



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EXPRESION DE ACTINA FLUORESCENTE EN CELULAS
TRANSFECTADAS Y SU DISTRIBUCION EN EL CITOPLASMA.

PALABRAS CLAVE: GFP, CITOESQUELETO DE ACTINA,
TRANSFECCION, VIRUS DENGUE.

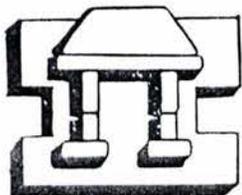
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ZAMUDIO MEZA HORACIO



IZTACALA

ASESORA: DRA. ISAURA MEZA GOMEZ-PALACIOS

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX.

2002



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.

Dedico esta tesis con todo mi amor y respeto a:

A mi madre, **Margarita Maza Pulido** ya que fue la fuente de inspiración para mantenerme en esta rumbo y porque siempre ha respetado mis decisiones y a estado ahí cuando la necesito, simplemente gracias por ser mi madre.

A mi padre, **Trinidad Zamudio Martínez**, quien siempre me ha apoyado en todo lo que hago y me ha enseñado lo importante de la vida y que siempre hay que hacer todo lo posible por alcanzar lo que se desea, igualmente gracias por permitirme ser tu hijo.

A mis hermanos **Victoria, Eva, José Guadalupe, Carolina, Gisela y Leticia**, por todo lo que cada uno es y por todo lo que he aprendido de cada uno de ellos, por su paciencia y confianza.

Gracias a toda Mi familia y espero no defraudarlos.



El presente estudio se llevo a cabo en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), bajo la asesoría de la Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio.

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesora, la **Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio**, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por todo su apoyo para la realización de esta tesis.

A la **Dra. Rebeca Manning Cela**, por todo el apoyo recibido durante mi estancia en su laboratorio, así como todos sus atinados comentarios que fueron de mucha utilidad durante la realización de la tesis.

Al **Dr. Dodanim Talavera A.** Por todo su apoyo teórico y de manejo de los cultivos celulares, así como por todos sus consejos y su amistad.

A los compañeros del laboratorio de la **Dra. Rebeca Manning**, por todo su apoyo y paciencia.

Al laboratorio de la **Dra. Estrada**, por su apoyo el uso del microscopio invertido de fluorescencia.

A la **QFB Claudia Márquez**, por su apoyo en el laboratorio y su amistad.

A la **QFB Maria del Carmen Domínguez R.** Por su apoyo en el manejo de los cultivos celulares y sus comentarios.

A la **Biol. Elizabeth Franco** por su apoyo y sus comentarios.

A **Alejandro Trejo** por sus apoyo técnico y por su amistad.

Al **Sr. Isaías Carrasco**, por su apoyo técnico y su amistad.

A todos mis compañeros de la carrera y muy en especial a **Montserrat, Mauricio, Sergio, Jorge, Isidro, Julio y David.**

A todos mis compañeros de laboratorio de los cuales aprendí demasiado.



INDICE.

I. RESUMEN.

II. LISTA DE FIGURAS. **IZT.**

III. INTRODUCCIÓN.	1
3.1 Problemática.	1
3.2. Generalidades.	2
3.3. El citoesqueleto.	3
3.3.1. Actina.	4
3.3.2. Formas de estudio.	5
3.4. Proteína Verde Fluorescente.	7
3.5. Línea celular MDCK.	9
IV. ANTECEDENTES.	10
4.1. Generales.	10
4.2. Particulares.	12
V. JUSTIFICACION.	16
VI. OBJETIVOS.	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
Materiales.	17
Preparación de células competentes (Ca ⁺⁺).	17
Transformación.	18
Obtención y Extracción del ADN Plasmídico.	18
Cultivos celulares.	20
Transfección de células MDCK.	21
Clonación de expresiones estables.	22
Fijación de células.	23



Tinción directa de F-actina.....	23
Inmunotinciones.....	23
Células transfectadas tratadas con citocalacina D.....	24
Infección de células MDCK con el virus del Dengue serotipo 2 (DV-2).....	24
Cinética de infección con VD-2 en células MDCK expresando la EGFP-actina en etapas tempranas.....	24
Procesamiento de imágenes.....	25
Colocalización.....	25
VIII. RESULTADOS.....	27
Vectores de expresión.....	27
Expresión de actina fluorescente en células MDCK.....	33
Distribución de la EGFP-actina, en células MDCK.....	36
Organización del citoesqueleto de actina en células transfectadas MDCK.....	40
Infección de células MDCK, con el virus dengue 2 (VD-2).....	42
Organización del citoesqueleto de actina en células MDCK transfectadas e infectadas con VD-2.....	43
Cambios en la organización del citoesqueleto de actina durante la infección de células MDCK en etapas tempranas.....	49
IX. DISCUSIÓN.....	54
X. CONCLUSIONES.....	59
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	60
XII. APÉDICE.....	64



I. RESUMEN.

Algunos virus que infectan células epiteliales inducen cambios morfológicos que se correlacionan con alteraciones funcionales como la permeabilidad. Se sabe que dichos cambios están asociados con una reorganización de algunos componentes del citoesqueleto. En Dengue Hemorrágico, causado por infección con el virus del Dengue, se observa un drástico incremento de la permeabilidad endotelial. La permeabilidad endotelial puede ser modificada por distintos factores que alteran la organización del citoesqueleto de actina, aunque se desconoce si el virus Dengue puede inducir directamente alteraciones en la permeabilidad celular afectando la organización del citoesqueleto. Para estudiar las modificaciones en la organización de actina causadas por la infección con el virus, células epiteliales MDCK se transfectoraron para expresar la proteína verde fluorescente unida a β -actina (EGFP-actina). En estas células se ha establecido claramente la regulación de la permeabilidad por el citoesqueleto de actina y es un sistema favorable a la transfección y expresión de proteínas exógenas. Este es el primer reporte de infección productiva en células epiteliales por virus del Dengue-2 (VD-2). Se utilizaron los vectores de expresión pEGFP-actin y p(EYFP-actin)⁻ (mock) seleccionando con G-418. La subclona C1-4 y células del control mock se infectaron con el DV-2 a una MOI de 1.0 a distintos tiempos y se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia e inmunotinciones de la proteína E viral y β -tubulina. La organización de la F-actina se analizó con Faloidina-rodamina. La actina fluorescente expresada en las células MDCK, se comportó de forma similar a la actina endógena en los análisis de colocalización y al tratar con citocalasina D. Al interactuar con el VD-2, se observó que a los 30min de interacción virus-célula se presenta una reorganización de los filamentos de actina. Después de 48hrs post-infección se observaron estructuras tubulares de actina en el citoplasma de células sub-confluentes. En células confluentes los filamentos de actina se desorganizaron y los microtúbulos mostraron una condensación marcada alrededor del núcleo. Estas alteraciones son causadas directamente por la infección ya que no se presentaron en células control no infectadas. El uso de sondas fluorescentes en células que las expresan de forma permanente para analizar cambios en la dinámica del citoesqueleto, abre numerosas posibilidades para estudiar y entender los mecanismos de invasión de agentes infecciosos.



II. LISTA DE FIGURAS.

Esquema de transfección de células MDCK por Ca-Pi.....	26
Figura 1. Gel de agarosa del vector pEGFP-Actin.....	27
Figura 2. Análisis de restricción del ADN del Vector pEGFP-Actin purificado por CsCl.....	28
Figura 3. Doble digestión del vector pEYFP-Actin, con las enzimas de restricción <i>Bam</i> H I y <i>Pst</i> I que reconocen un solo sitio de corte.....	29
Figura 4. Análisis de restricción con la enzima <i>Avr</i> II, del ADN extraído por STETprep de las clonas transformadas con el fragmento religado de 4162pb para obtener el control mock.	30
Figura 5. Análisis comparativo del vector construido p(EYFP-actin) ⁻ de 4162pb y del vector pEGFP-Actin de 5820pb, ambos purificados por CsCl.....	31
Figura 6. Análisis del patrón de restricción de los vectores pEGFP-Actin y p(EYFP-Actin) ⁻	31
Figura 7. Eficiencia de transfección en las células MDCK por Ca-Pi.....	33
Figura 8. Expresión de la proteína verde fluorescente unida a β -actina (EGFP-actina), en células MDCK transfectadas por Ca-Pi.	34
Figura 9. Células MDCK transfectadas con el vector p(EYFP-actin) ⁻ del control mock creciendo en presencia de G-418.	35
Figura 10. Células MDCK, expresando la EGFP-actina, clonadas por dilución.	36
Figura 11. Distribución de la EGFP-actina en células MDCK.	37
Figura. 12. Distribución de actina en células MDCK expresando la EGFP-actina y marcadas con faloidina- Rodamina.....	39
Figura. 13. Organización del citoesqueleto de actina en células MDCK transfectadas y tratadas con Citocalacina D (4 μ g/ml).....	41



Figura 14. Tinción indirecta de la proteína E del virus del Dengue en células MDCK a las 12hrs, 24hrs y 48hrs post infección.	43
Figura 15. Células MDCK mock, infectadas con VD-2, después de 48hrs.	44
Figura 16. Células MDCK expresando la EGFP-actina infectadas con el VD-2 después de 48hrs en las monocapas confluentes.	46
Figura 17. Células MDCK expresando la EGFP-actina, después de 48hrs infectadas con el VD-2 en monocapas sub-confluentes.	46
Figura 18. Tinción indirecta de β -tubulina total, en células MDCK mock, después de 48hrs post infección con el VD-2.	47
Figura 19. Tinción indirecta β -tubulina total de células MDCK mock, infectadas con el VD-2 después de 48hrs.	48
Figura 20. Tinción indirecta de la proteína E del VD-2 en células MDCK infectadas a las 2hrs y 3hrs.	49
Figura 21. Tinción directa de F-actina con faloidina en células MDCK del control mock, infectadas con el VD-2 a las 2hrs y 3hrs.	50
Figura 22. Células MDCK expresando la EGFP-actina, infectadas con el VD-2 en las primeras etapas de interacción.	53



III. INTRODUCCIÓN.

3.1. Problemática.

El organismo humano presenta distintos mecanismos de defensa como respuesta a la interacción con agentes patógenos entre los cuales se encuentran las bacterias, hongos, protistas y por entidades virales. Estos últimos son de una importancia particular dado que hasta ahora no se conocen bien sus mecanismos de infección, así como los efectos que causan al infectar células. Los mecanismos de defensa son los encargados de combatir a las agentes extraños, por medio de una compleja red de sistemas que se relacionan entre sí, como la fagocitosis celular y el sistema inmune. Estos mecanismos en primera instancia bloquean la entrada de los microorganismos al organismo invadido (Donald, 1995).

Los virus pueden evadir muchos de los mecanismos de defensa y al encontrarse dentro, afectan a las células de diferentes formas. Pueden cambiar la estructura y la función de la célula. Por ejemplo, pueden hacer que las células infectadas se aglutinen, cambien de forma y se desprendan. También interfieren con la producción de enzimas y de otras sustancias químicas dentro de las células. Los virus pueden afectar la permeabilidad de la célula cambiando el movimiento normal de sustancias hacia el interior y el exterior del citoplasma y finalmente pueden causar la lisis, liberando así a otros virus. Cuando no esta dentro de la célula, un virus no puede llevar acabo los procesos de replicación y aparece como partícula inerte.

A pesar de que los virus comparten muchas características son muy diferentes en cuanto a forma y tamaño. En cada clase de virus las proteínas de la envoltura tienen una constitución diferente. La forma de la cápside y el tamaño, son otros rasgos que se usan para la clasificación. Al clasificar a los virus, se tiene en cuenta si infectan a plantas, animales o bacterias siendo específicos en cuanto a la célula blanco (Alexander, *et al*, 1992).

La enfermedad del Dengue, causada por el virus del Dengue, es una de las enfermedades virales de etiología más importante, el virus es transmitido al hombre por medio la hembra hematófaga del mosquito del género *Aedes*, la cual es utilizada como vector. Tanto la incidencia como la prevalencia de la enfermedad se han incrementado en México, con un aumento de la tasa de morbilidad y mortalidad. En el periodo comprendido entre 1984 a 1993 solamente se reportaron 26 casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue (DHF), en cambio en 1994, esta forma de la enfermedad ocurrió en 30 y 40 pacientes; casos que fueron confirmados por estudios de laboratorio y con una letalidad de 23.3 %. Para 1995 se registraron ya 539 casos. La aparición de los casos severos se extiende a lo largo del territorio nacional, y en 1995, 20 entidades federativas registraron al menos un caso de DHF, comparados con los nueve estados que reportaron casos esporádicos durante el periodo de 1984-1993.

Los 539 casos de DHF han sido confirmados según los criterios de la OMS-OPS, y cumplen con la presencia de trombocitopenia y hemoconcentración. Solo en 110 de



ellos se logró la confirmación diagnóstica por análisis de ELISA (IgM, IgG). De los 539 casos se registró un total de 29 defunciones (letalidad de 5.4%), nivel superior al reportado en otros países (1%). Actualmente nuestro país reúne las condiciones que hacen factible la aparición de un gran número de casos de la forma hemorrágica de la enfermedad (Rigau-Peréz, *et al*, 1998; Gómez *et al*, 1999).

Cuando el virus ingresa al hospedero el paciente puede permanecer asintomático o presentar las distintas formas clínicas, de la enfermedad. En casos donde se presenta DHF, la pérdida de volumen sanguíneo es principalmente debida a un drástico y sostenido incremento de la permeabilidad vascular sin aparente destrucción de células endoteliales. Se ha propuesto un mecanismo alternativo que explicará el incremento en la permeabilidad vascular por participación de proteínas como miosina y los filamentos de actina provocando la contracción del anillo de actina en las células endoteliales y la disrupción de las uniones intercelulares (Mitic y Anderson, 1998).

Hasta el momento no se conoce con exactitud la causa del aumento tan drástico en la permeabilidad vascular y de las hemorragias en múltiples tejidos en los pacientes. Se ha demostrado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, que algunas citocinas, son secretadas como respuesta a la infección, sin embargo en todos los procesos infecciosos e inflamatorios estas citocinas son liberadas y no en todos los casos ocurre un drástico y sostenido incremento en la permeabilidad vascular, ni hemorragias múltiples. (Kurane, 1994)

3.2. Generalidades.

La célula es definida como la unidad fundamental y estructural de los organismos vivos, en organismos pluricelulares hay una estrecha comunicación entre las células vecinas, ya que se requiere de varias células para el funcionamiento armónico de un órgano en particular. En la célula están contenidos una serie de sistemas altamente organizados que llevan acabo distintas actividades como el almacenamiento, el transporte de información tanto a través de moléculas como de iones, síntesis de moléculas, movimiento y respuesta a las fluctuaciones ambientales por medio de alteraciones internas así como de reacciones químicas (Wolfe, 1993).

El complejo de sistemas membranales en las células eucariotas define los límites de las estructuras inmersas en el citoplasma, teniendo un núcleo bien definido en donde se encuentra el material genético. La mayoría de las células presentan una variedad de estructuras internas elaboradas y complejas conocidas como organelos, esto plantea la necesidad de tener otras estructuras que mantengan el control de los movimientos de los diferentes organelos. Todas las células tienen un esqueleto interno llamado "citoesqueleto", este se encarga de mantener la forma celular, el movimiento interno para mantener los organelos y el transporte dentro de las células, además se encarga del movimiento externo de las células o la locomoción (Alberts, *et al*, 1993).



Las células pueden variar de tamaño, de volumen y forma; esta última depende de varios factores como son las características del contenido celular, el citoesqueleto, la tensión superficial, la presión de estructuras vecinas, además del estado funcional (Revilla *et al*, 1986).

3.3. Citoesqueleto.

El citoesqueleto es un sistema fibrilar de estructuras inmersas en el citoplasma de las células eucariotas. Este se compone de estructuras filamentosas y tubulares y la habilidad de las células para adoptar diferentes formas y llevar a cabo diferentes movimientos coordinados, depende de esta red compleja de proteínas que se extienden a través del citoplasma.

El citoesqueleto además de dar forma a las células, lleva a cabo muchas otras funciones. Las fibras que lo componen permiten todo tipo de movimientos celulares, como por ejemplo contracción muscular, movimiento de cilios, flagelos y movimientos mitóticos de los cromosomas entre otras funciones.

La estructura del citoesqueleto es muy dinámica. Es la única estructura celular que tiene contacto directo con otros organelos celulares como el núcleo y la membrana celular externa. El citoesqueleto está aparentemente ausente en bacterias y se considera un factor crucial en la evolución de las células eucariotas.

La diversidad de funciones que dependen del citoesqueleto requieren de la participación de tres tipos principales de proteínas; los filamentos de actina y de miosina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada estructura del citoesqueleto está formada por diferentes subunidades proteicas: La actina forma los filamentos de actina, varios tipos de miosina forman los filamentos de miosina, la tubulina forma los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas como la vimentina, la keratina así como la lamina nuclear forman los filamentos intermedios. La actina y la tubulina son las más altamente conservadas durante el curso de la evolución, por tanto se consideran como fundamentales en la estructuración del citoesqueleto. Estas proteínas filamentosas se unen a una gran variedad de proteínas accesorias, y en conjunto, tienen participación en las distintas funciones que realiza la célula.

De los tres tipos de proteínas filamentosas que componen el citoesqueleto, solo la actina y los filamentos intermedios están asociados con las uniones célula - célula y con la matriz extracelular. (Small *et al*, 1999) Esta adhesión célula-célula es requerida para la morfogénesis de los tejidos y para mantener la homeostasis (Vasioukhin y Fucs, 2001).

El descubrimiento de las estructuras del citoesqueleto fue hecho por diferentes investigadores como A. Szent-Györgyi, V. A. Engelhard y otros entre 1930 y 1960, haciendo estudios sobre motilidad en el músculo. Proteínas responsables de la contracción fueron identificadas y se encontró que la contracción celular dependía de la hidrólisis de ATP activando la ATPasa de la miosina.



Las estructuras fibrilares del músculo encontradas fueron los filamentos de actina y de miosina, siendo descubiertas en los primeros estudios de microscopía electrónica y sugeridos por H. E. Huxley y J. Hanson, en 1954 (Alberts, *et al* 1993).

3.3.1. Actina.

La actina es una de las proteínas más abundantes en las células eucariotas. Esta proteína del citoesqueleto a menudo constituye del 5% al 10% de la proteína celular total. Cada molécula de actina es un único polipéptido de 375 aminoácidos y esta asociada muy íntimamente con la molécula de ATP (Alexander *et al*, 1988).

Las células de eucariotas inferiores como las levaduras, tienen un solo gen para la actina que codifica una única proteína. Sin embargo, todas las células de organismos superiores tienen isoformas codificadas por una familia de genes de actina. Al menos hay seis tipos distintos de actina en los tejidos de los mamíferos; se agrupan en tres clases, dependiendo de su punto isoeléctrico, la alfa (α) actina se encuentra en diversos tipos de músculo, mientras que la beta (β) y gama (γ) actina, son constituyentes principales de las células no musculares. Aunque las distintas formas de actina presentan diferencias sutiles en sus propiedades, las secuencias de aminoácidos han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución.

Los filamentos de actina se observan como hebras de 8nm de diámetro. Al igual que los microtúbulos, un filamento de actina es una estructura polar, con dos extremos estructuralmente distintos, un extremo menos (-) estructuralmente inerte y de crecimiento lento y un extremo más (+) de crecimiento rápido, la actina en este extremo polimeriza unas 10 veces más rápidamente que el extremo (-). La incorporación de G-actina o actina globular se lleva a cabo en los dos extremos del filamento, la parte (-) y la parte (+), para darle forma de hélice a los filamentos de actina o F-actina. Rápidamente después de la polimerización, el fosfato terminal del ATP unido a la molécula de actina se hidroliza, quedando un ADP atrapado entre los dos monómeros, formando así el polímero en forma de hélice (Alberts, *et al*, 1993).

En las células, los filamentos de actina pueden formar estructuras estables y estructuras lábiles. Los microfilamentos estables forman el eje de las microvellosidades orientados verticalmente en la parte apical de los epitelios, unidos entre sí por proteínas como la fimbrina y la vellosina. Son un componente esencial en el aparato contráctil de las células musculares en donde forman el sarcómero que está altamente organizado y es muy estable. En células no musculares los filamentos de actina se encuentran a lo largo de la membrana basolateral formando parte de lo que se conoce como la red cortical que forma parte fundamental en la adhesión célula-célula y a diferentes sustratos en el caso de cultivos celulares. Muchos de los movimientos celulares dependen de estructuras lábiles formadas por microfilamentos de actina.

La actina al participar en varios procesos celulares, requiere de un comportamiento dinámico, el cual involucra la polimerización y despolimerización de los filamentos, este proceso requiere de la participación de la forma soluble o globular



para formar los filamentos y viceversa (Ballestrem, *et al*, 1998). Para la polimerización y despolimerización de la actina, pueden interactuar muchas proteínas llamadas proteínas de unión a actina. Estas proteínas regulan el grado de polimerización de la actina en estabilidad, longitud y distribución de los filamentos. La miosina es una proteína de unión a la actina de una importancia especial. Los filamentos de actina activan a la ATPasa de la miosina-Mg² y el movimiento de la miosina a lo largo de los filamentos de actina produce la contracción del músculo. La interacción actina-miosina produce otros tipos de movimientos especializados como son el transporte de vesículas y contracción en células no musculares (Kabsch y Vanderkehove, 1992).

