



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**Determinación del efecto de Citocalasina D sobre el ciclo del  
Herpesvirus Bovino tipo 1 en células VERO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**Itzel Guadalupe Aguilar López**

**ASESOR: Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate**

**Cuautilán Izcalli, Edo Méx. a 14 de Enero de 2020**



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.

# AGRADECIMIENTOS

## ÍNDICE

RESUMEN	.....	4
INTRODUCCIÓN	.....	5
JUSTIFICACIÓN	.....	16
OBJETIVOS	.....	17
HIPÓTESIS	.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	.....	18
RESULTADOS	.....	20
DISCUSIÓN	.....	30
CONCLUSIONES	.....	32
REFERENCIAS	.....	33

## RESUMEN

En la familia Herpesviridae la utilización del citoesqueleto es crucial para efectuar de manera óptima el ciclo replicativo. El citoesqueleto proporciona forma, organización interna y polaridad funcional de una célula mediante su unión a la membrana plasmática y a los organelos internos. Está compuesto de tres estructuras filamentosas: Microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. Los microfilamentos (filamentos de actina) son estructuras flexibles que poseen un diámetro de entre 5 y 9 nm. Se ha reportado que los herpesvirus realizan re-arreglos de estos microfilamentos para la formación de filopodios (proyecciones delgadas y rígidas conformadas por actina) en varias líneas celulares y poder llegar así a las células adyacentes. La función de los filamentos de actina puede ser alterada en condiciones experimentales por toxinas producidas en hongos o esponjas de mar. La citocalasina, es una toxina derivada de metabolitos fúngicos que se utiliza para alterar el citoesqueleto. Propiamente, la citocalasina D se une al extremo *más* de los microfilamentos, lo que inhibe la asociación y disociación de los monómeros. En el presente trabajo, se evalúa el desarrollo del ciclo replicativo del Herpesvirus Bovino 1 en células Vero tratadas con citocalasina D para poder comprender más a fondo las interacciones del virus con el citoesqueleto de actina, así como determinar el tipo de alteración que se provoca en el ciclo viral por la inhibición de la polimerización de los microfilamentos.

## INTRODUCCIÓN

### **Familia herpesviridae**

La familia herpesviridae comprende a las subfamilias **Alphaherpesvirinae** (grupo de herpes simple), **Betaherpesvirinae** (grupo de citomegalovirus) y **Gammaherpesvirinae** (grupo de herpesvirus linfoproliferativos). Los viriones envueltos miden de 180 a 200 nm de diámetro (Dinter & Morein, 1990). La cápside mide alrededor de 100 nm de diámetro y consiste de 162 capsómeros; 12 pentámeros y 150 hexámeros. Alrededor de la cápside existe una capa de material globular, conocida como tegumento, que llena el espacio entre la cápside y la envoltura. El herpesvirión comprende una molécula de ADN lineal de doble cadena enrollado por una proteína fibrilar con un diámetro entre 120 y 200 nm (Fenner *et al.*, 1995; Mayr & Büttner, 1990). La partícula vírica contiene más de 20 proteínas, de las cuales 6 se encuentran en la nucleocápside y 2 de ellas están asociadas al ADN. Las glucoproteínas, de las que al menos existen 5, se localizan en la envoltura y a veces pueden proyectarse como peplómeros (Dinter & Morein, 1990; Fenner *et al.*, 1995; Mayr & Büttner, 1990). Los herpesvirus sobreviven de una generación a la siguiente mediante el establecimiento de infecciones latentes con una eliminación viral periódica, a partir de las cuales los virus se reactivan y diseminan (Jones *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2005). Esta infección latente está asociada con el estrés ocasionado por el transporte, frío, condiciones ambientales o hacinamiento (Jones *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2005; Fenner *et al.*, 1995; Mayr & Büttner, 1990).

### **Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)**

El virus fue descrito por primera vez en Estados Unidos a principios de los años 50 y, posteriormente, en Europa (Dinter & Morein, 1990; Fenner *et al.*, 1995). Los sinónimos utilizados para denominar la infección por Herpesvirus bovino 1 son **rinotraqueítis infecciosa bovina**, **vulvovaginitis pustular infecciosa**, **balanopostitis pustular infecciosa** y **exantema coital** indicando que este virus produce alteraciones respiratorias y genitales, pero no abarcan totalmente el espectro de enfermedades que pueden causar en el ganado bovino, entre las que

se encuentran además; conjuntivitis, aborto, encefalitis y un proceso generalizado en los terneros recién nacidos (Arboleda *et al.*, 2016; Dennet *et al.*, 1976; Espinasse, 1980; Reed *et al.*, 1973; Pérez, 2005; Mayr & Büttner, 1990).

### Cuadro 1. Propiedades de los Herpesvirus

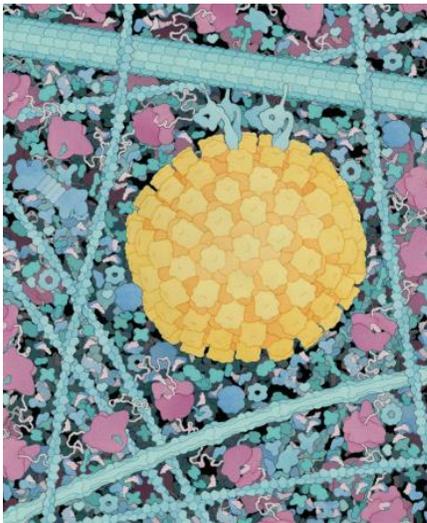
✓ Todos producen infecciones latentes.
✓ Viriones con envolturas de 120 a 200 nm de diámetro.
✓ Cápside icosaédrica con 162 capsómeros.
✓ Peplómeros de 8 nm de longitud en la envoltura.
✓ Genoma de DNA lineal de doble cadena.
✓ Replicación en el núcleo.
✓ Adquisición de la envoltura al atravesar la membrana nuclear durante la gemación.

Modificado de Fenner, 1995.

### Ciclo viral del BoHV-1

Tras su adsorción a los receptores de las células del hospedador por medio de la glicoproteína de envoltura (**gD**), conocida por unir varios receptores, como las nectinas (Sakisaka *et al.*, 2007) y al menos tres glicoproteínas virales de los peplómeros de la envoltura (**gB y gH/gL**) (Jonhson *et al.*, 2001; Ladelfa *et al.*, 2011; Favoreel *et al.*, 2005), la nucleocápside penetra en el citoplasma mediante la fusión de la envoltura con la membrana celular (Cole & Grose, 2003; Lyman & Enquist, 2009; Spear & Longnecker, 2003). En ese momento, se desprende de la nucleocápside al citoplasma y recluta a una proteína motora, para su internalización a través de los microtúbulos al poro nuclear y liberar el genoma viral en el núcleo, donde ocurre la transcripción de los genes virales y la replicación del genoma. Las proteínas de envoltura viral son producidas en el citoplasma y transportadas al núcleo en donde forman las procápsides (cápsides incompletas que se combinan con el DNA para formar viriones primarios), que dejan el núcleo unidas a la membrana nuclear interna, seguida de una fusión de la envoltura de estos viriones, con la membrana nuclear externa. La maduración final ocurre en el citoplasma por

una envoltura secundaria de las cápsides intracitosólicas unidas a vesículas de la red trans-Golgi conteniendo glicoproteínas virales, resultando en un virión envuelto dentro de una vesícula celular (Cudmore *et al.*, 1997; Cole & Grose, 2003; Fenner *et al.*, 1995; Mettenleiter *et al.*, 2009). Después del transporte hacia la superficie celular, la vesícula celular y la membrana plasmática se fusionan, liberando un virión envuelto maduro desde la célula (Döhner *et al.*, 2005; Radtke *et al.*, 2006).



**Fig 1. Esquema a escala de un alphaherpesvirus (amarillo) transportado a lo largo de un microtúbulo por dineínas motoras.** En el citosol pueden apreciarse microfilamentos (filamentos verticales hacia la derecha e izquierda de la cápside), un filamento intermedio (filamento mediano debajo de la cápside), ribosomas (rosa), proteínas chaperonas (proteínas redondas azules), entre otras estructuras. Tomado de David S. Goodsell, Scripps Research Institute.

La polimerasa II dependiente del ADN celular transcribe al menos tres clases de ARN;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . El ARNm  $\alpha$  (inmediato), cuando es procesado adecuadamente a ARNm, se traduce a proteínas  $\alpha$ , que inician la transcripción de ARNm  $\beta$  (precoz), el cual se traduce en proteínas  $\beta$  (preoces) que suprimen la transcripción de más ARNm  $\alpha$ . En ese momento comienza la replicación del ADN viral, en la que se utilizan algunas proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  así como proteínas de la célula huésped (Fenner *et al.*, 2005; Mendoza, 2009). Componentes virales interactúan directamente con la maquinaria de transporte del citoesqueleto (Döhner *et al.*, 2005, Frischknet & Way, 2001). El BoHV-1 empieza a reducir los niveles de actina de la célula huésped a las 6 hpi, y se encuentra en relación inversa con el aumento en el ADN y ARN virales (Tikoo *et al.*, 1995). Durante este ciclo se elaboran más de 70 proteínas enzimáticas y estructurales que son codificadas por el virus (Fenner *et al.*, 1995). Cada célula infectada puede producir hasta  $10^5$  partículas víricas. Los

cuerpos de inclusión intracelulares son característicos de las infecciones por herpesvirus y, generalmente, pueden observarse tanto en los tejidos de animales

infectados como en los cultivos celulares infectados (Mendoza, 2009; Fenner *et al.*, 1995).

