



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Identificación y características de crecimiento *in vitro* de una cepa del virus de
Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) aislada en campo**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTAN

MARISA SÁNCHEZ MIRANDA

EDUARDO VICENTE RUIZ LARA

Asesor: Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate

Coasesor: M.V.Z. Uriel Vergara Ramírez



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**



Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

“Identificación y características del crecimiento in vitro e una cepa del virus de Rinotraqueítis infecciosa bovina aislada en campo”

Que presenta la pasante: **Marisa Sánchez Miranda**
Con número de cuenta: **40209664-3** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.C. Raúl Arturo Mar Cruz	
VOCAL	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
SECRETARIO	MVZ. Yasmín Luis Ceballos	
1er SUPLENTE	MVZ. Saúl Rodríguez Zamora	
2do SUPLENTE	Dra. María Leonor Quintero Mora	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

“Identificación y características del crecimiento in vitro e una cepa del virus de Rinotraqueítis infecciosa bovina aislada en campo”

Que presenta el pasante: **Eduardo Vicente Ruiz Lara**
Con número de cuenta: **09714910-9** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MC. Raúl Arturo Mar Cruz	
VOCAL	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
SECRETARIO	MVZ. Yasmín Luis Ceballos	
1er SUPLENTE	MVZ. Saúl Rodríguez Zamora	
2do SUPLENTE	Dra. María Leonor Quintero Mora	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

El presente trabajo fue apoyado por la catedra de investigación NCOS-07 (Morfología veterinaria y biología celular) del programa PACIVE 2012 de la FES Cuautitlán.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres † por sus desvelos, sus consejos, por enseñarme que en la vida nada es fácil por que gracias a ellos soy lo que soy y por darme la mejor herencia en la vida mi profesión, este logro es de ustedes, gracias por enseñarme que cuantas veces me caiga hay que darle una buena cara a la vida los amo aunque ya no estén conmigo físicamente sé que siempre estarán conmigo y en mi corazón.

A mi hermana Marisela porque sin su apoyo no estaría el día de hoy concluyendo una etapa más de mi vida infinitamente gracias por no dejarme sola y apoyarme cuando más lo necesite, te quiero. A mi hermana Aurelia por ser un ejemplo a seguir en mi vida por tus consejos y por qué tenemos la dicha de estar nuevamente juntas celebrando cada logro que la vida nos da te quiero y gracias por todo tu apoyo.

A mis sobrinas y sobrino para que este pequeño trabajo les sirva como ejemplo y que sepan que nada es imposible siempre y cuando se lo propongan los quiero.

A mi esposo Eduardo gracias por que juntos daremos un paso muy importante en nuestras vidas por que ambos sabemos el esfuerzo que nos ha costado llegar hasta aquí, te amo.

A mi hija Daniela por que tu eres lo mas hermoso que tengo en esta vida por ser esa razón para seguir luchando y no darme por vencida, por que tu risa es la que alegra mi día este logro es por ti, mi amor, te amo.

A la UNAM y principalmente a la FES Cuautitlán por abrirme las puertas y darme la oportunidad y el privilegio de estudiar una de las carreras mas hermosas que es veterinaria gracias.

A todos los profesores por brindarme sus conocimientos y su tiempo y principalmente al Doctor Víctor Pérez Valencia por darme la oportunidad y abrirme las puertas de su hospital para formarme como medico gracias.

A mis amigos Iliana Gómez y Omar Vilchis por su apoyo incondicional en cada momento, sus consejos y la ayuda que me brindan cuando mas lo necesito los quiero mucho, gracias.

A todos aquellos perritos que involuntariamente dieron su vida para mi formación como medico gracias. Y por ultimo a mis perritas geny, Charlotte y mimi que me mostraron mi profesión.

Marisa.

A mis padres, Irma Lara Valadez y Martin Felipe Ruiz López, que siempre me han dado su apoyo incondicional y a quienes debo este triunfo profesional, por todo su trabajo, su amor, sus consejos y su dedicación para darme una formación académica y por los valores que siempre me han inculcado. De ustedes es este triunfo y para ustedes es todo mi agradecimiento.

A mis hermanas, por su apoyo en todo momento, para que sigamos saliendo adelante y cumpliendo todas nuestras metas.

A mi esposa Marisa, porque después de todas las cosas buenas y malas que hemos pasado, aquí estamos dando otro paso juntos, gracias a ti por ser la razón no solo de este triunfo, si no de todo lo que hemos logrado juntos; por tu paciencia en todo momento, gracias, te amo.

A mi hija Daniela, por ser la razón de todo en mi vida desde el momento en que supe que estabas con nosotros, esto es por ti y para ti, te amo.

A todas esas personas que han estado junto a mi a lo largo de mi vida, las que siguen y las que lamentablemente ya no están, ya que cada una de ustedes me han marcado y han dejado alguna enseñanza en mi, gracias ya que ha todos ustedes soy la persona que soy.

EDUARDO

A nuestro asesor el Dr. Carlos Ignacio Soto por su paciencia y disposición para nosotros, por que sin su ayuda esta tesis no seria una realidad el día de hoy, parte de este éxito se lo debemos a usted; infinitas gracias, lo admiramos y respetamos.

A nuestro coasesor el Dr. Uriel Vergara por formar parte de este proyecto y la ayuda que nos brindo para que finalmente nos formemos como profesionistas, gracias.

Índice

RESUMEN -----	1
INTRODUCCIÓN -----	2
OBJETIVOS -----	13
MATERIAL Y MÉTODOS -----	14
RESULTADOS -----	17
DISCUSIÓN -----	33
CONCLUSIONES -----	37
BIBLIOGRAFÍA -----	38
APÉNDICE -----	42

Resumen

El virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR, por sus siglas en Inglés), es un Herpesvirus de la subfamilia Alphaherpesvirinae, cuyos huéspedes son los bovinos. En México, la IBR es una de las enfermedades infecciosas más importantes en los hatos lecheros pues en la mayoría de los animales, la enfermedad transcurre en forma subclínica, afectando los parámetros reproductivos y productivos e incrementando notablemente las pérdidas económicas. Por otra parte, a nivel celular, existen reportes de algunos virus que utilizan el citoesqueleto de las células del huésped con el fin de facilitar aspectos de su ciclo replicativo como la entrada, egreso y difusión intercelular. Sin embargo, la importancia biológica de estos eventos no está totalmente entendida. El objetivo de este trabajo fue identificar y describir las características del herpesvirus bovino-1 (HVB-1) al desarrollar su ciclo de replicación *in vitro*. Con este fin se estudiaron las características de su ciclo de replicación y los efectos citopáticos (ECP) desarrollados en las líneas celulares RK-13, PK-15, C6 y Vero. Para esto se realizó la infección de cultivos de dichas líneas celulares y se hizo el seguimiento del desarrollo del ciclo viral mediante observación directa de los cultivos al microscopio invertido. Se encontró que las células RK-13 y Vero fueron las más permisivas ya que los primeros ECP aparecieron a las 17 y 18 horas postinfección (hpi), respectivamente; mientras que para C6 y PK-15 aparecieron a las 20 y 21 hpi. Los ECP encontrados fueron: la presencia de células con apariencia rugosa, presencia de vesículas, formación de puentes intercelulares, sincitios y lisis celular. De manera particular, en las células C6, se encontró redondeamiento de las células y formación de cúmulos. Adicionalmente se investigaron las modificaciones que los filamentos de actina de las células RK-13, VERO y C6 desarrollan por la interacción con el virus de IBR. Para ello las células fueron infectadas, expuestas a faloidina rodaminada y observadas al microscopio de fluorescencia. Se encontró que todas las líneas celulares utilizadas mostraron la presencia de rearrreglos del citoesqueleto de actina y de éstos, los filopodios y las proyecciones intercelulares fueron las más sobresalientes. Es importante señalar que los ECP y las modificaciones del citoesqueleto fueron de diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares utilizadas, ya que las diversas interacciones de los herpesvirus con la actina parecen depender del tipo celular. Los resultados obtenidos demuestran que este es un modelo adecuado para profundizar el estudio de las interacciones entre el HVB-1 y las células durante su replicación. En la actualidad, aún se desconocen muchos detalles de los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo del ciclo del HVB-1 por lo que resulta necesario realizar más estudios que permitan conocer de manera específica dichos procesos, este conocimiento permitiría entender mejor los aspectos moleculares básicos de este virus y podría conducir al desarrollo de mejores vacunas y/o métodos de diagnóstico y prevención.

Introducción

La rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad contagiosa que afecta a los bovinos. Como su nombre lo indica, esta enfermedad se caracteriza esencialmente por la aparición de una rinotraqueítis exudativa que puede afectar a los bronquios principales de los animales infectados. Las complicaciones bacterianas subsecuentes, suelen afectar el parénquima pulmonar y agravar el curso de la enfermedad. No obstante, la rinotraqueítis no es más que una de las manifestaciones clínicas que el agente causal puede ocasionar (Aguilar, 1987).

En 1954 se señaló en los Estados Unidos la presencia de una enfermedad viral en las vías respiratorias altas de los bovinos, que anteriormente se conocía con los nombres de “red nose”, “dust pneumonia” y, posteriormente, fue denominada por McKercher y col. (1957) rinotraqueítis infecciosa de los bóvidos (Beer, 1987).

La IBR ha sido diagnosticada en los EUA, Perú, Gran Bretaña, Alemania, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica, Tanzania y Japón. En México fue diagnosticada en 1971, y hasta la fecha se ha aislado el virus de IBR a partir de bovinos con signos clínicos sospechosos de esta enfermedad en hatos de diferentes partes de la República Mexicana. También se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra IBR en bovinos del D.F., Edo. de México, Puebla y Yucatán. Otras encuestas serológicas más recientes han demostrado que la IBR está diseminada por muchas áreas ganaderas del país (Correa, 1988). Así pues, en México, la infección del virus de IBR se encuentra ampliamente difundida. En un estudio reciente, se encontraron rangos seropositivos del 19 al 84% en bovinos productores de leche y del 20 al 70% en ganado de carne (Trigo, 1987).

Los bovinos de todas las razas y edades son susceptibles a la infección experimental, pero la enfermedad natural se observa, principalmente, en animales mayores de seis meses de edad. No se registran variaciones estacionales en la incidencia, salvo una mayor ocurrencia en lotes de engorda durante los meses de otoño e invierno, cuando se concentra un gran número de animales susceptibles (Radostits, 1992). Los borregos, caballos, cueros, ratones, perros y gatos son refractarios a la infección natural y experimental. En caballos, cabras, borregos y conejos

se puede estimular una respuesta inmune humoral. En los conejos inoculados por vía intracerebral se puede producir la infección, mientras que por vía intradérmica o intratesticular sólo se desarrollan lesiones locales. Además del ganado bovino, hasta la fecha, no se ha demostrado ningún otro reservorio, sin embargo hay hallazgos de que los cerdos, cabras y, en raras ocasiones, los venados puedan sufrir infecciones naturales (Correa, 1988). Aunque las infecciones en otras especies domésticas, como las mencionadas, carecen de importancia para las epizootias de IBR (Blaha, 1995).

Desde un punto de vista económico, la importancia de la IBR aún no ha sido evaluada completamente, pero se calcula que cada diez años se debe renovar un 18% del hato a causa de las enfermedades infecciosas y, de éstas, la más relevante es el aborto. La IBR es una enfermedad enzoótica de notificación obligatoria en México por su efecto significativo en la producción pecuaria. Además, pertenece al grupo B del Código Zoosanitario Internacional por su importancia estratégica para las acciones de salud animal en cada país (Bracho, 2006).