La motilidad basada en actina esta estrechamente ligada a la dinámica de los filamentos. Este factor es controlado por el continuo estado de ensamblaje de actina que es regulado también por las proteínas y los factores de polimerización y despolimerización de actina como profilina, cofilina y gelsolina, los cuales al afectar la dinámica de polimerización y despolimerización, afectan directamente la motilidad (Carlier, 1998).

Aunque el estudio relacionado con el comportamiento de la actina *in vitro* ha aportado muchos datos importantes, la dinámica del citoesqueleto de actina para mantener la forma celular, la locomoción, el comportamiento ante distintos estímulos externos, la interacción con agentes infecciosos, entre otras funciones, no ha sido totalmente comprendida hasta el momento (Ballestrem, *et al*, 1998).

3.3.2 Formas de estudio.

Ya que la actina participa en distintas funciones celulares, entre las cuales se encuentra la de mantener la arquitectura celular y a interacción con agentes externos, su estudio se ha abordado desde muy diversos puntos, como por ejemplo el utilizar algunas drogas que inhiben algunas de las funciones de la actina al desestabilizar los filamentos. Estas drogas son herramientas importantes para investigar el comportamiento dinámico de estos filamentos en las células. Por ejemplo, la citocalasina, droga que es producto sintetizado por hongos que impide la polimerización de la actina ya que se une al extremo (+) de los filamentos de actina, frecuentemente se utiliza para el estudio del movimiento celular y procesos que tienen que ver con la endocitosis de distintas partículas. En la mayoría de las células en movimiento, la citocalasina provoca la retracción de este borde frontal de avance. Las faloidinas por su parte, son toxinas aisladas del hongo *Amanita*, que se une muy fuertemente a ambos lados de los filamentos de actina y los estabilizan, impidiendo su despolimerización, esta droga es utilizada ampliamente como derivado fluorescente, para marcar los filamentos de las células fijadas, y tiene también un efecto profundo en las células vivas. En donde provoca cambios dramáticos en el citoesqueleto de actina (Alberts, *et al*, 1993).

La polimerización de la actina se da de forma temporal y espacial, regulándose en respuesta a estímulos externos y juega un papel importante en muchos contextos fisiológicos que particularmente involucran a la motilidad celular, la quimiotaxis,



la interacción con partículas externas, la respuesta a distintos estímulos y a la forma celular (Wear *et al*, 2000).

La forma de las células está relacionada con su función y ésta con la conformación de la actina. Idealmente el estudio de las células debería de realizarse por medio de observaciones con muestras vivas, para que la estructura del citoesqueleto pueda ser estudiada sin los artificios que la muerte y la fijación inevitablemente provocan. Además el estudio de células vivas es importante cuando se pretenden estudiar sus movimientos y comportamiento, esto puede realizarse por medio de vídeo microscopía o por medio de microscopía óptica de campo claro, pero lamentablemente no permite la observación de estructuras más detalladas como las del citoesqueleto, a pesar de que se observe una monocapa celular tan fina que la luz atravesase diferentes estructuras celulares.

Para conocer la morfología de los elementos celulares como el citoesqueleto, es necesario contar con sistemas que ofrezcan un poder de resolución mucho mayor como el microscopio electrónico. Sin embargo, la microscopía electrónica no es un buen método para el estudio de la célula viva, pues requiere de condiciones especiales para su funcionamiento como el alto vacío, el cual es incompatible con la preservación de la célula viva. Los especímenes que pueden ser vistos ofrecen varios detalles morfológicos, pero siempre queda la duda de cuanto se aproxima a los especímenes en condiciones fisiológicas. Por otro lado la morfología y la dinámica de sus estructuras internas en un mismo tipo celular, pueden variar de acuerdo con la actividad en que se encuentren, al momento en que sus procesos fisiológicos son detenidos (Revilla *et al*, 1986).

De esta manera se han desarrollado un variado número de técnicas para el estudio de proteínas del citoesqueleto como la actina y su distribución dentro de la célula por medio del uso de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos con afinidad específica para actina (Boschek *et al*, 1981).

Las tinciones con anticuerpos dirigidos contra distintos componentes del citoesqueleto, pueden ser utilizadas para una gran variedad de aplicaciones, una de las cuales es el poder explicar como se dan las interacciones de la actina y algunas proteínas de unión a actina, por medio de tinciones dobles.

El utilizar distintas sustancias para fijar a las células y así estudiar la dinámica de actina es una de las alternativas utilizadas, pero en un momento dado pueden causar cambios dramáticos en la conformación original del citoesqueleto por lo que se han comenzado a explorar otras alternativas, utilizando células vivas las cuales proporcionan mayores beneficios. Se han realizado estudios utilizando microinyección de células con proteínas fluorescentes, esta técnica presenta algunas limitaciones porque solo se utiliza para tiempos cortos, en procesos que duran menos de 12hrs, ya que las proteínas introducidas a la célula, pueden ser degradadas por proteólisis, además que el número de células que se pueden microinyectar es limitado y la técnica requiere de un equipo costoso. La fusión de secuencias de proteínas unidas a proteínas fluorescentes y su introducción a células por medio de distintas técnicas de transfección, expresándolas en forma



constante, actualmente es un método que está siendo explorado y por medio del cual se puede observar la actina en células vivas utilizando a la proteína fluorescente como gen reportero (Herget-Rosenthal, *et al*, 2001).

3.4. Proteína Verde Fluorescente.

La proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein = GFP) descubierta por Shimomura en 1964, es una proteína que se encuentra en forma natural en la medusa del Pacífico *Aequoria victoria*. Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con Ca^{++} llamada aquarina, la cual emite una luz azul-verde.

La proteína verde fluorescente es extremadamente estable, esta compuesta de un monómero de 27-kDa de 238 aminoácidos. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado covalentemente que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente) la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación de un p-hidroxibencilidimidazolin. El espectro de excitación de la GFP nativa de *A. victoria* (azul) tiene dos picos a 375nm y uno más pequeño a 470nm. Mientras que el espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico de 509nm. Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de la molécula, lo cual le proporciona algunas ventajas, como la resistencia a la desnaturalización con tratamientos de guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y dos días de tratamiento con varias proteasas tales como: Tripsina, quimiotripsina o papaina a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Deleciones en la secuencia de aminoácidos, en particular del residuo más allá de la metionina del extremo N-terminal o más de siete aminoácidos del extremo C-terminal, resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del cromóforo se encuentren intactas. La GFP puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su extremo N-terminal o C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la proteína GFP parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can, denominada así, por la forma estructural de la proteína la cual presenta 11 pliegues antiparalelos beta en la parte externa formando así un cilindro muy compacto parecido a una lata, por lo que la estructura de la GFP no se distorsiona significativamente por la fusión con otras proteínas (Yant *et al*, 1996).

Una de las aplicaciones más exitosas, es fusionarla con otras proteínas y así monitorear la localización y características de las proteínas de interés utilizando a la GFP como marcador o bandera. La fusión es realizada utilizando la secuencia del gen que codifica para la GFP junto con la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés y la quimera resultante se introduce a la célula blanco de forma de que se exprese manteniendo las funciones normales. Ya que el tamaño y la forma de la GFP y los diferentes pHs así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares no parecen ser una barrera importante en la expresión de esta proteína, se han obtenido resultados exitosos al expresar y localizar quimeras con



la GFP en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas, citoesqueleto y la membrana plasmática permitiendo así su análisis "in vivo".

Por otra parte la enorme flexibilidad que tiene como marcador no invasivo en células vivas sirve para otras numerosas aplicaciones tales como, utilizarla como control en experimentos de transfección, monitorear la proteína en células vivas, marcar células para protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), la expresión de genes reporteros y como una medida en el estudio de interacciones proteína-proteína.

Los factores que afectan la expresión o de los cuales depende la detectabilidad de la GFP son los siguientes: Cantidad total de la GFP (número de copias del gen y duración de la expresión), eficiencia de la formación del cromóforo después de la traducción (disponibilidad de los chaperones, tiempo, temperatura, propiedades moleculares de la GFP madura o dimerización, competencia con otras señales de fondo o con autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión), además, la proteína requiere de la presencia de oxígeno para su expresión en las etapas tempranas, particularmente para el deshidrogenado de los enlaces α y β del residuo 66 que se localiza en el cromóforo. Una vez que la proteína ha madurado el oxígeno no tiene efecto (Tsien Y., 1998).

La GFP original ha sido modificada de varias maneras tanto para la optimización de la fluorescencia así como para una mayor expresión y estabilidad en diferentes sistemas eucariotas.

Existen diferentes variantes de la GFP dentro de las cuales esta la llamada Enhanced Green Fluorescent Protein= EGFP. Esta proteína ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima =488 nm, emisión máxima = 507nm). El vector de información pEGFP codifica la variante GFPmut1 que contiene una sustitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP. Sin embargo la proteína requiere de promotores fuertes para su expresión, tales como el del citomegalovirus (CMV), CV40 y el del VIH, para que la detección sea apreciable y más aún en células de mamífero (Tsien, 1998).

Existen varios métodos por medio de los cuales se puede conseguir la transferencia de genes con una alta eficiencia en células, particularmente de mamífero. Cada una de las técnicas esta asociada a problemas de equipo como la electroporación y la microinyección en comparación con técnicas como la transfección por medio de DEAE-Dextran y la Co-precipitación con fosfato de Calcio, siendo estas últimas técnicas sencillas de realizar y las cuales no requieren de equipo especial y por medio de las cuales se pueden transfectar células eucariotas con ADN genómico de otro origen (Pollad J., et al, 1990).



3.5. Línea celular MDCK.

Las células MDCK, pertenecen a una línea celular derivada de la porción ascendente gruesa del asa de Henle y de los túbulos distal y colector cortical, del riñón de una perra cocker. Esta línea fue obtenida en 1953 por Madin y Darby (Madin y Darby, 1958). La característica principal de esta línea celular es que puede formar *in vitro* monocapas celulares que funcionan como epitelio de transporte.

En estado adulto este tipo de epitelio se encuentra recubriendo cavidades y se encuentra involucrado en el movimiento vectorial de iones, agua y macromoléculas, dicho movimiento incluye procesos como la absorción, secreción e intercambio de iones y diversos tipos de moléculas.

Para llevar a cabo dichos procesos, primero se requiere de la organización del citoesqueleto para mantener la adhesión célula-célula y la adhesión de la célula al sustrato que en los tejidos esta representado por a la matriz extracelular. Segundo, la diferenciación de la membrana celular en dos dominios estructural y funcionalmente diferentes denominados apical y basolateral. Cada dominio esta compuesto por diferentes grupos de proteínas, las cuales regulan el transporte de iones y solutos a través del epitelio (Yeman *et al*, 1999).

En estas monocapas se forman complejos proteicos para integrar uniones intercelulares, como el de las uniones estrechas (UE), responsables del mantenimiento de la permeabilidad paracelular al paso de iones, a pequeñas moléculas y responsable del mantenimiento de la función de barrera epitelial que impide el paso de macromoléculas y microorganismos patógenos por la ruta paracelular.

Las células MDCK *in vitro*, forman un epitelio de transporte tanto transcelular como paracelular. El transporte transcelular consiste en el movimiento de iones y agua a través de la membrana del dominio apical y basolateral y es dependiente de ATP. El transporte paracelular es pasivo y se lleva a cabo entre las uniones de las células, por lo que dichas uniones forman una barrera. Las uniones herméticas, son las que determinan y regulan la permeabilidad del transporte paracelular. La permeabilidad es comúnmente evaluada por medio de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Ledezma, 2001).

El citoesqueleto en este tipo de células tiene un papel fundamental en mantener la polaridad, estructura y función epitelial a través de sus componentes como la actina, microtúbulos y los filamentos intermedios.

El citoesqueleto de actina interactúa con la membrana celular a diferentes niveles como son las microvellosidades apicales, en sitios de contacto entre célula-célula y en sitios de contacto célula-sustrato. Además los microfilamentos de actina junto con la miosina I, se encuentran involucrados en el transporte de vesículas destinadas a la región apical (Leiser *et al*, 1993).

La actina también se encuentra distribuida a lo largo de la membrana por debajo de las microvellosidades y en la membrana basolateral formando parte de lo que se conoce como red cortical (Montes de Oca *et al*, 1997).



En las células MDCK los filamentos intermedios se han observado alrededor del núcleo extendiéndose hacia la periferia y conectándose a los desmosomas y hemidesmosomas (Leiser *et al*, 1993)

En las células MDCK no polarizadas los microtúbulos se organizan a partir de la región perinuclear y se extienden de forma uniforme en el citoplasma de la célula con sus extremos positivos hacia la periferia celular. Después del establecimiento de los contactos célula-célula y célula-substrato, los microtúbulos se reorganizan formando un conjunto denso de microtúbulos cortos orientados al azar en el citoplasma de la región subapical y a lo largo de la membrana basal.

El citoesqueleto de estas células es rígido y bien estructurado en comparación con el de otras líneas celulares epiteliales. Esta característica ha sido utilizada convenientemente para estudiar los cambios que tienen lugar en la permeabilidad regulada por el citoesqueleto y ha sido un modelo útil para estudiar cambios en los epitelios durante la invasión por algunos microorganismos patógenos.

IV. ANTECEDENTES.

4.1. Generales.

En 1981, Boschek y colaboradores, investigaron los cambios tempranos en la distribución y organización en los microfilamentos en células de embrión de pollo transformadas, haciendo tinciones con anticuerpos. Sus resultados mostraron que existe un rearrreglo de los microfilamentos durante la infección con el virus del Sarcoma a diferentes tiempos, en la que participan actina, α -actinina, miosina y tropomiosina.

Wolfe, en su publicación de 1993, reportó que un gran número de enfermedades se asocian con modificaciones al citoesqueleto, en particular en células que se encuentran en proceso de transformación como es el caso de las células cancerosas. Típicamente los microfilamentos en células transformadas cambian su conformación, concentrándose en zonas específicas de la célula. La proporción de actina despolimerizada se incrementa y las fibras de estrés presentes; generalmente desaparecen. Las uniones entre la actina y la membrana plasmática, llevada a cabo vía proteínas como la vinculina y la talina, frecuentemente desaparecen.

Gottlie y colaboradores, en 1993, estudiaron el papel que juegan los microfilamentos en cuanto a la endocitosis viral en los dominios apical y basolateral de células epiteliales polarizadas MDCK, transfectándolas con la secuencia de una proteína receptora del virus VSV conocida como proteína G la cual después se expresó de forma constante y tratar con citocalacina D, droga que induce la despolimerización del citoesqueleto de actina. En sus resultados encontraron que al tratar a las células con citocalacina D, se disminuye la endocitosis del virus VSV en la parte apical de la célula, pero no así en la parte basolateral, sugiriendo que la diferenciación en células polarizadas es fundamental en los procesos que se refieren a la endocitosis por medio de vesículas y que la



integridad en los filamentos de actina se requiere en la parte apical. Los filamentos asociados a la membrana y aquellos situados en las microvellosidades pueden formar el motor mecano-químico en cuanto al movimiento de los componentes de la membrana, lo cual provee la fuerza requerida para propiciar la invaginación de la membrana, formar vesículas hacia el espacio citoplásmico y endocitar varios tipos de moléculas.

En los estudios sobre la dinámica del citoesqueleto realizados por Ott D. y colaboradores, en 1996, se demostró que tres proteínas del citoesqueleto se asocian con viriones del VIH en células H9 y CEMss. Estas proteínas se encuentran en distintas proporciones, la ezrina en un 2% y cofilina en un 10%, en algunas preparaciones la actina en un 15%, esto puede sugerir que el citoesqueleto está involucrado con el ensamblaje y unión de los retrovirus.

Higley y Way en una revisión realizada en 1997, mencionan que *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.* y *Yersinia sp.*, provocan una respuesta en la célula hospedera, involucrando la polimerización de la actina la cual facilita la entrada por fagocitosis de la bacteria al interior de la célula. *Escherichia coli* entero patógena (EPEC), es una de las causas de la diarrea infantil; la unión de la EPEC a las células epiteliales induce la pérdida del borde de las microvellosidades y la polimerización de la actina en la célula hospedera, propiciando la formación de una estructura llamada pedestal la cual se localiza por debajo de la bacteria en la membrana celular y que corresponde a la zona de contacto. Por otro lado, se tienen reportes del comportamiento del citoesqueleto de actina durante la transcripción del genoma viral, la unión y el ensamblaje de las partículas virales.

En una revisión de Cudmore y colaboradores, en 1997, sobre la relación de los virus con el citoesqueleto de actina, se describe que varios tipos de virus como los Oncornavirus, y los Paramixovirus interactúan con la actina de las células infectadas en distintas etapas de su ciclo de replicación modificando el arreglo del citoesqueleto, confiriéndoles ventajas al momento de la infección.

El estudio de las citocinas en relación con los cambios de permeabilidad vascular en infecciones virales, ha sido abordada por distintos grupos de investigación. Blum y colaboradores en 1997, observaron el efecto del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) y el interferon gamma (IFN-gamma) sobre la resistencia eléctrica transendotelial, que es un indicador del grado de permeabilidad paracelular a iones, en el endotelio microvascular de la dermis humana. Estos autores encontraron que células tratadas con estas citocinas, exhiben una drástica disminución de la resistencia eléctrica transendotelial (TER). Las monocapas tratadas con estas citocinas exhiben cambios morfológicos notables que se correlacionan con la redistribución de la molécula ZO-1 al nivel de la unión oclusora. Esta redistribución es dependiente de un rearrreglo en el citoesqueleto de actina lo cual habla de una relación directa del citoesqueleto en respuesta a un estímulo.



Bunjaratvej y colaboradores en 1997, estudiaron el efecto del virus del Dengue sobre las células endoteliales, encontrando que se incrementa la proliferación celular y se producen cambios morfológicos.

En 1998, Robert's y Compans, reportaron que la morfología viral depende de la célula hospedera, trabajando con células epiteliales MDCK polarizadas, infectadas con el virus de la influenza A/Udorn/72. Se encontró que el fenotipo de las células polarizadas y la integridad de los filamentos de actina son un determinante celular de la morfología del virus filamentoso de la influenza.

En 1998, Bonner S. y colaboradores, utilizando células endoteliales como sistema modelo para investigar el Síndrome de Choque por Dengue, observaron que las células endoteliales presentaban replicación del virus además de que se aumenta la permeabilidad, y concluyeron que las monocapas de células endoteliales ECV304, son un sistema lo suficientemente sensible para detectar las respuestas de permeabilidad al infectar con el virus.

Dentro de los cambios sobre la dinámica de actina, se ha estudiado el papel de los cambios en la distribución del citoesqueleto de actina en relación con la permeabilidad endotelial. Por ejemplo, Vouret-Claviari y colaboradores en 1999, estudiaron los efectos de algunas toxinas bacterianas sobre la redistribución del citoesqueleto de actina y alteraciones en la permeabilidad en células endoteliales de cordón umbilical; vieron que toxinas como la toxina letal secretada por *Clostridium sordelli* al inhibir específicamente a proteínas como RAC, RAS y RAP, es capaz de incrementar la formación de fibras de tensión de actina y aumentar la permeabilidad endotelial.

Ploubidou y colaboradores mencionaron en el año 2001, como parte introductoria de su investigación, que en 1970 por medio de microfotografías se pudieron observar células infectadas con partículas virales las cuales tenían una asociación estrecha con elementos del citoesqueleto y posteriormente la desorganización del citoesqueleto resultaba en una reducida producción de virus. En su revisión sobre el transporte viral y el citoesqueleto, mencionan que realmente el citoesqueleto de la célula hospedera esta involucrado por medio del tráfico vesicular membranal, donde los elementos de los microtúbulos se encuentran relacionados con el transporte retrogrado y anterogrado de la cápside o de los complejos nucleoprotéicos. El papel de la actina por otro lado, en gran parte parece estar relacionado con los procesos concernientes a la membrana celular, los cuales incluyen la entrada y salida de los virus. Además, la actina puede participar en mecanismos que facilitan el ensamblaje de las partículas virales en la membrana plasmática y activamente en el transporte activo hacia el exterior con el virus vaccinia.

4.2. Específicos.

Gorman y colaboradores en 1982, trabajaron con una parte de la secuencia del virus del Sarcoma RSV LTR, utilizada como promotor de expresión de distintas secuencias proteicas, este ultimo fue introducido en distintas líneas celulares por



medio de transfección con la técnica de co-precipitado con fosfato de calcio, y concluyen que este promotor es muy eficiente para la expresión de distintas secuencias proteicas en una gran variedad de células.

La introducción de ADN exógeno que codifica para genes reporteros en células eucariotas a permitido el estudio de la expresión de genes a nivel molecular. En 1991, Rupprencht A y Coleman D., realizaron estudios con cultivos primarios de macrófagos transfectados con un gen reportero, cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) usando tres técnicas, DEAE-Dextran, co-precipitado con fosfato de calcio y lipofectina. Encontraron que la técnica de DEAE-Dextran presenta mucho mayor eficiencia de transfección en los macrófagos y que la transfección con el gen reportero CAT permite la caracterización y la regulación de este mismo.