### **Patogenia y lesiones**

Cuando el virus penetra por la vía nasal, se localiza en los agregados linfoides y células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio superior, donde se multiplica y da lugar a una viremia corta, para luego infectar el epitelio respiratorio donde las lesiones dependen principalmente de la invasión bacteriana secundaria. El virus posee capacidad de diseminación hacia riñón, hígado, glándulas adrenales o cerebro, especialmente en terneros (Pérez *et al.*, 2005; Reed *et al.*, 1973). De igual forma el virus puede llegar al feto y causar viremia con la consecuente muerte fetal. Por lo general, la enfermedad se presenta de forma súbita, con temperatura elevada, congestión de mucosas nasales, salivación, secreción nasal, aumento de frecuencia respiratoria, inapetencia y caída de la producción láctea (Espinasse, 1980). El cuadro puede iniciarse con dificultad respiratoria, lesiones necróticas en mucosa oral, lengua, esófago y cavidades gástricas y prosigue con diarrea, salivación excesiva y descarga nasal y lacrimal. Clínicamente, esta forma de la enfermedad es similar a la diarrea viral bovina (Reed *et al.*, 1973). En animales mayores de 3 meses la replicación viral está, generalmente, confinada a la superficie mucoide del tracto respiratorio con recuperación en 10 a 12 días (Maclachlan & Dubovi, 2010).

Histopatológicamente se puede encontrar necrosis focal en el hígado, riñones y glándulas adrenales; además de cuerpos de inclusión intranucleares llamados “Cuerpos de Cowdry” (Kahrs, 1977; Mendoza, 2009). La diseminación del virus en los animales desde el foco inicial de la infección se produce probablemente a través de la viremia asociada con células. El periodo de incubación va de los 2 a los 6 días dependiendo de la cantidad de virus infectante, vía de entrada, estado inmunológico del hospedero y de las influencias ambientales (Sossa *et al.*, 1982; Murphy *et al.*, 1999).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico de la infección viral generalmente se realiza a partir del aislamiento del virus en cultivos de células renales bovinas y la confirmación posterior se hace mediante la identificación por seroneutralización con anticuerpos específicos (Hurk *et al.*, 1993; Merchant & Packer, 1970; Mendoza, 2009; Mohanty & Dutta, 1988). El agente puede ser aislado de secreciones respiratorias, genitales, oculares y heces (Crandell, 1977; Mendoza, 2009; Vera & Betancur, 2008). También puede ser determinada por detección del antígeno viral mediante la técnica de inmunofluorescencia y PCR (Delgado *et al.*, 2005; Mendoza, 2009). La seropositividad para estudios de prevalencia puede determinarse mediante una serie de pruebas serológicas como inmunodifusión, hemoaglutinación indirecta, fijación del complemento, seroneutralización y ELISA (Witte *et al.*, 1989). Entre las pruebas serológicas, el ensayo de ELISA ha sido considerada como la más sensible, específica y económica, y puede ser realizada en muestras de suero lácteo o leche facilitando la cobertura de grandes hatos bovinos (Sossa *et al.*, 1982). Se le ha considerado la prueba más apropiada para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica en campañas de control o erradicación de la infección por BoHV-1 (Witte *et al.*, 1989). El aislamiento y la caracterización del virus constituyen un diagnóstico definitivo. Los alphaherpesvirus producen un efecto citopático rápido, algunas especies producen sincitios y en las células infectadas pueden identificarse fácilmente la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos. En caso de sospecha de infecciones latentes, la administración de corticosteroides desencadenan la reactivación del virus y ha sido utilizada como sistema de detección y eliminación de toros portadores en los centros de inseminación artificial (Fenner *et al.*, 1995; Melamed *et al.*, 1994).

## **Epidemiología y control**

Los viriones de IBR contienen lípidos en su envoltura lo que los vuelve susceptibles a muchos desinfectantes, especialmente a solventes como éter y cloroformo. El BoHV-1 sobrevive en el ambiente por 30 días en invierno y dentro de las instalaciones por 6 a 13 días (en invierno) y de 5 a 9 días (en verano). Puede ser

inmediatamente inactivado del alimento a una temperatura superior a 63°C (Dinter & Morein, 1990). La adaptación a las condiciones del cebadero y el cambio de alimentación, incluyendo la dieta rica en proteína, contribuyen a crear un ambiente de estrés que puede favorecer la aparición de la enfermedad, aunque en las explotaciones bien manejadas estos factores se reducen al mínimo, con la consecuente menor incidencia de la enfermedad (Fenner *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1999). En ocasiones se ha producido la transmisión iatrogénica entre toros en los centros de inseminación artificial cuando se ha utilizando la misma esponja en el lavado del prepucio previo a la recogida del semen (Mohanty & Dutta, 1988; Dinter & Morein, 1990). En la actualidad se utilizan una amplia gama de vacunas que contienen herpesvirus bovino 1 (la mayoría de ellas como virus atenuado). Asimismo, su aplicación está muy extendida en Europa. Aunque no evitan la infección, las vacunas contribuyen significativamente en la reducción de la incidencia de la enfermedad (Fenner *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1999). En el 2006 se realizó la prueba de una vacuna viva atenuada de gE del BoHV-1 para caprinos aprovechando la íntima relación antigénica del herpesvirus bovino tipo 1 y el herpesvirus caprino 1 (CpHV-1, por sus siglas en inglés). El experimento tuvo un éxito relativo con la disminución del título de producción viral y el retraso en la excreción de virus por parte del grupo experimental (Thiry *et al.*, 2006).

## **Tratamiento**

Las enfermedades producidas por herpesvirus son las únicas infecciones virales en las que se debe mencionar la posibilidad de aplicar una **quimioterapia**, aunque ello sólo sea viable en el caso de animales de compañía de alto valor. Los medicamentos antiherpéticos como la 5-iodo-2'-desoxiuridina (Iodouridina), el arabinósido de citosina (Cytarabina) y la acicloguanosina (Acyclovir) representan un importante progreso en el desarrollo de medicamentos cada vez más eficaces para el tratamiento de las enfermedades herpéticas del hombre. Esos medicamentos no se utilizan o no se destinan habitualmente a la aplicación en medicina veterinaria, con la posible excepción del tratamiento de las úlceras corneales producidas por herpesvirus felino I (Fenner *et al.*, 1995).

## **El citoesqueleto**

Las células deben disponer de una morfología correcta, ser físicamente resistentes y poseer una estructura interna adecuada, pero a la vez, deben poder cambiar de forma, producir movimientos en su interior, migrar de un sitio otro e interactuar con su entorno. Generalmente, se acepta que estas consideraciones dependen directamente de los elementos del **citoesqueleto**. El término *citoesqueleto* denomina a un grupo complejo de estructuras citoplasmáticas constituidas por proteínas filamentosas (Alberts, 2002; Jiménez & Merchant, 2003). El citoesqueleto es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza de manera continua a medida que la célula cambia de forma, se divide y responde a su ambiente. Controla la localización de los organelos que llevan a cabo funciones especializadas, además de suministrar la maquinaria para el transporte entre ellos. El citoesqueleto es también importante en el proceso de señalización y ordenamiento de proteínas, así como para estabilizar a las proteínas recién sintetizadas en algún dominio de membrana (Blanchoin *et al.*, 2013; González *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2007). La gran variedad de sus funciones depende del comportamiento de tres diferentes estructuras: a) **Microtúbulos**, b) **Filamentos intermedios** y c) **Microfilamentos**. Cada tipo de filamento presenta distintas propiedades mecánicas, distinta dinámica y diferentes funciones biológicas (Alberts, 2002; Jiménez & Merchant, 2003; Kaiser *et al.*, 2007). La fuerza y estabilidad que requiere la estructura del citoesqueleto, así como la coordinación con la que se efectúan los movimientos celulares, no se basa sólo en la interacción de los filamentos proteicos mencionados, sino también a la presencia de proteínas accesorias, que participan como puentes de unión entre los filamentos y otras partes de la célula (González *et al.*, 2003).

