de letras empleado para designar las

proteínas de los herpesvirus humanos (herpes simple tipo 1 y 2). La razón del cambio es facilitar la comparación de las propiedades biológicas de proteínas homólogas de diferentes herpesvirus (Kluge y col., 2000; Mettenleiter, 2000).

Los genes que codifican muchas de las proteínas mencionadas anteriormente no son esenciales para la replicación del virus (Michael y col., 2006). Así tenemos que las cepas vacunales del virus de pseudorrabia han sido manipuladas por ingeniería genética para que sean deficientes en gE, gC, gG y TK (Timidin-Cinasa) (Quint y col., 1987).

La virulencia del PRV está controlada en forma sinérgica por varios genes entre los que se pueden señalar a los que codifican para gE, gD, gI y TK (Simon y col., 1989; Kritas y col., 1994; Mulder y col., 1996).

Las proteínas gB, gC y gD parecen ser las más importantes en lo que respecta a la inducción de inmunidad. Esta conclusión se basa en la observación de que los anticuerpos monoclonales que representan múltiples epítomos de la gB neutralizan el virus de la pseudorrabia *in vitro* y también son activos en la prueba de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (Pejsak y Truszczynsky, 2006).

Cuadro 1. Nomenclatura y función de las proteínas de envoltura del virus de pseudorrabia (Kluge y col., 2000; Mettenleiter, 2000).

Nomenclatura antigua	Nomenclatura moderna	Función			
		Unión	Penetración	Difusión Intercelular	Difusión Neuronal
gI	gE	-	-	(+)	(+)
gIIa, b y c	gB	-	+	+	+
GIII	gC	(+)	-	-	-
Gp50	gD	(+)	+	-	-
Gp63	gI	-	-	(+)	(+)
gX	gG	-	-	-	-
gH	gH	-	+	+	-
gL	gL	-	+	+	-

Clave: +, función esencial; (+), función no esencial ó moduladora; -, no participa.

Las cepas de alta virulencia pueden aislarse a partir de macrófagos alveolares (Iglesias y col., 1992), epitelio de los bronquiolos terminales, hepatocitos, células linfoides de bazo y nodos linfáticos, células de la corteza suprarrenal, trofoblastos y embriones del útero grávido y células lúteas del ovario (Bolin y Bolin, 1984).

Ciclo viral

El desarrollo del ciclo viral del PRV se ha estudiado a nivel de cultivo celular en una amplia variedad de linajes celulares, desde neuronas a monocitos, pero de manera particular se han empleado líneas de células epiteliales de riñón de diferentes especies (Vero, SK6, PSEK, PK, RK, GBK y MBDK).

La infección celular inicia con la unión de viriones libres a las células blanco, seguida por la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática (1, 2) (Mettenleiter, 1994). La interacción entre las glicoproteínas de la envoltura viral y los componentes de la superficie celular que actúan como receptores del virus es crítica para la unión y la fusión (Pejsak y Truszczynsky, 2006).

El primer contacto entre el virus y la célula blanco involucra la interacción de gC con el heparan sulfato de la superficie celular (1) (Rue y Ryan, 2003). Además de gD y dos grupos de receptores celulares; heparan sulfato y proteínas relacionadas con el receptor de poliovirus. La entrada requiere de la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral (2). El proceso de fusión involucra al menos a cuatro proteínas virales; gB, gH/gL y gD. La ausencia de cualquiera de estas glicoproteínas produce virus incapaces de realizar la fusión. Después de la translocación de la nucleocápside al citoplasma de la célula huésped, es transportada a la membrana nuclear (3). Dicho transporte se realiza a lo largo de los microtúbulos (4). La cápside es orientada hacia un poro nuclear de tal forma que el vértice ocupado por el portal, un complejo dodecamérico en forma de anillo, queda situado enfrente del poro (5) (Mettenleiter, 2000). Así, el ADN abandona el virión y entra al núcleo a través de dicho complejo (Forest y col., 2005; Chang y col., 2007; Nellisery y col., 2007).¹

Al entrar el ADN lineal al núcleo se circulariza e inicia la transcripción (6). Primero se expresan los genes tempranos-inmediatos, los cuales codifican proteínas reguladoras, en el

¹ Los números entre paréntesis están referidos a la figura 1.

PRV, se trata de un solo gen (IE180) (7). Este es un potente activador de genes tempranos, entre los que se encuentran aquellos que codifican proteínas requeridas para la replicación del ADN y otras funciones enzimáticas. Los genes tempranos se caracterizan por ser expresados antes de la replicación del ADN. La replicación del ADN de los herpesvirus se realiza por un mecanismo de círculo-rodante que conlleva a la síntesis de largas moléculas que necesitan ser cortadas en secuencias genómicas únicas (Mettenleiter, 2000).

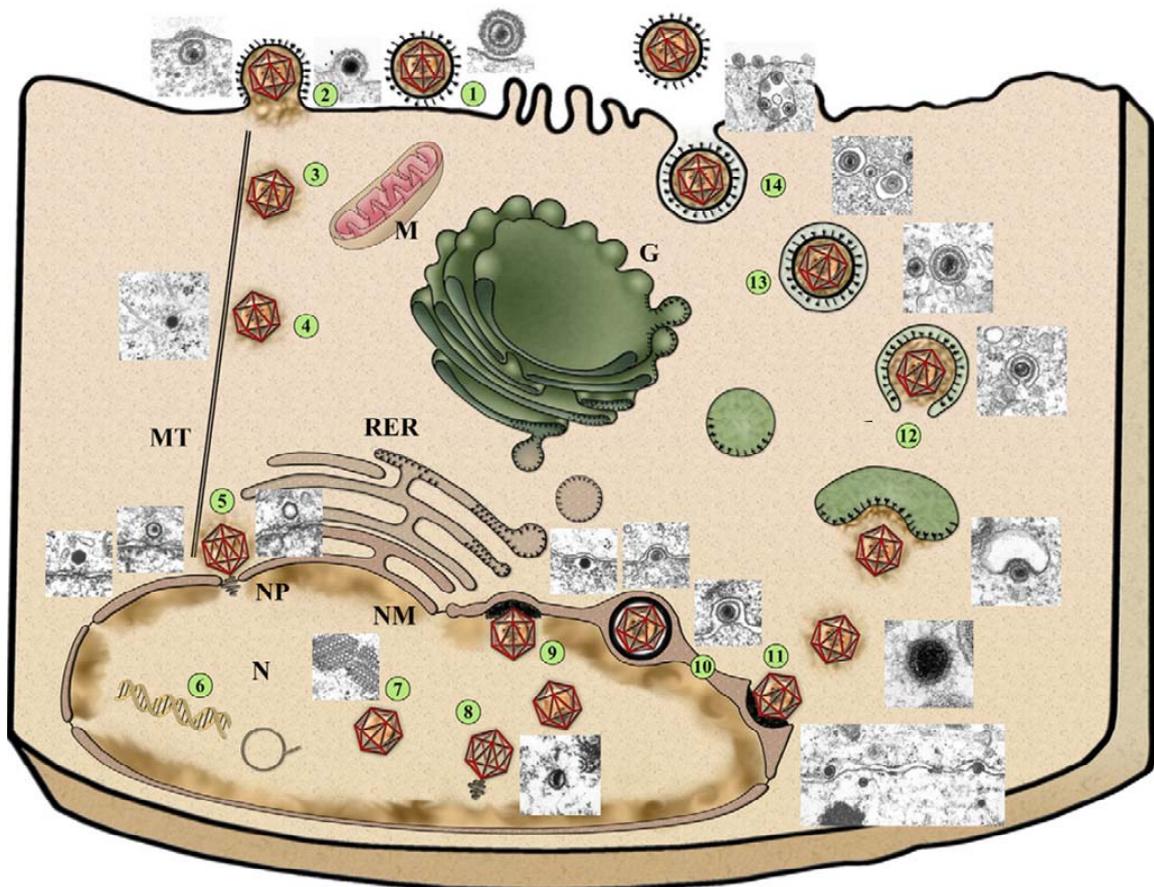


Figura 1. Esquema del ciclo de replicación del virus de pseudorrabia. M. Mitocondria, MT. Microtúbulos, NP. Poro nuclear, N. Núcleo, NM. Membrana nuclear, RER. Retículo endoplásmico rugoso. G. Aparato de Golgi. (Tomado de Mettenleiter, 2009).