La morbilidad y mortalidad de los distintos brotes de IBR dependen de la condición inmune inicial del rebaño afectado, eventuales enfermedades virales, bacterianas y parasitarias del aparato respiratorio y la situación de estrés (Dirksen, 2005).

Las principales fuentes de infección son el exudado nasal y aerosoles, secreciones genitales, semen, líquidos y tejidos fetales. La infección por aerosoles se considera el principal medio de propagación de la enfermedad respiratoria; mientras que la transmisión venérea es la forma en que se propagan las enfermedades genitales (Radostits, 1992).

Las nuevas infecciones del hato parten de animales recién introducidos, clínicamente enfermos o portadores sanos con una infección latente de herpesvirus bovino 1 (HVB-1) o vacunados con vacunas vivas. Los animales portadores pueden sufrir una reactivación y excreción del agente viral por estrés. Los principales factores reactivantes son; parto, transporte, hacinamiento de animales de distintos orígenes, frío, otras enfermedades primarias, verminosis pulmonares, aplicación de glucocorticoides, vacunaciones, etc. (Gerrit, 2005). El HVB-1 se transmite fácilmente en forma directa de un animal a otro, ya que de los animales infectados se libera una gran cantidad de virus principalmente en las secreciones respiratorias, oculares y reproductivas, sin embargo, la transmisión también puede hacerse en forma indirecta, a través de personas o equipos (Ruiz, 2008).

La forma respiratoria de la enfermedad, IBR, es la más importante por su elevada morbilidad y baja mortalidad. En las vacas la forma genital produce vulvovaginitis pustular infecciosa y en los toros balanopostitis pustular infecciosa. Se caracterizan por enrojecimiento y edema con pequeñas pústulas que al desprenderse dejan una zona erosionada. Presentan secreción mucopurulenta abundante tanto en la mucosa de la vulva como del pene. De manera esporádica, la infección con HVB-1 puede causar meningoencefalitis (Manual de la OIE, 2004). También se han descrito casos de mastitis, enteritis, metritis, dermatitis, tonsilitis e infecciones sistémicas en animales jóvenes (Ávila, 2008).

Agente etiológico

Características del virus

La rinotraqueítis infecciosa bovina es causada por el herpesvirus bovino 1, el cual es un miembro del género *Varicellovirus* en la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que pertenece a la familia herpesviridae (Nandi, 2009). Comparte ciertas propiedades biológicas con el virus herpes simple 1 y 2 de humano y con el virus de la pseudorrabia (Mettenleiter, 2009). Los miembros de la familia Herpesviridae son virus de ADN que muestran un espectacular éxito evolutivo. El nombre, deriva del griego ερπειν (*herpein*), "arrastrarse".

La familia Herpesviridae se divide en tres subfamilias; Alfa, Beta y Gammaherpesvirinae. La subfamilia Alphaherpesvirinae contiene cuatro géneros: Simplexvirus, Varicellovirus, Mardiviruses y Iltoviruses 1. Esta subfamilia incluye virus que se caracterizan por tener una amplia gama de huéspedes, un ciclo de replicación corto, son en general muy citopáticos a nivel de cultivo celular y tienen capacidad para inducir una infección latente, principalmente, aunque no de manera exclusiva, en las neuronas. Entre los alphaherpesvirus que infectan a los rumiantes, el prototipo es el herpesvirus bovino 1 (Thiry, 2006; Dwight, 1999).

**Tabla 1. Propiedades generales de los herpesvirus.
(tomada y modificada de Fenner, 1992).**

Viriones con envoltura de 120-200 nm de diámetro
Cápside icosaédrica con 162 capsómeros
Peplómeros de 8 nm de longitud en la envoltura
Genoma de ADN lineal de doble cadena de 120-200 kb
Todos producen infecciones latentes

Las propiedades del HVB-1 están determinadas por: a) El ADN lineal de doble cadena, capaz de codificar entre 30 y 35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada; b) La cápside icosaédrica constituida por 162 capsómeros; c) La capa amorfa, fibrosa y asimétrica, denominada tegumento, que se encuentra rodeando a la nucleocápside, compuesta de lipo y glicoproteínas, junto con otras proteínas con actividad enzimática; d) La envoltura externa, que presenta proyecciones glicoproteicas (espículas o peplómeros); e) El virión de entre 150 y 250 nm de diámetro debido a la envoltura pleomórfica; f) El tamaño variable del genoma entre 124 y 235 pares de kb y g) La composición de bases con 32 a 75% de G+C (Stanchi, 2007).

Ciclo viral

El HVB-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular. Aunque la totalidad de las moléculas involucradas en la entrada del HVB-1 a la célula no están completamente dilucidadas, está claramente establecido que el virus se une al heparán sulfato presente en la membrana celular. Luego de esta unión inicial, las glicoproteínas virales gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores putativos de la membrana celular (Ruiz, 2008).

Una vez que han entrado en el citosol de la célula, las partículas del HVB-1 son transportadas sobre los microtúbulos hacia los poros del núcleo con el fin de permitir la liberación del ADN viral. Mientras la partícula viral está siendo transportada al núcleo, las proteínas del tegumento se desprenden en el citosol de la célula infectada donde podrían jugar un papel importante en

los primeros momentos de la infección, ya que son las primeras moléculas en interactuar con el medio intracelular (Muylkens, 2007).

El complejo ADN-proteína es liberado de la nucleocápside para entrar al núcleo. Rápidamente se detiene la síntesis macromolecular de la célula huésped y ocurre la replicación del ADN viral. El genoma de los herpesvirus sólo codifica proteínas que son esenciales para la replicación viral, el resto de los materiales son adquiridos de la célula huésped (Ávila, 2008). Después de ser replicado dentro del núcleo, una parte del ADN viral pasa al citoplasma, ahí transcribe el ARN mensajero el cual se adhiere a los ribosomas, las proteínas de la envoltura viral son producidas en el citoplasma y transportadas al núcleo en donde forman las procápsides (cápsides incompletas). Las cuales se combinan con el ADN para producir un nucleoide de virus completo (Correa, 1988). Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo para dirigirse a la membrana citoplasmática, para esto son transportados dentro de vesículas intracelulares hasta ser liberados de la célula (Ruiz, 2008).

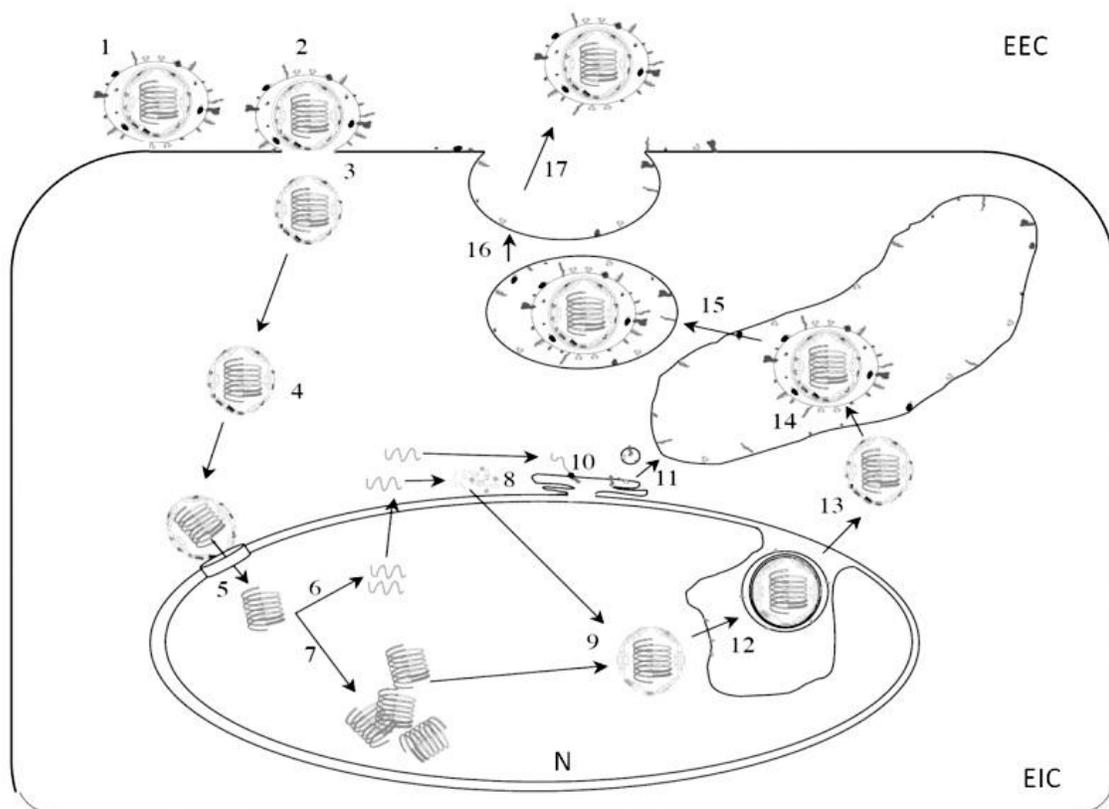


Figura 1. Ciclo de replicación del HVB-1. Adhesión de los viriones a la membrana celular (1); fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática (2); liberación de la nucleocápside en el citoplasma (3); transporte de la nucleocápside al núcleo e interacción con la membrana nuclear (4); internalización del genoma al núcleo celular (5); transcripción del ADN (6); replicación secuencial del genoma viral (7); transporte del ARN viral al citoplasma para ser traducido (8); las proteínas estructurales son redirigidas al núcleo para la encapsidación (9); las proteínas de la envoltura viral son traducidas en el retículo endoplásmico (10) y, posteriormente, son incorporadas en diferentes vesículas y direccionadas a través de la vía secretoria (11, 15, 16); la nucleocápside sale del núcleo por gemación en la membrana interna de la pared nuclear (12) y por fusión con la membrana nuclear externa (13); el virus adquiere su envoltura y tegumento en el aparato de Golgi (14); el virus abandona la célula huésped por exocitosis (15 - 17). **EEC**, espacio extracelular; **EIC**, espacio intracelular; **N**, núcleo (Adaptado de Roizman y Pellett, 2001).

Patogénesis

En la primoinfección con HVB-1, luego de una incubación de 2 a 4 días, se produce una replicación masiva del agente en las células epiteliales del aparato respiratorio o genital y la excreción del mismo durante 2 a 3 semanas a través de lágrimas, secreción nasal y saliva o secreción genital (Dirksen, 2005).

En el proceso de las vías respiratorias altas, el virus se disemina desde el punto de entrada hacia las regiones vecinas y ocasiona una inflamación de las vías respiratorias altas y/o una conjuntivitis. En la mayoría de los casos también penetra en la corriente sanguínea, produciendo septicemia, el virus es transportado en la sangre por los leucocitos. En los casos benignos sólo se desarrollará una septicemia transitoria. En el curso de esta fase septicémica el virus se asienta en las vías respiratorias bajas y, raramente, en el sistema nervioso central o en el feto. Con las mucosas lesionadas se facilita la multiplicación de bacterias patógenas facultativas y pueden aparecer procesos inflamatorios secundarios, principalmente neumonías (Beer, 1987).

Signos Clínicos y lesiones macroscópicas.

La forma respiratoria de IBR incluye; fiebre de 40.5 a 42°C, abatimiento, anorexia, respiración rápida (40 a 80 rpm), secreción nasal serosa abundante que pasa a ser una secreción mucopurulenta espesa durante las primeras 72 horas de la infección, tos dolorosa, formación de costras necróticas en el hocico, placas de color blanco visibles en la mucosa nasal, en la

mucosa del tabique nasal y, a veces, en las ventanas externas de la nariz y el hocico, ulceración de la mucosa del hocico y de la mucosa oral, estertores traqueales debidos al exudado mucopurulento o a las membranas diftéricas en laringe y tráquea, también se reporta la presencia de ruidos y estertores en ambos campos pulmonares. Aunque en ocasiones se ha observado bronquitis y bronquiolitis, en la mayoría de los casos no hay desarrollo de una patología pulmonar, a no ser que exista una bronconeumonía bacteriana secundaria (Rebhun, 1995).