### **Microfilamentos o filamentos de actina**

Los microfilamentos están formados de un solo polipéptido globular llamado **actina** con un peso molecular de 41,800 Daltons y un diámetro de 5 a 7 nm. Es la proteína más abundante de las células eucariontes. Posee asociación con una molécula de  $Mg^{2+}$  que estabiliza su conformación y una molécula de ATP, cuyo fosfato terminal se hidroliza cuando la actina globular (actina G) polimeriza y se convierte en actina

fibrilar (actina F) para formar el microfilamento. El análisis de cristalografía de rayos X revela que su apariencia globular está constituida de dos lóbulos separados por una profunda hendidura que componen el pliegue ATPasa, lugar donde se unen el ATP o el  $Mg^{2+}$ . La actina presenta algunas isoformas aparentemente especializadas: la  $\alpha$ -actina se asocia con estructuras contráctiles, la  $\beta$ -actina está en el borde director de las células en movimiento donde los filamentos de actina se polimerizan y la  $\gamma$ -actina forma parte de las fibras de estrés. En organismos unicelulares y en células no musculares, los filamentos de actina se organizan para formar redes finas y haces o fibras de tensión, que están involucradas en la motilidad y en el mantenimiento de la morfología celular (Jiménez & Merchant, 2003; Cárdenas *et al.*, 2016; Alberts, 2002; Vázquez *et al.*, 2016; Blanchoin *et al.*, 2013).

Se considera que un filamento de actina está formado por dos protofilamentos paralelos que giran uno sobre el otro siguiendo una hélice de rotación hacia la derecha. En los filamentos de actina, la ranura de unión de ATP en el monómero está dirigida hacia el extremo “*menos*”. Los extremos *más* de los filamentos de actina se conocen como extremos “romos” (*barbed* en inglés) y los extremos *menos* como “puntiagudos” (*pointed* en inglés). La orientación paralela y regular de las subunidades proporciona a los filamentos de actina su polaridad estructural. El ensamblaje de la actina-G en actina-F se acompaña con la hidrólisis de ATP (Alberts, 2002; Kaiser *et al.*, 2007; Jiménez & Merchant, 2003).

Las células se mueven en respuesta a estímulos externos, extendiendo y remodelando sus estructuras periféricas en la dirección de la locomoción. El remodelaje requiere el montaje vectorial de subunidades de actina en polímeros lineales. El desmontaje de los filamentos entrecruzados en fragmentos cortos o subunidades monoméricas sustituye componentes para las reacciones del montaje de actina que producen protrusión. Las proteínas celulares que responden a los lípidos y a señales iónicas inducidas por señales sensoriales dirigen a la actina a través de este ciclo en el que los filamentos son montados, entrecruzados y desmontados (Jiménez & Merchant, 2003; Vázquez *et al.*, 2016).

La polimerización de actina se resume en tres fases: **(1) Fase de nucleación**, que se caracteriza por un periodo de latencia en el que la actina-G se une al

nucleótido ATP para formar oligómeros de actina cortos e inestables (dímeros y trímeros). Una vez que el oligómero alcanza cierta longitud o cuatro subunidades, puede actuar como un núcleo que, en la segunda fase, la de **elongación (2)** se alarga con rapidez para formar un filamento por medio del agregado de monómeros de actina en ambos extremos. Los filamentos de actina-F crecen asimétricamente en esta fase, debido a que el extremo romo crece más rápidamente (entre 5 y 10 veces más que el extremo puntiagudo). Disminuye la concentración de monómeros de actina-G, hasta alcanzar el equilibrio con los filamentos. **(3)** En la fase de **estado estacionario**, los monómeros de actina-G se intercambian con las subunidades de los extremos del filamento, pero no hay un cambio neto en la masa total del filamento. Alcanzada esta fase, la concentración de las subunidades no ensambladas se denomina **concentración crítica (C<sub>c</sub>)**. Una vez incorporados los monómeros de actina G-ATP en un filamento, el ATP fijado se hidroliza a ADP (Kaiser *et al.*, 2007; Alberts, 2002).

La polimerización de los filamentos de actina y su asociación con otras proteínas accesorias generan diversas arquitecturas, entre las que se encuentran: redes entrecruzadas y ramificadas (formando lamelipodios), haces paralelos (formando filopodios) y estructuras contráctiles antiparalelas (formando fibras de estrés). En una célula viva, proteínas accesorias unen y entrecruzan los filamentos, haciendo que estas grandes estructuras de actina sean mucho más resistentes que los filamentos individuales ya que unen los filamentos al resto de componentes celulares entre sí (Alberts, 2002; Cárdenas *et al.*, 2016; González *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2007).

Los filamentos de actina generalmente son más cortos que los microtúbulos, y el transporte basado en actina es significativamente más lento (~ 0.1 μm/s) (Alberts, 2002). Las proteínas accesorias (ABPs, actin-binding proteins, por sus siglas en inglés) incluyen proteínas secuestradoras (como la profilina) que mantienen a los monómeros de actina en solución; los factores de nucleación (como los complejos Arp2/3 y forminas) que controlan la trimerización; las proteínas coronadoras/capping (como CapZ y las tropomodulinas) que se unen a los filamentos para estabilizarlos o para promover su desensamblado; las proteínas de

corte (como ADF, cofilina y gelsolina) que rompen los filamentos de actina estabilizando un cambio de conformación en la subunidad. Cuando una proteína de corte rompe un filamento en un sitio, permanece unida al extremo *más* de uno de los fragmentos obtenidos, lo que impide el agregado de subunidades de actina, en una actividad denominada **encasquetamiento** (*capping*, en inglés). Las proteínas entrecruzadoras (como  $\alpha$  - actinina y filamina) que organizan a los filamentos en haces o redes; y por último, las proteínas **motoras** (pertenecientes a la familia de la miosina) que proveen de la fuerza conductora durante los procesos activos (Kaiser et al., 2007, Vázquez et al., 2016; Schliwa & Woehlke, 2003). Para sobrevivir, las células introducen y expulsan sustancias a través de sus membranas mediante fenómenos de internalización o de excreción que requieren continuos movimientos de vesículas, éstas se desplazan sobre largos filamentos de actina polimerizada gracias al impulso que les brindan motores biológicos como las **miosinas** que convierten la energía de la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica para poder desplazar los organelos a lo largo de los filamentos o a los filamentos entre sí (Schliwa & Woehlke, 2003). Se ha sugerido que en las células animales el transporte de largo alcance ocurre a lo largo de los microtúbulos y el transporte de distancias cortas, a lo largo de los filamentos de actina (Döhner *et al.*, 2005; Schliwa & Woehlke, 2003).

### **Toxinas que alteran el citoesqueleto**

Varias toxinas cambian el equilibrio habitual entre microtúbulos y microfilamentos. En el caso del citoesqueleto de actina: **citocalasina D**, latrunculina y faloidina son ejemplos de estas toxinas que poseen la propiedad de alterar a los microfilamentos. La citocalasina D (un metabolito fúngico de *Zygosporium mansonii*), inhibe la polimerización y despolimerización de actina; latrunculina (*Latrunculina magnifica*), se fija a la actina-G e impide que se una al extremo más del filamento y faloidina (*Amanita phalloides*), se une y estabiliza a los microfilamentos, produciendo un incremento en la polimerización de actina (Alberts, 2002; Jiménez & Merchant, 2003; Cooper, 1987; Schliwa, 1982; Flanagan & Lin, 1980).

**Cuadro 3. Toxinas que provocan alteraciones en los microfilamentos.**

<b>Toxinas</b>	<b>Efecto que produce en los microfilamentos</b>
Faloidina	Se une y estabiliza los filamentos de actina
<b>Citocalasina</b>	<b>Encasqueta el extremo -más- de los microfilamentos</b>
Suínholida	Fragmenta los filamentos de actina
Latrunculina	Se une a las subunidades e impide su polimerización

Modificado de Alberts, 2002.

### **Citocalasinas**

Son un grupo de metabolitos fúngicos, una familia con más de 20 miembros de agentes interruptores de actina. Son extensamente usadas para estudiar el rol de los filamentos de actina en diferentes sistemas biológicos. Entre las funciones de la citocalasina se encuentran el bloqueo de un extremo de los filamentos de actina, acortar los filamentos, permear las membranas celulares, inhibir la síntesis proteica, entre otras (Cooper, 1987; Schliwa, 1982; Hess *et al.*, 1989). Cuando se agrega citocalasina a las células vivas desaparece el citoesqueleto y se inhiben los movimientos; por ejemplo, la locomoción y la citocinesis (Alberts, 2002; Jiménez & Merchant, 2003). Las citocalasinas encasquetan el extremo romo de los microfilamentos, inhibiendo ambas, la polimerización y despolimerización de subunidades en este extremo. La estequiometría de unión es alrededor de una citocalasina por filamento de actina (Brenner & Korn, 1979; Brown & Spudich 1981).

La citocalasina D (CD), es específica para los filamentos de actina por lo que ha sido utilizada para identificar procesos celulares dependientes de actina; despolimeriza los microfilamentos por unión al extremo *más* de la actina-F, donde bloquea el agregado posterior de subunidades, proveyendo un efecto dilatorio en las funciones celulares. Sin embargo, no afecta la mitosis ni la contracción muscular, debido a que estos fenómenos implican despolimerización de actina (Alberts, 2002; Hess *et al.*, 1989; Ornelles *et al.*, 1986).