En 1992, Schevzov y colaboradores estudiaron los impactos en la citoarquitectura de mioblastos C2 al sobreexpresar los genes β y γ actina, introduciendo las secuencias de cada uno por medio de transfección con la técnica de co-precipitado con fosfato de calcio. En sus resultados observan que al expresar estos genes en las células, contrario a lo que se pensaba, los genes no son equivalentes y que la sobreexpresión de ambos genes resulta en cambios en la expresión relativa de los genes de la β -actina y γ -actina. Altos niveles de expresión del gen de la β -actina resulta en un incremento en el área de las células y en contraste altos niveles de expresión del gen de la γ -actina, resultan en un significativo decremento en el área de las células. Los cambios en la citoarquitectura de las células al introducir los genes de la β -actina y γ -actina humana provoca la alteración en la organización de los filamentos. La comparación de sus datos les sugiere fuertemente que los dos genes transfectados en las células no son equivalentes y probablemente estos dos genes codifican información estructural diferente para las células.

Por más de 20 años se había estado utilizando la técnica de co-precipitado con fosfato de calcio pero hasta 1996, Jordan y colaboradores, estudiaron la forma de optimizar los parámetros críticos que afectan la formación de precipitados con calcio-fosfato, determinando que el tiempo de incubación del calcio-fosfato con el ADN por 20min a temperatura ambiente es crucial para obtener mayor cantidad de precipitado, además de que la concentración de ADN que se recomienda está en el intervalo entre 25 y 50 μ g, la concentración del CaCl₂ de 250mM y la del fosfato de 0.5M. Al utilizar las soluciones a 37° C aumentan los precipitados, lo cual incrementa, las probabilidades de transfección.

Para estudiar la dinámica de los filamentos de actina y su participación durante el movimiento celular y la quimiotaxis, Westphal y colaboradores en 1997, monitorearon esta dinámica usando una fusión de la proteína verde fluorescente con actina (GFP-actin), demostrando que con el uso de la fusión de GFP-actina es posible estudiar y monitorear la dinámica de la actina en cuanto a su acumulación y desensamblaje en células vivas, además de que con ello se puede omitir el uso de faloidina o anticuerpos marcados, los cuales solo pueden ser usados con células fijadas. Además la mayoría de la GFP-actina transfectada o exógena, podía ser visualizada en mayor proporción como F-actina. Por otro lado una de las



aplicaciones más interesantes de la GFP-actina es el monitoreo del ensamblaje y desensamblaje de la actina observando los cambios en la forma y el comportamiento en células que se mueven rápidamente.

La cantidad, la localización y la organización de los filamentos de actina están relacionados con importantes procesos en las células eucariotas, por lo que Pang y colaboradores en 1997, trabajaron con la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) unida a ABD, una proteína de unión a actina, utilizando como modelo a la forma amiboidea de *Dictyostelium* y observaron el patrón de fluorescencia de las células que expresaban la GFP-ABD. La actina fluorescente se encontraba exclusivamente en la zona cortical y se expresaba fuertemente en los urópodos, además de que existía colocalización con la actina teñida con faloidina-rodamina. La unión de la GFP-ABD mostró una asociación del 40.4% con el citoesqueleto. La localización de la GFP en la unión GFP-ABD se alteró con la fijación; mostrando una deslocalización de la GFP después de 20-30seg después de la adición de los fijadores, esto sugiere que la GFP-ABD puede tener una baja afinidad por la F-actina una vez que es disociada rápidamente durante la permeabilización.

Ballestrem y colaboradores en 1998, estudiaron la dinámica de la actina en células vivas de mamífero, por medio de la transfección de células B16F1, Fibroblastos 3T3, células CHO y células t.Ent3 con la fusión de la proteína verde fluorescente (EGFP) y la β -actina, encontrando que esta fusión provee una importante herramienta para el estudio de los cambios dinámicos de los diferentes componentes del citoesqueleto de actina. Ya que el citoesqueleto de actina se encuentra relacionado con un vasto número de funciones celulares, la fusión de EGFP y la β -actina, puede ayudar a dar una idea más clara de la función de esta proteína en células vivas.

En el año 2000, Wittenmayer y colaboradores caracterizaron de forma funcional a la proteína verde fluorescente fusionada con la proteína profilina, esta última es considerada un importante regulador de la dinámica de la F-actina en las células. Ellos probaron las fusiones de las profilinas I y II provenientes de ratón con la GFP unida a su extremo N-Terminal y al extremo C-Terminal para cada una, expresándolas en *E. coli* y observando la afinidad de esta en poliprolina-sefarosa, cuantificando la afinidad por medio de ensayos de polimerización, también se pusieron a interaccionar con la VASP, un ligando rico en prolina para profilina analizando por medio de ELISA y la unión de las proteínas a PtdIns. Sus resultados muestran que la fusión de la GFP al extremo C-Terminal de la profilina I disminuye la unión a la prolina. En contraste la otra fusión de la proteína se une a la poliprolina-sefarosa y a la VASP. La unión a la PtdIns no fue significativamente alterada. Además, la fusión de cada una de las isoformas de la proteína con la GFP no disminuye la afinidad a actina. En estudios de localización en células de mamífero, todas las fusiones mostraron la localización esperada de la profilina en las zonas de mayor dinámica de actina. Finalmente concluyen que la fusión de la EGFP con otras proteínas, es una herramienta de mucha utilidad en los estudios de localización celular de proteínas como profilina, la cual es de pequeño



tamaño en comparación con la GFP y que la fusión de la GFP a cualquiera de los dos extremos, N- y C- terminal de cada una de las isoformas de la proteína profilina, permiten obtener los dos ligandos de unión y así identificar los sitios o las proteínas a las que se une; lo cual quiere decir que la inserción de la GFP en cualquiera de los dos extremos no afecta la expresión.

En el 2001, Batard y colaboradores, usando células HEK-293, y una línea celular recombinante CHO, en estudios de microscopía confocal, citometría de flujo y el uso de vectores con secuencias unidas a la proteína verde fluorescente (EGFP), estudiaron la penetración del ADN y su expresión en las células, usando el método de transfección de co-precipitado con fosfato de calcio (Ca-Pi). Sus resultados indican que existe una endocitosis durante la transfección con Ca-Pi y el aumento de la expresión al momento de tratar con una solución de glicerol, no incrementa la entrada del ADN, además de que la transferencia de un alto número de copias del ADN plasmídico correlaciona con el alto nivel de expresión. Y por último que la expresión de la EGFP en células es un buen indicador para la co-transfección de un segundo gen de interés.

Herget-Rosenthal y colaboradores en 2001, estudiaron las características de la proteína amarilla fluorescente (Enhanced Yellow Fluorescein Protein), fusionada con la β -actina (pEYFP-actina); este plásmido es una variante de la GFP y fue utilizado para transfectar células epiteliales LLC-PK. Por medio de microscopía se siguió la dinámica de actina en ausencia y presencia de ATP, simulando un proceso de Isquemia *in vitro*. Se encontró que la EYFP-actina se incorpora mayormente a las fibras de estrés, a la actina cortical y a las microvellosidades, además de que colocaliza con la actina endógena teñida con faloidina en células fijadas. De forma paralela, la ausencia de ATP induce la formación de agregados perinucleares de la EYFP-actina colocalizando con la F-actina endógena. Al momento de volver a colocar el ATP en el medio, después de 30min existe un alto grado de agregación entre la formación de la F-actina de la EYFP-actina y la actina endógena. La ausencia de ATP a tiempos cortos parece afectar de forma clara a las fibras de estrés sin afectar al anillo cortical ni a las microvellosidades y sin que la actina se despolimerize. Estos datos indicaron que la EYFP-actina no altera las características ni la morfología de la actina endógena de las células LLC-PK además de que esta línea celular, es un buen modelo para el estudio de la Isquemia *in vitro*.



V. JUSTIFICACIÓN.

Basándose en todo lo antes expuesto, en el presente trabajo se pretende establecer las condiciones óptimas para el estudio del citoesqueleto de actina en células vivas, utilizando como modelo la línea celular MDCK, en condiciones normales y al infectar con el virus del Dengue serotipo 2 (VD-2). En estas células se ha establecido claramente la regulación de la permeabilidad por el citoesqueleto de actina y además es un sistema favorable a la transfección y expresión de proteínas exógenas. Tomando como premisa que las propiedades morfológicas y las funciones de las células no se ven alteradas por la expresión de la proteína verde fluorescente fusionada con actina, el objetivo del presente trabajo es obtener células que expresen la proteína verde fluorescente fusionada con β -actina humana (EGFP-actina), observar su distribución y organización dentro de las células y monitorear las modificaciones provocadas por la infección con el virus.

VI. OBJETIVOS.

General

Expresión de actina fluorescente en células transfectadas, observar su distribución y organización dentro del citoplasma y monitorear las modificaciones causadas por la infección con el VD-2.

Para llevar a cabo el presente estudio, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Construcción del vector p(EYFP-actin)⁻, (control mock).
- Clonación de células transfectadas.
- Infección de células MDCK con el VD-2.
- Observación y caracterización de las modificaciones de actina en células transfectadas, infectadas con el VD-2 en etapas tempranas y tardías.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales.

Los plásmidos pEGFP-Actin y pEYFP-Actin, utilizados para realizar los experimentos de transfección, fueron adquiridos en Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto California, USA), el último plásmido fue tomado como base para la construcción del control mock, p(EYFP-actin)⁻,

Las endonucleasas de restricción junto con los buffers de reacción, utilizados para los análisis de restricción de los plásmidos, fueron adquiridos en BioLabs Inc. (New England).

Las células epiteliales usadas como sistema modelo para la expresión de la proteína fluorescente unida a actina fue la línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney), provenientes de la colección americana de cultivos celulares (ATCC).

Los reactivos para las tinciones e inmunotinciones fueron adquiridos de distintas fuentes. La Faloidina-Rodamina fue adquirida en Molecular Probes OR U. S. A. El anticuerpo monoclonal de ratón específico para la proteína E del virus dengue serotipo 2, fue donado por el Instituto Pedro Kourí (Habana, Cuba). El anticuerpo monoclonal anti β -tubulina total fue adquirido en ICN Biomedicals Costa Mesa, CA. (Cat No. 633781). El segundo anticuerpo utilizado para las inmunotinciones indirectas, fue el anticuerpo monoclonal Alexa Fluor 488 anti ratón IgG conjugado, y fue adquirido en Molecular Probes OR U.S.A.

Por otro lado el virus Dengue serotipo 2 utilizado en los experimentos de infección, fue aislado del suero de un paciente en el Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológica (INDRE), con 14 pases en células de larva de mosquito C6/36, y titulado en células BHK 21.

Preparación de células competentes (Ca⁺⁺).

Para la obtención del ADN plasmídico del vector pEGFP-Actin y del ADN de la construcción p(EYFP-actin)⁻, que se usaron para los experimentos de transfección, se hizo el cultivo de bacterias *E. coli* cepa DH10B, utilizándolas como células almacenadoras, en las cuales se propagó el ADN plasmídico. La preparación y transformación de las bacterias se basa en tratarlas con soluciones frías de CaCl₂, ya que aparentemente el tratamiento induce un estado transiente de competencia durante la introducción de ADN plasmídico o de otras fuentes. Para la preparación de las bacterias, se utilizaron cultivos de una noche, en medio TYM (2% Bacto-Tryptona, 0.5% extracto de levadura, 0.01M NaCl y 10mM Mg SO₄), cuantificando el crecimiento en un espectrofotómetro hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a 600nm. Las bacterias competentes se colocaron en tubos para ser centrifugadas a 4000rpm, 15min a 4°C, posteriormente el concentrado celular fue resuspendido con la solución de TFB I (30mM KOAc pH 7, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10 mM CaCl y 15% glicerol), centrifugado a 4000rpm, 15min a 4°C. La pastilla resultante



fue resuspendida con la solución de TFB II (10mM MOPS pH 7.0 /, 75 mM CaCl₂, 10mM KCl y 15% glicerol). Las bacterias fueron alicuotadas en tubos eppendorf previamente etiquetados y congeladas con etanol-hielo seco. La eficiencia de transformación se analizó, transformando a las bacterias con ADN plasmídico purificado por CsCl. Las bacterias se plaquearon en cajas petri con medio Luria (LB) y antibiótico (Kanamicina, 30µg/ml).

Transformación.

Las células competentes DH10B con una eficiencia de transformación de 1X10⁶ bac/µg de ADN, se transformaron con el ADN plasmídico, colocando en un tubo de ensaye de cristal pre-enfriado 25ng del ADN plasmídico, se mezclaron con 100µl de sol. TFB II y por último se adicionó 50µl de las bacterias competentes. La mezcla fue incubada a 4°C por 10min para propiciar que el ADN adicionado se adhiriera a la pared celular de las bacterias, posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C durante 1.5min, esto facilita que la bacteria pueda incorporar el ADN. Después de este lapso de tiempo las células fueron enfriadas en hielo por 2min y colocadas a Temperatura ambiente (T° amb.) 5min, al final se agregaron 850µl de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1hr en agitación continua. Del total de la transformación se tomaron 200µl y 300µl para plaquear en cajas petri con medio LB conteniendo Kanamicina (30µg/ml).

Obtención y Extracción del ADN Plasmídico.

La construcción del vector mock p(EYFP-actin)⁻, se realizó tomando como base el ADN del plásmido pEYFP-Actin. Este vector presenta una secuencia idéntica a la del vector pEGFP-Actin y solo difiere en algunas mutaciones específicas para cuatro secuencias de aminoácidos (Ser-65 por Gly, Val-68 por Leu, Ser-72 por Ala y Thr-203 por Tyr) que son los que le dan la coloración amarilla al expresarse en células. La construcción del vector se realizó deletando la secuencia que codifica para la proteína amarilla fluorescente (EYFP-actina) por medio de una doble digestión con el uso de enzimas de restricción, *Pst* I y *Bam*H I (Bio-Labs) a 37°C, toda la noche. Con esta doble digestión, se liberaron dos fragmentos. Para esta reacción se utilizaron 6.8µg del ADN plasmídico del vector pEYFP-actin.

Después de concluida la reacción se inactivaron las enzimas de restricción con calor a 80°C por 20min, en un termoblock, posteriormente se precipitaron los fragmentos de ADN con acetato de sodio (1/10 en vol.) y etanol absoluto frío (2.5 vol.). El ADN se resuspendió en agua Milli-Q, para realizar la reacción de rellenado de los extremos de cadena sencilla de cada fragmento, junto con la enzima T4 DNA Polimerasa (Bio-Labs), dejando incubar a 12° por 20min.

Los fragmentos obtenidos de la doble digestión, fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE (tris-boratos/EDTA). La electroforesis permite determinar el tamaño en pares de bases de ADN al hacer pasar una corriente eléctrica a través del gel propiciando la migración de las



IZT.

bandas teñidas con una solución de azul de bromofenol y xilano para indicar la posición de las bandas en el gel y con bromuro de etidio para identificar las bandas con luz ultravioleta (UV). La migración de las bandas depende de su tamaño, ya que bandas de tamaño pequeño migran más rápido y bandas de tamaño más grande migran más lento. Los fragmentos corridos en el gel fueron observados con luz UV. La purificación del fragmento de 4162pb se hizo cortando la banda directamente del gel, para colocarlo en un tubo eppendorf, donde se fundió la con agarosa calor. El fragmento de 4162pb fue separado del gel utilizando un Kit de purificación de ADN (Plasmid Miniprep Kit de BIO RAD). El fragmento purificado, finalmente fue religado utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (GIBCO BRL, Life Technologies). La reacción se realizó incubando toda la noche a T° amb., para finalmente obtener el vector llamado p(EYFP-actin)⁻, el cual fue utilizado como control mock.

Las bacterias Ca⁺⁺ cepa DH10B, fueron transformadas con el vector mock p(EYFP-actin)⁻, posteriormente de las colonias obtenidas, se extrajo ADN plasmídico por la técnica de STET-prep (Sambrook, 1989). Técnica con la cual se puede extraer ADN a pequeña escala y se basa en la lisis de las células bacterianas por medio de calor. Las células bacterianas fueron cultivadas en medio LB toda la noche, posteriormente se centrifugaron a 12,000rpm por 30seg, la pastilla fue resuspendida en 350µl de sol. STET (NaCl 0.1M, Tris-NaCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0, triton X-100 5%) 8%, se agregaron 25µl de lisosima y se mezcló perfectamente para posteriormente colocarlas en agua hirviendo por 50seg, la solución viscosa fue centrifugada a 12,000rpm por 10min recuperando el sobrenadante y precipitando con acetato de sodio 2.5M e Isopropanol dejando reposar 10min a temperatura ambiente. Nuevamente se volvió a centrifugar a 12,000rpm, 5min a 4°C y la pastilla fue resuspendida en etanol al 70% para eliminar el isopropanol y se centrifugó a 12,000rpm, 2min a 4°C. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en solución TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). El ADN obtenido de cada clona (células provenientes de una misma colonia), fue analizado por medio de digestiones con enzimas de restricción *EcoR* V, *Bam*H I, *Avr* II y *Hinc* II.

Una de las colonias positivas fue elegida para realizar la extracción del ADN plasmídico a mayor escala y luego purificarlo por medio de la técnica de gradientes de equilibrio de Cloruro de Cesio (CsCl) Bromuro de Etidio (Sambrook, 1989). La técnica esta basada en la obtención del ADN plasmídico por medio del cultivo a gran escala de las células bacterianas de donde se extrajo el ADN plasmídico. Las células fueron crecidas en medio LB en cultivos de toda la noche, posteriormente las células fueron centrifugadas a 5000rpm, 10min a 4°C en una centrífuga SORVALL con el rotor GSA para eliminar el medio. La pastilla fue resuspendida en solución TS (Tris-sacarosa) adicionando solución ELT (EDTA 100mM, lisosima 2mg/ml y triton 0.1% en H₂O), dejando reposar 10min a T° amb. Posteriormente las células se calentaron en baño maria a 70°C durante 10min exactos, la solución calentada fue centrifugada en una ultracentrífuga Beckman con



el rotor 70.1 Ti a 40,000rpm por 20min a 4°C, el sobrenadante fue recuperado en un tubo Corex de cristal y se adicionó un volumen 1:1 de PEG-NaCl dejando reposar 30min a T° amb. La solución fue centrifugada en la centrifuga SORVALL con el rotor SS a 7,000rpm 10min a 4°C, resuspendiendo la pastilla en solución TE, a la cual se le agregaron 25µl de RNAsas libre de DNAsas y se incubaron a 37° por 2hrs. Después de este tiempo se adicionaron 4gr de CsCl en tubos para rotor NVT-90, y 300µl de bromuro de Etidio. Los tubos se calibraron en la balanza analítica con solución TE y tapando perfectamente. El ADN plasmídico fue centrifugado a 90,000rpm durante 16hrs a 20°C en la ultracentrífuga Beckman, dando como resultado un gradiente de densidad, del cual sé extrajo la banda que contenía el ADN plasmídico en un cuarto oscuro haciendo incidir luz UV sobre el tubo para que fluoresciera el ADN marcado con el bromuro de etidio. A la solución extraída se le adicionó un volumen 1:1 de Isopropanol saturado para eliminar el Bromuro de Etidio (color rojo), repitiendo este paso tres veces hasta que la solución quedo transparente, posteriormente se colocaron tres volúmenes de etanol al 70% a cada tubo, dejando a -20°C toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 8,500rpm 15min a 4°C, la pastilla fue resuspendida en TE y el ADN plasmídico fue extraído con fenol-cloroformo colocando un volumen 1:1, centrifugando a 12,000rpm, 10min. Se tomó la parte acuosa (arriba) y sé precipitó con 1/10 en volumen de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejando a -70°C, 20min. La red de ADN que se aprecia en este paso, se centrifugó a 12000rpm a 4°C y finalmente fue resuspendida en 200µl de TE. El ADN extraído por esta técnica fue cuantificado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm. Alicuotas del mismo, se digirieron con enzimas de restricción, para analizar su patrón de restricción. Las enzimas utilizadas fueron *Avr* II y *Hinc* II.

La extracción de ADN del plásmido pEGFP-Actin, se realizó utilizando 200ng, del ADN original (Clontech), trasformando bacterias *E. coli* Ca⁺⁺ DH10B, y plaqueadas en medio LB con Kanamicina (30µg/ml). Las colonias que crecieron en estas condiciones fueron utilizadas para la extracción del ADN plasmídico con la técnica de STETprep (Sambrook, 1989) y se analizaron por medio de digestiones con enzimas de restricción *EcoR* V, *BamH* I, *Avr* II y *Hinc* II. Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico por la técnica de CsCl (descrita anteriormente) resuspendiendo en 200µl finales de solución TE.

Los dos vectores de expresión pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻, fueron utilizados para realizar los experimentos de transfección.

Cultivos celulares.

La línea celular MDCK, se utilizó en los pasajes 50-70. Las células fueron sembradas a una densidad de 5x10⁴ en botellas para cultivo de 25cm² (esta es la razón de pase normal recomendada por semana). Se cultivaron en medio modificado Eagle-Dulbeco-Vöigt (DMEM) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-Glutamina (200mM), insulina al 1% (Eli Lilly, México D. F.), 100u/ml de penicilina y 100u/ml de estreptomocina (IN VITRO S. A.



México D. F.). Los cultivos fueron crecidos en botellas desechables para cultivo, en una incubadora con atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C (Forma Scientific). El pH se mantuvo en un intervalo de entre 7.2-7.4. Las células se desprendieron para su resiembra, utilizando una solución de Tripsina-Verseno al 0.05% (IN VITRO S. A. México D. F.) previamente lavadas con PBS 1X. Para realizar los experimentos se utilizó el mismo protocolo, solo variando la densidad celular y los requerimientos de cada técnica.