Los genes tardíos codifican para los componentes de la cápside y envoltura (como gC), los que después de ser sintetizados en el citoplasma entran al núcleo. El ensamble de la cápside

es un proceso autocatalítico, con y alrededor de una proteína soporte, que sólo requiere de los componentes correspondientes (8). Así que aunque no es requerido para la formación de la cápside, la presencia del complejo portal, parece iniciar la formación de la misma (Huffman y col., 2008; Yang y Baines, 2008).

Las cápsides completas salen del núcleo por gemación a través de la membrana interna del núcleo (9). Esta primera envoltura viral aparece “lisa” al microscopio electrónico lo cual denota la ausencia de glicoproteínas (10). Los viriones dejan el espacio perinuclear por fusión de la envoltura primaria con la membrana externa del núcleo resultando en la liberación de cápsides desnudas al citoplasma (11). Un proceso secundario de envolvimiento se desarrolla en el aparato de Golgi. En este paso, la envoltura muestra con claridad proyecciones que representan a las glicoproteínas (12). El resultado final de estos eventos de gemación es la presencia de una partícula viral completa dentro de una vesícula (13). Finalmente estas vesículas se dirigen hacia la membrana citoplasmática, se fusionan con ella y se liberan las partículas virales al espacio extracelular (14) (Mettenleiter, 2000).

Mecanismos de infección *in vitro*

Se sabe que los herpesvirus infectan a las células por dos mecanismos generales: 1) por viriones libres que se unen a receptores en la superficie de las célula, ó 2) la infección puede propagarse directamente a partir de una célula infectada, la propagación de la infección de célula a célula (propagación intercelular) permite la evasión de los anticuerpos neutralizantes en un huésped inmunizado (Spear, 1993) y las células no infectadas son reclutadas en sincitios en mucho menos tiempo del que tarda una célula infectada en producir viriones (Demmin y col., 2001).

La propagación intercelular de la infección por *alfaherpesvirus* puede producirse por al menos dos procesos. En el primero, la membrana plasmática de la célula infectada se fusiona con la de las células adyacentes no infectadas, dando como resultado la formación de sincitios gigantes y multinucleados (Spear, 1993). No todos los tipos celulares se fusionan cuando son infectadas por estos virus, lo que indica que es necesario un ambiente celular específico (Dingwell y col., 1994). En el segundo proceso, se considera que la difusión de la infección se realiza a través de las uniones intercelulares y, en este proceso, no hay formación de sincitios. También se ha demostrado que el mecanismo molecular por

el cual se realiza la propagación intercelular de la infección es diferente del proceso de infección por viriones libres. Es necesario señalar que la propagación de la infección intercelular requiere un mayor repertorio de proteínas virales del que requiere la infección con viriones libres (Spear, 1993).

El citoesqueleto de las células eucariontas

El citoesqueleto consiste de una red de filamentos proteicos que se extiende por el citoplasma de todas las células eucariotas, proporciona un armazón estructural para la célula y actúa como un soporte que determina la forma celular y la organización general del citoplasma, también es responsable de los movimientos de la célula así como del transporte interno de los organelos y otras estructuras (tales como los cromosomas mitóticos). Así pues, es una estructura dinámica que se reorganiza continuamente según las células se mueven y cambian su forma (Cooper, 2006).

El citoesqueleto está constituido por tres diferentes tipos de filamentos de proteína: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, que se mantienen juntos y unidos a los organelos intracelulares y a la membrana plasmática mediante diversas proteínas accesorias (Alberts y col., 2008).

La proteína citoesquelética más abundante en la mayoría de las células es la actina, que se polimeriza para formar filamentos, los cuales son fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud, estos filamentos se organizan en estructuras de orden superior, formando haces o redes tridimensionales (Favoreel y col., 2007).

El ensamble y desensamble de estos filamentos, sus uniones cruzadas para constituir haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (como la membrana plasmática) se regulan mediante diversas proteínas de unión a actina (Alberts y col., 2008).

Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que proporciona un soporte mecánico, determina la forma de la célula y permite el movimiento de la superficie celular, lo que posibilita que las células puedan migrar, endocitar partículas y dividirse (Alberts y col., 2008).

La actina se aisló por primera vez en 1942 a partir de células musculares, en las que constituye el 20% de la proteína total de la célula. El primer paso en la polimerización de

esta proteína, denominado nucleación, es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina. Los filamentos son entonces capaces de crecer por la adición reversible de monómeros a ambos extremos, pero uno de ellos (el extremo más) crece de a cinco a diez veces más rápido que el otro extremo (extremo menos) (Favoreel y col., 2007). Los monómeros de actina pueden unir ATP, el cual se hidroliza a ADP tras el ensamblaje del filamento. Aunque el ATP no es necesario para la polimerización, los monómeros de actina que lo tienen unido polimerizan más rápido que aquellos que tienen unido ADP (Alberts y col., 2008). La unión y la hidrólisis del ATP desempeñan un papel clave en la regulación del ensamblaje y en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina. Los filamentos se pueden despolimerizar por la disociación de los monómeros, esto permite que estos filamentos se descompongan cuando sea necesario (Gouin y col., 2005). De esta forma, existe un equilibrio aparente entre monómeros de actina y filamentos, que depende de la concentración de los monómeros libres (Cooper, 2006).

Debido a que la actina-ATP se disocia con menos facilidad que la actina-ADP, la concentración crítica de monómeros que es necesaria para la polimerización de los extremos será diferente. Esta diferencia puede dar lugar al fenómeno conocido como “intercambio rotatorio” (treadmilling) que ilustra el comportamiento dinámico de estos filamentos. Para que el sistema se encuentre en un estado de equilibrio general, la concentración de monómeros libres debe ser intermedia entre las concentraciones críticas requeridas para la polimerización de los extremos más y menos. Bajo estas condiciones existe una pérdida neta de monómeros del extremo menos que se compensa con una adición neta al extremo más (Alberts y col., 2008).

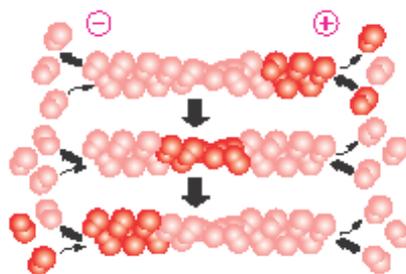


Figura 2. Intercambio rotatorio en los filamentos de actina. Se esquematiza la manera en que las moléculas de actina transitan activamente entre dos estados complementarios, de tal forma que pasan de ser monómeros solubles para formar un filamento de actina. (Tomado de Alberts y col., 2008).

El intercambio rotatorio en la célula, refleja el ensamble y desensamble dinámico de los filamentos de actina que requieren las células para moverse y cambiar de forma (Cooper, 2006; Alberts y col., 2008). La clave para comprender este proceso se obtuvo con el descubrimiento de un grupo de proteínas, el complejo Arp2/3 (Arp; proteínas relacionadas a actina), que se une a la actina/ATP presente en el extremo más para dar origen a una nueva rama (Schroer y col., 1994; Favoreel, 2007).

Las actividades de las proteínas asociadas a actina, esto es; cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controladas por una variedad de mecanismos señalizadores que permiten que la polimerización de actina se regule apropiadamente en respuesta a estímulos ambientales (Gouin y col., 2005). Así, estas proteínas pueden actuar conjuntamente para estimular la renovación de los filamentos y la remodelación del citoesqueleto, lo cual es necesario para que la célula pueda realizar una diversidad de movimientos y cambios en su forma. Esto es una gran tarea de tal manera que en algunos tipos celulares, el ensamble y desensamble de los filamentos es responsable de la mitad de la hidrólisis de ATP en la célula (Cooper, 2006).