## JUSTIFICACIÓN

Las patologías respiratorias constituyen, junto con las enfermedades entéricas, la principal causa de mortalidad en terneros, lo que ocasiona pérdidas importantes en la producción y, por lo tanto, pérdidas económicas (Bennet *et al.*, 1999; Abad *et al.*, 2016; Arbodela *et al.*, 2016).

La prevalencia de la **Rinotraqueitis Infecciosa Bovina** en México es de alrededor del 30% (Abad *et al.*, 2016) y al poseer dos tipos de afecciones importantes (respiratoria y reproductiva) nos obliga a indagar más sobre el ciclo replicativo del virus, sobre sus componentes moleculares y la forma como interaccionan con los organelos de la célula huésped para su propia replicación. Las interacciones específicas del BoHV-1 con las estructuras internas de la célula (sobre todo con el citoesqueleto) no son bien conocidas, por lo que es de gran importancia el estudio y desarrollo de técnicas que nos permitan conocer más a fondo qué ocurre cuando una célula es infectada por este herpesvirus.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de citocalasina D sobre los filamentos de actina y su impacto sobre el ciclo replicativo del Herpesvirus Bovino tipo 1 en cultivos de células Vero.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia y capacidad de replicación *in vitro* del Herpesvirus Bovino 1.
- Documentar los efectos citopáticos del BoHV-1 sobre un cultivo de células Vero a diferentes horas post-infección.
- Determinar el efecto de la Citocalasina D sobre los filamentos de actina en cultivos de células Vero.
- Documentar el efecto del BoHV-1 sobre los filamentos de actina.
- Determinar el efecto de la citocalasina D sobre el ciclo replicativo del herpesvirus bovino tipo 1 en células Vero.

## HIPÓTESIS

El ciclo biológico del herpesvirus bovino tipo 1 no se podrá llevar a cabo correctamente en un cultivo de células Vero debido al efecto de la citocalasina D.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**a) Cultivo celular y virus.** Se utilizaron cultivos de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) (Morgan & Darling, 1995), mantenidos en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino al 7%, antibiótico (penicilina 100 UI/ml; estreptomycin 100 mg/ml), a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El virus proviene de un caso clínico ocurrido en un establo del Complejo Agroindustrial de Tizayuca, Hgo., y aislado en el Laboratorio 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. El título de la suspensión viral fue obtenido mediante 14 diluciones seriadas (1:10) de la solución stock del virus BoHV-1 con DMEM. Finalmente se depositaron 100 µl por pozo de cada una de las últimas nueve diluciones (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-14</sup>). Los cultivos infectados fueron mantenidos por 72 h en incubadora a 37°C y bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Reed y Muench, 1938). Con esta metodología se determinó que la solución stock de BoHV-1 tiene un título de 10<sup>11.49</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> (Sánchez y Ruíz, 2012).

**b) Ensayo de infección y determinación de la presencia del virus.** Se realizaron cultivos de células Vero sobre cubreobjetos en cajas de Petri de 100 mm, cuando se alcanzó una confluencia celular de 40%, se realizó la infección colocando 50 µL de BoHV-1 al cultivo. Después de 72 hpi, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, bloqueadas con albúmina sérica de bovino y permeabilizadas con Tritón-X-100. Posteriormente, fueron expuestas a un **anticuerpo monoclonal** dirigido a la glicoproteína B (gl) del BoHV-1 (VMRD, cat. H2). Después, se expusieron al anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-ratón producido en cabra acoplado a fluoresceína, Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-2010). Al final, los cubreobjetos fueron montados sobre un portaobjetos con el medio de montaje (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-24941) y se realizó la observación al microscopio de fluorescencia.

**c) Inhibición de la polimerización de actina con citocalasina D.** Se realizaron cultivos de células Vero en una placa de 24 pozos. Se prepararon diluciones de citocalasina D en dimetilsulfóxido (DMSO) y DMEM a diferentes concentraciones (25 nM, 50 nM y 100 nM), las cuales fueron adicionadas a los cultivos, se incubaron por 1 hora, se retiró el tratamiento y se dio el seguimiento por 72 h.

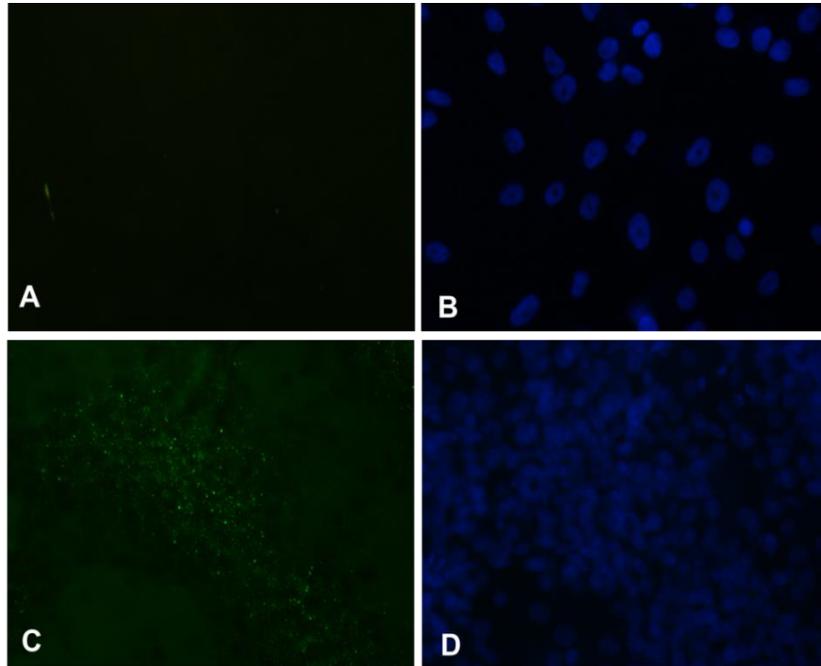
**d) Desarrollo del ciclo viral en presencia de citocalasina D.** Se realizaron cultivos de células Vero en cuatro cajas de Petri de 100 mm con 6 cubreobjetos cada una. Al alcanzar un 40% de confluencia celular, se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) BoHV-1, 200  $\mu$ L; 2) CD 100 nM, 2 mL y 3) BoHV-1, 200  $\mu$ L + CD 100 nM, 2 mL, en cajas independientes. A la cuarta caja no se le aplicó ningún tratamiento (cultivo control negativo). Se permitió que los tratamientos actuaran durante una hora, se retiraron y se sustituyeron por medio fresco. Posteriormente, se fue retirando un cubreobjetos de cada caja a las siguientes horas post-tratamiento (hpt); 1, 6, 23 y 35. Estos cubreobjetos se fijaron, se expusieron a faloidina rodaminada y se montaron sobre un portaobjetos con el medio de montaje (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-24941). Finalmente, se realizó la observación al microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS

### **1. Determinación de la presencia de BoHV-1 en células Vero mediante inmunofluorescencia indirecta.**

Con la finalidad de determinar la presencia del BoHV-1 se infectaron cultivos de células Vero con una suspensión de BoHV-1. Como primer paso, las células fueron expuestas a un anticuerpo primario dirigido al BoHV-1 posteriormente, a un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. Al final, los cubreobjetos fueron montados sobre un portaobjetos y observados al microscopio de fluorescencia. La observación de los cultivos se realizó a las 72 hpi.

Como se puede observar en la Figura 1, el cultivo no expuesto al virus (control negativo) no presentó ninguna señal fluorescente (A), mientras que el cultivo infectado evidenció la presencia de una coloración verde fluorescente que corresponde a la unión de los anticuerpos (C). A la par, se muestran las fotos de los núcleos de las mismas células evidenciados mediante la tinción con DAPI (B y D), para corroborar que existen células en ambas preparaciones. Con esto se corroboró la presencia del virus BoHV-1 en el cultivo infectado.