Lesiones histopatológicas

Microscópicamente las lesiones de la mucosa escamosa están caracterizadas por áreas focales de necrosis, erosión y ulceración. En las áreas basales de las lesiones hay una marcada reacción leucocitaria, predominantemente de neutrófilos, que con frecuencia se extienden desde la lámina propia subyacente. Las células epiteliales, localizadas en la periferia de las lesiones, se encuentran hinchadas y con su citoplasma vacuolado. Adicionalmente puede presentar inclusiones de Cowdry, aunque éstas son un hallazgo inconsistente. Es más factible encontrarlas si los tejidos son recolectados en las etapas tempranas de la enfermedad y fijados con solución de Bouin. Las lesiones en el abomaso abarcan la necrosis de las células glandulares y las glándulas afectadas están dilatadas y llenas de restos necróticos. Tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso se pueden observar lesiones necróticas focales que afectan las criptas y la lámina propia. Las lesiones del abomaso y del intestino pueden predisponer al desarrollo de micosis secundarias que son una complicación común. También se pueden producir focos de necrosis coagulativa en el hígado, nódulos linfáticos, placas de Peyer, bazo y corteza adrenal (Jubb, 1990).

Citoesqueleto

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución un complejo esqueleto celular o citoesqueleto, el cual resulta imprescindible para el mantenimiento de la morfología celular, así como para realizar diversas funciones como movilidad, migración y división celular. El citoesqueleto está constituido por tres tipos de biopolímeros; microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina o microfilamentos (Guirado, 2002; Dieguez, 2008).

La proteína citoesquelética más importante de 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., 2005). El ensamblaje y desensamblaje de estos filamentos, sus uniones cruzadas para constituir haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (como la membrana plasmática) están regulados por una gran cantidad de proteínas relacionadas (ARPs) o de unión (ABPs) a actina globular (actina G) o filamentosa (actina F) (Alberts y col., 2008). Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática (corteza celular), 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 (Cooper, 2006). Así, el ensamblaje de los microfilamentos participa en el "comportamiento exploratorio" de células con cuerpo lábil (metazoarios, células ameboides, fibroblastos o neuronas), es decir, participa en la formación de filopodios, lamelipodios y ondulaciones de la membrana o *ruffling* (Dieguez, 2008).

El primer paso en la polimerización de actina, 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 en ambos extremos, pero uno de ellos (el extremo más) crece de cinco a diez veces más rápido que el otro extremo (extremo menos) (Favoreel y col., 2005).

Los monómeros de actina pueden unir ATP, el cual se hidroliza a ADP después de su ensamblaje al filamento. Aunque esta molécula no es necesaria para la polimerización, los monómeros de actina que la tienen unida 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. Debido a que la polimerización de actina es reversible, los filamentos se pueden despolimerizar por la disociación de monómeros, lo que 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 que ilustra el comportamiento dinámico de estos filamentos (Alberts y col., 2008).

El intercambio rotatorio en la célula, refleja el ensamblaje y desensamblaje 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 (proteínas relacionadas a actina), que se une a la actina/ATP presente en el extremo más (Schroer y col., 1994). Una vez activado, el complejo Arp2/3 se une a un filamento de actina cerca del extremo más y da origen a una nueva rama (Favoreel y col., 2005).

Las actividades de las proteínas asociadas a actina; cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controladas por una variedad de mecanismos señalizadores celulares, 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 que es necesario para una diversidad de movimientos celulares y cambios en la forma de la célula. Esto es una gran tarea y, en algunos tipos celulares, el ensamblaje y desensamblaje 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 las entrecruzan y las disponen 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 (Fig. 2), 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 (proyecciones rígidas y delgadas), lamelipodios (proyecciones regulares delgadas y laminares) y ondulaciones en la membrana, así como la formación de adhesiones focales y fibras de tensión (Fig. 2) (Alberts y col., 2008).

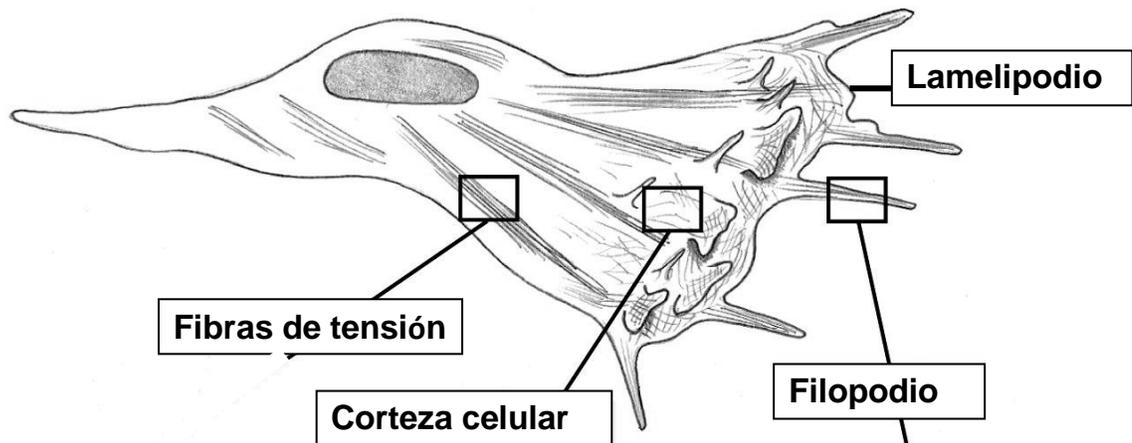


Figura 2. Representación esquemática de las principales remodelaciones del citoesqueleto (tomado y modificado de Alberts y col., 2008).

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 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 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).

Aún y cuando hay múltiples evidencias de que los herpesvirus pueden modificar el citoesqueleto de actina durante su ciclo infeccioso. Sin embargo, la importancia biológica de estos eventos no está totalmente entendida. Así tenemos que las diferentes interacciones de los herpesvirus con la actina parecen depender del tipo celular, esto es, el papel de la actina durante la entrada del virus parece depender fuertemente del tipo celular infectado (Favoreel y col., 2006; Favoreel y col., 2007).

Objetivos

Objetivo general

Identificar y describir las características del herpesvirus bovino-1 al desarrollar su ciclo de replicación *in vitro*.

Objetivos particulares

- a. Identificar el herpesvirus bovino-1 por microscopia electrónica.
- b. Explorar el desarrollo del ciclo de replicación viral en distintas líneas celulares.
- c. Determinar la duración del desarrollo del ciclo de replicación viral.
- d. Describir los efectos citopáticos observados y las modificaciones del citoesqueleto de actina inducidos por la interacción con el virus.

Material y métodos

Cultivo Celular y virus

Para realizar este trabajo se utilizaron cultivos de las líneas celulares RK13 (células epiteliales de riñón de conejo), Vero (fibroblastos de riñón de mono verde africano), PK15 (células epiteliales de riñón de porcino) y C6 (células de glioma de rata). 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 estreptomycin 100 mg/ml), a 37°C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. El virus fue aislado a partir de un caso clínico presentado en un establo del Complejo Agroindustrial de Tizayuca, Hgo., el virus fue aislado en el laboratorio 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC y titulado mediante un ensayo de infectividad (TCID₅₀).

Microscopía electrónica

Un cultivo de células RK-13 fue crecido en una caja de Petri de 100 mm, cuando alcanzó una confluencia de 80% fue infectado y, después de 48 horas postinfección, fue fijado con glutaraldehído al 2.5% amortiguado con cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2 durante 60 minutos. Después, el cultivo fue lavado con PBS y las células fueron recuperadas de la caja con un gendarme y empaquetadas en un tubo Eppendorf por centrifugación a baja velocidad. La pastilla fue resuspendida e incubada con tetróxido de osmio al 1% en PBS por 45 min. La suspensión celular fue incubada con acetato de uranilo al 1% por 15 min y se realizaron los pasos progresivos de deshidratación en etanol (50, 60, 70, 80, 90%) hasta terminar con 3 pasos sucesivos en etanol absoluto. Posteriormente se realizó la infiltración de la muestra en resina acrílica (spurr) y se realizaron cortes ultradelgados que fueron contrateñidos con acetato de uranilo y sales de plomo para ser examinados al microscopio electrónico.

Ensayos de Infección

Para realizar los ensayos de infección, las células fueron sembradas en una caja de cultivo de 60 mm de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia, se eliminó el sobrenadante y se depositaron 50 µl del aislado viral diluido en 1 ml de DMEM, se dejó adsorber por una hora, posteriormente se eliminó y se agregaron 8 ml de medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora hasta que fueron evidentes los ECP y/o la lisis celular. Para documentar la progresión del ciclo replicativo, estos cultivos fueron mantenidos bajo observación al microscopio invertido desde el inicio hasta el final del ciclo, asimismo se realizó el registro fotográfico. Con cada ensayo de infección se realizó un cultivo paralelo que no fue infectado (control negativo) y que fue mantenido en observación el mismo tiempo que los cultivos infectados.

Marcaje de Actina

Para realizar estos ensayos, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos colocados dentro de una caja de cultivo de 100 mm de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia se eliminó el sobrenadante; se depositaron 60 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 hasta el final del ensayo y para documentar las modificaciones del citoesqueleto de actina inducidas por la interacción con el virus, algunos cubreobjetos fueron recuperados al inicio (17-20 hpi) y otros al final (42-71 hpi) del ciclo de infección. Los cubreobjetos obtenidos fueron fijados 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 por 5 minutos. Sobre cada cubreobjeto se colocaron 50 µl de faloidina rodaminada (Sigma, cat. P1951) diluida 1:150 en PBS durante 30 min a TA en cámara húmeda, finalmente se lavaron con PBS y agua desionizada, y fueron colocados sobre un portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Sc 24941 (Santa Cruz Biotechnology). Finalmente se realizó la observación al microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, modelo Axioskop 40) y se realizó el registro fotográfico.

Producción de partículas virales

Se realizaron ensayos de infección en cultivos de células RK-13 y VERO en los que se utilizó la misma dosis infectante (60 µl), fueron mantenidos en incubación por el mismo tiempo y, finalmente, las partículas virales producidas fueron obtenidas mediante ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Posteriormente, se realizó la titulación de las suspensiones virales obtenidas, para este fin se hicieron cultivos de las células RK-13 y Vero en microplacas de 96 pozos. Por otro lado, se realizaron 14 diluciones seriadas (1:10) de la solución stock del virus de IBR con DMEM. Finalmente, se depositaron 100 µl por pozo de cada una de las últimas nueve diluciones (10^{-6} a 10^{-14}). Para cada una de las diluciones se utilizaron 5 pozos. Los cultivos infectados fueron mantenidos por 72 horas en una incubadora a 37° C y bajo una atmosfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se hizo la revisión de los resultados. También se dejaron una serie de pozos (10 A-E) sin infectar que funcionaron como control negativo para la prueba.

Resultados

1. Identificación del virus por microscopía electrónica.

Con el propósito de evidenciar la presencia de partículas virales en los cultivos celulares con efectos citopáticos evidentes, se procesó un cultivo infectado por los métodos de rutina para hacer una tinción negativa al microscopio electrónico. Se obtuvieron varias imágenes en las cuales fue posible observar partículas virales, en la figura 3 se pueden apreciar dos partículas virales cuya apariencia y tamaño corresponden con las descripciones disponibles del HVB-1. Para corroborar que efectivamente se trata del HVB-1 será necesario realizar pruebas adicionales como podría ser una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos.