La congelación de las células para mantener el "stock", se hizo sembrando a una densidad de 5X10⁵cél/ml en botellas de 75cm² con 10ml de medio DMEM complementado, con un cambio de medio a las 24hrs de incubación, la congelación se realizó a las 48hrs de incubación lavando a las células con PBS 1X a 37°C dos veces, posteriormente tripsinando con 2ml de tripsina-verseno 0.05% dejando actuar durante 10-20min. Después de este lapso de tiempo las células fueron resuspendidas en medio y centrifugadas a 1000rpm por 5min. El número de células se cuantificó en una cámara de Neubauer para obtener una concentración de 3X10⁶cél/ml. La pastilla fue resuspendida en medio DMEM+SFB al 10% y posteriormente con medio DMEM+Dimetil sulfóxido (DMSO al 10%) muy cuidadosamente, otra parte de la suspensión celular se utilizó para tener un control de esterilidad con medio Luria. La suspensión fue colocada en tubos de congelación con 1ml de medio cada uno, previamente etiquetados. Los tubos fueron colocados a -20°C durante 1hr, pasado el tiempo se colocaron en el congelador REVCO a -70°C por 24hrs. Finalmente, los tubos fueron colocados en varillas de aluminio etiquetadas y puestas en N₂ líquido. Después de siete días se descongeló un tubo para realizar una prueba de viabilidad.

La descongelación de las células se realizó sacando un tubo del N₂ líquido, dando un choque térmico, pasando rápidamente a un vaso con agua a 37°C. El tubo fue lavado perfectamente con etanol al 70%, la suspensión celular fue resuspendida en 5ml de medio y centrifugada a 1000rpm por 5min para eliminar el DMSO, la pastilla fue resuspendida en 5ml de medio DMEM complementado. Las células fueron sembradas en una botella de 25cm² a alta densidad, incubando a 37°C con 5% de CO₂. Después de que las células llegaron a confluencia se les dio un pase 1:2 y posteriormente un pase 1:5, después de esto se siguió con el pase normal recomendado.

Transfección de células MDCK.

Las células MDCK se transfectaron con los vectores de expresión pEGFP-Actin, el cual contiene un sitio múltiple de clonación donde se encuentra la secuencia completa que codifica para la proteína verde fluorescente unida a la secuencia de β-actina humana. El vector pEGFP-Actin junto con el vector p(EYFP-actin)⁻ contienen un promotor de citomegalovirus (CMV) para permitir la expresión en células de mamífero, una zona de poliadenilación de SV40, un promotor de expresión bacteriana de resistencia a Kanamicina, un gen de resistencia a neomicina/kanamicina y un sitio de poliadenilación del Herpes Simplex Virus



(HSV). El vector de expresión p(EYFP-actin)⁻ antes mencionado, fue utilizado como un control de transfección (mock) (ver apéndice).

Los experimentos de transfección se realizaron por medio de la técnica de coprecipitado con fosfato de calcio (Ca-Pi) (Jordan *et al*, 1996), (Ver esquema, Pág. 26), con algunas modificaciones, utilizando 10µg de ADN de cada vector, pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻ previamente precipitados con acetato de sodio y etanol absoluto a -70°C y centrifugando a 12000rpm a 4°C, la pastilla fue finalmente resuspendida en 10µl de agua Milli-Q estéril. Cada uno de los plásmidos, fue mezclado con una solución de CaCl 0.25 M y HBS 2X pH 7.05 (NaCl HEPES, Na₂ HPO₄ anhidro), incubando durante 20min a temperatura ambiente (Las proporciones fueron las siguientes: 10 µg de ADN pEGFP-Actin o p(EYFP-actin)⁻ purificados por CsCl, 250µl CaCl 0.2M y 250µl HBS 2X, para botellas con 5 ml de medio). Las células MDCK fueron sembradas 24hrs antes, a una densidad de 6x10⁵ cél/ml, obteniendo una confluencia del 80% después de 24hrs a 37°C con 5% de CO₂. A estas células se les adicionó la solución de ADN/CaCl/HBS 2X, cuidadosamente junto con el medio de crecimiento y se dejaron en incubación durante 24hrs a 37°C con 5% de CO₂. Después de este lapso de tiempo se les dio un choque de Glicerol al 15% en un buffer HEPES/NaCl, para aumentar la eficiencia de transfección, la solución de Glicerol al 15% se adicionó a la monocapa previa decantación del medio y se adicionó un 1ml de solución (precalentada a 37°C) durante 3min a 37°C. Posteriormente la monocapa fue lavada con PBS 1X, dos veces y una vez con medio, adicionando por ultimo medio fresco continuando con la incubación por 24hrs más.

Después de 48hrs post transfección las células fueron sometidas a la selección para distinguir transfecciones estables adicionando G-418 (Geneticina, droga análoga a neomicina) a una concentración de 600µg/ml. La incubación se continuó haciendo cambios de medio con droga cada tres o cuatro días con la subsecuente muerte celular, de las células que no habían integrado el vector que confiere la resistencia a G-418. Después de dos o tres semanas quedaron solamente las colonias de células resistentes a la droga. El monitoreo se realizó por medio de un microscopio invertido marca Olympus de fluorescencia con el filtro verde. Una vez obtenidas las colonias resistentes, estas fueron tripsinadas para reseminar una parte y la otra congelarla para realizar los experimentos posteriores.

Clonación de expresiones estables.

Ya que la expresión de la actina fluorescente en la población de células transfectadas no es homogénea en todas las células, fue necesaria la clonación (la obtención de poblaciones celulares provenientes de una misma célula). Este procedimiento se llevó a cabo sembrando células transfectadas en placas de 96 pozos que contienen 12 columnas. A cada uno de los pozos de cada columna, se les agregó un inóculo de 100µl de medio conteniendo una densidad aproximada de 350 cél/ml y reseminando por dilución los pozos siguientes hasta llegar al octavo pozo de cada columna. Las clonas que se obtuvieron fueron seleccionadas



procurando que solo se encontrará una célula en el pozo, estas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta que cada una de las clonas de mayor expresión determinada mediante la visualización de la fluorescencia de la proteína exógena, llegará a confluencia, para posteriormente ampliar la población. Las clonas seleccionadas fueron trispinadas y sembradas en cajas petri de 30mm de diámetro, posteriormente se les dio un pase 1:2 para finalmente darles el pase semanal recomendado. Una parte de cada clona fue congelada para utilizarse en los experimentos posteriores.

Fijación de células.

Para cada experimento que requirió la fijación de las células, fueron sembradas en placas de seis pozos, sobre cubreobjetos, en medio DMEM complementado, después del tiempo de incubación requerido para cada experimento, las células fueron lavadas con PBS 1X a 37°C dos veces y fijadas con Formaldehído al 4% (en PBS 1X) (Grado ultra puro, Tousimis Research Co., Rockville, MD) durante 20min a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se permeabilizaron con Tritón 100X 0.2% (en PBS 1X) durante 6min a T° amb. Las células fueron mantenidas en PBS 1X a 4°C, hasta el momento de realizar las tinciones.

Tinción directa de F-actina.

Para la tinción directa con faloidina en las células MDCK, se tomaron 10µl de faloidina-rodamina y se evaporaron por centrifugación en un Speed Vac durante 15min y la pastilla fue resuspendida en 200µl de PBS 1X. Las células ya fijadas en el cubreobjetos fueron colocadas sobre portaobjetos conteniendo 25µl de Faloidina-rodamina y se incubaron en cámara húmeda durante 20min a T° amb. Finalmente, las células en los cubreobjetos fueron montadas en portaobjetos con una gota de Gelvatol y selladas con barniz de uñas. Las laminillas fueron etiquetadas y almacenadas a -20° C en oscuridad total para su posterior análisis al microscopio de fluorescencia.

Inmunotinciones.

En el caso de las inmunotinciones indirectas con anticuerpos, las células crecidas sobre cubreobjetos después de ser permeabilizadas fueron bloqueadas con Albumina de Suero Bovino al 0.05% (ASB) a T° amb. durante 30min. Posteriormente fueron incubadas con el primer anticuerpo monoclonal anti proteína E del virus con una dilución de 1:10 por 60min a 37°C en cámara húmeda. Para el caso de tubulina se utilizó el anticuerpo monoclonal anti β-tubulina total con una dilución de 1:100. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% durante 20min por lavado, para ambos anticuerpos y se incubó con el segundo anticuerpo monoclonal anti ratón Alexa conjugado con una dilución de 1:100 durante 60min a 37°C en cámara húmeda. Este anticuerpo se utilizó como anticuerpo fluoresceinado en ambas tinciones, los controles fueron tratados de la



misma forma y solo se incubaron con el segundo anticuerpo. En los casos en los que se requirió observar actina junto con las células teñidas con la proteína E viral se utilizó la técnica de tinción de faloidina-rodamina antes mencionada.

Finalmente las células fueron montadas en portaobjetos con Gelvatol, sellados con barniz de uñas, etiquetados y almacenados a -20° .

Células transfectadas tratadas con citocalacina D.

La citocalacina D, fue preparada a una concentración de $4\mu\text{g}/\text{ml}$ en Dimetil Sulfoxido (DMSO) a partir de una solución stock 10mM . Las células MDCK transfectadas fueron sembradas en placas de seis pozos sobre cubreobjetos a una densidad de 5×10^5 e incubadas durante 48hrs a 37°C con 5% de CO_2 . Después de ese tiempo las células fueron tratadas con citocalacina D a la concentración indicada. Las células fueron fijadas a distintos tiempos para observar los cambios producidos en los filamentos de actina (0', 15', 30', y 60'). Las células fueron lavadas con PBS 1X dos veces y se fijaron con formaldehído 4% dejando 20min a T° amb. Posteriormente las células fueron permeabilizadas con Tritón 100X al 0.02% por 6min a T° amb. Finalmente las células fueron teñidas con faloidina-rodamina y montadas con Gelvatol en portaobjetos y almacenadas a -20°C . Las observaciones sobre las modificaciones del citoesqueleto de actina se realizaron, por medio de un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss.

Infección de células MDCK con el virus del Dengue serotipo 2 (DV-2)

Para los ensayos de infección las células MDCK, fueron sembradas en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos colocados en el fondo del pozo, a una densidad de 2.5×10^5 cél/ml adicionando a cada pozo 0.5ml de medio, las células se mantuvieron en incubación durante 48hrs a 37°C con 5% de CO_2 antes de infectarlas con el virus. Antes de realizar la infección, el virus fue descongelado de -70°C a 37°C en baño maría y posteriormente colocado en hielo. La inoculación de las células se efectuó con una multiplicidad de infección (MOI) de 1.0, utilizando el sobrenadante del medio de células C6/36. A las células se les retiró el medio y se les inoculó con 0.5ml de la suspensión del virus para cada pozo, a los controles sólo se les adicionó medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 90min a 37°C dispersando la suspensión cada 20min, finalmente él inóculo fue retirado adicionando medio fresco e incubando a 37°C para observar la progresión de la infección. Las células fueron fijadas a intervalos de 12hrs, 24hrs y 48hrs, para hacer las tinciones con los anticuerpos dirigidos contra la proteína E viral, β -tubulina y con faloidina-rodamina.

Cinética de infección con VD-2 en células MDCK expresando la EGF-actina en las primeras etapas.

La caracterización de la reorganización del citoesqueleto de actina en células transfectadas con respecto a la infección causada por el VD-2 en etapas tempranas, se efectuó, sembrando las células MDCK, que expresan la EFGP-actina, a una



densidad de 1.5×10^5 sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pozos. Las células fueron inoculadas después de 48hrs de crecimiento con el VD-2 a una MOI de 1.0, manteniendo el inóculo durante el transcurso del experimento desde los 30min hasta las 3hrs y fijando a las células para observar en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes se capturaron en los momentos en que se observaron cambios relevantes en el citoesqueleto de actina.

Procesamiento de imágenes.

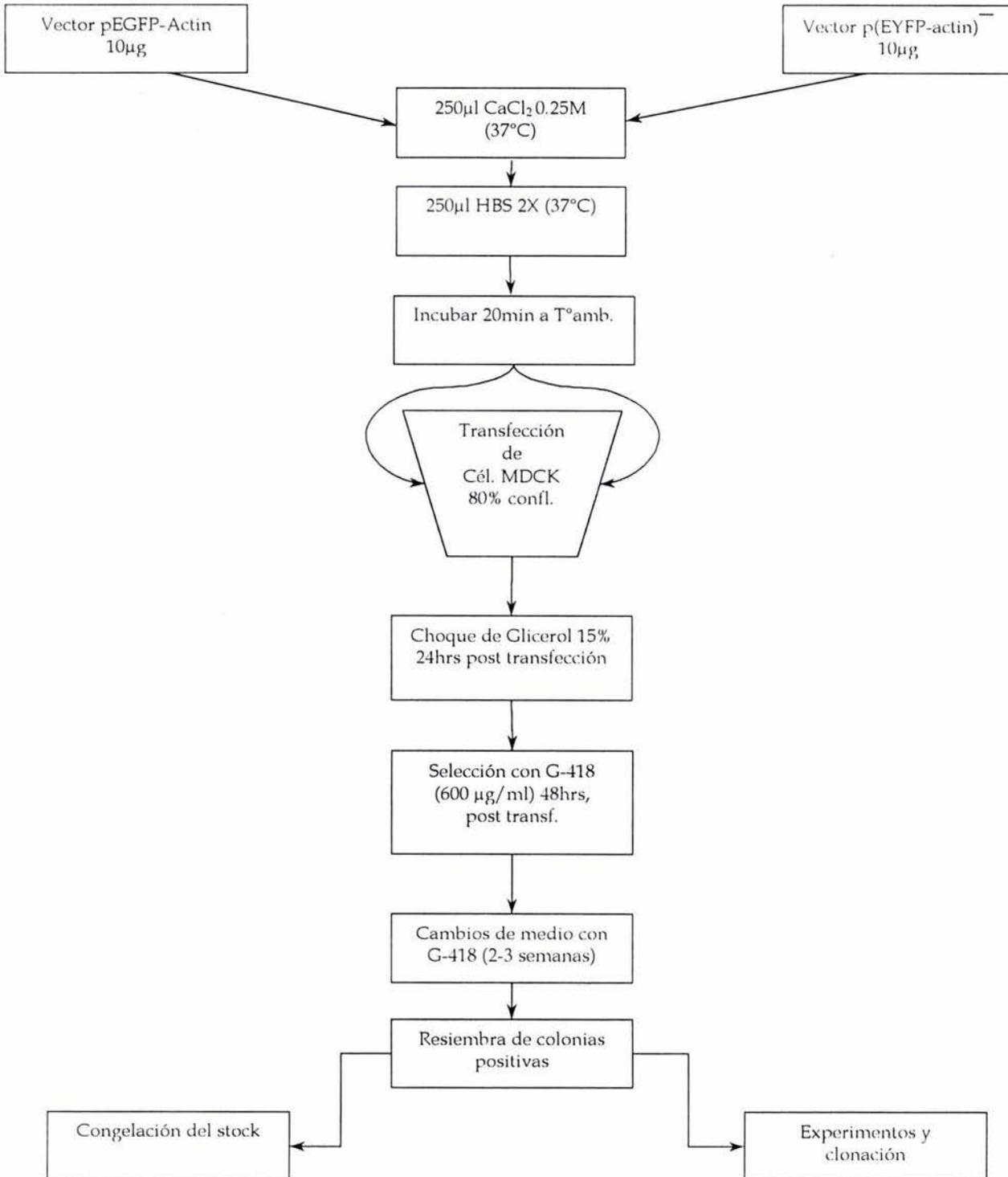
La captura de imágenes se realizó en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de inmersión de 63X, con filtros de color verde para el anticuerpo Alexa conjugado, para visualizar la actina fluorescente en las células fijadas. Para la actina marcada con faloidina, las células se observaron con un filtro rojo. Las imágenes fueron capturadas con un sistema de computo acoplado al microscopio y con el software Twin Viewfinder, versión 3.0 y fueron procesadas con el software Image-Pro Plus, versión 4.0.

Colocalización.

Para realizar los análisis de colocalización las imágenes capturadas fueron procesadas con el programa Image-Pro Plus 4.0, para esto se realizaron tomas en el mismo campo de las células transfectadas y teñidas con faloidina, posteriormente con el programa se realizó la superposición de las imágenes y la colocalización se observó al mezclar los colores rojo y verde, dando como resultado un color amarillo. Estos procedimientos se efectuaron con las imágenes de células en condiciones normales y tratadas con citocalacina D.



Esquema de transfección de células MDCK por Ca-Pi.



VIII. RESULTADOS.

Vectores de expresión.

Para la realización de los experimentos de transfección se utilizó el vector de expresión pEGFP-Actin, el cual se purificó por medio de la técnica de CsCl, posteriormente fue cuantificado en un espectrofotómetro a una Densidad Óptica (D.O.) de 260nm, obteniendo una concentración final de 2.2 μ g/ μ l en solución TE. Del ADN plasmídico, se corrieron 200ng según los cálculos de la D.O. en un gel de agarosa al 1% en TBE, **Fig. 1**. En el carril uno se corrieron 3.5 μ l del marcador de 1Kb (1Kb ADN Ladder, Gibco-BRL) el cual nos muestra el peso aproximado de las muestras problema, en el carril dos, se aprecia una banda de aproximadamente 5820pb que corresponde al ADN del vector pEGFP-Actin de 5.8Kb, indicando que es el ADN esperado.

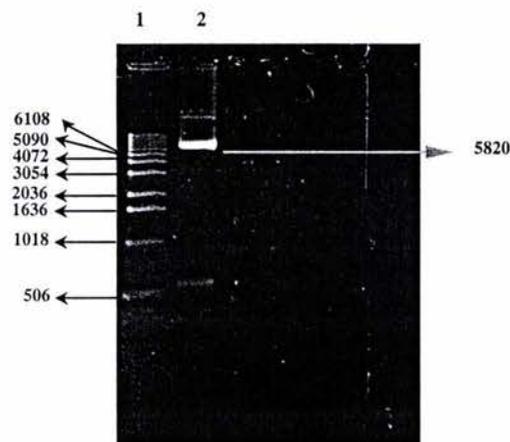


Figura 1. Gel de agarosa del vector pEGFP-Actin. En el carril 2, se corrieron 200ng del ADN del vector pEGFP-Actin original de 5820pb, utilizado para la purificación por CsCl y los experimentos de transfección. En el carril 1 se corrieron 3.5 μ l del marcador de 1Kb.

El ADN plasmídico purificado fue analizado realizando digestiones con enzimas de restricción *EcoR* V, *BamH* I, las cuales lo cortan en un solo sitio y *Avr* II y *Hinc* II, que cortan en dos sitios. El resultado de estas digestiones, se muestra en la **Fig. 2**, teniendo en el primer carril el marcador de 1Kb, en el segundo carril el ADN plasmídico del vector pEGFP-Actin sin digerir de 5820pb, en los carriles tres y cuatro, se corrieron las digestiones con las enzimas de restricción de un solo corte que resulta en la linearización del ADN plasmídico y por tanto la banda que se aprecia es de 5820pb. En el carril cinco, se corrió la digestión con la enzima *Avr* II que reconoce dos sitios de corte, obteniendo la liberación de dos fragmentos, el primero de 4805pb y el segundo de 1015pb. En el carril seis, se corrió la digestión



con la enzima *Hinc* II, con la cual se liberaron dos fragmentos, el primero de 4593pb y el segundo de 1227pb. Con estos análisis se corrobora que el ADN plasmídico del vector pEGFP-Actin corresponde con lo que se esperaba.

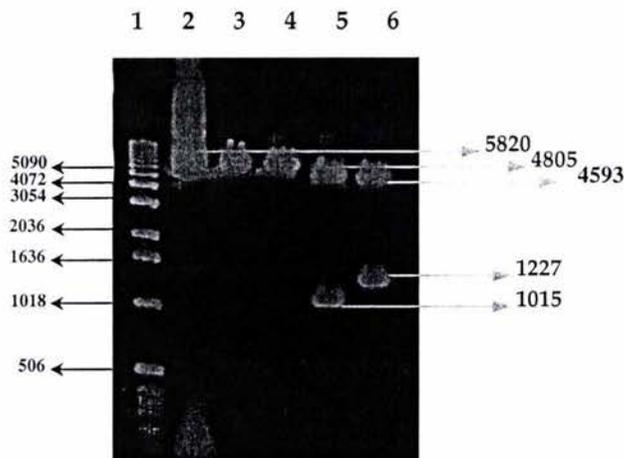


Figura 2. Análisis de restricción del ADN del Vector pEGFP-Actin purificado por CsCl. En el carril 1 se corrió el patrón de 1Kb, en el carril 2 se colocó un control del vector pEGFP-Actin no digerido. En el carril 3 y 4 se colocaron las digestiones con las enzimas *EcoR* V y *Bam*H I respectivamente, las cuales reconocen solo un sitio de corte. En los carriles 5y 6, se colocaron las digestiones con las enzimas *Avr* II y *Hinc* II que reconocen dos sitios de corte y por lo tanto liberaron dos fragmentos.

Construcción del control mock.