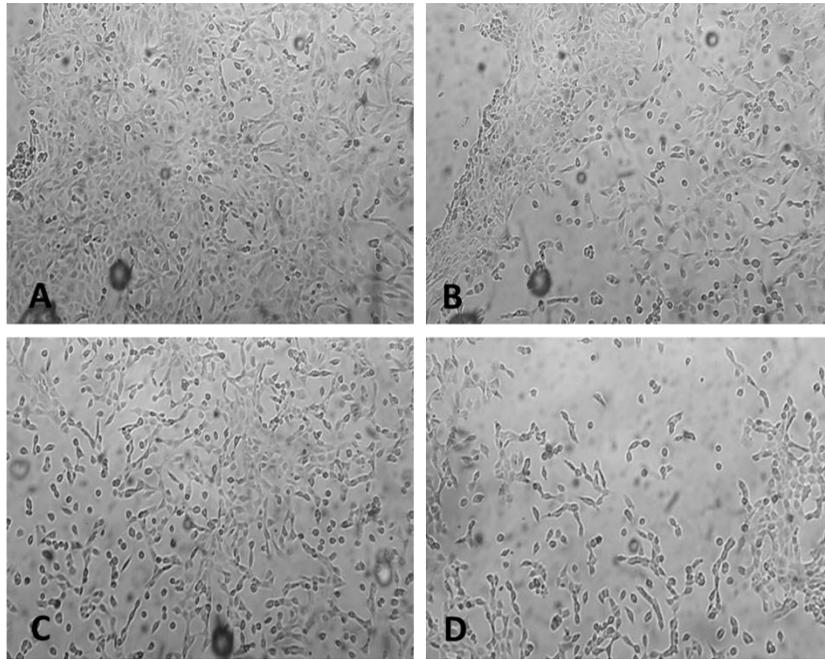
**Figura 1. Presencia de herpesvirus bovino 1 en un cultivo de células Vero mediante inmunofluorescencia. A)** Control negativo. **B)** Evidencia de núcleos pertenecientes al control negativo mediante DAPI. **C)** Células Vero infectadas con BoHV-1 y expuestas al anticuerpo fluoresceinado. **D)** Núcleos pertenecientes a las células Vero infectadas con BoHV-1 evidenciados con DAPI. Microscopio de fluorescencia, 100x.

## **2. Inhibición de la polimerización de actina con Citocalasina D a diferentes concentraciones.**

Para determinar el efecto de la citocalasina D (CD), se realizaron cultivos de células Vero en placas de 24 pozos, los cuales fueron expuestos a concentraciones crecientes de citocalasina D; 25 nM, 50 nM y 100 nM, y se permitió que actuara durante 1 hora.

El control negativo (Fig. 2-A) presenta su morfología normal correspondiente a la línea celular Vero. En el cultivo expuesto a 25 nM de CD se presentan cambios evidentes sólo en algunas partes del cultivo, como se muestra en la figura (Fig. 2-B). En los pozos en los que se aplicaron 50 nM, la mayor parte del cultivo se presenta como células separadas que adoptan una morfología redondeada y no logran asentarse en monocapa (Fig. 2-C). La concentración más alta de citocalasina

D utilizada (100 nM) parece tener un efecto más significativo en la disposición de las células debido a que se observan dispersas, redondeadas y escasas en todo el pozo (Fig. 2-D). Debido a que los efectos más significativos de la citocalasina D sobre el cultivo se encontraron con la dosis más elevada, se optó por utilizar esta concentración (100 nM) en los experimentos subsecuentes.



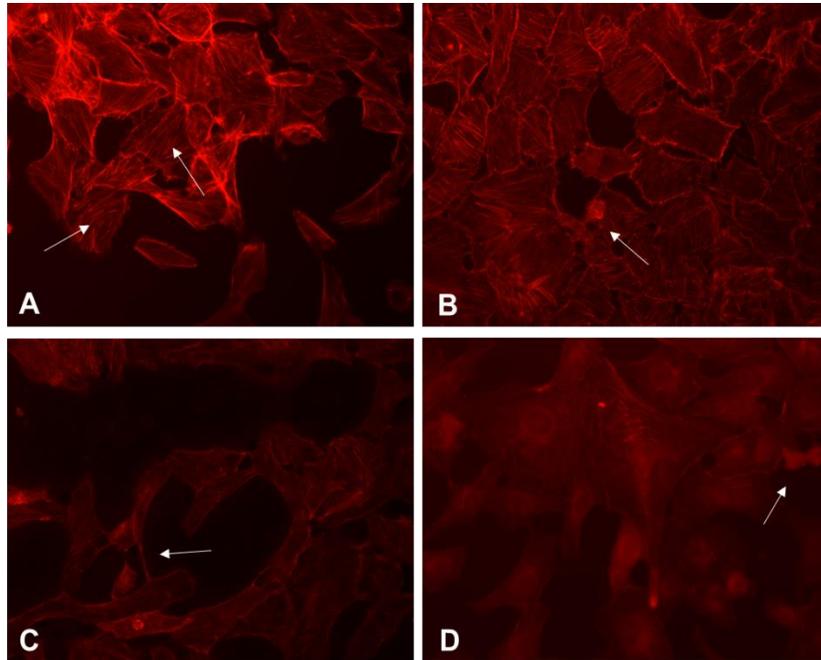
**Figura 2. Efecto de la citocalasina D (1h) sobre un cultivo de células Vero. A.** Control negativo. **B.** Citocalasina D a 25 nM. Las células permanecen estables en ciertas zonas del cultivo, se empiezan a mostrar algunas células redondeadas y dispersas. **C.** Citocalasina D a 50 nM. Se presentan más células redondeadas y dispersas, el cultivo difícilmente adopta su forma habitual. **D.** Citocalasina D a 100 nM. La mayor parte del cultivo se presenta disperso, hay abundantes células redondas y focos de células acumuladas. Microscopio invertido, 40x.

### **3. Células Vero infectadas con BoHV-1 y tratadas con Citocalasina D a diferentes horas post-infección.**

Para poder determinar el efecto de la citocalasina D sobre el ciclo viral del BoHV-1 se trataron cultivos de células Vero realizados en cubreobjetos contenidos en cajas de Petri de 100 mm; una caja con la concentración elegida de citocalasina D (100 nM) + 200 µL de suspensión viral (BoHV-1); otra caja con 200 µL de BoHV-1 y una caja más con 2 ml de CD 100 nM. El tiempo de recuperación de cubreobjetos fue la variable independiente, así, se recuperaron cubreobjetos a diferentes horas post-tratamientos (1, 6, 23 y 35 horas).

#### **1 hora post-tratamientos**

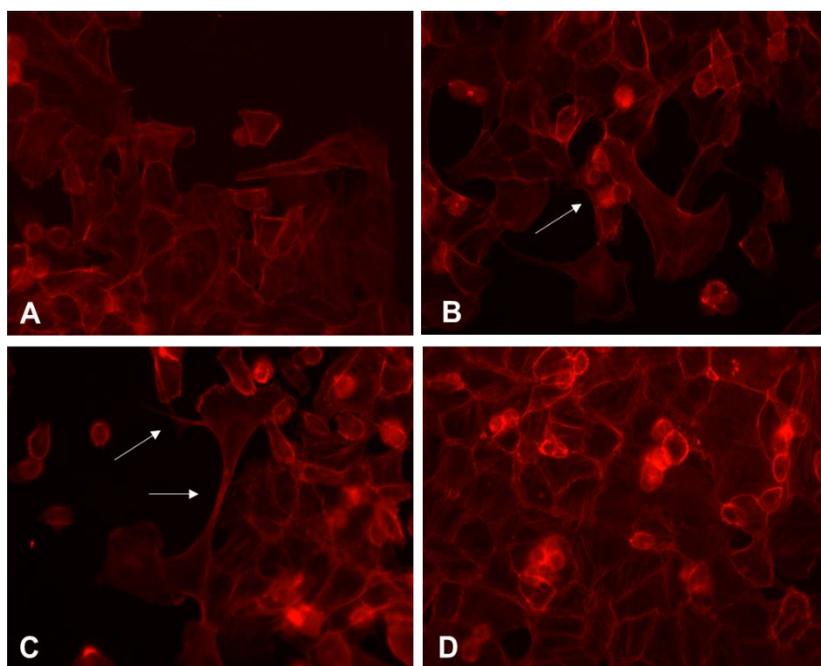
El primer grupo de preparaciones fueron recuperadas a una hora postratamientos (hpt) y se fijaron inmediatamente, posteriormente, fueron expuestos a faloidina rodaminada. Los cubreobjetos se observaron al microscopio de fluorescencia encontrándose cambios leves en los cultivos experimentales comparados con el control. Algunas células se mostraban más compactas, redondeadas y presentaban fibras de tensión con menor intensidad (Fig. 3-B) que en el grupo control (Fig. 3-A). En el cultivo con BoHV-1 (Fig. 3-C) se aprecia la formación de filopodios a lo largo de la superficie celular la cual a su vez, muestra un grosor más evidente. Hay pérdida importante de las fibras de tensión. En las células con ambos tratamientos, se presentan células escasas con cambios en su morfología, poseen menos fibras de tensión y formaciones iniciales de filopodios (Fig. 3-D).



**Figura 3. Citoesqueleto de actina de células Vero evidenciado mediante faloidina rodaminada a 1 hpt. A.** Control Negativo. El cultivo se observan con la apariencia típica de células Vero y se señalan las fibras de tensión compuestas por actina. **B.** Células Vero con Citocalasina D. Las células presentan fibras de tensión apenas visibles. **C.** Células Vero infectadas con BoHV-1. El cultivo se presenta disperso, hay células alargadas y se aprecia la formación proyecciones intercelulares. **D.** Células Vero infectadas con BoHV-1 y Citocalasina D. Se presentan células grandes, pérdida de fibras de tensión y la presencia de células redondas. Microscopio de fluorescencia, 400x.