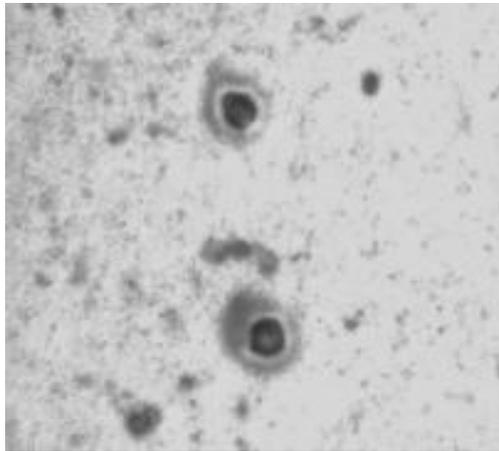


Figura 3. Imagen del herpesvirus bovino 1.
(Microscopio electrónico, tinción negativa, 20,000×).

2. Desarrollo del ciclo viral en las células PK-15

Con el fin de determinar la duración del ciclo viral y los cambios inducidos en la línea celular PK-15 por la interacción con el HVB-1, se infectó un cultivo y, posteriormente, se hizo el seguimiento observando el cultivo infectado al microscopio invertido a diferentes horas post-infección.

Las células del cultivo control presentan forma fibroblastoide mostrando algunas proyecciones y núcleos bien definidos (Fig. A). A las 21 horas postinfección (hpi), se observa la presencia

de proyecciones intercelulares y la formación incipiente de fusiones celulares, también se aprecia un grupo de células de contorno irregular y apariencia rugosa (Fig. B). A las 28 hpi, muchas células tienen una apariencia rugosa, de igual forma es evidente que la mayoría de las células ha cambiado su forma y tamaño, son más grandes de lo normal, sus núcleos también son grandes y se puede apreciar el nucléolo, algunas incluso presentan más de uno, y se siguen observando las proyecciones intercelulares (Fig. C). A las 45 hpi, además de que los cambios señalados previamente son más notables, también se empiezan a apreciar zonas de desprendimiento celular (Fig. D). A las 100 hpi, el desarrollo de desprendimiento celular es más evidente por la presencia de grandes áreas sin células (Fig. E). A las 126 hpi, la mayoría de las células presentan apariencia rugosa, se siguen apreciando proyecciones intercelulares y el desarrollo de fusiones celulares, así como zonas más grandes de desprendimiento celular (Fig. F).

Tabla 2. Efectos citopáticos en células PK-15.

Línea celular	Efectos citopáticos	Ciclo viral (hpi)
PK-15	Formación de puentes intercelulares y sincitios	21-28
	Células con varios nucléolos	28-45
	Células con apariencia rugosa	28-126
	Lisis celular	45-100

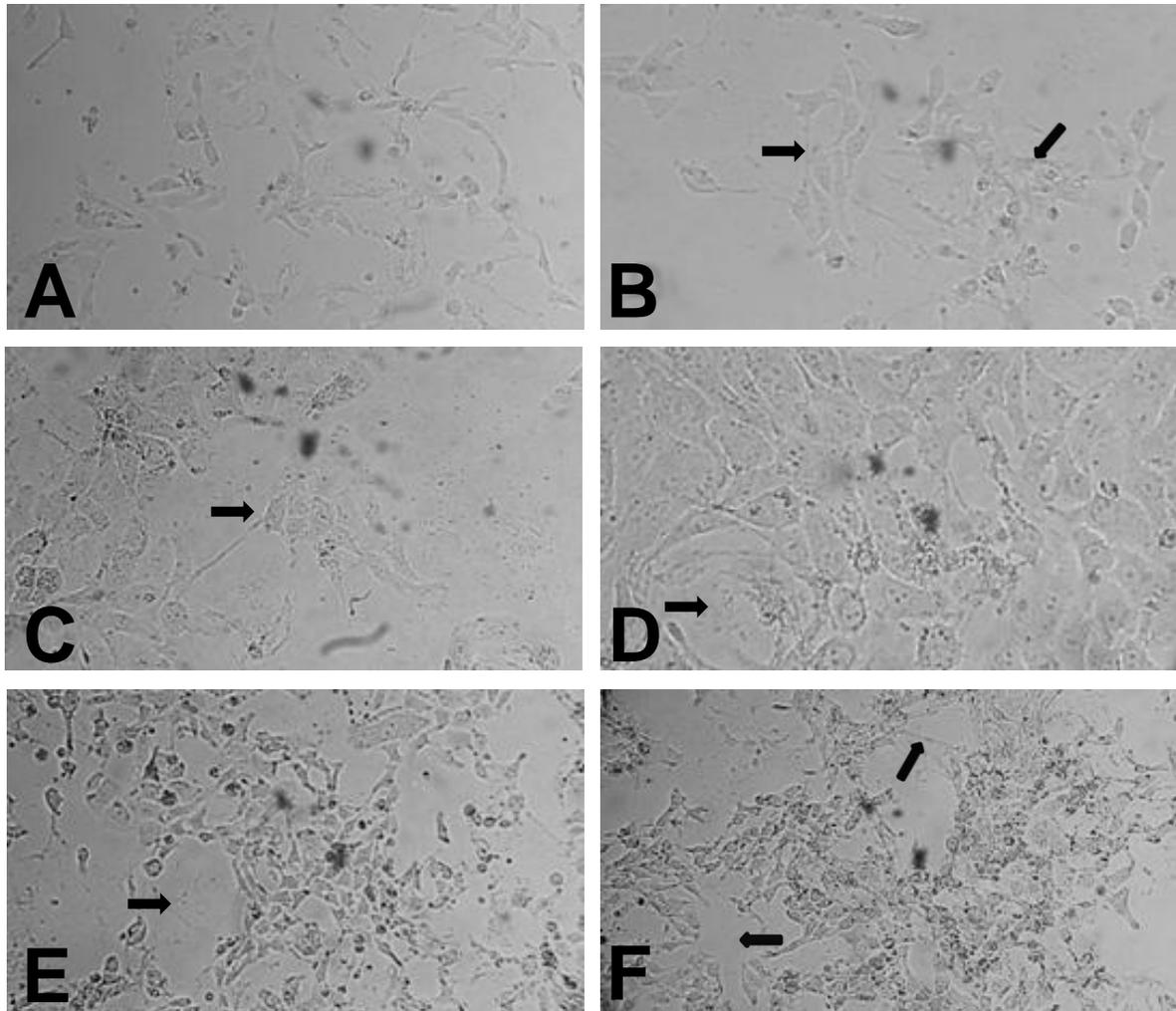


Figura 4. Cultivos de células PK-15 infectados con herpesvirus bovino 1. (A) Cultivo control, células de morfología fibroblastoide mostrando algunas proyecciones. (B) A las 21 hpi, se inicia la formación de puentes intercelulares y sincitios. (C) A las 28 hpi, presencia de sincitios evidentes. (D) A las 45 hpi, los efectos previamente descritos son más evidentes e inicia el desprendimiento celular. (E) A las 100 hpi, es más fácil notar el desprendimiento celular. (F) A las 126 hpi la mayoría de las células tienen apariencia rugosa, hay proyecciones intercelulares, sincitios y las zonas de desprendimiento celular son más grandes. Imágenes tomadas en el microscopio invertido: A, B, C, E y F 40×; D 100×.

3. Desarrollo del ciclo viral en las células RK-13

En el cultivo control se observan células de forma alargada y con núcleos evidentes (Fig. A). A las 17 hpi, se observa como las células comienzan a redondearse y tienden a agruparse por lo que muestran una apariencia oscura (Fig. B). A las 23 hpi, se observa que las células muestran irregularidad en su forma y tamaño, su apariencia es rugosa y se aprecia claramente el desarrollo de fusiones celulares. Adicionalmente, las células contienen en su interior gran cantidad de vesículas (Figs. C y D). A las 42 hpi, se aprecian células grandes de contorno irregular con núcleos grandes y una marcada presencia de vesículas (Fig. E). A las 71 hpi, se observan células enormes de apariencia rugosa por la presencia de vesículas, su contorno es irregular y esto corresponde al proceso de formación de grandes sincitios (Fig. F).

Tabla 3. Efectos citopáticos en células RK-13.

Línea celular	Efectos citopáticos	Ciclo viral (hpi)
RK-13	Células redondeadas y formando grupos	17-23
	Células con apariencia rugosa	23
	Presencia de vesículas	17-42
	Células de contorno irregular	42-71
	Presencia de sincitios	71

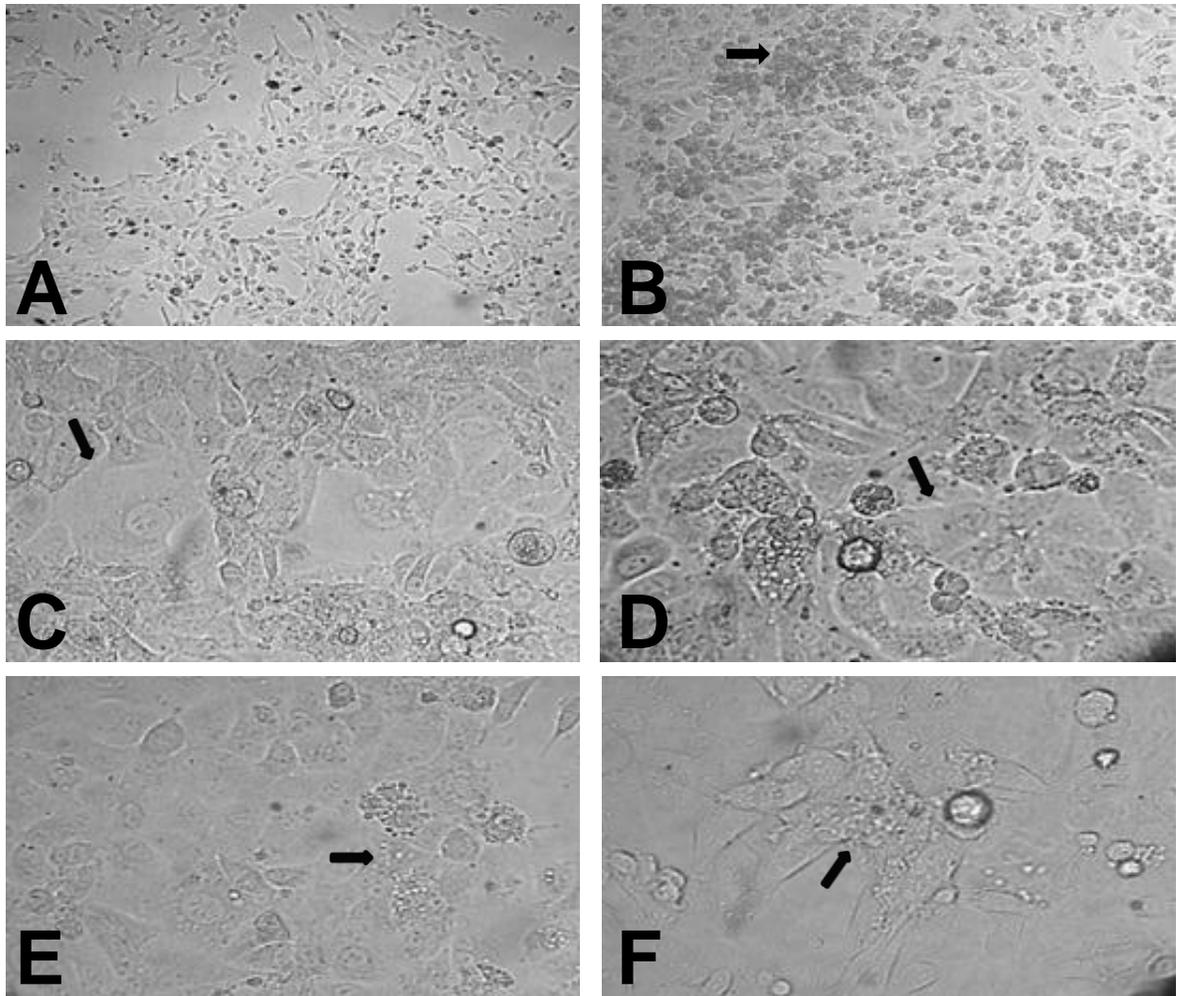


Figura 5. Cultivos de células RK-13 infectados con herpesvirus bovino 1. (A) Cultivo control. (B) A las 17 hpi, las células se redondean y tiende a formar grupos. (C y D) A las 23 hpi, células de forma y tamaño irregular, su apariencia es rugosa y se aprecia la formación de fusiones celulares. (E) A las 42 hpi hay células grandes de contorno irregular y con gran cantidad de vesículas. (F) A las 71 hpi se observan células enormes de apariencia rugosa y su contorno es irregular. Imágenes tomadas en el microscopio invertido: A y B 40×; C, D, E y F 100×.