Los filamentos de actina se ensamblan en dos tipos generales de estructuras, denominados haces y redes de actina, que desempeñan papeles distintos en la célula. En los haces, los filamentos están entrecruzados por proteínas de unión a actina (fimbrina, α -actinina) que logran disponerlos en estructuras paralelas estrechamente agrupadas. En las redes, los filamentos de actina están unidos a la filamina (otra proteína de unión a actina) que provoca que los filamentos se relacionen formando casi un ángulo recto, con lo cual toman una disposición más holgada y forman mallas tridimensionales que adquieren las propiedades de los geles semisólidos (Alberts y col., 2008).

En la periferia de la célula hay una elevada concentración de filamentos y de proteínas de unión a actina que forman una red tridimensional bajo la membrana plasmática (Alberts y col., 2008). Esta red, denominada corteza celular, determina la forma de la célula y está implicada en diversas acciones de la superficie celular, incluyendo el movimiento. De esta manera, la asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es fundamental para la estructura y función celular (Cooper, 2006).

Las respuestas de la célula a las señales extracelulares con frecuencia suponen alteraciones en la motilidad y en la forma celular. Por lo tanto, el remodelado del citoesqueleto es un

proceso fundamental en la respuesta de muchas células a los factores de crecimiento y a otros estímulos extracelulares. Dentro de estas remodelaciones se incluye la formación de evaginaciones de la superficie celular (filopodios, lamelipodios y ondulaciones en la membrana) así como la formación de adhesiones focales y fibras de tensión (Alberts y col., 2008).

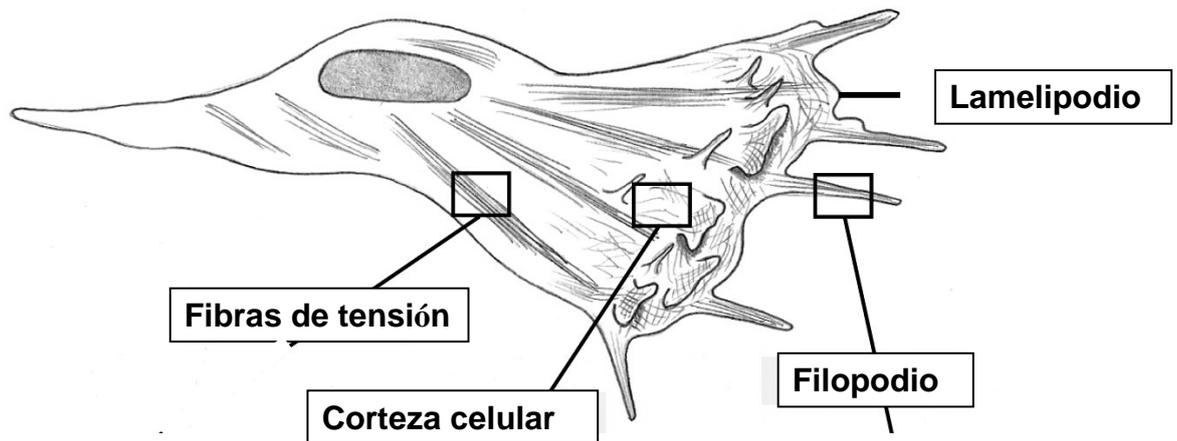


Figura 3. Representación esquemática de las principales remodelaciones del citoesqueleto (tomado y modificado de Alberts y col., 2008).

Los miembros de la familia Rho, Rac1 y Cdc42, proteínas de unión a GTP involucradas en señalar los rearrreglos del citoesqueleto, desempeñan un papel central en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, controlan diversos procesos celulares, incluidos; motilidad, adhesión y citocinesis (Cooper, 2006). Sirven como reguladores universales del citoesqueleto de actina, acoplando las señales extracelulares a las variaciones en el movimiento y en la forma celular (Murata y col., 2005; Favoreel y col., 2007).

Debido a las muchas funciones celulares en las cuales está involucrada la actina, no es sorprendente que muchos patógenos intracelulares interactúen con la actina y las vías de señalización regulatorias (Stevens y col., 2006; Gouin y col., 2005).

Se ha reportado que algunos virus explotan el citoesqueleto de las células del huésped en formas fascinantes para facilitar aspectos importantes de su ciclo de vida como puede ser la

entrada, egreso y difusión intercelular. Por ejemplo, el poliomavirus SV40 interactúa con la actina y los microtúbulos para facilitar el transporte del virus al núcleo (Pelkmans y col., 2001), el virus de Vaccinia interactúa con los microtúbulos e induce la formación de colas de actina para permitir el egreso eficiente y la difusión intercelular en la presencia de anticuerpos (Moss y Ward, 2001). Adicionalmente, se ha mostrado que los miembros de los herpesvirus, adenovirus y retrovirus usan transporte asociado a los microtúbulos para la liberación eficiente del genoma viral al núcleo (McDonald y col., 2002).

Los cambios morfológicos, como el redondeo y la pérdida de contacto con las estructuras subyacentes ya se han descrito *in vitro e in vivo* en células infectadas con PRV, los cuales generalmente están relacionadas con alteraciones en la arquitectura celular del citoesqueleto (Minnebruggen y col., 2002). También se ha observado el desensamble de las fibras de tensión de actina, la retracción y redondeo de las células y la formación de proyecciones conteniendo actina en estados tardíos del ciclo de replicación de los herpesvirus (Favoreel y col., 2007). Sin embargo no siempre es igual, así tenemos que las diferentes interacciones de los herpesvirus con la actina y las Rho GTPasas parecen depender del tipo celular, esto es, el papel de la actina durante la entrada del virus parece depender fuertemente del tipo celular infectado (Demmin y col., 2001). Aunque se conocen varios aspectos de los mecanismos subyacentes a la modificación del citoesqueleto de actina, las relaciones de las proteínas involucradas, virales y celulares, aún no se conocen en detalle.

En un estudio previo, realizado en nuestro laboratorio, se exploró la interacción de PRV con líneas epiteliales derivadas de riñón (PK15, RK13 y VERO) y se documentaron las modificaciones del citoesqueleto de actina y el tiempo empleado para desarrollarlos, es importante resaltar que tanto los efectos citopáticos (ECP) como el tiempo fueron diferentes en cada línea celular. En este nuevo trabajo se explorarán los cambios que podrían ocurrir en relación con los mismos aspectos (ECP y duración del ciclo viral) en células pertenecientes a otros linajes celulares. Así, se describen las modificaciones que los filamentos de actina de las células 3T3 (fibroblastos de ratón), MDCK (células epiteliales de riñón de canino) y C6 (células de glioma de rata) presentan por la interacción con el virus de pseudorrabia.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar las diferencias encontradas en el citoesqueleto de actina durante la interacción del virus de pseudorrabia con las células 3T3, MDCK y C6.

Objetivos particulares:

- a) Describir las modificaciones inducidas en el citoesqueleto de actina por la interacción con el virus de pseudorrabia.
- b) Determinar los tiempos postinfección a los cuales se desarrollan los cambios en el citoesqueleto de actina.
- c) Señalar si las modificaciones del citoesqueleto de actina tienen el mismo comportamiento en las diferentes líneas celulares utilizadas.

Materiales y Métodos

Virus y cultivos celulares

Para realizar este trabajo se utilizaron cultivos de las líneas celulares 3T3, MDCK y C6. Estas células fueron mantenidas en DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 mg./ml.), a 37° C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. El virus que se utilizó proviene de un brote de campo, fue aislado en el CENASA e identificado como cepa Minnesota. El aislado viral tiene un título de $50 \times 10^{-2.92}$ (TCID₅₀). Para realizar los ensayos de infección, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos colocados dentro de una caja de cultivo de 100mm. de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia se eliminó el sobrenadante; se depositaron 50 µl del aislado viral diluido en 1 ml de DMEM, se dejó adsorber por una hora, y se agregaron 8 ml de medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora durante las siguientes 24 horas. Para documentar la progresión del ciclo replicativo, se fue recuperando un cubreobjeto cada 2 horas a partir de las 15 hpi y, estas muestras, fueron expuestas a faloidina rodaminada. Con cada ensayo de infección se realizó un cultivo paralelo (tres cubreobjetos en una caja de 60 mm.) que no fue infectado (control negativo) y que fueron sembrados y recuperados al mismo tiempo que los cultivos infectados.