Tomando en cuenta que al introducir ADN plasmídico extraño a las células cabe la posibilidad de que se presenten modificaciones en sus propiedades, es necesario contar con controles de transfección (mock). Para lo cual, se realizó la construcción de un vector en el cual no se encuentra la secuencia que codifica para la actina fluorescente (EYFP-actina). El ADN plasmídico tomado como base para hacer la construcción fue el vector pEYFP-Actin, al cual se le deletó la secuencia que codifica para la EYFP-actina por medio de una doble digestión con las enzimas *Bam*H I y *Pst* I que reconocen solo un sitio de corte, dando como resultado la liberación de dos fragmentos **Fig. 3**. El fragmento de mayor tamaño fue de 4162pb y el segundo de 1658pb. El fragmento de 4162pb fue utilizado para realizar la construcción del control mock. La doble digestión dio como resultado la liberación del fragmento de 1658pb que contiene el fragmento que codifica para EYFP-actina. En los dos fragmentos obtenidos, los extremos de corte no fueron compatibles al momento de intentar religar los fragmentos individualmente, por lo que fue necesario rellenar las secuencias de cadena sencilla con la enzima T4 DNApolimerasa. Esto es debido a que las endonucleasas utilizadas para la obtención de los fragmentos son enzimas de tipo 2, que cortan en el sitio que reconocen, dejando un intervalo de cinco o de seis bases en los extremos 5' y 3' de



cada una de las cadenas y al momento de llevar a cabo la digestión se obtienen extremos salientes que dependiendo de las enzimas que se utilicen estos extremos pueden ser complementarios en sus secuencias salientes y así religarse o como en este caso, donde los extremos no tienen secuencias similares y para religarlos es necesario rellenarlos para obtener extremos romos o chatos. Posteriormente el fragmento de 4162pb fue purificado del gel de agarosa. Este fragmento purificado fue precipitado para finalmente hacer la ligación con la enzima T4 DNA Ligasa. Al hacer la ligación con los extremos romos, en teoría se disminuye la eficiencia de ligación al no tener extremos salientes que la faciliten.

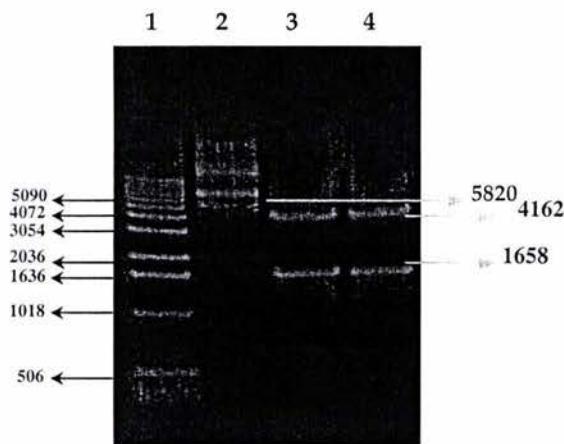


Figura 3. Doble digestión del vector pEYFP-Actin, con las enzimas de restricción *BamH I* y *Pst I* que reconocen un solo sitio de corte. Los productos de esta digestión fueron usados para la construcción del vector que fue utilizado como control mock en los experimentos de transfección. En el carril 1 se colocó el marcador de 1Kb. En el carril 2 se colocó un control de ADN del vector pEYFP-Actin no digerido. En los carriles 3 y 4, se corrió la doble digestión con las enzimas de restricción que liberaron dos fragmentos.

El fragmento de 4162pb religado fue tomado para transformar células calcio competentes DH10B, las que después fueron crecidas en placas con medio Luria y kanamicina 30µg/ml. De las colonias crecidas se seleccionaron 12 colonias (clonas) y se les extrajo ADN plasmídico para posteriormente analizarlas colocando digestiones con la enzima de restricción *Avr II*. Las digestiones fueron corridas en dos geles de agarosa, colocando en cada pozo 5µl del ADN de cada clona. En el primer gel se corrieron las clonas 1-6, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8, Fig. 4a. en el segundo gel se corrieron las clonas 7-12, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8, Fig. 4b. En los carriles 1 y 2, se corrieron el marcador de 1Kb y el ADN original no digerido. Como resultado se obtuvieron ocho clonas positivas que liberaron dos fragmentos, el primero de 3147pb y el segundo de 1015pb, dando una eficiencia de



transformación del 70%. Los fragmentos sumados dan un tamaño de 4162pb que corresponde al tamaño del fragmento religado. Las clonas 10, 11, 12 y 15, **Fig. 4b**, presentaron una digestión total, y las clonas 4, 5, 6 y 8 presentaron una digestión parcial. La clona 10 fue seleccionada para realizar la extracción del ADN plasmídico por CsCl. El ADN plasmídico purificado fue cuantificado por D. O. obteniendo una concentración final de 4µg/µl en solución TE.

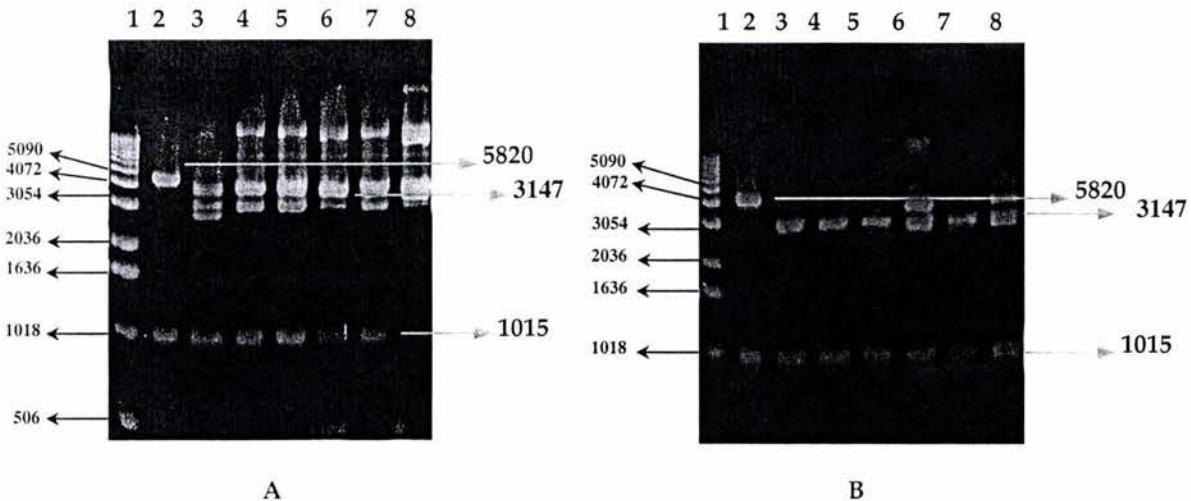


Figura 4. Análisis de restricción con la enzima *Avr II*, del ADN extraído por STETprep de las clonas transformadas con el fragmento religado de 4162pb para obtener el control mock. En el carril 1 se colocó el marcador de 1Kb y en el carril 2 se colocó un control del vector pEYFP-Actin sin digerir (**A** y **B**). Las digestiones de las clonas 1 a la 6, se colocaron en los carriles 3 al 8 del gel **A**. Las digestiones de las clonas 7 a la 12, se colocaron los carriles 3 al 8 del gel **B**. El producto de la doble digestión corresponde a dos fragmentos.

El vector obtenido de 4162pb fue denominado p(EYFP-actin)⁻ y fue utilizado como control mock en los experimentos de transfección. El ADN plasmídico del vector p(EYFP-actin)⁻ fue corrido en un gel para compararlo con el vector pEGFP-Actin, **Fig. 5**. En el carril uno se corrió el patrón de 1Kb, los carriles dos y tres corresponden al ADN del vector pEGFP-Actin, colocando 200ng y 100ng, respectivamente, observando una banda de 5820pb correspondiente al vector antes mencionado. Los carriles cinco y seis corresponden al vector p(EYFP-actin)⁻, en los cuales se corrieron 200ng y 100ng respectivamente. Se observa una banda de 4162pb en ambos carriles.



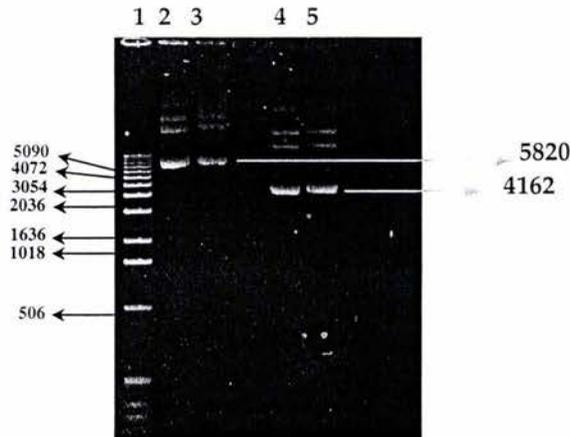


Figura 5. Análisis comparativo del vector construido $p(\text{EYFP-actin})^-$ de 4162pb y del vector $p\text{EGFP-Actin}$ de 5820pb, ambos purificados por CsCl. De cada vector se corrieron 200ng y 100ng respectivamente. En el carril 1 se colocó el marcador de 1Kb. En los carriles 2 y 3 se colocaron las dos concentraciones del ADN del vector $p\text{EGFP-Actin}$ y en los carriles 4 y 5 se corrieron las mismas concentraciones del vector construido $p(\text{EYFP-actin})^-$.

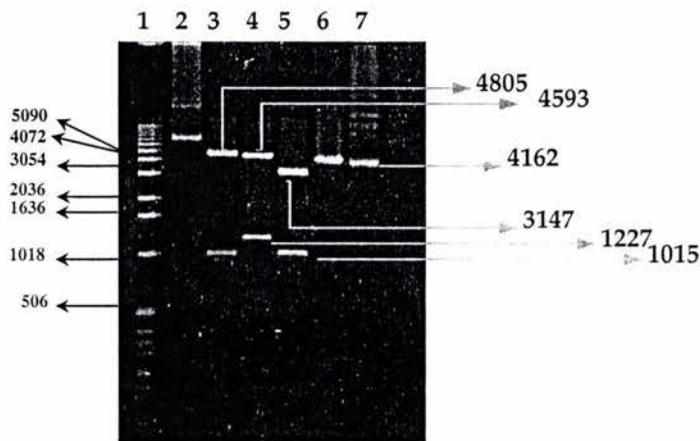


Figura 6. Análisis del patrón de restricción de los vectores $p\text{EGFP-Actin}$ y $p(\text{EYFP-actin})^-$. El análisis se realizó con las enzimas *Avr II* y *Hinc II* que reconocen dos sitios de corte. En el carril 1 se colocó el marcador de 1Kb. En los carriles 2 y 7, se colocaron los controles del vector $p\text{EGFP-Actin}$ y $p(\text{EYFP-actin})^-$ no digeridos. En los carriles 3 y 4, se colocaron las digestiones con *Avr II* y *Hinc II* respectivamente del vector $p\text{EGFP-Actin}$ y en los carriles 5 y 6 se colocaron las digestiones con *Avr II* y *Hinc II* respectivamente del vector construido $p(\text{EYFP-actin})^-$.



Los dos vectores fueron analizados con las enzimas de restricción *Avr* II y *Hinc* II como se muestra en la **Fig. 6** para observar su patrón de restricción. En el carril dos, se observa la banda de 5820pb del ADN plasmídico del vector pEGFP-Actin sin digerir, en el tercero y cuarto carril, se colocaron las digestiones del vector pEGFP-Actin con las enzimas *Avr* II y *Hinc* II. En el carril tres se observan los dos fragmentos obtenidos con la digestión de la enzima *Avr* II que corresponden a 4805pb el primero, y el segundo de 1015pb. En el carril cuatro, de la digestión con *Hinc* II, se obtuvieron dos fragmentos, el primero de 4593pb y el segundo de 1227pb y corresponden a los pesos esperados del vector de 5.8Kb, según el mapa de restricción (ver apéndice).

En los carriles cinco, seis y siete, se encuentran las muestras correspondientes al vector p(EYFP-actin)⁻. En el carril cinco, se colocó la digestión con la enzima *Avr* II y se obtuvieron dos fragmentos al igual que en el vector pEGFP-Actin, pero estos fueron de menor tamaño, el primero de 3147pb y el segundo de 1015pb. En el carril seis, se colocó la digestión con la enzima *Hinc* II, solamente se observa el fragmento correspondiente a 4162pb, lo cual indica que solo se linearizó el fragmento lo cual indica que uno de los sitios de corte que reconoce la enzima en el vector original de la región deletada se perdió. En el carril siete, se observa el ADN sin digerir del vector p(EYFP-actin)⁻ dando una banda de 4162pb que corresponde al fragmento religado. Estos datos confirman que la construcción p(EYFP-actin)⁻ corresponde a los resultados esperados.



Expresión de actina fluorescente en células MDCK.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron como modelo células epiteliales MDCK, las cuales fueron transfectadas con los vectores de expresión pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻ por medio de la técnica de co-precipitado con fosfato de calcio (Ca-Pi). Después de 48hrs post transfección, las células fueron seleccionadas con G-418 (Geneticina) a una concentración de 600µg/ml. A las 48hrs después de agregar la droga se observó muerte celular. Cabe señalar que al momento de adicionar la droga las células no fueron tripsinadas sino hasta después de dos semanas cuando se observó un crecimiento claro de colonias resistentes. Al transfectar con los vectores pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻ se obtuvo una eficiencia de transfección de aproximadamente 40%, Fig. 7. La gráfica representa tres experimentos por separado, tomando en cuenta el porcentaje de muerte celular contra los días transcurridos después de comenzar a seleccionar con G-418, comparando las células transfectadas con las células control, a las cuales se les trato de la misma forma, solo que no se les adicionó ADN plasmídico. La recuperación de las células transfectadas, se comenzó a observar a los 11 días después de adicionar G-418, y fueron tripsinadas cuando se observó aproximadamente un 60% de confluencia.

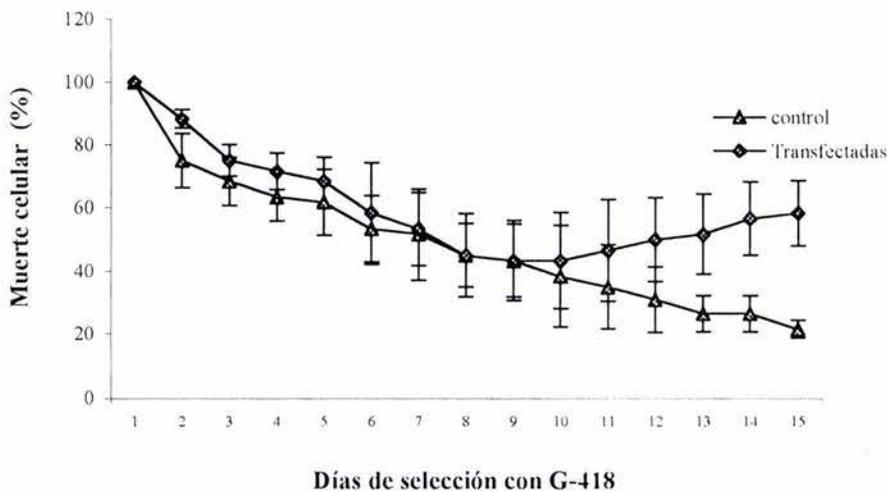


Figura 7. Eficiencia de transfección en las células MDCK por Ca-Pi. El porcentaje de muerte celular se evaluó 24hrs después de adicionar G-418. La gráfica representa tres experimentos independientes, con los dos vectores pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻. Después de 9 días de selección las células control mostraron un 40% de muerte. Las células transfectadas comenzaron a presentar una recuperación después de los 11 días en presencia de G-418 y entonces fueron resembradas. Las barras verticales representan la desviación estándar.



Las células MDCK control mostraron una muerte celular en los primeros días de hasta el 40%, aunque algunas células continuaron adheridas y resistieron hasta nueve días en presencia de G-418. Aunque las células se mostraban aparentemente en buenas condiciones al parecer quedaron adheridas al sustrato y no mostraron signos de crecimiento.

Las células transfectadas, después de 16 días de crecimiento en presencia del marcador de selección, fueron tripsinadas y cultivadas con medio condicionado DMEM complementado + 600µg /ml de G-418. A pesar de que las células crecían en presencia del marcador de selección (G-418), solo alrededor de un 60% expresaban en forma claramente visible la EGFP-actina al ser observadas al microscopio invertido de fluorescencia. **Fig. 8.** Las células transfectadas resistentes a G-418 presentaron características morfológicas semejantes entre ellas, aunque había diferencias en los niveles de intensidad de la expresión de la EGFP-actina.

Las células MDCK transfectadas fueron sometidas a una segunda selección después de dos pases semanales, dividiendo a las población en dos y colocando a un grupo de células con G-418 y otras no. Las células que contenían G-418 se mantuvieron así para asegurar la población resistente y las del segundo grupo se pusieron a prueba para ver si se había integrado el vector al cromosoma de las células. Después del segundo pase semanal, se reseleccionaron con medio DMEM con G-418. Después de la segunda selección las células mostraron un buen crecimiento lo cual aseguró que las células transfectadas si habían incorporado el ADN de cada uno de los vectores a su genoma y por lo tanto este se encontraba ahora regido por los mismos procesos metabólicos que el resto del genoma celular.

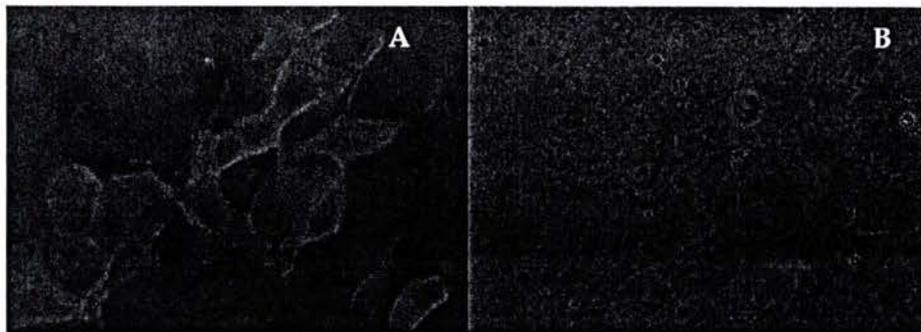


Figura 8. Expresión de la proteína verde fluorescente unida a actina (EGFP-actina), en células MDCK transfectadas por Ca-Pi. Después de dos pases semanales en presencia de G-418, se muestra que alrededor de un 60% de las células expresan la proteína fluorescente (A), la monocapa confluyente se aprecia en contraste de fases del mismo campo (B). Objetivo 40X.



A pesar de la sub-clonación no se pudo obtener una expresión homogénea de la proteína verde fluorescente unida a actina en las células MDCK. Este comportamiento puede estar relacionado con la forma de inserción del vector ya que fue una transfección de sitio no específica realizando una recombinación heteróloga al insertar el gen de β -actina humana en la línea celular MDCK. Otra posibilidad es alguna anomalía al momento de la traducción de la secuencia de la proteína transfectada propiciado por alguna deleción en la secuencia, o puede ser debido a algún problema relacionado con una degradación parcial de la proteína. Sin embargo, todas las células mostraron resistencia a G-418 lo que indica que la secuencia había sido insertada en el ADN de la célula.

En el caso de las células transfectadas con el vector $p(\text{EYFP-actin})^-$, pudo ocurrir un fenómeno similar, pero este no pudo ser detectado ya que el vector no presenta la secuencia bandera de la actina fluorescente y por lo tanto las células transfectadas no la expresan y solo presentan resistencia a G-418. **Fig. 9.** Probablemente con este control mock, no se pueda comprobar la existencia de alguna anomalía en la secuencia del vector ya que solo se puede comprobar la presencia del vector por medio de la resistencia a G-418, claro que alguna anomalía a cualquier nivel en la secuencia del vector o en la expresión parcial de la algún componente, representaría problemas para la célula, y si esta anomalía existiera en la región que codifica para la resistencia Kan/Neo o que afectará la expresión de alguna región derivaría en la muerte de las células al estar en presencia de G-418.

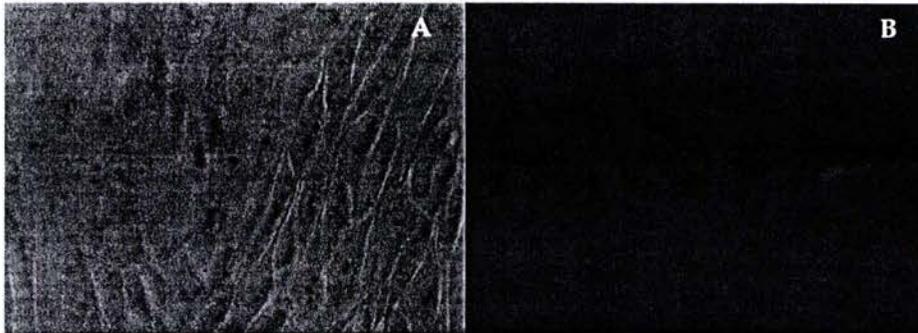


Figura 9. Células MDCK transfectadas con el vector $p(\text{EYFP-actin})^-$ del control mock creciendo en presencia de G-418. Las células después de dos semanas de selección fueron crecidas en medio condicionado obteniendo así el control mock. La imagen en contraste de fases muestra el crecimiento de las células en presencia de G-418 (A). La imagen del mismo campo vista con fluorescencia muestra que las células mock no expresan la proteína verde fluorescente unida a actina (B). Objetivo 40X.