4. Desarrollo del ciclo viral en las células Vero

Con el fin de describir los efectos causados por el HVB-1, se infectaron cultivos de esta línea celular y se obtuvieron fotografías a diversos tiempos post-infección.

En el cultivo control, se observan células fusiformes y alargadas (Fig. A). A las 18 hpi, se evidencia el desarrollo del ciclo viral con la formación de largas proyecciones intercelulares (Fig. B). A las 23 hpi, es posible observar células que se están fusionando y que muestran una apariencia rugosa (Fig. C). A las 71 hpi, es evidente el desprendimiento celular ya que se aprecia en el campo óptico una área grande sin células y se alcanza a observar el borde del cultivo que aún permanece unido a la caja (Fig. D). En las zonas del cultivo donde aún no hay desprendimiento celular, se aprecian células grandes, rugosas y de contorno irregular con núcleos y nucléolos evidentes (Fig. E), por otra parte, sigue siendo evidente la presencia de larguísimas proyecciones intercelulares (Fig. F).

Tabla 5. Efectos citopáticos en células Vero.

Línea celular	Efectos citopáticos	Ciclo viral (hpi)
Vero	Proyecciones intercelulares	18-71
	Células con apariencia rugosa	23-71
	Células agrupadas y grandes	71
	Lisis y desprendimiento celular	71

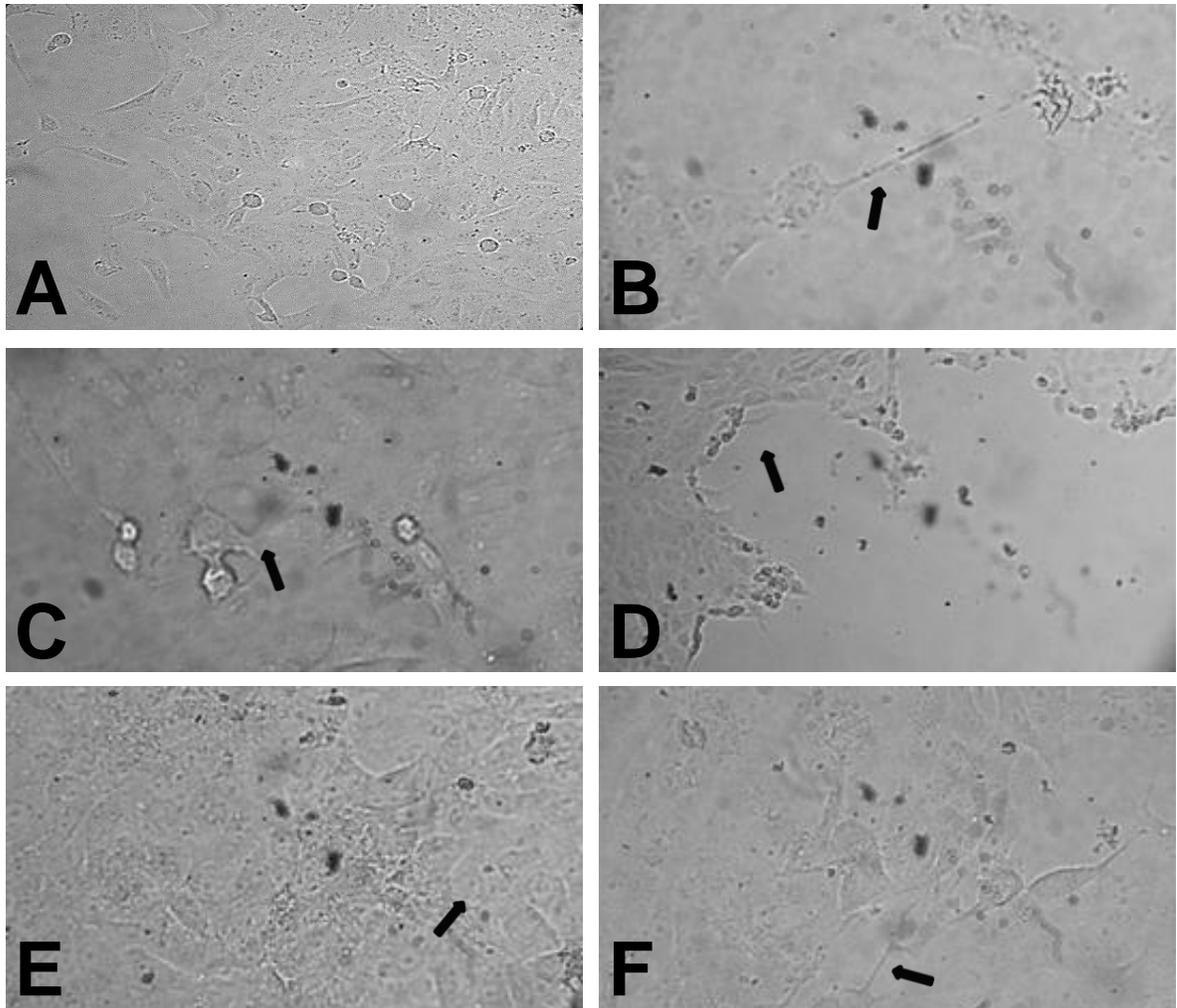


Figura 6. Cultivos de células Vero infectados con herpesvirus bovino 1. (A) Cultivo control. (B) A las 18 hpi se evidencia el desarrollo del ciclo viral con la presencia de proyecciones intercelulares. (C) A las 23 hpi se pueden apreciar células con apariencia rugosa que están en proceso de fusión. (D) A las 71 hpi existen grandes áreas de desprendimiento celular. (E) También hay presencia de células grandes, rugosas y de contorno irregular. (F) Se siguen observando células grandes de apariencia rugosa y con largas proyecciones intercelulares. Imágenes tomadas en el microscopio invertido: A y D 40×; B, C, E y F 100×.

5. Desarrollo del ciclo viral en las células C6

Con el fin de observar el proceso del ciclo viral y describir los cambios inducidos en las células C6, se infectaron cultivos de esta línea celular y posteriormente se observaron al microscopio invertido a diferentes horas post-infección.

Las células C6 son fusiformes y con proyecciones largas que se superponen entre sí (Fig. A). A las 20 hpi, se aprecian células de forma redondeada que tienden a formar grupos, adicionalmente, estas células muestran un contorno irregular y su apariencia es rugosa (Fig. B). A las 40 hpi, los efectos descritos previamente son más evidentes y, es posible notar, que el número de células involucradas en los cúmulos es mayor (Fig. C). A las 45 hpi, se aprecian células con apariencia redondeada, algunas de ellas son más grandes y sus núcleos muestran dos o más nucléolos, lo cual es una evidencia del desarrollo de sincitios (Fig. 4 D).

Tabla 5. Efectos citopáticos en células C6.

Línea celular	Efectos citopáticos	Ciclo viral (hpi)
C6	Células redondeadas y formando grupos	20-45
	Desarrollo de fusiones celulares	40-45

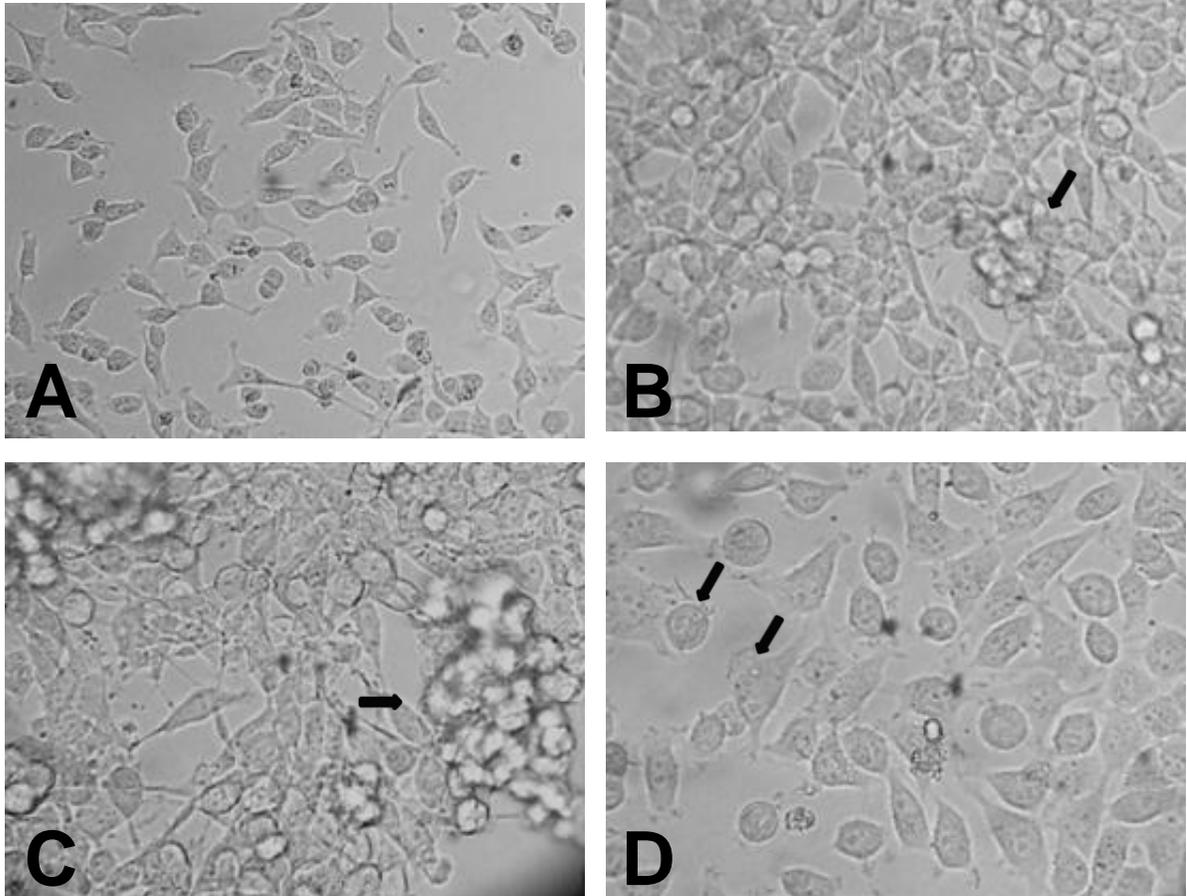


Figura 7. Cultivos de células C6 infectados con herpesvirus bovino 1. (A). Cultivo control. **(B).** A las 20 hpi se aprecian células redondeadas que tienden a agruparse. **(C).** A las 40 hpi los efectos previamente descritos son más evidentes, de tal manera que en la formación de los cúmulos participan un mayor número de células. **(D)** A las 45 hpi se aprecian células redondeadas y algunas células son más grandes con núcleos y nucléolos evidentes. Imágenes tomadas con microscopio invertido: A 40×; B, C y D 100×.

6. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células RK-13

Con el fin de determinar el papel que desempeña el citoesqueleto de actina en los efectos citopáticos observados en los ensayos de infección previamente realizados, se infectaron cultivos celulares crecidos sobre cubreobjetos y, posteriormente, fueron expuestos a faloidina rodaminada y observados al microscopio de fluorescencia.

Las células del cultivo control presentan una corteza bien definida y se aprecian claramente las fibras de tensión (Fig. A). A las 17 hpi, las células se comienzan a redondear y a agrupar, también es posible apreciar proyecciones intercelulares, las fibras de tensión y fuertes concentraciones focales de actina, sin embargo, aún es posible apreciar la corteza celular (Fig. B). A las 42 hpi, ya no se aprecian las fibras de tensión, la corteza celular, ni las concentraciones focales de actina, sin embargo resulta evidente la formación de sincitios (Fig. C). En la figura D se observan los núcleos de las células mostradas en la figura anterior teñidos con DAPI, como se puede apreciar dentro de los límites de cada una de las células se localizan varios núcleos, con lo cual se evidencia la formación de sincitios.

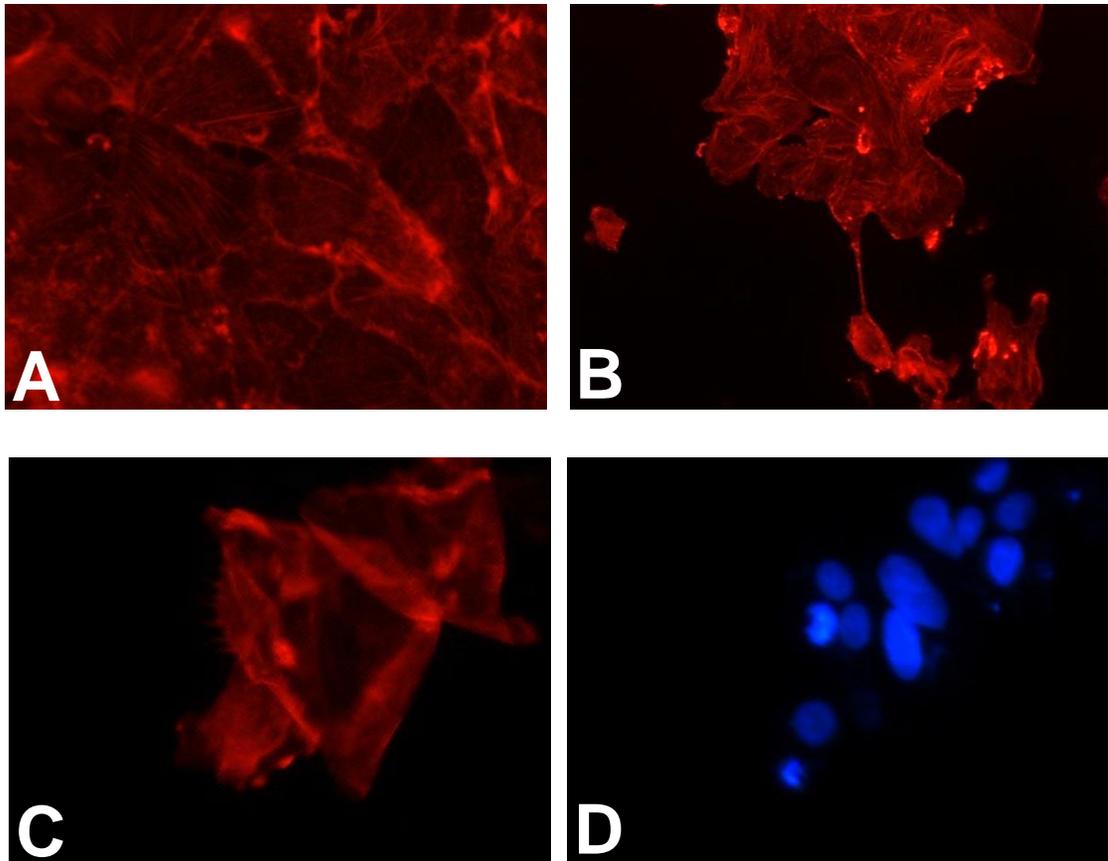


Figura 8. Cultivos de células RK-13 infectados con HVB-1 y expuestos a faloidina rodaminada. (A) Cultivo control. (B) Se observan la corteza celular, las fibras de tensión y fuertes concentraciones focales de actina, así como proyecciones intercelulares. (C) No es posible observar las fibras de tensión, ni la corteza y ya no son evidentes las concentraciones focales de actina. (D) En esta figura se aprecian los núcleos de las células mostradas en la figura anterior, estos núcleos están teñidos con DAPI y permiten comprobar la presencia de un sincitio. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia: B 200×; A, C y D 400×.

7. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células VERO

Con el propósito de explorar si el desarrollo del ciclo viral de HVB-1 en las células Vero es capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de actina, se inocularon con HVB-1 cultivos de estas células desarrollados en cubreobjetos. Posteriormente fueron expuestos a faloidina rodaminada y observados al microscopio de fluorescencia.

En las células del cultivo control se puede apreciar una corteza bien definida, así como sus fibras de tensión (Fig. A). A las 18 hpi, se aprecian la corteza y las fibras de tensión, así como algunos filopodios (Fig. B). A las 23 hpi, se sigue apreciando la corteza, fibras de tensión y filopodios, además se pueden observar concentraciones focales de actina (Fig. C). A las 71 hpi, se observan que las concentraciones focales de actina son más grandes y numerosas, y las células se observan agrupadas (Fig. D). En estas células fue muy difícil apreciar cambios evidentes en el citoesqueleto de actina, ya que es una línea celular que tiene un alto índice de proliferación y el cultivo estaba saturado por lo cual no había espacios entre las células que favorecieran la aparición de filopodios.

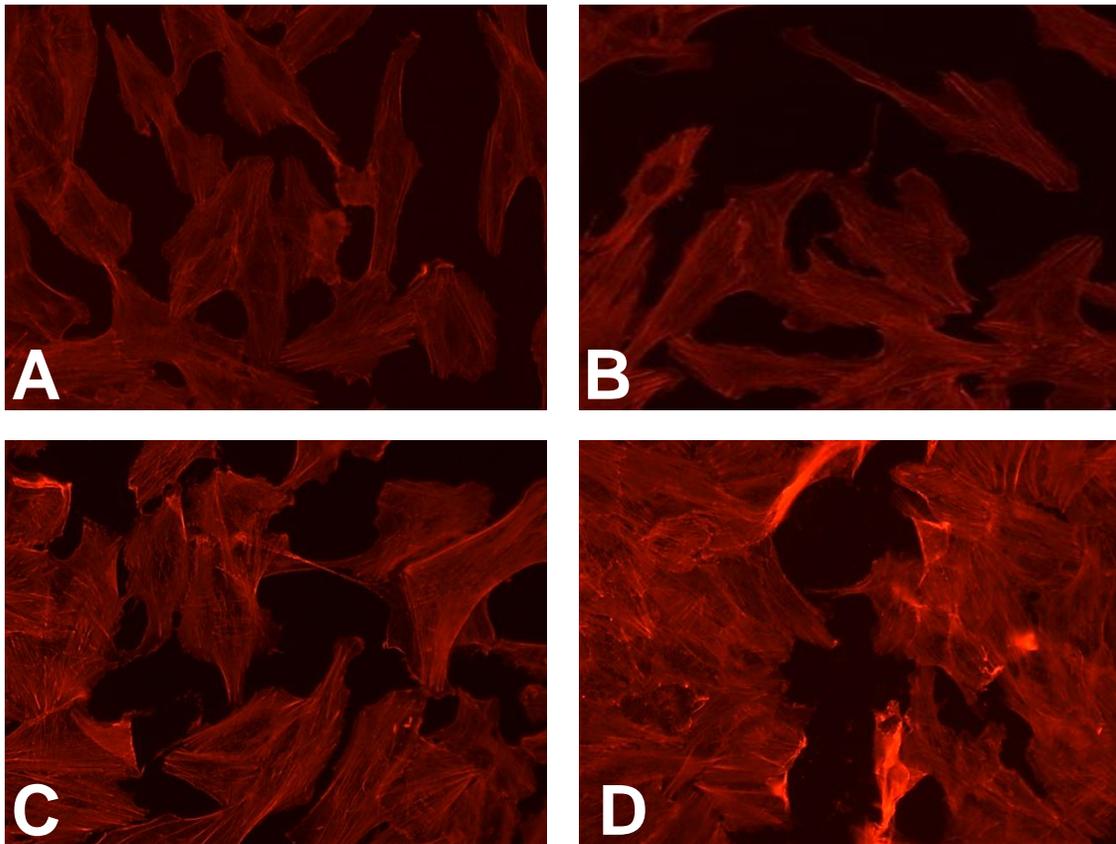


Figura 9. Cultivos de células Vero infectados con HVB-1 y expuestos a faloidina rodaminada. (A) Cultivo control. (B) Se aprecian las fibras de tensión, así como la presencia de filopodios. (C) Aún es posible apreciar las fibras de tensión y la corteza, adicionalmente se observan filopodios. (D) Se observan múltiples concentraciones focales de actina, se siguen apreciando las fibras de tensión y, sin embargo la corteza no se distingue fácilmente. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia: A, B, C y D 200×.

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

Con el propósito de estudiar el desarrollo del ciclo viral del HVB-1 en las células C6 y determinar si es capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de actina, cultivos de esta línea celular fueron crecidos en cubreobjetos e inoculados con HVB-1, posteriormente, estos cultivos fueron expuestos a faloidina rodaminada y observados al microscopio de fluorescencia.

Al revisar el cultivo control se aprecia la corteza de actina, de tal manera que las células se pueden diferenciar de manera individual, asimismo es posible observar las fibras de tensión (Fig. A). A las 20 hpi, las células comienzan a redondearse, también se observa la presencia de filopodios y se perciben concentraciones focales de actina en diferentes puntos del cultivo, sin embargo, se sigue observando la corteza, aunque ya no es posible apreciar las fibras de tensión (Fig. B). A las 40 hpi, se observan puentes intercelulares y concentraciones focales de actina (Fig. C). A las 45 hpi, el redondeo celular es ya muy evidente y no es posible apreciar la corteza, se aprecia de forma evidente la presencia de sincitios (Fig D). En la figura E se muestran los núcleos teñidos con DAPI de las células mostradas en la figura anterior, denotando de esta manera la formación de sincitios.