### 6 horas post-tratamientos

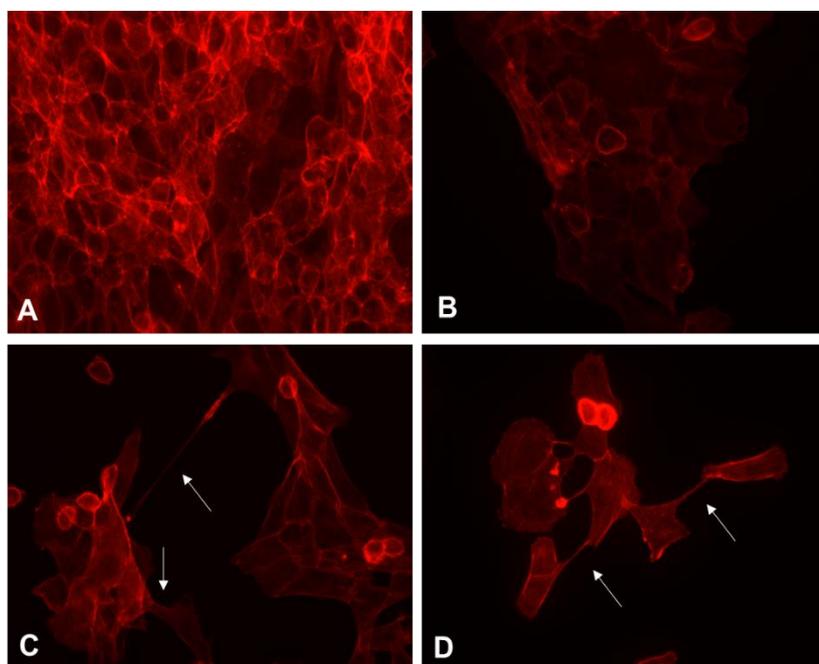
A las 6 horas post-tratamientos (Fig. 4), se presenta una mayor cantidad de células redondeadas debido a la presencia de citocalasina D (Fig. 4-B) con respecto al control. En el cultivo infectado con BoHV-1 se muestran células alargadas, persiste la formación de filopodios y se agrega la presencia de algunos lamelipodios que permiten la comunicación entre células, además de la presencia de células gigantes (Fig. 4-C). En el cultivo con ambos tratamientos (Fig. 4-D) se observa que la mayoría de las células están redondeadas, no hay proyecciones intercelulares y hay pérdida evidente de las fibras de tensión.



**Figura 4. Citoesqueleto de actina de células Vero evidenciado mediante faloidina rodaminada a las 6 hpt. A) Control Negativo. B) Células Vero con Citocalasina D.** Las células presentan una forma más compacta y pueden apreciarse más células redondeadas (marcadas). **C) Células Vero infectadas con BoHV-1.** Se observan células alargadas, existe cambio en la morfología celular y se aprecia la formación de filopodios y lamelipodios además de células gigantes y proyecciones intercelulares (marcados). **D) Células Vero infectadas con BoHV-1 y Citocalasina D.** Se aprecian bastantes células redondeadas y pérdida de fibras de tensión. Microscopio de fluorescencia, 400x.

### 23 horas post-tratamientos

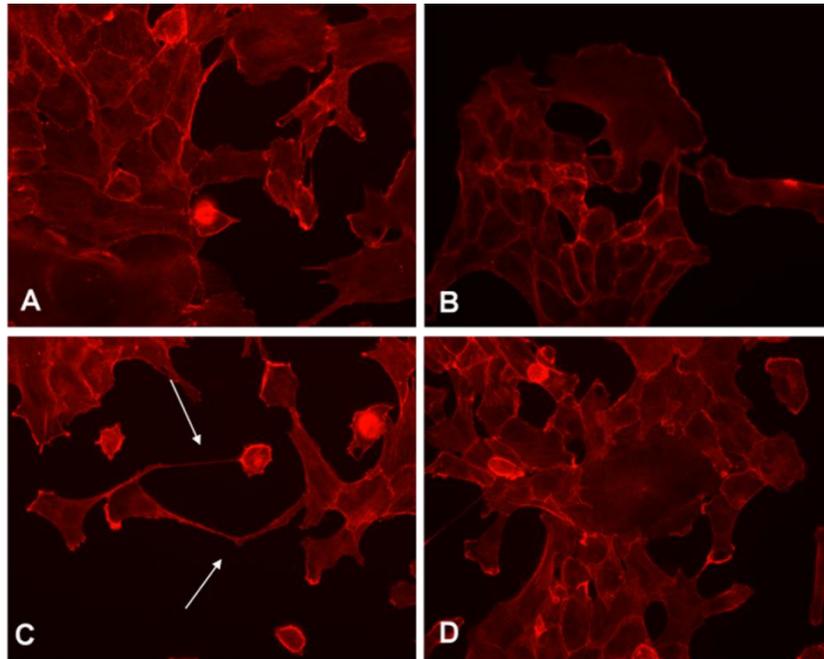
A las 23 hpi, hay cambios más aparentes como pérdida en la disposición de la membrana y por consiguiente, la morfología normal del cultivo parece perderse, (Fig. 5-B y C), a diferencia del cultivo control (Fig.5-A), donde la morfología celular se mantiene estable. En el cultivo infectado con BoHV-1 se aprecian filopodios largos que logran realizar comunicaciones intercelulares (Fig. 5-C), los cuales también se aprecian en el cultivo con ambos tratamientos pero tienen una menor longitud (Fig. 5-D) mostrándose además, algunas células dispersas y de morfología redondeada.



**Figura 5. Citoesqueleto de actina de células Vero evidenciado mediante faloidina rodaminada a las 23 hpt. A) Control Negativo.** No hay cambio aparente en el cultivo, se aprecian células con forma típica y delimitación de la membrana. **B) Células Vero con Citocalasina D.** Pueden apreciarse algunas células redondeadas (encerradas). **C) Células Vero infectadas con BoHV-1.** Existe pérdida en la morfología celular y se aprecia la formación de filopodios largos y lamelipodios (marcados). **D) Células Vero infectadas con BoHV-1 y Citocalasina D.** Se aprecian pocas células redondas, pérdida de fibras de tensión y la presencia comunicaciones intercelulares más cortas que en el cultivo infectado con BoHV-1. Microscopio de fluorescencia, 400x.

### **35 horas post-tratamientos**

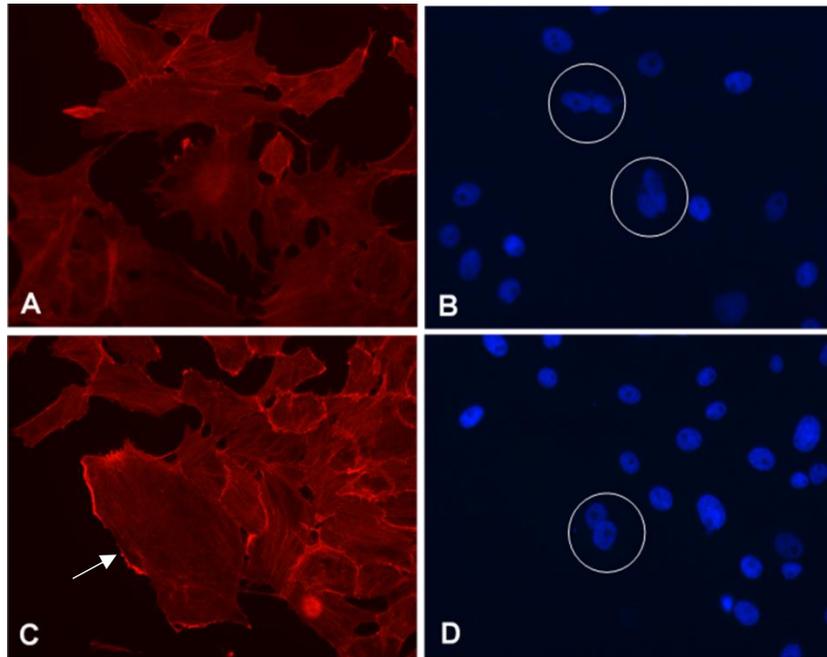
A las 35 horas con los tratamientos en el cultivo, la citocalasina D presenta una disminución importante de sus efectos (Fig. 6-B), sugerentemente por la utilización de monómeros libres por parte de la célula, con lo que el cultivo se asemeja considerablemente al cultivo control, con la excepción de la presencia de algunas células gigantes sugerentes de sincitios que al ser analizadas con la tinción DAPI se corroboró que no correspondían a sincitios. Hay menos fibras de tensión que en el cultivo control y algunas células presentan un incremento en su tamaño. Las proyecciones intercelulares largas permanecen en el cultivo infectado (Fig. 6-C) y se presentan pocas células por campo (lo que puede deberse al desprendimiento celular). En el cultivo con ambos tratamientos (Fig. 6-D) existen células gigantes, formación escasa de filopodios, lamelipodios y un cambio en la morfología celular.