Distribución de la EGFP-actina, en células MDCK.

Tomando en cuenta los resultados anteriores que indican una expresión diferencial en la población de células transfectadas de aproximadamente 60%, se consideró la sub-clonación de las células transfectadas para lograr una expresión de la proteína EGFP-actina más homogénea en la mayoría de las células. De las células sub-clonadas se eligieron tres clones con diferentes niveles de expresión de la EGFP-actina, las cuales fueron ampliadas y congeladas para tener un banco de reserva, las clonas seleccionadas fueron denominadas como Cl-4, Cl-6 y Cl-10 las cuales junto con las células mock se congelaron y almacenaron en N₂ líquido **Tabla 1**. Los ensayos sobre la organización y cambios en el citoesqueleto de actina fueron realizados con la clona Cl-4, la cual presentó un nivel de expresión alto y más homogéneo cuando se observaron bajo el microscopio de fluorescencia tanto en las monocapas sub-confluentes como confluentes **Fig. 10**. Aunque el proceso de clonación garantiza de algún modo el que se pueda obtener un mayor número de células que expresen la proteína fluorescente en forma homogénea, el nivel de expresión varía aun en las células que provienen de una misma. Las células de la clona Cl-4, presentaron este comportamiento, aunque se observa que dentro de la monocapa la intensidad de fluorescencia varía entre algunas células.

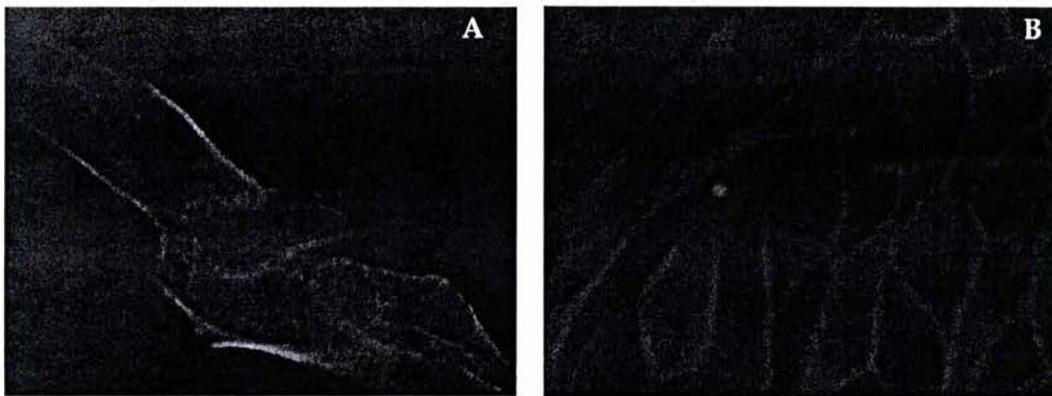


Figura 10. Células MDCK, expresando la EGFP-actina, clonadas por dilución. Las células clonadas (Cl-4) presentaron una expresión más homogénea en las monocapas sub confluentes (A) y confluentes (B), pero con distintos niveles de expresión. Observadas con objetivo de 63X.

Para poder descartar la posibilidad de que cualquiera de las propiedades funcionales de las células se vean alteradas o que el comportamiento de estas no represente los procesos normales debido al proceso de transfección y a la expresión de una proteína exógena deben hacerse varios controles. Las células MDCK transfectadas fueron analizadas para determinar la distribución de la EGFP-actina en el citoplasma utilizando un microscopio de fluorescencia, **Fig. 11**. Los resultados muestran que la EGFP-actina se localizó en varias estructuras del citoesqueleto de actina, encontrándose en las fibras de estrés que son numerosas, las microvellosidades y formando parte del anillo cortical en menor proporción en



células sub-confluentes. Este patrón se modificó cuando las células formaron monocapas confluentes, ya que la mayor parte de la EGFP-actina se organiza en el anillo cortical, en algunos filamentos de actina y contactos focales. Un menor porcentaje de la EGFP-actina se encontró distribuida en el citoplasma a excepción de algunas vesículas citoplasmáticas y alrededor del núcleo, correspondiendo a la actina globular (G-actina), en ambas fases de crecimiento.

La localización de la EGFP-actina en las células MDCK transfectadas al parecer corresponde al patrón esperado en cuanto a su distribución en el citoplasma. Para asegurarse de que en estudios más detallados se puedan obtener resultados representativos, se tiñeron las células transfectadas con faloidina-rodamina y se observó la colocalización de la actina endógena y la EGFP-actina correspondiente a la actina transfectada o exógena. Las imágenes fueron comparadas por medio de microscopía de fluorescencia con el filtro verde para la EGFP-actina y el filtro rojo para observar la faloidina. Las observaciones se realizaron con cada una de las dos señales y con los filtros correspondientes. La colocalización fue realizada con la ayuda de un programa de computadora, en el cual se procesaron las dos imágenes de un mismo campo haciendo la sobreposición en las imágenes de la computadora.

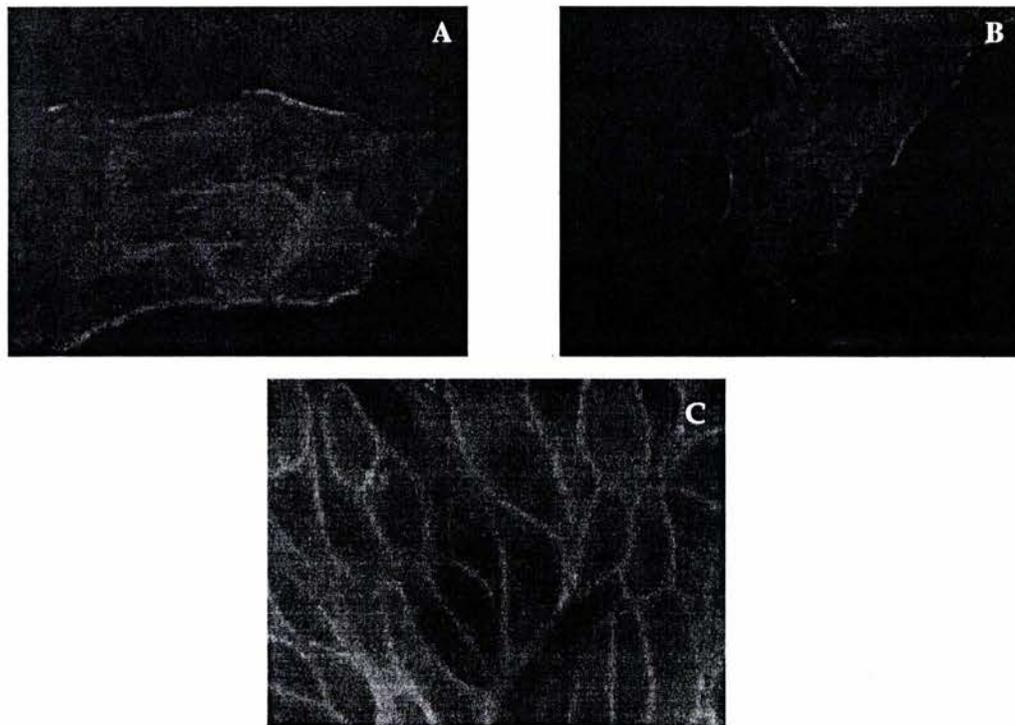


Figura 11. Distribución de la EGFP-actina en células MDCK. La actina fluorescente se localizó en distintas estructuras del citoesqueleto de actina como los filamentos de actina y microvellosidades (A), las fibras de estrés (B) y formando parte del anillo cortical (C). De esta figura en adelante todas las imágenes se tomaron con el objetivo 63X.



En las células transfectadas marcadas con faloidina, los filamentos de actina presentan una buena correlación con respecto a la señal emitida por la EGFP-actina, la sobreposición de las dos imágenes proporciona así la colocalización de las estructuras del citoesqueleto dando como resultado de la mezcla de los colores verde y rojo, un color amarillo **Fig. 12**. Alrededor de un 85-90% de las estructuras del citoesqueleto de actina teñidas corresponden al color amarillo **Fig. 12** (colocalización). La porción que no colocaliza con la tinción de faloidina y que da como resultado un fondo verde, corresponde a la porción G-actina de la EGFP-actina. La EGFP-actina, al parecer se incorpora en los mismos sitios que la F-actina endógena marcada con faloidina, formando parte de las distintas estructuras del citoesqueleto de actina, y su expresión parece no afectar la morfología de las células MDCK, además de que no altera la organización y distribución del citoesqueleto.



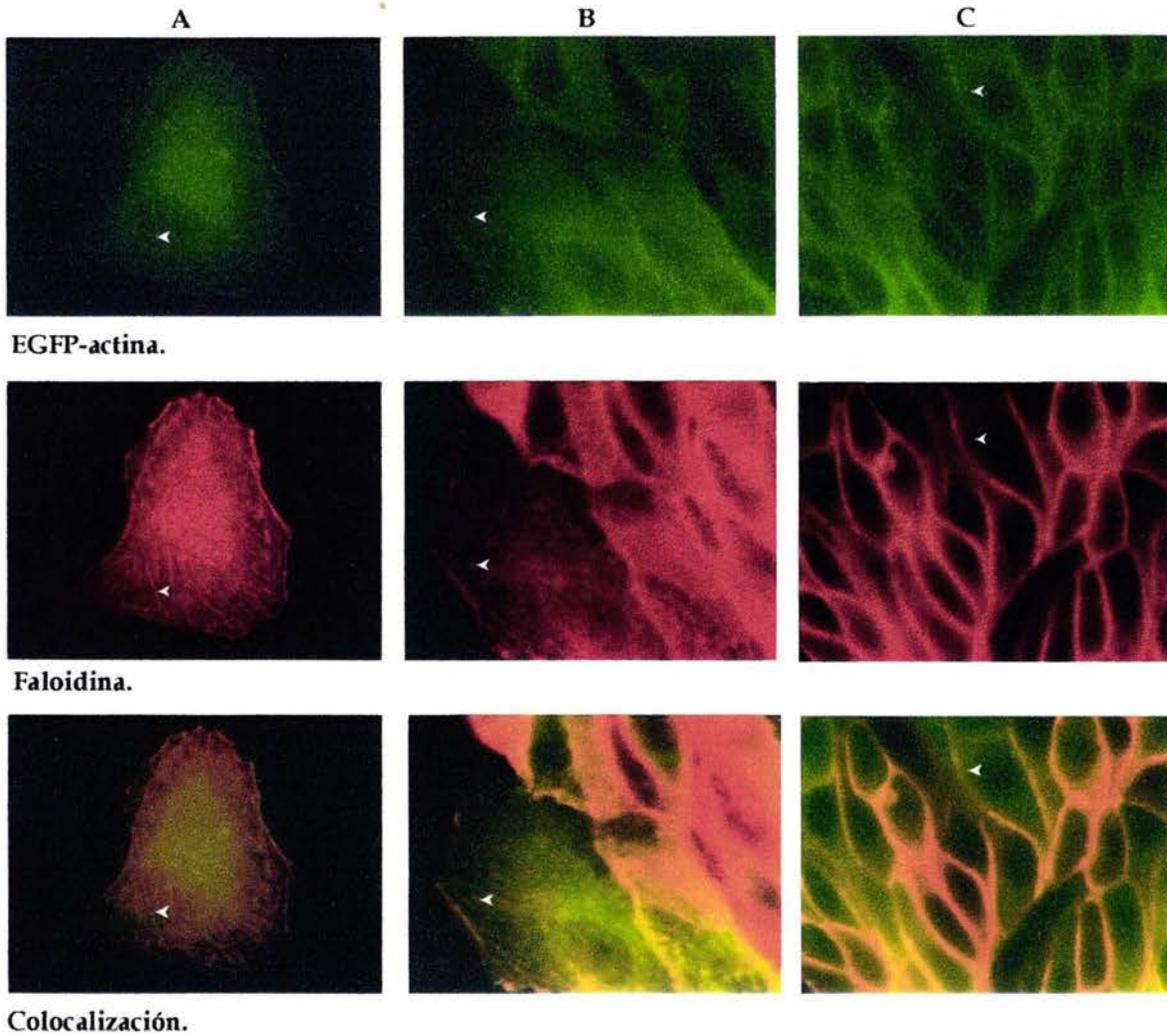


Figura. 12. Distribución de actina en células MDCK expresando la EGFP-actina y marcadas con faloidina-rodamina. El análisis de colocalización de las dos imágenes del mismo campo muestran aproximadamente un 85-90% de colocalización (color amarillo) entre las estructuras del citoesqueleto como las fibras de estrés (A), los filamentos de actina y las microvellosidades (B) y la actina del anillo cortical (C). El fondo verde corresponde a la G-actina.

Organización del citoesqueleto de actina en células transfectadas.

Un punto importante que hay que tomar en cuenta cuando se pretende estudiar los procesos que dependen del citoesqueleto de actina en células transfectadas, es verificar, que con la actina fluorescente transfectada y expresada en las células, se puedan observar procesos en donde se tiene una participación activa del citoesqueleto, como por ejemplo la modificación que sufren los filamentos de actina al tratar a las células con citocalacina D, droga la cual se sabe, desensambla los filamentos de actina. Para poder observar que la actina fluorescente, no solo se localizará en los mismos sitios que la actina endógena, sino que también se comporta de manera similar, se trataron células MDCK, transfectadas expresando de forma estable la EGFP-actina con citocalacina D, a una concentración de 4µg/ml. Las observaciones se realizaron a distintos tiempos fijando las células y haciendo un marcaje con faloidina-rodamina. Los resultados muestran que a los 15min después de adicionar la citocalacina D, hay modificaciones en los filamentos de actina que se agregan para formar cúmulos pequeños distribuidos en el citoplasma, correspondiendo al efecto de desorganización por la acción de la citocalacina D, **Fig. 13**. Las modificaciones provocadas al citoesqueleto se fueron incrementando conforme el paso del tiempo, de forma que a los 30min, se observan cambios dramáticos en la conformación de los filamentos y aparecen cúmulos en mayor cantidad, estas modificaciones se observaron de forma progresiva hasta los 60min, con un desarreglo casi total de los filamentos de actina tanto de la EGFP-actina como de la F-actina marcada con faloidina. La desorganización de los filamentos de actina en su mayoría se observa en forma de agregados, pero también se pueden apreciar algunos filamentos bien definidos con su organización normal en algunas zonas de las células transfectadas y marcadas. Este resultado indica que el comportamiento de la EGFP-actina en las células transfectadas al ser tratadas con citocalacina D, es similar al de la actina endógena marcada con faloidina. La EGFP-actina permitió observar la reorganización y los cambios sufridos por los filamentos de actina al poner a interactuar a las células con drogas que provocan efectos deletéreos al nivel del citoesqueleto de actina. Además la colocalización de las estructuras modificadas en las células doblemente marcadas fue de un 90% a los diferentes tiempos. Esta colocalización también se observó en células normales no tratadas con la droga.



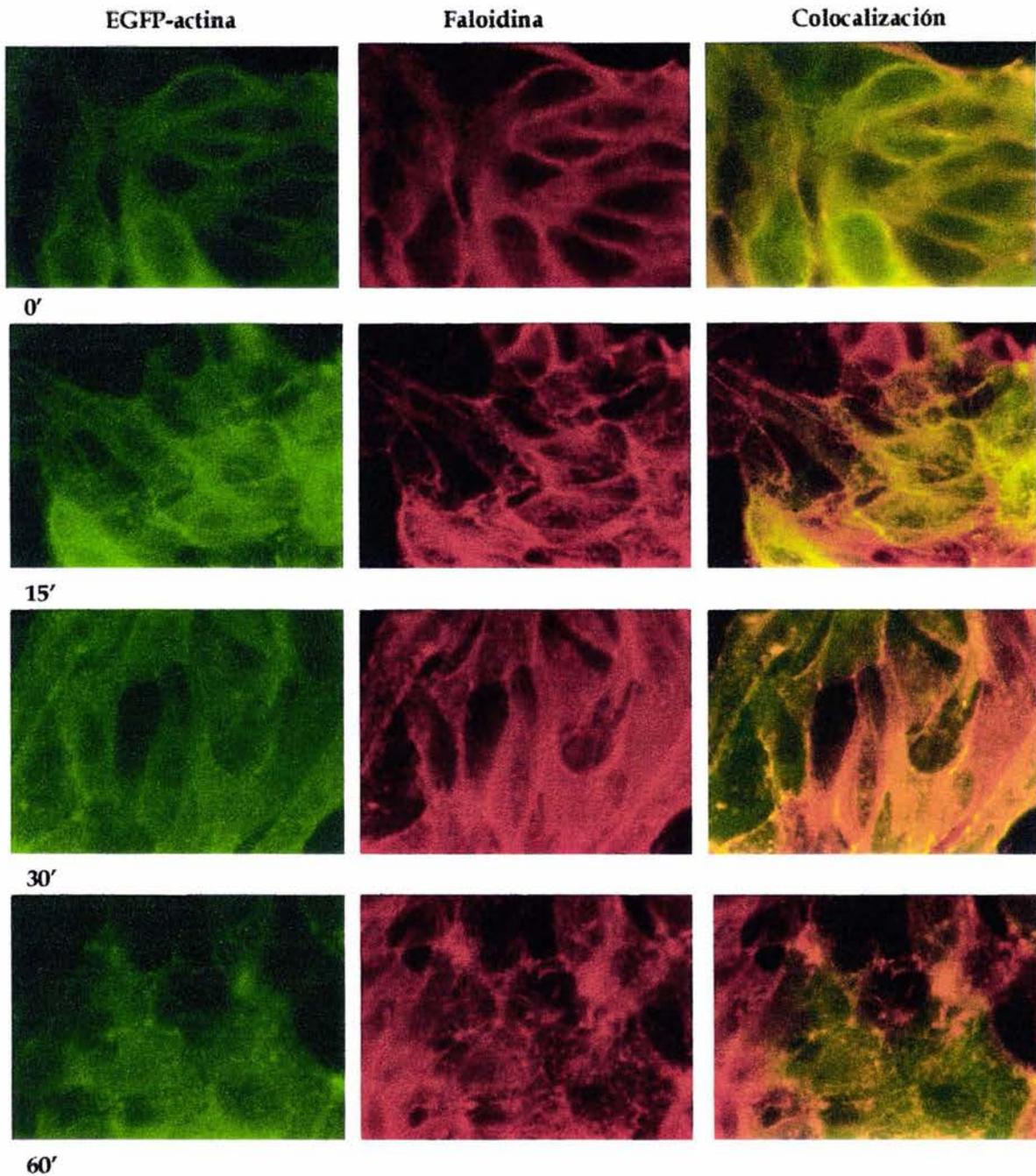


Figura. 13. Organización del citoesqueleto de actina en células MDCK transfectadas y tratadas con Citocalacina D (4µg/ml). Las alteraciones se observan a los 15' de colocar la citocalacina D, la desorganización de los filamentos es progresiva hasta los 60' en donde se aprecia una desorganización casi total, con respecto al tiempo 0'. En primera columna se encuentran las células con EGFP-actina (verde). En la segunda columna se muestran las células marcadas con faloidina-rodamina (rojo). En la tercer columna se muestran las imágenes de colocalización en donde se observa un 90% de correlación entre las dos imágenes (amarillo).



Infección de células MDCK con el virus dengue 2 (VD-2).

Los virus presentan distintas estrategias para invadir a su célula blanco, utilizando diversas rutas para poder penetrar y utilizar así la maquinaria celular durante su replicación. Esta invasión depende de la susceptibilidad de la célula, por ello, para poder estudiar los efectos causados por el VD-2 en células epiteliales, fue necesario determinar si la infección del VD-2 en células MDCK, era o no productiva. Para esto se infectaron las células MDCK y se observó la progresión de la infección a distintos tiempos, localizando la presencia del virus por medio de inmunotinción de la proteína E de la cápside y así saber el momento en que las células eran infectadas, **Fig. 14**. En primera instancia se infectaron células MDCK, no transfectadas, para establecer las condiciones óptimas del proceso de infección. Los resultados obtenidos después de 12hrs post infección muestran muy pocas células marcadas con el anticuerpo, **Fig. 14A**. Después de 24hrs post infección, la señal emitida por la proteína E marcada, fue más clara dentro de las células MDCK, observándose en forma de pequeños puntos y agregados distribuidos en el citoplasma, pero aun sin haber un porcentaje significativo de células infectadas, **Fig. 14B**. A las 48hrs, se observó una señal fuerte del anticuerpo contra la proteína E en las células infectadas, además de un mayor número de células emitiendo la señal (aproximadamente un 35% de la monocapa inoculada con el virus), **Fig. 14 (C y D)**. La tinción con el anticuerpo contra la proteína E, en células, mostró que la infección con el VD-2 es productiva en las células MDCK, además de que a las 48hrs post infección, se observó la aparición de unas estructuras que presentan una forma de fibras gruesas, distribuidas en el citoplasma. Esto sugiere que la infección del virus puede estar reorganizando alguna estructura del citoesqueleto. Otra posibilidad es que las partículas vírales al ensamblarse, se organicen de esta forma dentro de la célula y por ello se observen al momento de marcar la proteína E con los anticuerpos. La tinción de la proteína E viral junto con la presencia de las estructuras en forma tubular son un efecto directo del virus sobre las células MDCK, ya que no se observó ningún tipo de señal en las células control infectadas, tratadas solo con el segundo anticuerpo y células control no infectadas tratadas con los dos anticuerpos. Por otro lado, las imágenes de las células en contraste de fases indican que el virus provoca pequeñas modificaciones morfológicas de las células como la presencia de pequeñas vesículas en la membrana, observándose un aumento en el volumen. Cabe señalar que las estructuras observadas después de 48hrs post infección, aparecieron la mayoría de los casos, en células en etapa de sub-confluencia, lo cual sugiere que las células en estas etapas de su crecimiento, suelen ser más susceptibles a ser infectadas y que los efectos en el citoesqueleto provocados por la infección son más dramáticos. La infección en células que presentaron una confluencia de casi el 100% se vio disminuida, además de que las estructuras que se presentaron en las células sub-confluentes no se observaron en las monocapas confluentes.