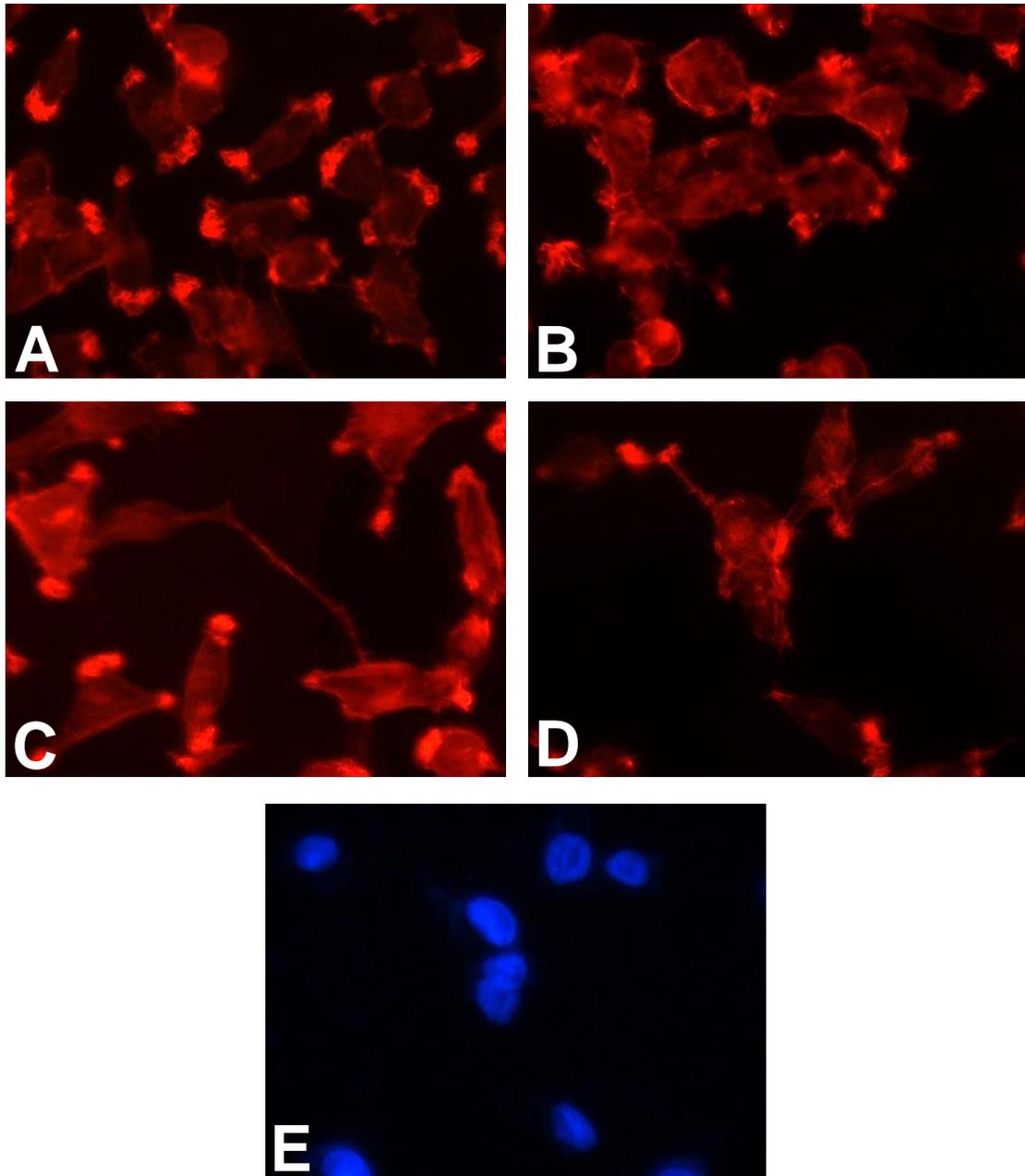


Figura 10. Cultivos de células C6 infectados con HVB-1 y expuestos a faloidina rodaminada. (A) Cultivo control. (B) Se observa el inicio del redondeo celular y la presencia de filopodios, asimismo se perciben concentraciones focales de actina en diferentes puntos del cultivo, se aprecia la corteza, pero no las fibras de tensión. (C) Se observan puentes intercelulares y concentraciones focales de actina. (D) Se aprecia el redondeo celular y la formación de sincitios, sin embargo no es posible apreciar la corteza celular. (E) Se muestran los núcleos teñidos con DAPI de las mismas células que en D. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia: A y B 200×; C, D y E 400×.

9. Producción de partículas virales en células RK-13 y Vero

Con el fin de explorar si había alguna diferencia en la producción de partículas virales dependiendo de la línea celular utilizada, cultivos de células RK-13 y Vero fueron infectados con diluciones seriadas realizadas a partir del mismo stock viral, se observaron después de 72 hpi y se realizó la titulación viral, para lo cual se utilizó el método de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938). De manera general se puede señalar que no hubo diferencia en la producción de partículas virales entre los cultivos utilizados, ya que tanto en las células RK-13 como en las Vero se obtuvo un título de $10^{11.49}$ TCID₅₀ ml⁻¹ (Reed y Muench, 1938).

Tabla 6. Evaluación de la producción de partículas virales en células RK-13.

Dilución	Unidad Infectada	Infectados Acumulados		Número de Infectados (A/A+B)	Porcentaje (%)
		A	B		
10 ⁻⁸	5/5	15	0	15/15	100.0
10 ⁻⁹	4/5	10	1	10/11	90.9
10 ⁻¹⁰	3/5	6	3	6/9	66.6
10 ⁻¹¹	2/5	3	6	3/9	33.3
10 ⁻¹²	1/5	1	10	1/10	10.0
10 ⁻¹³	0/5	0	15	0/15	0.0

Fórmula para obtener la distancia proporcional:

$\frac{(\% \text{ positivos arriba del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positivos arriba del } 50\%) - (\% \text{ positivos abajo del } 50\%)}$

(% positivos arriba del 50%) – (% positivos abajo del 50%)

Sustitución en la fórmula:

A) RK-13:

$$\frac{(66.6) - 50\%}{(66.6) - 33.3} = \frac{16.6}{33.3} = \mathbf{0.498 \text{ Distancia Proporcional}}$$

$$(-10) + (0.49)(-1.0) = -10.49 \approx 10^{-10.49}$$

$$\text{Por lo tanto: } 10^{10.49} \text{ TCID}_{50} \text{ } 0.1 \text{ ml}^{-1}$$

$$10 \times 10^{10.49} \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$$

$$\mathbf{10^{11.498} \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}}$$

Tabla 7. Producción de partículas virales en células Vero.

Dilución	Unidad Infectada	Infectados Acumulados		Número de Infectados (A/A+B)	Porcentaje (%)
		A	B		
10 ⁻⁷	5/5	20	0	20/20	100.0
10 ⁻⁸	4/5	15	1	15/16	93.75
10 ⁻⁹	3/5	11	3	11/14	78.57
10 ⁻¹⁰	3/5	8	5	8/13	61.53
10 ⁻¹¹	2/5	5	8	5/13	38.46
10 ⁻¹²	2/5	3	11	3/14	21.42
10 ⁻¹³	1/5	1	15	1/16	6.25
10 ⁻¹⁴	0/5	0	20	0/20	0.0

Sustitución en la fórmula:

B) VERO:

$$\frac{(61.53) - 50\%}{(61.53) - 38.46} = \frac{11.53}{23.07} = 0.499 \text{ Distancia Proporcional}$$

$$(-10) + (0.49 \times -1.0) = -10.49 \approx \text{Log ID}_{50}$$

Por lo tanto:

$$10^{10.49} \text{ TCID}_{50} \text{ } 0.1 \text{ ml}^{-1}$$

$$10 \times 10^{10.49} \text{ TCID}_{50} \text{ } 0.1 \text{ ml}^{-1}$$

$$10^{11.499} \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$$

Discusión

El agente etiológico de esta enfermedad es un virus ADN constituido por una nucleocápside de simetría icosaédrica (Marín Sánchez, 1996). La cápside está rodeada por una capa de material globular, conocido como tegumento y, alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Martínez, 2008). El aislado viral utilizado en este trabajo proviene de una muestra de cotiledones, post-aborto, de un bovino que previamente había presentado signología respiratoria. Dicha muestra fue enviada al laboratorio y procesada para obtener un filtrado que fue utilizado para infectar un cultivo de células RK-13, en el cual, a las 72 horas postinfección (hpi), se observaron efectos citopáticos. Posteriormente, se procesó una muestra de un cultivo infectado con el fin de realizar la identificación del agente al microscopio electrónico. En una de las fotomicrografías obtenidas (figura 3) se aprecian dos partículas del mismo tamaño, ambas con forma icosaédrica y con material denso que correspondería al tegumento; su apariencia y tamaño corresponden con las descripciones disponibles en la literatura para el HVB-1, esto junto con la signología del animal hace pensar que se trata del HVB-1. Sin embargo, para la identificación de este agente infeccioso se pueden utilizar otras técnicas, como la detección de proteínas virales por inmunofluorescencia (Ávila Sánchez, 2008). Con el fin de tener una mayor certeza en la identificación de este agente resultaría conveniente aplicar esta técnica utilizando anticuerpos específicos, sin embargo en este trabajo no fue posible realizar esta metodología por lo que queda como un asunto por abordar en estudios posteriores.

El virus de IBR puede replicarse en una gran variedad de células provenientes de diversos mamíferos. En la mayor parte de investigaciones con este virus se han utilizado las células MDBK con el objeto de estandarizar las condiciones de trabajo. Las células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) son una línea celular obtenida por Madin y Darby en 1958 y proviene de un riñón de bovino adulto. Esta línea presenta una gran sensibilidad al HVB-1 (Aguilar, 1987; López y Salazar, 2002). La replicación de este virus en células de origen bovino produce un ECP que se caracteriza por la formación de cuerpos de inclusión intranucleares llamados “de Cowdry” al inicio de la infección y, posteriormente, hay redondeamiento de las células las cuales forman como “racimos de uvas”, presencia de células multinucleadas (sincitios) hasta la total destrucción de la monocapa (Ávila, 2008; Martínez y Rivera, 2008).

Asimismo existen otros estudios donde también se ha utilizado a la línea celular RK-13 (Valera, 1999). Sin embargo, en ninguno de ellos se encontró una descripción que permitiera conocer datos tan importantes como el tiempo de duración del ciclo viral y los efectos citopáticos desarrollados. Se decidió utilizar a las células Vero, PK-15 y RK-13, debido a que estas líneas celulares, al igual que MDBK, son células epiteliales derivadas de riñón y su única diferencia es la especie de origen. Por otra parte, las células C6 provienen de un glioma de rata y se incluyeron en este trabajo como un ensayo independiente en el que se exploró la posibilidad de que el HBV-1 fuese capaz de desarrollar su ciclo en este linaje celular.

En las células PK-15, RK-13 y C6 los ECP observados abarcaron desde células con apariencia rugosa hasta la presencia de sincitios. Es importante resaltar que sólo en los cultivos de C6 se encontraron células redondeadas y agrupadas, mientras que sólo en PK-15 y Vero se observó la presencia de lisis celular.

Un aporte importante de este trabajo se refiere a la determinación del tiempo empleado por el virus de IBR para desarrollar su ciclo replicativo. Se encontraron diferencias evidentes con respecto al tiempo empleado por el virus para desarrollar su ciclo según la línea celular utilizada. Así, se puede señalar que las células RK-13 y Vero fueron las más permisivas y la duración del ciclo viral fue muy similar en ambas líneas celulares; en RK-13 abarcó desde las 17 hasta las 71 hpi, mientras que en las células Vero fue de las 18 a las 71 hpi. Por su parte, en las células C6 el ciclo abarcó desde las 20 hasta las 45 hpi y en las PK-15 fue de las 21 hasta las 126 hpi, así se puede señalar que esta última línea celular fue la más refractaria a la infección con HVB-1.

Al comparar los resultados, obtenidos *in vitro*, entre el virus de IBR y el de pseudorrabia se puede señalar que las similitudes encontradas con respecto a los ECP, son de carácter general ya que en ambos ensayos se encontró la presencia de proyecciones intercelulares (filopodios), sincitios y lisis celular, cambios citopáticos presentes en la mayoría de las infecciones virales. La diferencia más importante y evidente se encontró en el tiempo empleado para completar el ciclo viral ya que en todos los ensayos el virus de pseudorrabia desarrolló su ciclo en un tiempo menor.