**Figura 6. Citoesqueleto de actina de células Vero evidenciado mediante faloidina rodamina a las 35 hpt. A) Control Negativo.** Las células comienzan a perder morfología habitual, pero el cultivo se presenta estable. **B) Células Vero con Citocalasina D.** Existen menos células redondas por campo, el cultivo se asemeja al grupo control, hay presencia de células gigantes. **C) Células Vero infectadas con BoHV-1.** Existe pérdida en la morfología celular, se presentan pocas células por campo y existen células con proyecciones intercelulares muy largas, así como filopodios y lamelipodios. **D) Células Vero infectadas con BoHV-1 y Citocalasina D.** Se aprecian células gigantes, formación de filopodios y cambio en la estructura de la membrana celular. Microscopio de fluorescencia, 400x.

### Presencia de Sincitios

A las 35 hpt se detectó la presencia de sincitios (Fig. 7), que corresponden a células gigantes encontradas en el cultivo infectado (Fig. 7-A) y en el infectado + CD (Fig. 7-C). Sin embargo, en el cultivo infectado con BoHV-1 (Fig. 7-A) las proyecciones son más prominentes, además de la presencia de más sincitios por campo (Fig. 7-B) comparado con el cultivo con BoHV-1 + CD donde las células presentan menos filopodios, de menor longitud, y sólo un sincitio por campo (Fig. 7-D). En ambos cultivos se aprecian células con apariencia rugosa, persiste la presencia de filopodios, y se presentan células con fibras de tensión (Fig. 7-A y C).



**Figura 7. Presencia de sincitios.** **A) Células Vero infectadas con BoHV-1.** Se aprecian células con apariencia rugosa y proyecciones en la membrana además de filopodios. **B)** Mismo campo óptico que en A, con los núcleos teñidos con DAPI se hace evidente la presencia de sincitios (encerrados). **C) Células Vero infectadas con BoHV-1 y tratadas con CD.** Se aprecian algunas células parecidas al control negativo, con morfología normal y pocas fibras de tensión, sin embargo sobresale la presencia de una célula gigante (marcada). **D)** Mismo campo óptico que en C, con los núcleos teñidos con DAPI se corrobora que la célula gigante corresponde con la formación de un sincitio (encerrado). Microscopio de fluorescencia, 200x.

## DISCUSIÓN

El aislado viral utilizado en este trabajo proviene de una muestra de cotiledones, post-aborto de un bovino que presentaba signología respiratoria. Dicha muestra fue procesada para obtener un filtrado que se identificó mediante microscopía electrónica como BoHV-1, debido a sus dimensiones, morfología icosaédrica y la presencia de un material denso que podría corresponder al tegumento (Sánchez y Ruíz, 2012). En el presente trabajo se realizó la identificación específica del BoHV-1 (Fig.1) mediante inmunofluorescencia indirecta (Delgado *et al.*, 2005).

Tal como se muestra en este trabajo se conocía anteriormente la capacidad del BoHV-1 para inducir re-arreglos del citoesqueleto de actina en células Vero (Fig. 4-C, 5-C y 6-C) con la finalidad de establecer comunicaciones intercelulares necesarias para realizar la infección completa del cultivo (Favoreel, 2005; Sánchez y Ruiz, 2012; Ladelfa *et al.*, 2011). Estas interacciones virales ya han sido reportadas en otros Herpesvirus, por ejemplo, Ladelfa *et al.*, (2011) y por Favoreel *et al.*, (2005) con el Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) donde se determinó que la proteína US3 es la responsable de la reorganización de los microfilamentos, así como por Melamed *et al.*, 1994 con el virus de Epstein- Barr, que realiza estos re-arreglos del citoesqueleto a las 6 hpi. Favoreel (2005), explica la presencia de filopodios como un medio importante de infección mediante la fusión de la membrana plasmática de una célula infectada con la de otra célula adyacente no infectada (propagación intercelular), dando como resultado la formación, en primer lugar, de puentes intercelulares y, posteriormente, de grandes sincitios.

Las concentraciones de citocalasina D utilizadas en este experimento comparadas con las utilizadas por Yahara *et al.* (1982) y Schliwa (1982), que van desde 0.5 – hasta 2  $\mu\text{M}$  y a partir de las cuales se disuelven las fibras de tensión, corroboran que estos procesos desestabilizadores ocurren inclusive con dosis reducidas de CD (desde 25 y hasta 100 nM) (Fig. 2), contrario a lo que indica Miranda, (1974), para el caso específico de células Vero, donde marca una respuesta desde 200 nM de CD.

Los resultados de este trabajo, muestran que la citocalasina D interviene en la formación de filopodios y proyecciones intercelulares antes de las 23 horas post tratamiento (Fig. 4-D), lo que concuerda con lo mostrado por Dixit *et al.*, (2008), donde inhibieron la formación de filopodios en la superficie celular inducidos por el virus del Herpes simple (HSV-1) mediante concentraciones  $> 0.37 \mu\text{M}$  de CD, esto puede ser debido a que los filamentos de actina son requeridos en estadios **tempranos** de infección como indica Słońska *et al.*, (2014) donde corroboraron, mediante microscopía confocal, que la aplicación de CD hasta las 24 h tuvo pocas limitaciones en el ciclo de replicación del Herpesvirus equino 1 (EHV-1). Esto puede deberse a la nueva formación de polímeros de actina debido a la unión de monómeros libres mediada por proteínas asociadas a la actina (Alberts, 2002) o bien, a la utilización de otros componentes del citoesqueleto por parte del virus (Słońska *et al.*, 2014). Como lo indican Favoreel (2005) y Sánchez y Ruiz (2012), la aparición de sincitios y células gigantes en el cultivo infectado con un herpesvirus es inminente, aunque, con el agregado de CD, se puede observar que la formación de estos sincitios es menor (Fig. 7-D).

La citocalasina D inhibe la utilización temprana del citoesqueleto de actina por parte del BoHV-1 en células Vero, evitando la formación de filopodios y proyecciones intercelulares dando como resultado el retraso de la propagación del virus en el cultivo y, por lo que, el ciclo viral se desarrolla en un tiempo mayor, como lo muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

## CONCLUSIONES

- En cultivos de células Vero el BoHV-1 induce la formación de proyecciones intercelulares desde la primer hora post infección.
- La inhibición de la polimerización de actina en células Vero puede llevarse a cabo con concentraciones mínimas de CD (25 nM), obteniendo efectos consistentes a partir de 100 nM.
- Los efectos de la CD sobre células Vero después de una hora de tratamiento son: redondeamiento celular, pérdida de morfología celular, desprendimiento celular y formación de agrupaciones celulares.
- Antes de las 23 h post-tratamientos, la CD inhibe la formación de filopodios y proyecciones intercelulares en células infectadas con BoHV-1.
- A las 35 h posteriores al tratamiento con CD, su efecto parece disminuir y provoca que los cultivos de células Vero infectadas con BoHV-1 se asemejen al control negativo.
- Al evitar la formación temprana de filopodios y proyecciones intercelulares, la citocalasina D retrasa y disminuye la aparición de sincitios en células Vero infectadas con BoHV-1.

## REFERENCIAS

1. Abad-Zavaleta, J., Ríos-Utrera, A., Rosete-Fernández, J. V., García-Camacho, A., & Zárate-Martínez, J. P. (2016). **Prevalencia de rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la Zona Centro de Veracruz.** *Nova scientia*, 8(16), 213-227.
2. Alberts, B. (2002). **Molecular Biology of the Cell:** Hauptbd. Garland.
3. Arboleda, J. J., Rodas, J. D., Ossa, J. E., & Zuluaga, F. N. (2016). Espectro clínico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina: Generalidades. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 3-13.
4. Bennett, R. M., et al (1999). Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 66(3), 455-459.
5. Blanchoin Laurent, Boujemaa-Paterski Rajaa, Sykes Cécile, Plastino Julie. (2013). **Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility.** *Physiol Rev.* 2014 Jan; 94(1): 235–263. doi:10.1152/physrev.00018.2013
6. Brenner, S. L., & Korn, E. D. (1979). **Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit actin polymerization.** Additional evidence for an F-actin treadmill. *Journal of Biological Chemistry*, 254(20), 9982-9985
7. Brown, S. S., & Spudich, J. A. (1981). **Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends.** *The Journal of cell biology*, 88(3), 487-491.
8. Cárdenas Monroy, C., González Andrade, M., Guevara Flores, A., Lemus, L., & Matuz Mares, D. (2016). **El citoesqueleto de actina: Una estructura dinámica al servicio de la transducción de señales.** *Mensaje Bioquímico*, 40.
9. Cole, N. L., & Grose, C. (2003). **Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus.** *Reviews in medical virology*, 13(4), 207-222.
10. Cooper, J. A. (1987). **Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.** *The Journal of cell biology*, 105(4), 1473-1478.