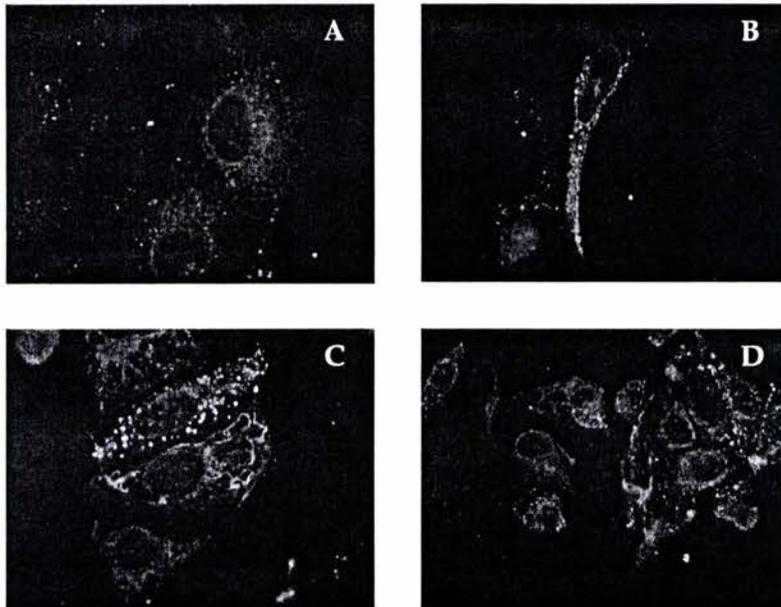


Figura 14. Tinción indirecta de la proteína E del virus del Dengue en células MDCK a las 12hrs, 24hrs y 48hrs post infección. La señal de la proteína E, a las 12hrs es poco clara(A), a las 24hr se observa mayor cantidad de células infectadas y con una señal más localizada (B). A las 48hrs la infección es muy clara, además se aprecian estructuras filamentosas (C y D).

Organización del citoesqueleto de actina en células MDCK transfectadas e infectadas con DV-2.

En células epiteliales MDCK, modificaciones provocadas por la infección con el virus del Dengue no se han reportado hasta este momento, por tanto, es necesario caracterizarlas de tal modo que se pueda contar con una referencia que permita la identificación de los cambios que sufren las células y las estructuras del citoesqueleto que tienen participación. Los resultados muestran que las células MDCK, presentan susceptibilidad a la infección con el VD-2 y que al momento de marcar con anticuerpos contra la proteína E de la envoltura del virus, se observa la formación de estructuras filamentosas gruesas, junto con zonas punteadas que indican la presencia del virus. Estas estructuras pueden estar relacionadas con la modificación de alguna estructura del citoesqueleto. En este caso se utilizaron células mock y así obtener preparaciones doblemente marcadas con la proteína E viral y faloidina, **Fig. 15**. Los resultados obtenidos indican que a las 48hrs post infección, la células presentan una modificación del citoesqueleto de actina afectando de forma evidente a los filamentos los cuales se reorganizan formando estructuras atípicas en el interior del citoplasma y la actina cortical de las células infectadas en algunos casos se pierde. Los efectos provocados por la infección con el VD-2 en las células coinciden con las modificaciones morfológicas de las células



antes descritas, con un aumento de volumen Fig. 15A. En esta misma muestra se hizo la tinción de la proteína E viral. Al tomar las imágenes del mismo campo con los filtros verde y rojo, las modificaciones vistas con faloidina coincidieron con las zonas que se tiñeron al marcar la proteína E viral y la actina. Esto es que las células infectadas presentan modificaciones del citoesqueleto de actina en comparación con el resto de la monocapa, además esta modificación de los filamentos colocaliza con las estructuras formadas al realizar la tinción de la proteína E, Fig. 15B. Este patrón fue registrado en varias muestras, lo que permite sugerir que la relación de la infección con la modificación de los filamentos de actina son un efecto provocado el virus.

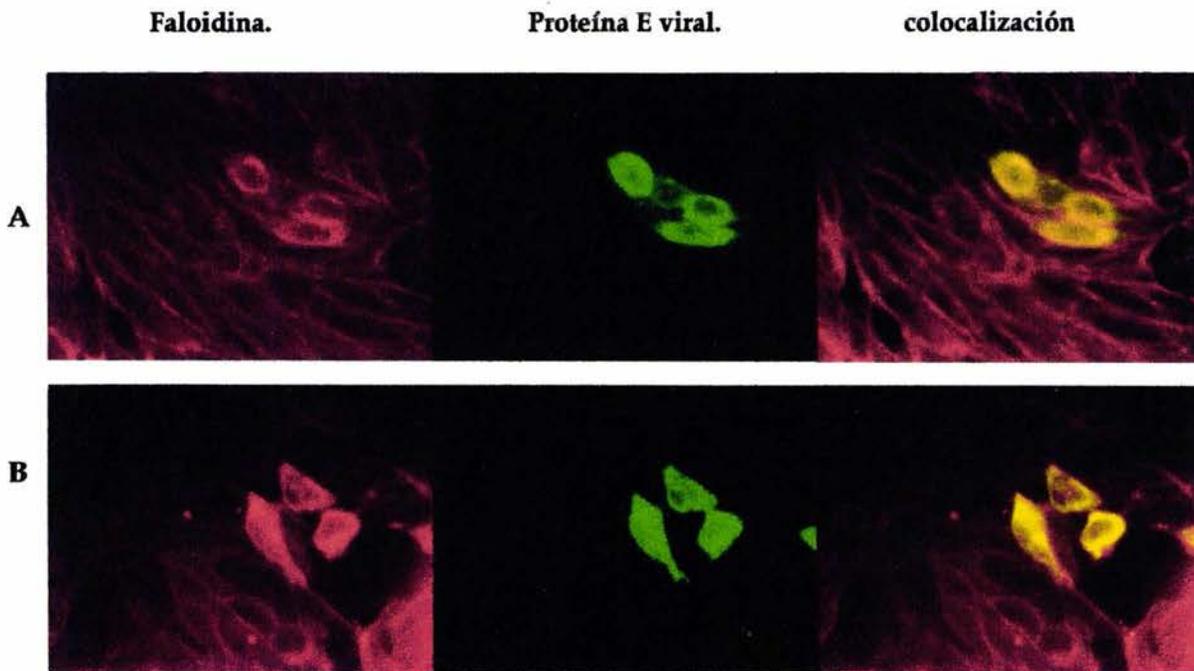


Figura 15. Células MDCK mock, infectadas con VD-2, después de 48hrs. Las células fueron teñidas con el anticuerpo contra la proteína E y en 2° anticuerpo marcado con Alexa y marcadas con faloidina para los análisis de colocalización. La señal de la proteína E coincide en las células teñidas con faloidina-rodamina que muestran alteraciones en los filamentos, (A). En las células se observa la modificación de los filamentos que colocalizan con la tinción de la proteína E, (B). Izquierda (faloidina), centro (Proteína E) y derecha (colocalización en amarillo).



Por otro lado, la ventaja de poder contar con las células transfectadas que expresan la EGFP-actina, permitió observar los cambios provocados por el virus tanto con la F-actina como en la G-actina. Las células transfectadas e infectadas con el virus del Dengue, fueron tratadas de la misma forma que las células mock, solo que en este caso las células fueron fijadas, montadas y observadas directamente en el microscopio de fluorescencia. Los resultados muestran que con la EGFP-actina, que se expresa en las células se pueden percibir las modificaciones que sufre el citoesqueleto de actina al infectar con el VD-2, **Fig. 16**. Los efectos causados por el VD-2 en las células transfectadas, son similares a los encontrados en las células mock. En las células infectadas que expresan la EGFP-actina, se aprecia la desorganización de los filamentos de actina de formas muy variadas, desde proyecciones en todas direcciones formadas por los filamentos y la formación de pequeños cúmulos de los filamentos de actina dispersos en la parte apical de las células, hasta la formación de estructuras poco típicas de los filamentos y la pérdida del anillo cortical, lo cual podría provocar que las uniones entre las células se vayan disminuyendo hasta perderse. Las modificaciones morfológicas en las células infectadas van desde el aumento en tamaño hasta la forma poco característica de crecimiento, estas modificaciones son evidentes ya que contrastan con las células vecinas no infectadas hasta el momento de la fijación al igual que con las células mock. Un aspecto sobresaliente que se observa en las imágenes es la presencia de las estructuras filamentosas formadas de manera mas marcada por los filamentos de actina en células sub-confluentes **Fig. 17**, que como ya se ha comentado, están relacionadas con el efecto que provoca la infección con el VD-2. En las células que expresan la EGFP-actina la formación de las estructuras no presenta un patrón definido, lo que es cierto es que son modificaciones de los filamentos en respuesta a la infección y que pueden llegar a alterar algunos procesos funcionales que dependen del citoesqueleto de actina. Cabe mencionar que a diferencia de las tinciones realizadas con faloidina, en las células transfectadas se observa el fondo verde el cual corresponde a la G-actina. Es claro que las estructuras formadas por la reorganización de los filamentos de actina son un efecto directo de la penetración del virus, pero cabe la posibilidad de que no solamente los filamentos de actina se vean afectados por la infección.

Los microtúbulos junto con los filamentos de actina son uno de los componentes mayoritarios del citoesqueleto, y el comportamiento dinámico de ambos es fundamental para llevar a cabo funciones vitales en las células, como la migración, la adhesión y la retracción celular, además de los procesos desencadenados en respuesta a interacciones con agentes infecciosos. Por esta razón se analizó en estas células si había modificaciones provocadas por la infección con VD-2 al nivel de los microtúbulos, para así tener una visión más amplia sobre los efectos que provoca la infección en el citoesqueleto. Las células MDCK fueron infectadas de la misma forma que para visualizar actina y la proteína E. La tubulina total se localizó utilizando anticuerpos dirigidos contra la β -tubulina total.



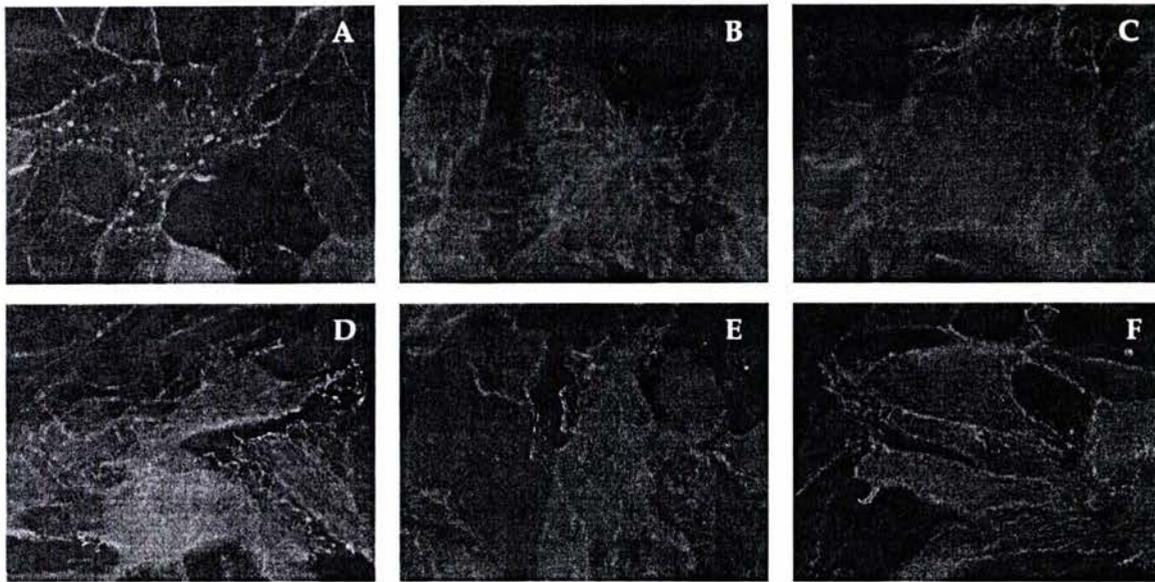


Figura 16. Células MDCK expresando la EGFP-actina infectadas con el VD-2 después de 48hrs en las monocapas confluentes. Las modificaciones de la actina muestran distintas características en las células infectadas, desde la formación de pequeños agregados (A), la desorganización de los filamentos (B, C y D), hasta los formación de estructuras filamentosas atípicas de los filamentos de actina (E y F).

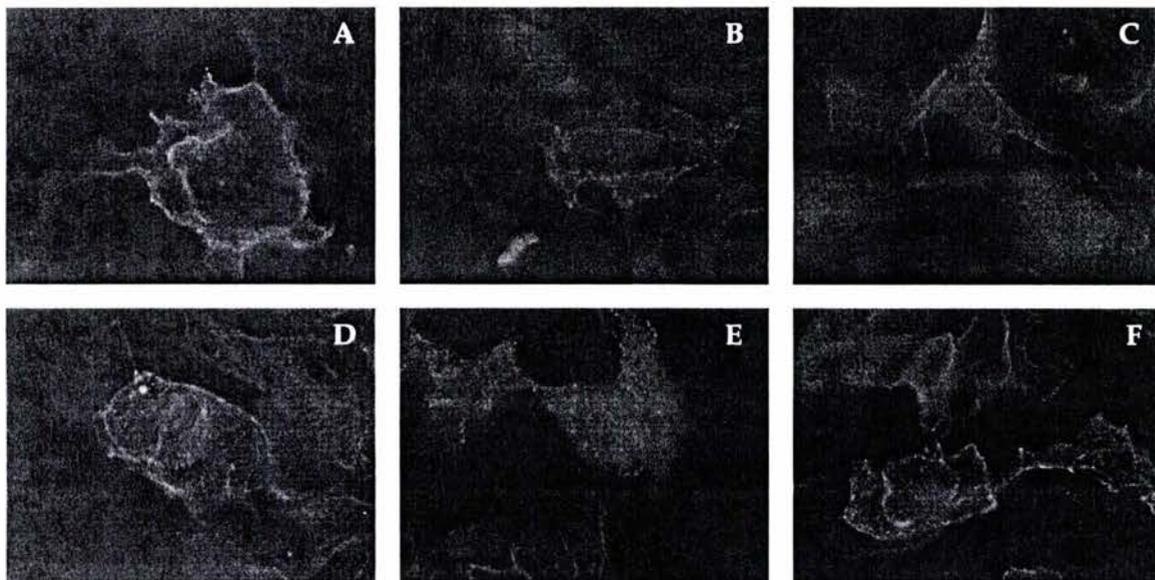


Figura 17. Células MDCK expresando la EGFP-actina, después de 48hrs infectadas con el VD-2 en monocapas sub-confluentes. En las células se aprecia la presencia de las estructuras filamentosas provocadas por la infección con el VD-2, al teñir la proteína E del virus (A, B y C). Estas estructuras presentan una organización muy variada formando filamentos más gruesos distribuidos azarosamente en el citoplasma (D y F). También se observa la desorganización de los filamentos proyectándose en todas direcciones (E).



Los resultados obtenidos después de 48hrs post infección, muestran que en las células MDCK teñidas con anticuerpos contra la β -tubulina total, hay una alteración en la organización de los microtúbulos en comparación con las células del control no infectadas. Los cambios observados son dramáticos a este tiempo en las células infectadas, **Fig. 18**. Las modificaciones que sufren las células infectadas se observan como una pérdida de la organización reticular a lo largo de las células. Los microtúbulos que aún permanecen polimerizados, distribuidos en todo el citoplasma, en algunos casos se observan segmentados y sin patrón definido (**Fig. 18, B y E**), estos efectos se ven más marcados en células sub-confluentes. Además se puede observar que los efectos acusados por la infección provocan que el espacio del núcleo que se observa en las células normales, se vea mas agrandado. En otras zonas de la monocapa, las células infectadas se observan un poco agrandadas en comparación con las células vecinas, mostrando de la misma forma, modificaciones de los microtúbulos, (**Fig. 18, C y F**). Las células no infectadas muestran el patrón característico de los microtúbulos en las células MDCK, organizándose desde las zonas perinucleares hacia los extremos de la célula (**Fig. 18, A y D**).

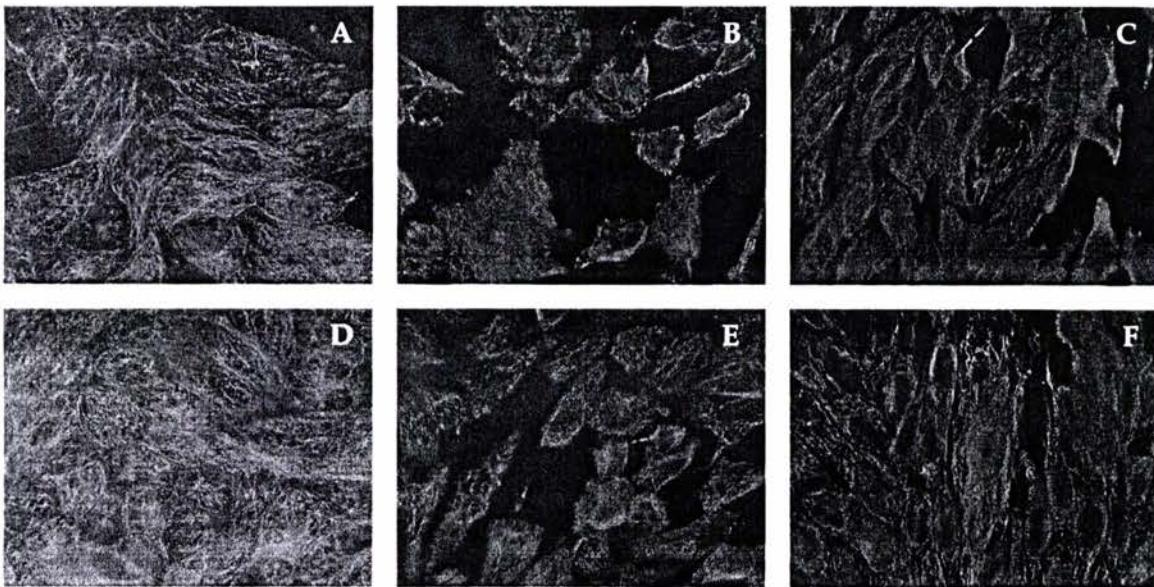


Figura 18. Tinción indirecta de β -tubulina total, en células MDCK mock, después de 48hrs post infección con VD-2. Las células control muestran el patrón de organización de tubulina normal en monocapas confluentes (A y D). Las células presentan una desorganización de los microtúbulos en monocapas sub-confluentes (B y E). En alguna zonas de la monocapa, las células infectadas muestran aumento del volumen (C y F).



En una zona donde la monocapa se encontraba sub-confluyente, se observó un fenómeno extraño ya que la organización de la tubulina se presentó muy irregular en particular en esta célula infectada, **Fig. 19**. Los microtúbulos marcados con el anticuerpo, muestran la desorganización total de la tubulina, formando estructuras tubulares de gran tamaño a lo largo de la célula en comparación con los microtúbulos en células normales, además hay una gran cantidad de fondo que pertenece a la tubulina difusa en el citoplasma marcada por el anticuerpo. Al comparar la imagen del mismo campo en contraste de fases se observó una morfología celular alargada y estrellada que no corresponde a la morfología normal de esta línea celular. Todas las modificaciones en la organización de los microtúbulos son producto de la infección con el VD-2, ya que ninguno de estos patrones se observó en las células control.

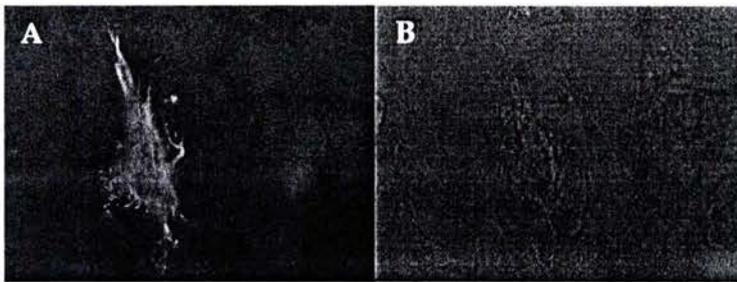


Figura 19. Tinción indirecta de β -tubulina total de células MDCK mock, infectadas con el VD-2 después de 48hrs. Particularmente en estas imágenes, la célula infectada muestra una desorganización total de los microtúbulos observándose cambios dramáticos y proteína difusa en el citoplasma (A). La morfología de la célula infectada es poco característica de estas células epiteliales como se ve en la imagen del mismo campo en contraste de fases (B).



Cambios en la organización del citoesqueleto de actina durante la infección de células MDCK a tiempos cortos.