Marcaje de actina

Los cubreobjetos obtenidos se fijaron con paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) por 10 min a temperatura ambiente (TA), después de lo cual fueron lavados con PBS y bloqueados con una solución de albúmina (BSA) al 1%. Se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.5% en PBS. Sobre cada cubreobjeto se colocaron 50µl de faloidina rodaminada (Sigma, cat. P1951) diluida 1:200 en PBS durante 30 minutos a TA en cámara húmeda, finalmente se lavaron con PBS y agua desionizada y se colocaron sobre un portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Sc 24941 (Santa Cruz Biotechnology). Finalmente se hizo la observación al microscopio de fluorescencia (marca Carl Zeiss) y se realizó el registro fotográfico.

Ensayo de infección para las células C6

Para todas las líneas celulares utilizadas se realizaron ensayos de infección de acuerdo con lo descrito en Vilchis (2009). Sin embargo, la línea celular C6 tiene como característica particular una tasa de proliferación muy alta en comparación al resto de las líneas celulares estudiadas hasta ahora, con el fin de determinar el momento idóneo al cual se desarrollan los efectos citopáticos en estas células se realizaron ensayos de infección de la siguiente manera. Se sembró la línea celular C6 en cajas de cultivo de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 5% de SFB (suero fetal bovino) y antibiótico (penicilina 100 UI/ml.) y estreptomycin 100 mg/ml.), se mantuvo en estufa de cultivo a 37°C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Cuando el cultivo alcanzó un crecimiento uniforme, las células fueron recuperadas mediante su exposición a 800 µl de Tripsina 0.5% - EDTA (Gibco, Cat. 15400) y cuantificadas en una cámara de Neubauer, después se realizaron las diluciones necesarias con medio DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico para obtener una concentración de 5×10^5 células/ml. Posteriormente se sembraron 1×10^4 células en cajas de cultivo de 60 mm y al día siguiente a las 19:00 hrs se infectó con 60 µl del aislado viral diluido en 500 µl de DMEM, se dejó adsorber por una hora, posteriormente se eliminó el medio de cultivo junto con las partículas virales libres y se agregaron 4 ml de DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico (Hierholzer, 1996). Durante los dos días posteriores se observaron al microscopio invertido hasta verificar la presencia de los efectos causados por la interacción con el virus de pseudorrabia y se realizó el registro fotográfico de los hallazgos con una cámara digital (Olympus, mod. SP-350 de 8.0 megapíxeles).

Presentación de resultados

Las imágenes de cada una de las líneas celulares infectadas con PRV y tratadas con faloidina rodaminada se presentan en un mismo panel y se ordenan de acuerdo con el tiempo transcurrido después del inicio de la infección con el fin de hacer evidentes los cambios encontrados en el citoesqueleto de actina.

Resultados

1. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células 3T3.

La línea celular 3T3 está formada por fibroblastos de ratón, que fueron obtenidos de un músculo de embrión de ratón (ratón suizo albino) y tiene la propiedad de mostrar un crecimiento adherente.

Con el fin de explorar si el desarrollo del ciclo viral de PRV en las células 3T3 era capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de actina, se inocularon con PRV cultivos de 3T3 desarrollados en cubreobjetos. Al observar los cultivos al microscopio de fluorescencia encontramos que; en el cultivo control se pueden apreciar células con una corteza definida y la presencia de fibras de tensión bien organizadas (Fig. 4 A). A las 15 horas postinfección (hpi) ya se observan pequeños filopodios aunque las fibras de tensión aún se mantienen organizadas (Fig. 4 B). A las 17 hpi, es más evidente la presencia de pequeños filopodios y se siguen apreciando las fibras de tensión (Fig. 4 C). Sin embargo, a las 19 hpi se observa un mayor número de filopodios, los cuales además son más largos y las fibras de tensión ya no son tan evidentes (Fig. 4 D). A las 21 hpi se observan filopodios más largos formando puentes intercelulares y las fibras de tensión sólo se pueden apreciar en algunas células dispersas (Fig. 4 E). Finalmente, el efecto encontrado a las 24 hpi es similar al descrito previamente (Fig. 4 E y F).

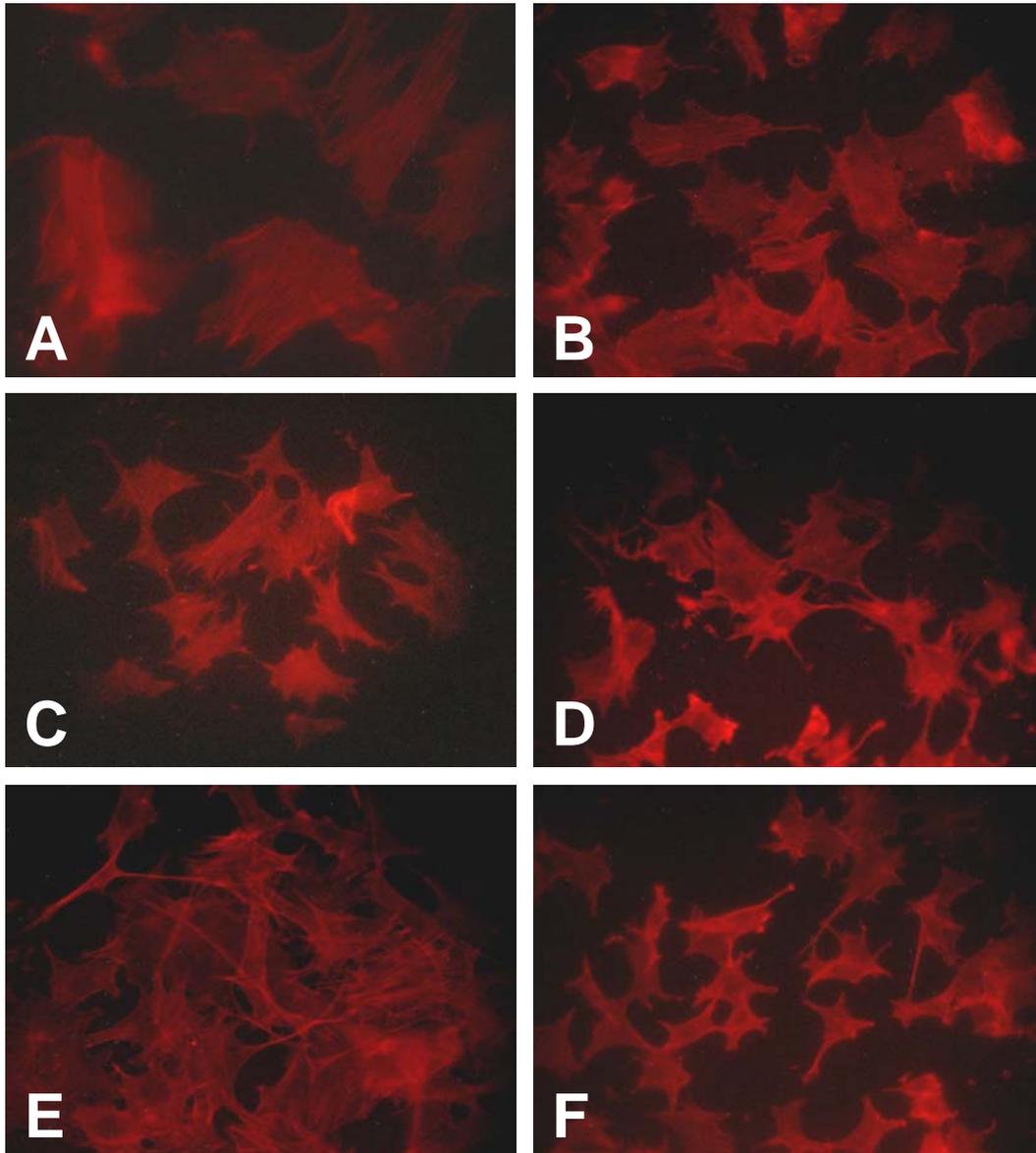


Figura 4. Detección de citoesqueleto de actina en células 3T3 infectadas con PRV. Cultivos de células 3T3 que fueron llevados a diferentes tiempos de infección y, posteriormente, fijados y expuestos a faloidina rodaminada. (A). Cultivo control, células con corteza definida y fibras de tensión bien organizadas. (B). 15 horas postinfección, se observan pequeños filopodios y fibras de tensión organizadas. (C). 17 horas postinfección, presencia de filopodios y fibras de tensión. (D). 19 horas postinfección, un mayor número de filopodios y más largos. (E). 21 horas postinfección, presencia de puentes intercelulares y fibras de tensión dispersas. (F). 24 horas postinfección, similar al descrito previamente. Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia, 400×.

2. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células MDCK.

La línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney) fue obtenida de un riñón de canino aparentemente normal, hembra, adulto; Cocker Spaniel, en 1958 por Madin y Darby. Las células MDCK presentan morfología de fibroblasto, producen queratina y presentan un crecimiento adherente.

Con el fin de detectar la presencia de modificaciones en el citoesqueleto de actina y el tiempo transcurrido para su aparición se utilizaron cultivos de células MDCK infectados con PRV y, posteriormente, la actina fue evidenciada con faloidina rodaminada. Es necesario señalar que en estas células las modificaciones del citoesqueleto de actina empezaron a ser evidentes hasta las 21 hpi.

Al microscopio de fluorescencia las células del cultivo control (no infectado) se aprecian con la corteza de actina bien definida de tal manera que se pueden diferenciar las células de manera individual, por otra parte las fibras de tensión no son aparentes (Fig. 5 A). A las 21 hpi se aprecia la corteza celular, no son evidentes las fibras de tensión y se empiezan a observar filopodios bastante largos (Fig. 5 B). A las 23 hpi aún se aprecia la corteza no así las fibras de tensión y el hallazgo más importante es la formación de puentes intercelulares y sincitios (Fig. 5 C). A las 25 hpi se sigue apreciando la corteza celular, se ven más definidos los puentes intercelulares y los sincitios, también es evidente la presencia de actina en el citosol, sin embargo, no está formando fibras de tensión (Fig. 5 D). A las 26 hpi, adicionalmente a la presencia de sincitios, las células adquieren una morfología redondeada y emiten filopodios cortos que no forman puentes intercelulares, asimismo se encuentran varios lamelipodios (Fig. 5 E). A las 28 hpi se observa una corteza celular bien definida, presencia de filopodios formando puentes intercelulares y algunas células presentan actina en el citoplasma, sin embargo, no es posible apreciar si están formando fibras de tensión (Fig. 5 F).

Una diferencia importante observada en estas células es que en ningún momento se dejó de apreciar la corteza, así como el hecho de que se presentaron modificaciones distintas a los filopodios, como son los lamelipodios.

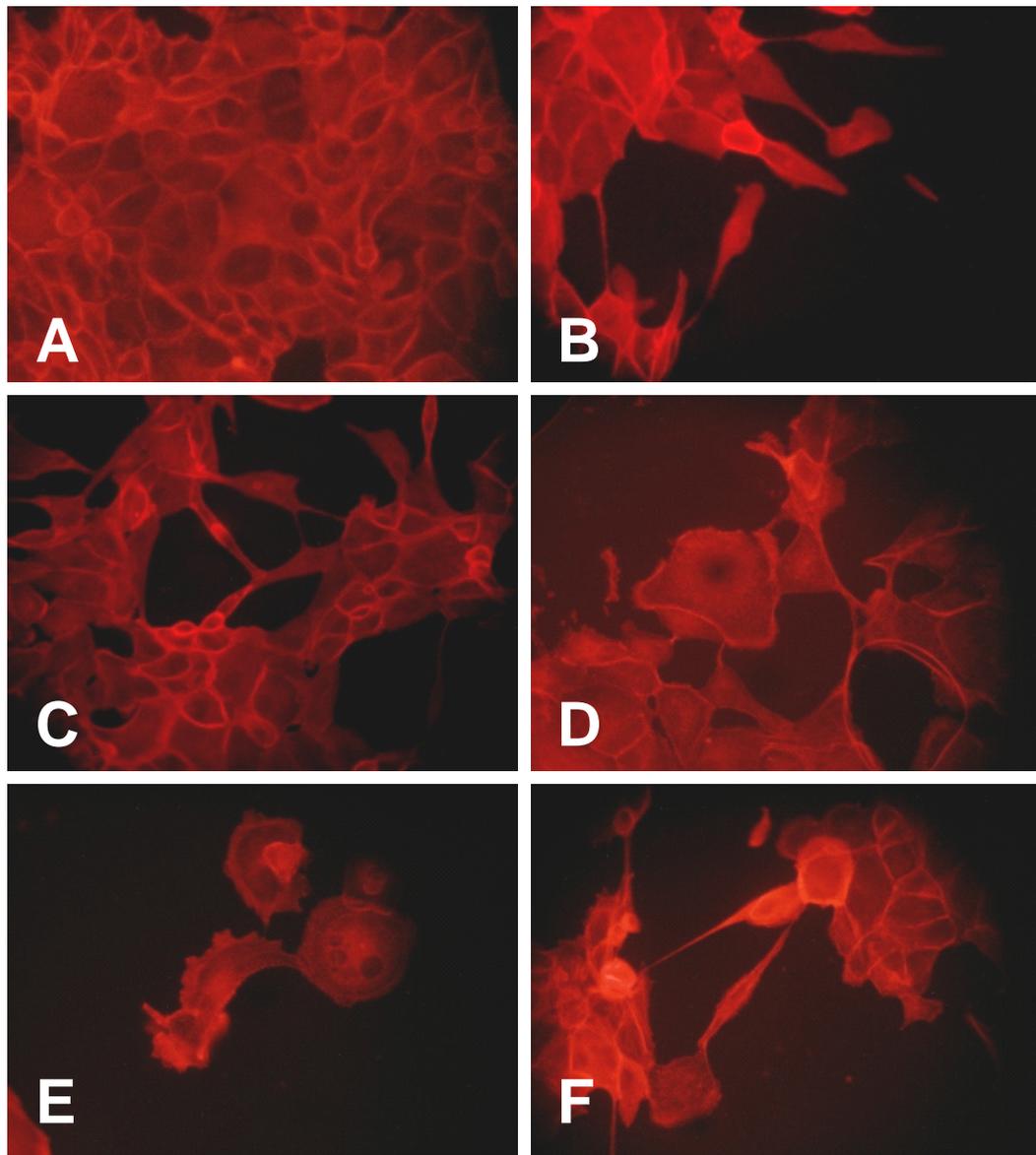


Figura 5. Detección de citoesqueleto de actina en células MDCK infectadas con PRV. Cultivos de células MDCK que fueron llevados a diferentes tiempos de infección y, posteriormente, fijados y expuestos a faloidina rodaminada. **(A)**. Cultivo control, células con corteza celular bien definida. **(B)**. 21 horas postinfección, se aprecian la corteza celular y algunos filopodios largos. **(C)**. 23 horas postinfección, se aprecia la corteza celular, puentes intercelulares y sincitios. **(D)**. 25 horas postinfección, adicionalmente a lo anterior también se aprecia la presencia de lamelipodios. **(E)**. 26 horas postinfección, presencia de sincitios y células redondeadas. **(F)**. 28 horas postinfección, algunas células tienen la corteza celular bien definida y presencia de puentes intercelulares. Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia, 400×.

3. Las células C6 son altamente refractarias al desarrollo del ciclo viral.

Las células C6 provienen de cerebro, su morfología es de tipo glial y presentan un crecimiento con características adherentes. Fueron aisladas a partir de un tumor glial de rata inducido *in vivo* por la administración de N-nitrosometilurea, presentan fuertes características tumorigénicas ya que tienen una alta tasa de crecimiento,.

Como se puede apreciar las células C6 son fusiformes y con proyecciones largas que se sobreponen entre sí (Fig. 5), esto provocó que en los primeros ensayos realizados, en los cuales se utilizaron cultivos con una confluencia alta (90%), no se pudieran detectar los ECP inducidos por la interacción con el PRV.