11. Crandell, R. (1977). **Diagnóstico de la rinotraqueitis infecciosa bovina.** *Control de enfermedades de los animales en las Américas. Washington DC OPS. Publicación científica, 358, 127-131.*
12. Cudmore, S., Reckmann, I., & Way, M. (1997). **Viral manipulations of the actin cytoskeleton.** *Trends in microbiology, 5(4), 142-148.*
13. Delgado, I. D., Valle, M. B., Barrero, N. R., Miranda, L. S., Elvira, S. M., & Carrasco, A. C. (2005). Utilización de estuches de diagnóstico de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas para la determinación de parainfluenza 3 bovina y herpesvirus bovino 1 en Cuba. *Veterinaria México, 36(3), 295-302.*
14. Dennett, D. P., Barasa, J. O., & Johnson, R. H. (1976). **Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle.** *Research in veterinary science, 20(1), 77-83.*
15. Dinter Z., Morein B. (1990). **Virus Infections of Ruminants.** Department of Veterinary Microbiology, Section of Virology, Swedish University of Agricultural Sciences, Biomedical Center, Uppsala, Sweden. Elsevier. Pp. 69 – 79.
16. Dixit, R., Tiwari, V., & Shukla, D. (2008). Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread. *Neuroscience letters, 440(2), 113-118.*
17. Döhner, K., Nagel, C. H., & Sodeik, B. (2005). **Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins.** *Trends in microbiology, 13(7), 320-327.*
18. Espinasse, J. (1980). **Puntualización sobre la rinotraqueítis de los bovinos (IBR-IVP).** *Gaceta Veterinaria*
19. Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., & Nauwynck, H. J. (2005). **Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(25), 8990-8995.*
20. Fenner, B., Bachman, P., Gibbs, P., Murphy, F., Studdert, M., & White, D. (1995). **Herpesvirus.** *Acribia. Zaragoza.*

21. Flanagan, M. D., & Lin, S. (1980). **Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin.** *Journal of Biological Chemistry*, 255(3), 835-838.
22. Frischknecht, F., & Way, M. (2001). **Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization.** *Trends in cell biology*, 11(1), 30-38.
23. Goddette, D. W., & Frieden, C. (1986). Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), 15974-15980.
24. González Malerva, Laura & Hernández Ambrosio, Javier. (2003). **El citoesqueleto.** *Ciencias*, (070).
25. Hess, R. T., Goldsmith, P. A., & Volkman, L. E. (1989). **Effect of cytochalasin D on cell morphology and AcMNPV replication in a *Spodoptera frugiperda* cell line.** *Journal of invertebrate pathology*, 53(2), 169-182.
26. Hurk *et al*, (1993). **Bovine herpesvirus-1 vaccines.** *Immunology and cell biology*, 71(5), 405-420.
27. Jiménez, L. F., & Merchant, H. (2003). **Biología celular y molecular.** Pearson educación.
28. Johnson, D. C., Webb, M., Wisner, T. W., & Brunetti, C. (2001). **Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread.** *Journal of virology*, 75(2), 821-833.
29. Jones, C.; et al. (2006). **Functional analysis bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency.** *Vet. Microbiol.* 113 (3-4): 199 – 210.
30. Kahrs, R. F. (1977). **Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171(10), 1055-1064
31. Kaiser, C. A., Krieger, M., Lodish, H., & Berk, A. (2007). **Molecular cell biology.** WH Freeman.
32. Ladelfa, M. F., Kotsias, F., Zajac, M. P. D. M., Van den Broeke, C., Favoreel, H., Romera, S. A., & Calamante, G. (2011). **Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis.** *Veterinary microbiology*, 153(3-4), 361-366.
33. Lyman, M. G., & Enquist, L. W. (2009). **Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton.** *Journal of virology*, 83(5), 2058-2066.

34. Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2010). **Fenner's veterinary virology**. Academic press.
35. Matthews, J. D., Morgan, R., Sleighter, C., & Frey, T. K. (2013). **Do viruses require the cytoskeleton?** *Virology journal*, 10(1), 121.
36. Mayr, A., & Büttner, M. (1990). **Virus infections of ruminants**.
37. Melamed, I., Stein, L., & Roifman, C. M. (1994). **Epstein-Barr virus induces actin polymerization in human B cells**. *The Journal of Immunology*, 153(5), 1998-2003.
38. Mendoza S. E., *et al.* (2009). **Manual de Diagnóstico Viroológico**. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México. Primera Edición. Comité Editorial. 20 -35 Pp.
39. Merchant, I. A., & Packer, R. A. (1970). **Bacteriología y virología veterinaria** (No. 636.089 M47Y 1967).
40. Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., & Granzow, H. (2009). **Herpesvirus assembly: an update**. *Virus research*, 143(2), 222-234.
41. Miranda, A. F., Godman, G. C., Deitch, A. D., & Tanenbaum, S. W. (1974). Action of cytochalasin D on cells of established lines: I. Early events. *The Journal of cell biology*, 61(2), 481-500.
42. Mohanty, S. B. & Dutta, S. K. (1988). **Virología Veterinaria**. Interamericana.
43. Morgan, S. J. & Darling, D. C. (1995). **Cultivo de células animales** (No. Sirsi i9788420007779).
44. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). **Veterinary virology**. Elsevier.
45. Nakanishi, H., & Takai, Y. (2004). **Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization**. *Biological chemistry*, 385(10), 885-892.
46. Ornelles, D. A., Fey, E. G., & Penman, S. (1986). **Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis**. *Molecular and cellular biology*, 6(5), 1650-1662.
47. Pérez, S. ; *et al.* (2005): **Latency – related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves**. *J. Clin. Microbiol.* 43 (1): 393 – 401.

48. Radtke, K., Döhner, K., & Sodeik, B. (2006). **Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell.** *Cellular microbiology*, 8(3), 387-400.
49. Rampal, A. L., Pinkofsky, H. B., & Jung, C. Y. (1980). **Structure of cytochalasins and citocalasina B binding sites in human erythrocyte membranes.** *Biochemistry*, 19(4), 679-683.
50. Reed, D. E., Bicknell, E. J., & Bury, R. J. (1973). **Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
51. Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., Fujita, N., & Takai, Y. (2007). **The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors.** *Current opinion in cell biology*, 19(5), 593-602.
52. Sánchez y Ruíz, 2012. **Identificación y características de crecimiento *in vitro* de una cepa del virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) aislada en campo.** Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. México.
53. Schliwa, M. (1982). **Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks.** *The Journal of cell biology*, 92(1), 79-91.
54. Schliwa, M., & Woehlke, G. (2003). **Molecular motors.** *Nature*, 422(6933), 759-765.
55. Słóńska, A., Cymerys, J., Godlewski, M. M., Dzieciatkowski, T., Tucholska, A., Chmielewska, A. & Bańbura, M. W. (2014). **Equine herpesvirus type 1 (EHV-1)-induced rearrangements of actin filaments in productively infected primary murine neurons.** *Archives of virology*, 159 (6), 1341-1349.
56. Sossa, C., Flórez, L., & Arango, H. (1982). **Estudio serológico de la RIB en hatos lecheros del Altiplano Norte y del Oriente de Antioquia.** *Trabajo de grado Medicina Veterinaria. Universidad de Antioquia.*
57. Spear, P. G., & Longnecker, R. (2003). **Herpesvirus entry: an update.** *Journal of virology*, 77(19), 10179-10185.
58. Thiry, J., Tempesta, M., Camero, M., Tarsitano, E., Bellacicco, A. L., Thiry, E., & Buonavoglia, C. (2006). **A live attenuated glycoprotein E negative bovine**

- herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats.** *Veterinary microbiology*, 113(3-4), 303-308.
59. Tikoo, S. K., Campos, M., & Babiuk, L. A. (1995). **Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1)** (Biology, Pathogenesis, and Control. In *Advances in virus research* (Vol. 45, pp. 191-223). Academic Press.
60. Van Engelenburg, F. A. C., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. M., Van den Burg, L., Moerman, A., Gielkens, A. L. J., & Van Oirschot, J. T. (1994). **A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves.** *Journal of General Virology*, 75(9), 2311-2318.
61. Vázquez-Victorio, G., González-Espinosa, C., Espinosa-Riquer, Z. P., & Macias-Silva, M. (2016). **GPCRs and actin–cytoskeleton dynamics.** In *Methods in cell biology* (Vol. 132, pp. 165-188). Academic Press.
62. Vera, V., & Betancur, C. (2008). **Aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 en bovinos del departamento de Córdoba-Colombia.** *Revista MVZ Córdoba*.
63. Witte, K. H., Hannemann, P., Dopatka, H. D., & Giesendorf, B. (1989). **Technical improvements of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1.** *Medical microbiology and immunology*, 178(1), 9-20.
64. Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K., & Natori, S. (1982). **Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin *in vitro*.** *The Journal of Cell Biology*, 92(1), 69-78.