De acuerdo con múltiples evidencias se considera que los filopodios permiten a la célula infectada establecer una gran cantidad de interacciones celulares y contactos íntimos con células adyacentes que permiten a las partículas virales migrar por dentro de dichas

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; Favoreel y col., 2005).

La presencia de filopodios, sugiere que en las células estudiadas la propagación de la infección, se realizó mediante la fusión de la membrana plasmática de una célula infectada con la de otras células adyacentes no infectadas (propagación intercelular), dando como resultado la formación, en primer lugar, de puentes intercelulares y, posteriormente, grandes sincitios, particularmente en los cultivos de células RK-13 y C6. 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).

También se encontraron diferencias con respecto al tiempo empleado por el virus para inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina según la línea celular utilizada. Asimismo, es importante señalar que para evidenciar los cambios ocurridos en el citoesqueleto, es necesario que el cultivo tenga una confluencia de media a baja pues en cultivos muy densos, estos cambios suelen no aparecer o bien son difíciles de apreciar. Las células RK-13 y C6 fueron las que presentaron las modificaciones más evidentes y en menor tiempo. Por su parte, con las células Vero se utilizaron cultivos con una confluencia alta y, por consecuencia, las modificaciones del citoesqueleto de actina fueron menos evidentes y, aparentemente, más tardías.

Con el fin de determinar si existen diferencias en la capacidad de producción de partículas virales entre las células Vero y las RK-13, se realizaron ensayos de infección y, al final del mismo, se realizó la cuantificación de las partículas virales producidas por medio del método $TCID_{50}$. Así se determinó una diferencia mínima a favor de las células Vero ($10^{11.499} TCID_{50} ml^{-1}$) con respecto a las RK-13 ($10^{11.498} TCID_{50} ml^{-1}$). Estos resultados sugieren que no hay diferencia entre estas líneas celulares al buscar producir grandes cantidades de HVB-1. Sin embargo y de acuerdo con la experiencia obtenida al realizar este trabajo, se puede recomendar a las células Vero ya que tiene un mayor índice de proliferación así como una producción ligeramente mayor de partículas virales.

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 HVB-1 y las

células durante su replicación. En la actualidad, aún se desconocen muchos aspectos de los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo del ciclo del HVB-1 por lo que es necesario realizar más estudios que permitan conocer de manera específica los eventos moleculares involucrados en la interacción virus-célula durante la replicación del virus HVB-1, este conocimiento permitirá entender mejor los aspectos básicos de este virus y podría conducir al desarrollo de mejores vacunas y/o métodos de diagnóstico y prevención. Los problemas concernientes tanto a las vacunas atenuadas como a las vacunas inactivadas, impulsaron la producción de nuevas alternativas vacunales que contienen sólo determinados componentes virales los cuales previamente han mostrado ser altamente inmunogénicos, como son las diferentes glicoproteínas virales. Dichas glicoproteínas son las encargadas de la interacción con las células blanco y con el sistema inmune (Ruiz-Saenz, 2009).

Conclusiones

- Se identificaron por microscopia electrónica partículas virales que por apariencia y tamaño parecen tratarse del HVB-1.
- Se encontró que las células RK-13 y Vero fueron las más permisivas al desarrollo del ciclo viral, mientras que la PK-15 fue la más refractaria.
- Los ECP encontrados fueron; células con apariencia rugosa, presencia de vesículas, puentes intercelulares, sincitios y lisis celular. De manera particular, en las células C6, se encontró redondeamiento de las células y formación de cúmulos.
- Las líneas celulares utilizadas mostraron la presencia de rearrreglos del citoesqueleto de actina y de éstos, los filopodios y las proyecciones intercelulares fueron las más sobresalientes.
- Los ECP y las modificaciones del citoesqueleto fueron de diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares estudiadas.
- Se recomienda el uso de células Vero para la producción de partículas virales.
- Este estudio conforma un modelo adecuado para profundizar el estudio de la interacción del HVB-1 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. Alcantar Meza F. Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por el virus de pseudorrabia en células 3T3, MDCK y C6 (tesis de licenciatura). México Cuautitlán: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2010.
3. Alfa Bracho C, Jaramillo ACJ, Martínez MJJ, Montañón HA Olgún y Bernal A. Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueítis infecciosa bovina en hatos lecheros, Veterinaria México, abril-junio, vol. 37, número 2, UNAM, México, 2006: 152-153.
4. Aguilar SJA. El virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Propiedades y Vacunación. Ciencia Veterinaria 4. México, 1987: 161-202.
5. Ávila SM, Rodríguez MM, Díaz de Arce H, Barrera VM. Diagnóstico virológico de Herpesvirus bovino tipo-1, revista electrónica de veterinaria 1695-7504, Volumen IX, número 3, 2008: 1-16.
6. Beer J. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos Tomo 1. Editorial Acribia. Zaragoza España 1987: 285-290.
7. Blaha T. Epidemiología Especial Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza España 1995: 190-194.
8. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3^a. edición, Marbán Libros, Madrid, 2006 pp. 435-444 y 574-575.
9. Correa GP. Rinotraqueítis infecciosa de los bovinos, Ciencia Veterinaria, Departamento de virología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 5ta edición. vol. 2 México, 1988 pp 131-155.
10. Demmin GL, Clase AC, Randall 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. Journal of Virology 2001 75: 10856-10869.
11. Dieguez FL, Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agrosoma

de actina (Tesis doctoral).Barcelona, España: Departamento de biología celular y Anatomía patológica, Universidad de Barcelona, 2008.

12. Dirksen G, Groünder H, Stöber M. Medicina Interna y Cirugía del Bovino vol. 1 4ta Edición. Editorial Intermédica. Argentina 2005: 255-260.
13. Dwight CH, Yuan CZ. Veterinary Microbiology. Edit Offices. E.U.A. 1999: 350-355.
14. Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2005 8: 35-45.
15. Guirado BO, Solanas GM, Costa TI, ESCRICH EE. El citoesqueleto de actina una perspectiva desde la biología molecular del cáncer, *Revista cubana de investigaciones biomédicas*. Vol. 21 Núm. 2, Cuba, 2002: 109-114.
16. Favoreel HW, Enquist LW, Feierbach B. Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends in Microbiology* 2007 15: 426-433.
17. 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 USA* 2005 102: 8990-8995.
18. Favoreel HW, Minnebruggen GV, Van de Walle GR, Ficinska J, Nauwynck HJ. Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies and hiding from antibodies. *Veterinary Microbiology* 2006 113: 257-263.
19. Fenner F, Bachmun A. *Virología veterinaria*. 4ta edición, editorial Acribia, España, 1992: 350-351.
20. Jubb KVF, Peter CK, Nigel Palmer. *Patología de los Animales Domésticos*. Editorial Hemisferio Sur. Tomo 2. 3era edición. Uruguay 1990: 133-134.
21. López HA, D. Salazar A, A Restrepo G, Zuluaga NF, Ossa JE. Resistencia natural, in vitro, a los virus de estomatitis vesicular y de rinotraqueítis infecciosa en ganado Blanco orejinegro, *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*. Vol. 15:1, 2002: 100-106.
22. Marín SM., *IBR y BVD-MD: difusión y trascendencia económica*. *Rev. Mundo ganadero*. Núm. 83, España, 1996: 46-54.
23. Martinez Carlier Paula J, Rivera Santos Iara M. Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control de la diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina (Tesis). Bogota Colombia: Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, 2008.

24. 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 vpr 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.
25. McKercher DG, Moulton JE, Madin SH, Kendrick JW. Infectious bovine rhinotracheitis; a newly recognized virus disease of cattle, *American Journal of Veterinary Research*, 1957, 18:67, p 246-256
26. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly. An Update. *Virus Research*, 2009, 143: 222-234.
27. Moss B, Ward BM. High-speed mass transit for poxviruses on microtubules. *Nat Cell Biol* 2001 3: 245-246.
28. 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.
29. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rinotracheitis, *Vet. Res.* 38, Belgium, 2007: 181-209.
30. Nandi S, Kumar M. Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Healt Research Reviews*, 2009 10:85-98.
31. Pelkmans L, Kartenbeck J, Heleninus A. Simian virus 40 (SV40) is unusual among animal viruses in that it enters cells trough caveolae, and the internalized virus accumulates is a smooth endoplasmic reticulum (ER) compartiment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 3: 473-483.
32. Radostits OM, Blood DC. *Medicina Veterinaria*, libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino. 7ma edición, vol 2. Interamericana Mc Graw-hill. España.1992: 967-974.
33. Rebhun W. *Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*. Editorial Acribia. España 1995: 105-107.
34. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 1938 27: 493-497.

35. Roizman B, Pellett PE. The family herpesviridae: A brief introduction. In *Fields Virology*, Fourth edition. Knipe DM and Howley PM, Editors. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 2001. p. 2381-2397.
36. Ruiz-Saenz J, Jairo J, Vera V. Latencia del herpesvirus bovino-1: el papel de los transcritos relacionados con latencia (RL). *Acta biol. Colombia*. Vol. 13 Núm 1, 2008: 3–22.
37. Ruiz-Saenz J, Jairo J, Vera V. Vacunas contra el herpesvirus bovino-1: una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. *Acta biol. Colombia*. Vol. 14 Núm 2, 2009: 3-20.
38. 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.
39. Spear PG. 1993. Entry of alpha herpesvirus into cells. *Semin Virol* 4:167-180.
40. Stanchi NO, Martino EP, Gentilini E, Reinoso EH, Echeverría MG, Leordini NA, Copes JA. *Microbiología Veterinaria*. 2da ed. Buenos Aires, Argentina, Intermédica, 2007: 378-381.
41. Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A, Thiry E. Ruminant alpha herpesvirus related to bovine herpesvirus 1, *Vet. Research. Belgica*. Vol. 37 No 2, 2006: 169-190.
42. Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*. Departamento de patología, UNAM, México, 4-1987.
43. Valera SAR, Galosi OCM, Echeverría AMG, Silvestrini GMP, Romero BJR, Nosetto KEO. Desarrollo y estandarización de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino tipo 1. *Avances en ciencias veterinarias* Vol. 13, Núm. 1. 1999: 21-24.
44. Vilchis González Omar. Efecto de la interacción del virus de pseudorrabia en el citoesqueleto de actina en las células RK-13, PK-15 y Vero (tesis de licenciatura). México Cuautitlán: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2009.

Apéndice 1

Descripción de las líneas celulares

- Las células PK-15 provienen de un cultivo de riñón normal de cerdo, son células de morfología epitelial con crecimiento adherente y muestran resistencia a poliovirus 2. Esta línea celular porta un retrovirus endógeno tipo-C y son positivas a antígenos de circovirus porcino. Sin embargo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha determinado que no están infectados con el virus de fiebre porcina clásica o el virus de fiebre porcina africana por lo que pueden usarse para investigar la presencia de dichos virus.
- La línea RK-13 proviene del riñón normal de un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de cinco semanas de edad, son células epiteliales con crecimiento adherente. Estas células son positivas al virus de la diarrea viral bovina y expresan queratina de manera constitutiva.
- La línea de células Vero proviene del riñón normal de un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto, son células epiteliales con crecimiento adherente que fueron aisladas el 27 de marzo de 1962 y desde entonces han sido ampliamente usadas en el desarrollo de diferentes estudios *in vitro*.
- Las células C6 provienen de cerebro, su morfología es de tipo glial y su crecimiento es adherente. 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 proliferación.