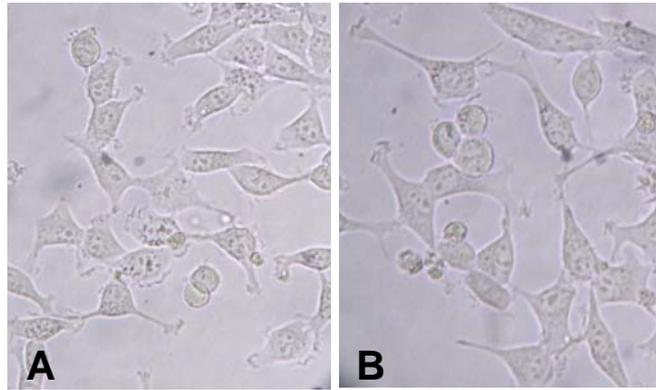


Figura 5. Cultivos de células C6 sin infectar (cultivo control). Los cubreobjetos que formaron parte del cultivo control fueron retirados de la incubadora y fijados con paraformaldehído a tiempos distintos, esto es; el primero se retiró a las 9:00 hrs (A), el segundo a las 14:00 hrs y el último a las 17:00 hrs (B). Una característica importante de estas células es la presencia de prolongaciones. Imágenes tomadas con microscopio invertido, 100×.

Con el fin de determinar el momento en el cual los ECP se podrían apreciar mejor, se repitieron los ensayos de infección pero considerando tiempos más largos, para esto se inició con cultivos celulares sembrados a muy baja densidad.

Estos ensayos de infección permitieron evidenciar que uno de los primeros cambios que presentan estas células es la adquisición de una morfología redondeada, posteriormente se forman sincitios y, finalmente, aparecen los puentes intercelulares. Asimismo, se pudo determinar que los ECP se presentan entre las 46 y las 48 hpi (Fig. 6).

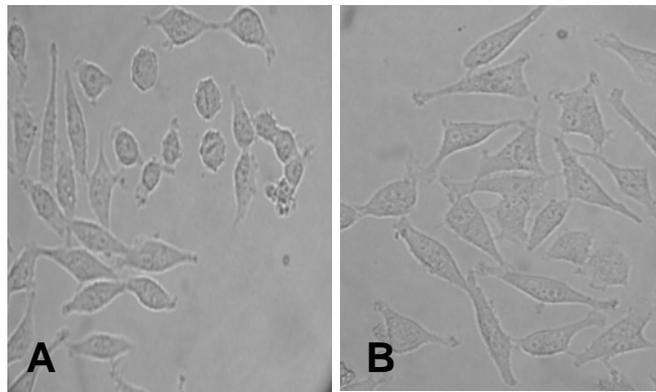


Figura 6. Cultivos de células C6 infectadas con PRV. Se permitió que los cultivos infectados con PRV se desarrollaran hasta las 52 hpi. **(A).** A las 46 hpi algunas células muestran una morfología redondeada. **(B).** A las 48 hpi resulta evidente la presencia de puentes intercelulares.

4. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células C6.

Con el fin de determinar el papel que desempeña el citoesqueleto de actina en los ECP observados en los ensayos de infección previamente realizados, se infectaron cultivos celulares crecidos sobre cubreobjetos y sembrados a baja densidad con el fin de que no alcanzaran un alto porcentaje de confluencia a pesar de ser mantenidos por periodos largos (52 horas). Con el fin de documentar la progresión del ciclo se fueron recuperando cubreobjetos cada cuatro horas a partir de las 19 hpi.

En el cultivo control (no infectado) se aprecian los límites de las células y su corteza de actina, sin embargo no es posible distinguir claramente las fibras de tensión (Fig. 7 A). A las 19 hpi las células se observan con morfología redondeada, la corteza celular no se define completamente, presentan un gran número de lamelipodios cortos y algunos sincitios (Fig. 7 B). A las 23 hpi las células siguen redondeadas, su corteza celular es delgada, están agrupadas en cúmulos, a pesar de lo cual es posible delimitarlas, hay zonas de condensación de actina y se aprecian algunos sincitios (Fig. 7 C). A las 44 hpi se aprecian focos aislados de condensación de actina, sin embargo la disposición del citoesqueleto de actina observada es prácticamente la disposición normal que presenta la actina en estas células (Fig. 7 D). A las 46 hpi hay presencia de sincitios y células con proyecciones incipientes, es importante resaltar que la forma y disposición del citoesqueleto es diferente a la que encontramos en la célula no infectada (Fig. 7 E). A las 48 hpi la mayoría de las células se encuentran interrelacionadas mediante puentes intercelulares y como se puede apreciar dichos puentes están formados por actina (Fig. 7 F).

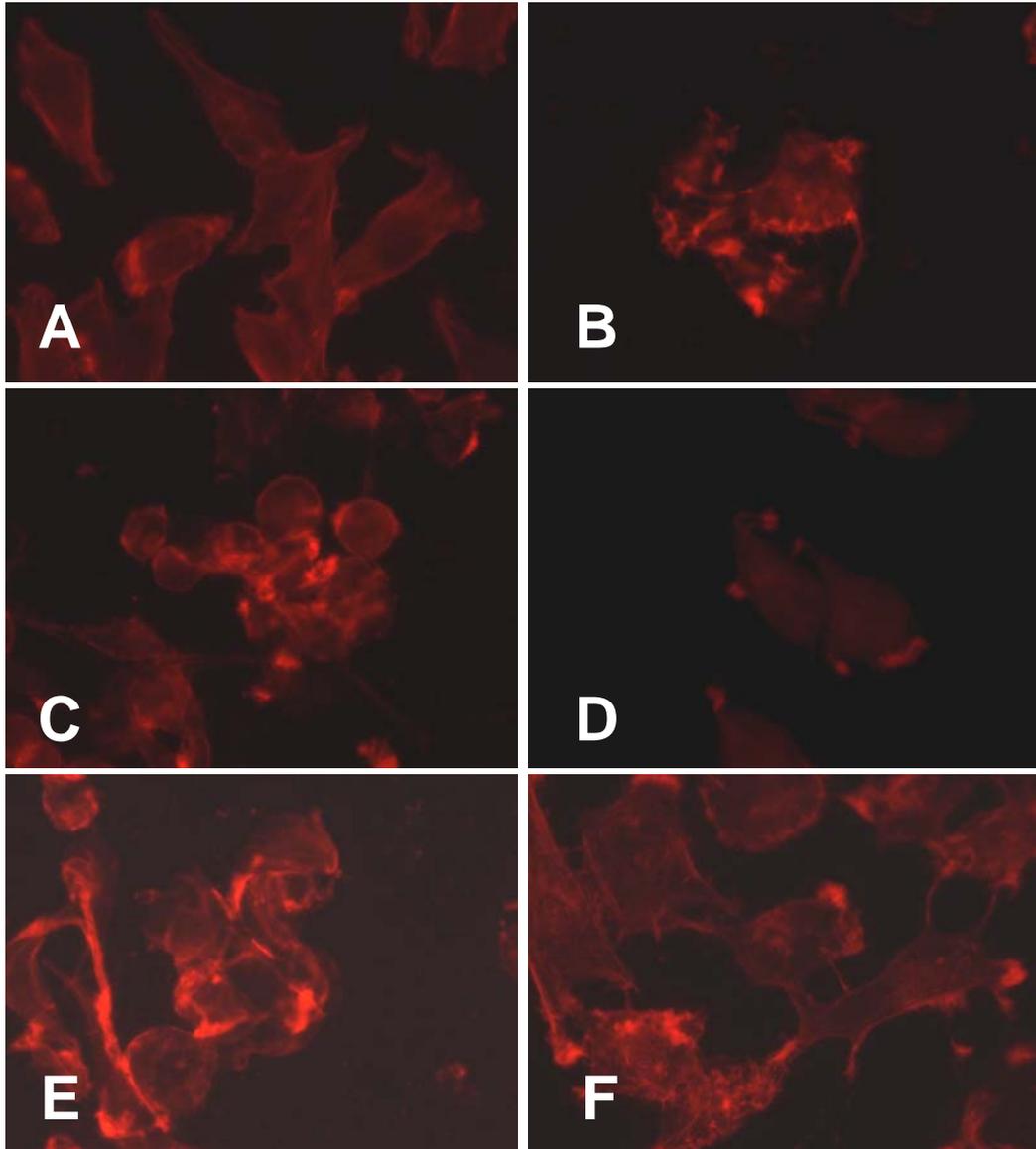


Figura 7. Detección de citoesqueleto de actina de células C6 infectadas con PRV. Cultivos de células C6 que fueron mantenidos durante diferentes tiempos post-infección y, posteriormente, fijados y expuestos a faloidina rodaminada. **(A)**. Cultivo control, se aprecia la corteza celular y las prolongaciones que emiten estas células. **(B)**. 19 horas postinfección, células agrupadas, redondeadas y fuertes concentraciones de actina. **(C)**. 23 horas postinfección, mismos efectos que en la anterior. **(D)**. 44 horas postinfección, células redondeadas, muy juntas y con lamelipodios cortos. **(E)**. 46 horas postinfección, células redondeadas en las que no se definen sus límites y grandes concentraciones de actina. **(F)**. 48 horas postinfección, presencia de puentes intercelulares. Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia, 400×.

Tabla 2. Resumen de los efectos citopáticos observados durante el desarrollo de los ensayos de infección *in vitro*.

Línea celular	Efectos citopáticos	Tiempo postinfección (horas)
3T3	Filopodios largos y delgados formando puentes intercelulares	19
MDCK	Filopodios, lamelipodios, puentes intercelulares y sincitios	23
C6	Redondeo de las células, puentes intercelulares y sincitios	48

Discusión

La actina filamentosa es una estructura clave del citoesqueleto en todas las células y está involucrada en muchos procesos celulares cruciales (Favoreel y col., 2007). Las formaciones de actina filamentosa mejor caracterizadas son los filopodios, lamelipodios y las fibras de tensión (Etienne Manneville y Hall, 2002; Alberts, 2008; Cooper, 2006).

Una característica importante de los *alfaherpesvirus* es su capacidad para inducir modificaciones evidentes en el citoesqueleto de actina (Mettenleiter, 2000). Este trabajo se realizó con la finalidad de explorar si la interacción del virus de pseudorrabia era capaz de inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina en líneas celulares como, 3T3 (fibroblastos de ratón), MDCK (epitelial de riñón de canino) y C6 (células de glioma de rata). La interacción del virus de pseudorrabia con las líneas celulares utilizadas provocó diversas modificaciones del citoesqueleto de actina, entre las cuales podemos resaltar la formación de filopodios (3T3, MDCK y C6) y lamelipodios (MDCK).

De acuerdo con múltiples evidencias se considera que los filopodios posibilitan que la célula infectada establezca interacciones celulares, que permiten a las partículas virales migrar por dentro de las proyecciones y es a partir de estas interacciones que el virus desarrolla la difusión intercelular de la infección (Favoreel y col., 2005), lo cual permite, entre otras cosas, la evasión de los anticuerpos neutralizantes en un huésped inmunizado (Spear, 1993; Alberts, 2008; Favoreel y col., 2005).

La presencia de filopodios, sugiere que en las células 3T3, MDCK y C6 la propagación de la infección se realizó mediante la difusión intercelular de la infección, dando como resultado la formación de sincitios grandes y multinucleados. Este tipo de propagación de la infección presenta la ventaja de ocurrir con mayor rapidez, ya que las células no infectadas son reclutadas en sincitios en mucho menos tiempo del que tarda una célula infectada en producir viriones (Demmin y col., 2001). Es necesario señalar que no todos los tipos celulares se fusionan cuando son infectados por estos virus, lo que indica que es necesario un ambiente celular específico (Dingwell y col., 1994).

Se encontraron diferencias evidentes con respecto al tiempo empleado por el virus para inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina, según la línea celular utilizada. Así, las células C6 fueron las más refractarias a la infección a viral (Fig. 7, 46 hpi) y por

consecuencia, las modificaciones del citoesqueleto de actina son más tardías, mientras que las células 3T3 fueron las más permisivas (Fig. 3 B, a 15 hpi).

Está bien documentado que el desarrollo del ciclo viral depende del tipo celular (Favoreel y col., 2007). Asimismo se reporta que durante la interacción del virus con las células intervienen una gran cantidad de proteínas tanto celulares como virales (Pejsak y Truszczynski, 2006). Aunque a la fecha aún no se conocen los factores que probablemente estén provocando esta variación en el tiempo empleado por el virus para desarrollar su ciclo replicativo de acuerdo con el tipo celular empleado (Mettenleiter, 2000).

El significado biológico de estos eventos aún no está bien comprendido, las diferentes interacciones de los herpesvirus con la actina parecen depender del tipo celular y aunque diversas evidencias han sido descubiertas acerca de los mecanismos subyacentes, la red exacta de proteínas virales y celulares no se ha esclarecido completamente (Favoreel y col., 2007; Mettenleiter, 2000). Por ejemplo, dentro de las proteínas virales que suelen expresarse durante la infección con el virus de pseudorrabia llama la atención la proteína US3, la cual es una cinasa de serina/treonina que produce el desensamble de las fibras de tensión de actina en diferentes tipos celulares (Frame y col., 1987; Van Minnebruggen, 2003). La proteína US3 está conservada entre los *alfa*herpesvirus y aunque no es esencial para la replicación, está implicada en varios aspectos de la infección, tales como egreso de la progenie viral desde el núcleo y protección a la apoptosis de las células infectadas (Klupp y col., 2001; Pol y col., 1991; Schumacher y col., 2005; Ogg y col., 2004; Hata y col., 1999). El desensamble de las fibras de tensión inducido por US3, también se asocia con el redondeo de las células y, adicionalmente, con la inducción de proyecciones de actina, largas y frecuentemente ramificadas, en células que se encuentran sembradas de manera dispersa (Murata y col., 2000; Favoreel y col., 2005). La inhibición de los rearreglos de actina inducidos por US3, mediante el uso de la droga estabilizadora de actina, el jasplakinolido, redujo significativamente la difusión intercelular del virus de pseudorrabia, lo cual sugiere que la US3 y la actina desempeñan un papel importante durante el proceso de difusión intercelular (Favoreel y col., 2005). Asimismo, en estudios posteriores será interesante dilucidar la significancia biológica y los mecanismos subyacentes de los rearreglos de actina inducidos por la proteína US3.

Los resultados obtenidos refrendan el hecho de que las líneas celulares utilizadas conforman un modelo adecuado en el cual estudiar detalles finos de las interacciones entre el PRV y las células durante su replicación, ya que aún no se conocen muchos detalles de los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo del ciclo del PRV. Asimismo, estos estudios permitirían entender la dinámica de la interacción célula-virus en otros alfa herpesvirus.

Es necesario realizar más estudios que permitan conocer de manera específica los eventos moleculares involucrados en la interacción virus-célula durante el proceso de replicación del virus PRV, este conocimiento permitirá entender mejor los aspectos moleculares básicos de este virus y podría conducir al desarrollo de mejores vacunas o de métodos de diagnóstico y/o de prevención (Kluge y col. 1999; Wittmann 1985).

Conclusiones

1. La interacción con el PRV indujo rearrreglos en el citoesqueleto de actina en todas las líneas celulares utilizadas.
2. Los rearrreglos del citoesqueleto de actina fueron de diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares estudiadas, así se pueden resaltar a los filopodios (células 3T3 y MDCK) y lamelipodios (células C6).
3. En las células C6 los ECP fueron distintos a los observados en las otras líneas (3T3 y MDCK); el primer gran efecto fue el redondeo de las células, seguido de la formación de puentes intercelulares cortos y sincitios.
4. El tiempo empleado para desarrollar los efectos citopáticos observados fue distinto con cada una de las líneas celulares estudiadas.
5. Las células C6 fueron las más refractarias (46 hpi) a la infección, mientras que las 3T3 fueron las más receptivas (15 hpi).
6. Este estudio conforma un modelo adecuado en el cual profundizar el estudio de la interacción viral con el citoesqueleto de las células eucariontes.

Bibliografía

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. Garland Science, New York, 2008 pp. 965-983.
2. Baines JD, Duffy C. Nucleocapsid assembly and envelopment of herpes simplex virus. In: Sandry-Goldin EM (Ed). Alpha Herpesviruses: Molecular and celular biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK 2006 1^a edition, pp. 175-204.
3. Baines JD, Hsieh CE, Wills E, Manella C, Marko M. Electron tomography of nascent herpes simplex virus virions. *J Virol* 2007 81: 2726-2735.
4. Baker ML, Jiang W, Rixon FJ, Chiu W. 2005 Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol* 2005 79: 14967-14970.
5. Bolin SR, Bolin CA. Pseudorabies virus infection of six- and ten-days-old porcine embryos. *Theriogenology* 1984 22: 101-108.
6. Borst EM, Mathys S, Wagner M, Muranyi Messerle M. The genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J Virol* 2001 75: 1450-1458.
7. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3^a edición, Marbán Libros, Madrid, 2006 pp. 435-444 y 574-575.
8. Chang JT, Schmid MF, Rixon FJ, Chiu W. Electron cryotomography reveals the portalin the herpesviruses capsid. *J Virol* 2007 81: 2065-2068.
9. Davison AJ, Eberte Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studert JJ, Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009 154: 171-177.
10. Demmin GL, Clase AC, Randal JA, Enquist LW, Banfield BW. Insertions in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. *J Virol* 2001 75: 10856-10869.
11. Dingwell KS, Brunetti CR, Henendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoprotein E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cell. *J Virol* 1994 68: 834-845.
12. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002 420: 629-630.
13. Favoreel HW, Enquist LW, Feierbach B. Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends in Microbiology* 2007 15: 426-433.

14. Favoreel HW, Minnebruggen GV, Adriaensen D, Nauwynck HJ. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 102: 8990-8995.
15. Forest T, Barnard S, Baines JD. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol* 2005 7: 429-431.
16. Frame MC, Purves FC, McGeoch DJ, Marsden HS, Leader DP. 1987. Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J Gen Virol* 68: 2699-2704.
17. Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2005 8: 35-45.
18. Hata S, Koyama AH, Shiota H, Adachi A, Goshima F, Nishiyama Y. Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect* 1999 1: 601-607.
19. Huffman JB, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL. Aminoacids 143-150 of the herpes simplex virus type 1 scaffold protein are required for the formation of portal-containing capsids. *J Virol* 2008 82: 6778-6781
20. Iglesias GJ, Trujano M, Lokensgard J, Molitor T. Study of the potencial involvement of pseudorabies virus in swine respiratory disease. *Can J Vet Res* 1992 56: 74-77.
21. Kluge JP, Beran GV, Hill HT, Platt KB, 1999. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). In *Diseases of Swine* (8th edition). BE Straw, D'Allaire, VL Mengeling, DJ Taylor, eds. Ames:Iowa State University Press,pp.233-246.
22. Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *Journal of General Virology* 2001 82: 2363-2371.
23. Klupp BG, Visser N, Mettenleiter TC. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein H. *Journal of Virology* 1992 66: 3048-3055.
24. Kritas SK, Pensaert MB, Mettenleiter TC. Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathway of the pig. *J General Virology* 1994 75: 2319-2327.
25. Lampson LA, Lampson MA, Dunne AD. Exploiting the lacZ reporter gene for quantitative analysis of disseminated tumor growth within the brain: Use of the lacZ gene

product as a tumor antigen, for evaluation of antigenic modulation and to facilitate image analysis of tumor growth in situ. *Cancer Res* 1993 53: 176-182.

26. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells to track the behavior human immunodeficiency virus (HIV)-1 in the cytoplasm of infected cells we have tagged virions by incorporation of HIV PRV fused to the GFP observation of the GFP-labeled particles in living cells revealed that they moved in. *J Cell Biology* 2002 159: 441-452.

27. McGeoch DJ, Rixon FJ. Topics in herpesvirus genomics and evolutions. *Virus Res* 2006 117: 90-104.

28. Mettenleiter TC. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: State of the art August 1993. *Acta Veterinaria Hungarica* 1994 42: 153-177.

29. Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: State of the virus and molecular pathogenesis-state of the art 1999. *Veterinary Research* 2000 31: 99-115.

30. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Research* 2009 143: 222-234.

31. Moss B, Ward BM. High-speed mass transit for poxviruses on microtubules. *Nat Cell Biol* 2001 3: 245-246.

32. Michael K, Klupp BG, Mettenleiter TC, Karger A. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47 or UL49 or enveloped glycoprotein E. *J Virol* 2006 80: 1332-1339.

33. Minnebruggen GB, Van de Walle GR, Favoreel HW, Nauwynek HJ, Pensaert MB. Temporary disturbance of actin stress fibers in swine kidney cells during pseudorabies virus infection. *Veterinary Microbiology* 2002 86: 89-94.

34. Mulder W, Pol J, Kimman T, Kok G, Priem J, Peeters B. Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron-to-neuron transmission in its natural host, then pig, but not after additional inactivation of gE or g1. *J Virol* 1996 70: 2191-2200.

35. Murata T, Goshima F, Daikoku T, Takakuwa H, Nishiyama Y. Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes to Cells* 2000 5: 1017-1027.

36. Nellissery JK, Szczepaniak R, Lamberti C, Weller SK. A putative leucine zipper within the herpes simplex virus type 1 UL6 protein is required for portal ring formation. *J Virol* 2007 81: 8868-8877.
37. Ogg PD, McDonnell PJ, Ryckman BJ, Knudson CM, Roller RJ. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* 2004 319: 212-224.
38. Pejsak ZK, Truszczynski MJ. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). In: Straw BE, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of swine*. 9th ed., Blackwell, Iowa, 2006 pp. 419-433.
39. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Simian virus 40 (SV40) is unusual among animal viruses in that it enters cells through caveolae, and the internalized virus accumulates in a smooth endoplasmic reticulum (ER) compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 3: 473-483.
40. Pellett P, Roizman B. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe D, Howley PM (Eds). *Fields Virology*. 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007 pp. 2479-2499.
41. Pensaert M, Kluge J, 1989. Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). In *Virus Infections of vertebrates*, vol 2. *Virus Infections of Porcines*. MB Pensaert, ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. pp 39-64.
42. Pol JMA, Wagenaar F, Gielkens A. 1991. Morphogenesis of three pseudorabies virus strains in porcine nasal mucosa. *Intervirology* 32: 327-337.
43. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurobiology and veterinary medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2005 69: 462-500.
44. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Elsevier, New York, 2007 pp. 1394-1404.
45. Rue CA, Ryan P. A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparin sulfate and which involves the actin cytoskeleton. *Virology* 2003 307: 12-21.

46. Schroer TA, Fyriberg E, Cooper JA, Waterson RH, Helfman D, Pollard TD, Meyer DI. Actin-related protein nomenclature and classification. *J Cell Biology* 1994 127: 1777-1778.
47. Schumacher D, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N, The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J Virol* 2005 79: 3987-3997.
48. Senasica-SAGARPA. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (Senasica) <http://www.senasica.gob.mx/?id=2848>.
49. Simon A, Mettenleiter TC, Rziha HJ. Pseudorabies virus displays variable numbers of a repeat unit adjacent to the glycoprotein gII gene. *J General Virol* 1989 70: 1239-1246.
50. Spear PG. 1993. Entry of alphaherpesvirus into cells. *Semin Virol* 4:167-180.
51. Stevely WS. Virus-induced proteins in pseudorabies-infected cells. II. Proteins of the virion and nucleocapsid. *Journal of Virology* 1975 16: 944-950.
52. Stevens JM, Galyov E, Stevens MP. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nature Review Microbiology* 2006 4: 91-101.
53. Van Minnebrugen G, Favoreel HW, Jacobs L, Nauwynck H. Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol* 2003 77: 9074-9080.
54. Vilchis-González O. Efecto de la interacción del virus de pseudorabia sobre el citoesqueleto de actina en las células RK13, PK15 y VERO. 2009. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM.
55. Wheeler JG, Osorio FA. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polimerase chain reaction. *American Journal of Veterinary Research* 1991 52: 1799-1803.
56. Wittmann G, Leitzke I. 1985. Die Beeinflussung des Aujeszkyvirus-Neutralisations tests durch verschiedene Testbedingungen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 92:262-266.
57. Yang M, Card JP, Tirabassi RS, Miselis RR, Enquist LW. Retrograde, transneuronal spread of pseudorabies virus in defined neuronal circuitry of the rat brain is facilitated by gE mutations that reduce virulence. *J Virol* 1999 73: 4350-4399.