Una de las ventajas más atractivas que ofrece el trabajar con la fusión de la EGFP-actina expresada en células de mamífero, reside en que se puede utilizar para observar los cambios que sufre el citoesqueleto de actina en procesos que requieren largos periodos de tiempo. Esta característica puede ser aprovechada para monitorear los cambios que experimentan las células al interactuar con agentes infecciosos y hacer un seguimiento de los cambios, dada la expresión permanente de la proteína en las células. Por otro lado, también permite la observación en las primeras etapas de algún proceso como la interacción con agentes externos.

Además de los efectos provocados a las células MDCK que expresan la EGFP-actina al ser infectadas con el VD-2 después de 24 y 48hrs, es interesante monitorear los procesos que tienen que ver con la interacción virus-célula a tiempos cortos ya que no se tienen reportes de los efectos que provoca el VD-2 en células epiteliales.

Para ello se establecieron controles utilizando las células del control mock, infectándolas con el VD-2 y fijándolas después de 1 y 2hrs de interacción con el virus y de esta forma al momento de monitorear el evento en las células MDCK que expresan la EGFP-actina se puedan comparar los cambios más fácilmente. Las células fijadas fueron utilizadas para la doble tinción con faloidina-rodamina y con el anticuerpo contra la proteína E viral, Fig. 20.



Figura 20. Tinción indirecta de la proteína E del VD-2 en células MDCK infectadas a las 2 y 3hrs. En las células control no infectadas a los dos tiempos no muestran ninguna señal de la proteína E, (A). La señal a las 2hrs de interacción con el VD-2 es escasa (B). Las células a las 3hrs de interacción con el VD-2, muestran un aumento en la señal pero muy pocas células muestran modificaciones (C). La proteína E teñida con Alexa se indica con las puntas de flecha.

Al realizar la inmunotinción de la proteína E en las células, se observó una señal escasa distribuida en distintas partes del campo visual. la mayoría de las partículas virales se encuentran adheridas a las células desde las 2hrs de interacción. En las células control no infectadas no se observó ninguna señal a los mismos tiempos.

Estos resultados fueron complementados con las imágenes obtenidas al observar la tinción con faloidina de la misma muestra para observar las modificaciones en los filamentos de actina de las células a las que estaban adheridos los virus, Fig. 21.



Las células infectadas fueron comparadas con las células control no infectadas, Fig. 21. A las 2hrs se observa que hay acumulación de los filamentos de actina en el anillo cortical en algunos sectores, en otras células este comportamiento es similar solo que se observa en toda la periferia de la célula haciendo que el anillo cortical se aprecie un poco engrosado. Por otro lado, en zonas donde no se presenta esta acumulación tan marcada, el anillo cortical se observa en algunas partes segmentado y no bien definido, Fig. 21(B y C).

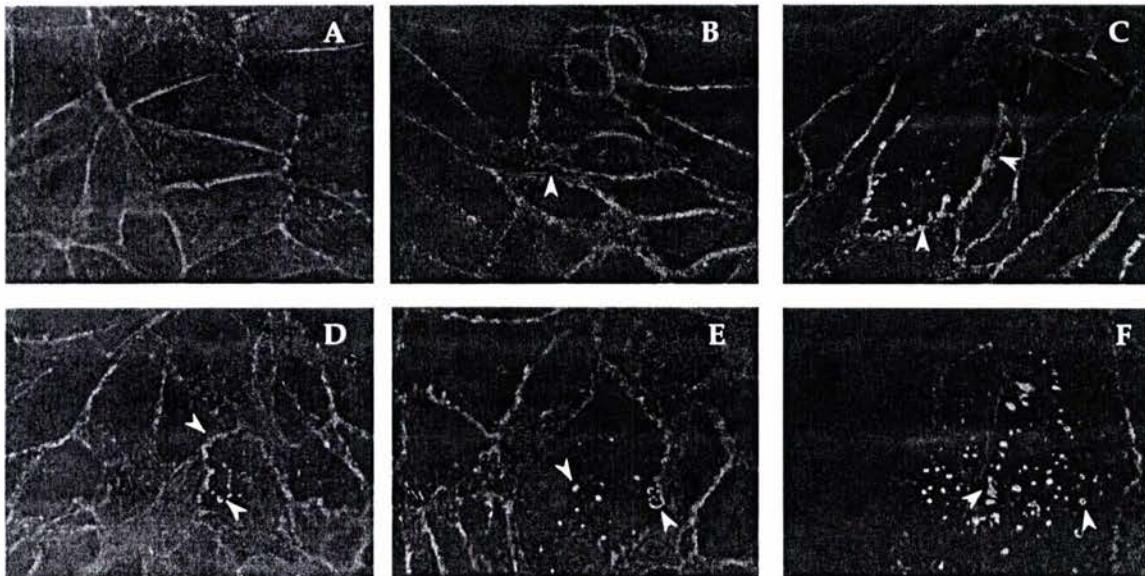


Figura 21. Tinción directa de F-actina con faloidina en células MDCK del control mock, infectadas con el VD-2 a las 2hrs y 3hrs. Las células comienzan a experimentar modificaciones desde las 2hrs con respecto al control (A). A las 2hrs, el anillo cortical presenta la acumulación de actina en algunas partes o de forma uniforme, (B y C). A las 3hrs, las modificaciones se ven más marcadas (D y E) y se observa la aparición de acumulaciones en forma de círculos en la parte apical de la células infectadas (F). La puntas de flecha indican la agregación de los filamentos.



Un detalle importante en las observaciones es la presencia de pequeñas acumulaciones de los filamentos de actina en forma de círculos asemejando a pequeñas donas distribuidas en el citoplasma en la parte apical de la célula, estas formaciones pueden ser sitios de unión de las partículas virales con la célula propiciando la polimerización de los filamentos en esas zonas, Fig. 21F. Después de las 3hrs de interacción, los efectos se ven más marcados además que se observa un aumento de la actina marcada en las microvellosidades de forma importante, Fig. 21 (D y E), en comparación con las células control. Los resultados obtenidos indican que en etapas tempranas se llevan a cabo modificaciones de los filamentos de actina al momento de que las partículas virales hacen contacto con la célula y que esto puede iniciarse por una serie de procesos de señalización que derivan en la posterior infección de las células.

Teniendo ya algunos antecedentes sobre el tiempo en que se comienzan a observar los cambios y los efectos que sufren los filamentos de actina en las etapas tempranas de la infección en las células infectadas y teñidas, el siguiente paso fue utilizar el sistema modelo con las células MDCK que expresan la EGFP-actina de forma estable y observar si los efectos causados por la infección con el VD-2 son perceptibles en este sistema y de esta forma determinar si el sistema modelo de MDCK expresando al EGFP-actina es lo suficientemente sensible para estudiar la dinámica de actina en respuesta a la interacción con agentes infecciosos.

Las células MDCK de la clona 4 que expresan la EGFP-actina, fueron inoculadas con el VD-2 después de 48hrs de crecimiento en etapa de sub-confluencia y se monitorearon para observar los cambios que presentaban los filamentos de actina desde los 30min, 1, 2 y 3hrs de interacción con el virus, mismos tiempos que fueron utilizados con las células del control mock. Cabe mencionar que en este caso los cambios se observaron siguiendo la fluorescencia de la EGFP-actina en células fijadas, Fig. 22.

Las células MDCK que expresan de forma estable la EGFP-actina comienzan a experimentar una reorganización de los filamentos desde los 30min mostrando la aparición de proyecciones en los márgenes de la célula y la formación de pequeñas acumulaciones en la zona apical. Después de 2hrs de interacción con el VD-2 muestran una acumulación o polimerización de los filamentos de actina en zonas cercanas a la membrana celular, en células individuales, desde la organización de los filamentos en ciertas zonas acompañadas de acumulaciones de estos en la parte apical de las células y la acumulación de la actina en la región del anillo cortical mostrando un engrosamiento de éste, Fig. 22 (D y E), al igual que lo observado en las células del control mock. En estas células el patrón no es tan definido y se pueden encontrar variaciones dentro de la misma muestra, además de que el número de células infectadas es muy bajo hasta este momento.

A las 3hrs de interacción con el virus, al igual que en las células del control mock, modificaciones se ven más marcadas, observando a los filamentos de actina acumulados en la región del anillo cortical y también la presencia de las pequeñas estructuras en forma de donas o algunas otras como puntos que, como ya se dijo



anteriormente, pueden ser zonas de contacto con el virus, las cuales vistas desde arriba muestran esta forma y probablemente al tener una imagen desde la parte lateral de la célula pudiesen corresponder a protuberancias en donde se realiza el primer contacto del virus con la célula **Fig. 22 (G, H e I)** . En el caso de las acumulaciones de la actina en la zona del anillo cortical, también pueden ser zonas de contacto, y al ser esta línea celular que presenta dos regiones, la apical y la basolateral que son distintas entre si, la zona basolateral que es donde se encuentran las acumulaciones de los filamentos de actina, se tengan mayores sitios de contacto que reconoce el virus que en la zona apical. Es muy importante decir que a estos tiempos las modificaciones que sufren los filamentos de actina no son tan dramáticas y que el primer contacto del virus puede desencadenar una serie de señalizaciones para posteriormente facilitar la entrada a la célula e infectarla.



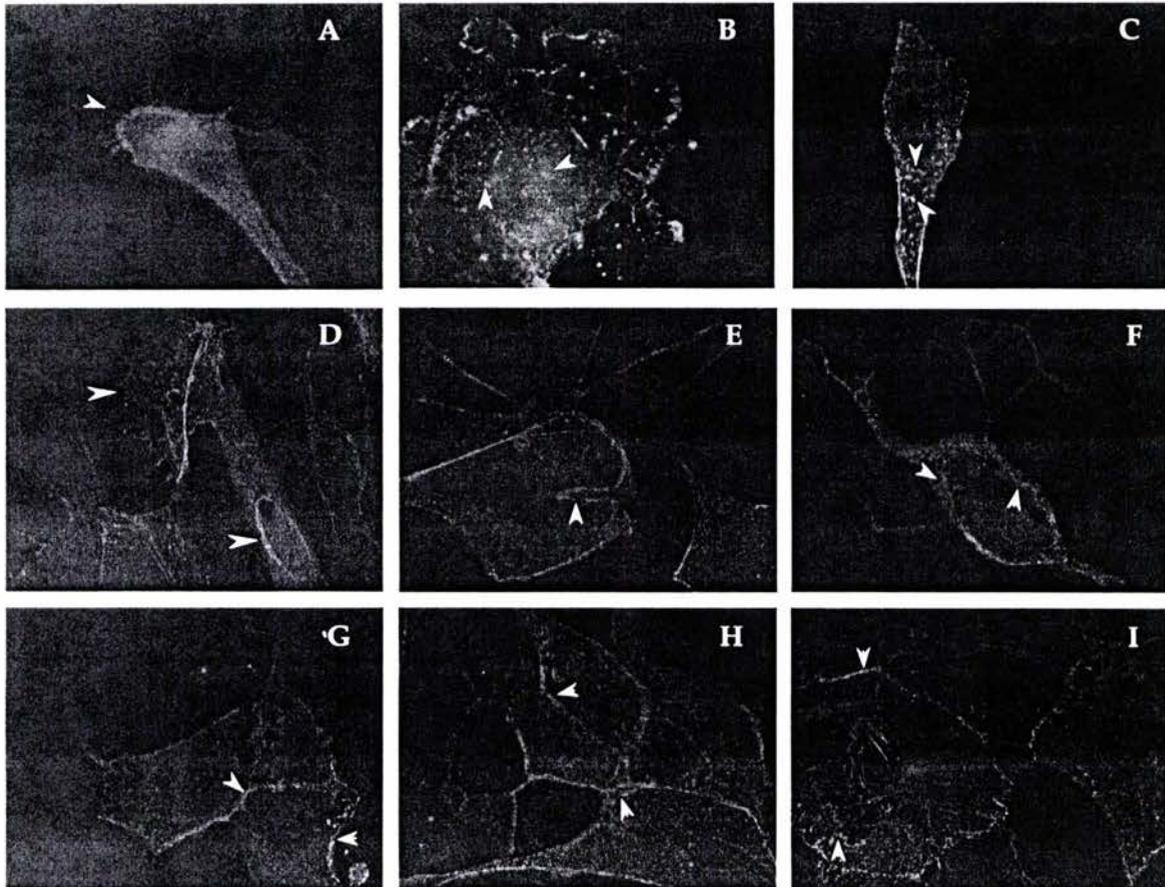


Figura 22. Células MDCK expresando la EGFP-actina, infectadas con el VD-2 en las primeras etapas de interacción. Las células infectadas muestran la reorganización de actina desde los 30min de interacción (A) y 1hr (B y C). Después de 2hrs de interacción con el virus, las células comienzan a experimentar una reorganización del citoesqueleto de actina acumulándose en ciertas zonas (D, E y F). A las 3hrs las acumulaciones de la actina en la zona del anillo cortical se ven más marcadas, (G, H e I). La puntas de flecha marcan la agregación de los filamentos.



IX. DISCUSIÓN.

Existen una gran variedad de técnicas de transfección con las cuales se pueden introducir secuencias de ADN a las células, muchas de las cuales son seleccionadas dependiendo de la respuesta que presente cada línea celular. Sobre la utilización de técnica de coprecipitado con fosfato de calcio (Ca-pi) se han realizado estudios los cuales hacen énfasis en la estandarización de las condiciones óptimas de precipitación del ADN, las que permiten aumentar las posibilidades de transfección. Las condiciones utilizadas en este trabajo para el CaCl₂, HBS 2X reportadas por Jordan *et al*, (1996) fueron las mismas, a excepción de la concentración del ADN, la cual fue de 10µg/ml ellos sugieren una concentración de ADN de entre 25-50µg/ml. Esta concentración no afectó significativamente la cantidad y calidad de los precipitados finos que permiten una mayor probabilidad de ser incorporados por la célula, obteniéndose resultados similares al momento de transfectar. Concentraciones diferentes del ADN han sido utilizadas en distintos trabajos como por ejemplo 20µg/ml del ADN de para los experimentos de transfección en macrófagos (Rupprecht *et al*, 1991).en algunos otros casos se han utilizado concentraciones menores, de 2.5µg/ml del ADN plasmídico (Batard *et al*, 2001). Por el contrario Ponce en 1998, utilizó una concentración alta del ADN para transfectar células MDCK, 100µg/ml del ADN plásmido. La variación en la concentración del ADN utilizada por cada autor, sugiere que la cantidad del ADN que se emplee para los experimentos de transfección con esta técnica, no es un factor que aumente de manera significativa las probabilidades de obtener una mayor cantidad y una mejor calidad de precipitados con fosfato de calcio, ya que se obtuvieron resultados favorables con la concentración elegida reflejados en la eficiencia de transfección. Por tanto la técnica de Ca-Pi es una buena herramienta que permite la introducción eficiente de vectores en las células MDCK sin provocar alteraciones que afecten sus funciones esenciales, aunque un reporte de Kaji, *et al*, (1996) en donde evaluaron las propiedades en el transporte ionico de las células MDCK al introducir ADN exógeno por medio de la técnica de Lipofectina, encontró que el proceso de transfección por si solo altera las funciones de transporte de las células epiteliales en cuanto al número de sitios de transporte en la superficie de la célula. Nuestro trabajo utilizando la técnica de transfección por precipitado con fosfato de calcio muestra una ventaja la cual justifica el uso de esta técnica, con respecto a otras técnicas las cuales además requieren reactivos y equipo más costoso.

Los resultados indican que los vectores pEGFP-Actin y p(EYFP-actin)⁻ pueden ser expresados en la línea celular MDCK con esta técnica, obteniendo una eficiencia de transfección aceptable del 40% aproximadamente con cualquiera de los dos vectores y que ninguno de los dos por si solos provocan alteraciones en las propiedades físicas de las células, al igual que en el reporte de Ponce, 1998, donde obtuvo una eficiencia de transfección del 30-40% en las células MDCK transfectando con el vector psvlCaMBP utilizando la misma técnica. Las células



transfectadas con el vector p(EYFP-actin)⁻ no presentaron alteraciones en las funciones que dependen del citoesqueleto, además de que las células pudieron ser aprovechadas para llevar a cabo los experimentos de infección usándolas para observar los efectos de la infección con el virus.

La fusión de proteínas como actina con la proteína verde fluorescente (EGFP-actina) puede ser usada como una herramienta para monitorear el comportamiento de la actina en distintos tipos de células. Al respecto se tienen reportes sobre la localización de la proteína EGFP-actina dentro de las células, Ballestrem *et al*, en 1998 al trabajar con células B16F1, fibroblastos 3T3, células CHO, COST-7 y t-End, transfectando con la EGFP-actina mencionan que la sobreexpresión de la β -actina utilizando la secuencia de un fuerte promotor del citomegalovirus (CMV) provoca severos impactos sobre la morfología de las células COS-7, provocado probablemente por un efecto citotóxico de la expresión de la EGFP por si sola y hacen énfasis en que seleccionar un promotor adecuado es crucial para poder expresar la EGFP unida a actina. Chodias *et al* en 1998, trabajaron con la EGFP-actina introduciéndola en las líneas celulares NIH3T3, NBT II, COS-7, PC-12 y células HeLa, y mostraron que esta proteína se encuentra presente en las fibras de estrés, las adhesiones focales y formando parte del anillo cortical además de encontrarse una parte diseminada en el citoplasma que corresponde a la actina globular. Estos resultados fueron similares en el trabajo de Herget-Rosenthal *et al* en el 2001, al transfectar células epiteliales LLC-PK, en donde se localizó a la proteína formando las mismas estructuras del citoesqueleto de actina y adicionalmente en las microvellosidades de esta línea celular epitelial. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con las reportes antes mencionados sobre la localización de la EGFP-actina. En las células MDCK se encontró a la proteína formando parte de las estructuras del anillo cortical, las fibras de estrés, microvellosidades y una parte diseminada en el citoplasma correspondiente a la F-actina y la G-actina, respectivamente. Esto indica que la localización de la EGFP-actina expresada en las células MDCK, corresponde a las estructuras del citoesqueleto de actina. Esta localización se corroboró con análisis de colocalización marcando a la F-actina endógena de las células transfectadas con faloidina-rodamina. Aunque si se presentaron distintos niveles de expresión en las células transfectadas, a diferencia del trabajo de Ballestrem (1998), no encontramos signos de toxicidad que derivaran en modificaciones morfológicas de las células transfectadas y clonadas, las cuales presentaron niveles altos de expresión de la EGFP-actina. Ya que se utilizó la secuencia de un virus (CMV) como promotor, la variabilidad de la expresión en estas células sugiere que la inserción del ADN del vector se dio azarosamente dentro del cromosoma de las células por medio del proceso de recombinación heteróloga y por tanto la expresión de éste en algunas células derivó en que la expresión se mostrara con distintos niveles al estar controlada la expresión de EGFP-actina por el promotor CMV y de secuencias endógenas de la célula que regulan la expresión de genes. Por ello la clonación de estas células fue necesaria para poder obtener la mayor cantidad de células que



expresaran la proteína EGFP-actina de forma homogénea. La otra alternativa que se ha propuesto sobre la falta de expresión homogénea de la proteína aún en presencia del marcador de selección, es la reportada por Choidas *et al* 1998, en la cual se plantea la posibilidad de alguna delección en la secuencia del plásmido o al momento de la expresión de la proteína que elimina en parte su fluorescencia. La primera propuesta mencionada puede explicar el comportamiento de las células MDCK transfectadas ya que se encontraron tanto células con distintos niveles de expresión así como células que crecían en presencia del marcador de selección y no emitían fluorescencia de la EGFP-actina de forma evidente, aunque no se obtuvieron datos que indiquen específicamente el comportamiento con la segunda propuesta.

El citoesqueleto de actina en células epiteliales es altamente dinámico y frecuentemente puede sufrir alteraciones. El uso de distintas estrategias para estudiar el comportamiento del citoesqueleto de actina en respuesta a distintos estímulos como el eliminar el ATP del medio (Herget-Rosenthal, *et al* 2001), la estimulación de células KB con factores de crecimiento como EGF (Witenmayer *et al*, 2000), tratar células B16 con citocalacina B y D (Ballestrem *et al*, 1998), es una prueba que indica si la organización del citoesqueleto de actina no se ve alterada por la presencia de la actina exógena. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que al tratar a las células transfectadas con citocalacina D, el citoesqueleto de actina sufre en forma progresiva la despolimerización de los microfilamentos de actina y son afectados tanto los que no contienen la EGFP-actina como los formados por actina no marcada. Los datos obtenidos hasta este punto sugieren que la expresión de la EGFP-actina no parece afectar la morfología de las células MDCK y que la incorporación de la proteína fluorescente a las estructuras del citoesqueleto no altera la organización ni la distribución del citoesqueleto de actina comparado con la actina endógena en las células no transfectadas y del control mock.

Las modificaciones que sufre el citoesqueleto en respuesta a la infección con entidades virales se ha reportado solo para algunos grupos de virus como Baculovirus, Iridovirus, Paramixovirus, Retrovirus y Ortopoxvirus (Cudmure *et al*, 1997), de los cuales se han podido caracterizar sus efectos al nivel del citoesqueleto. En general, la mayoría provoca la disrupción de los filamentos o la formación de estructuras que favorecen su entrada, como los cables de actina con adenovirus, la inducción de proyecciones en etapas tempranas de la infección con el herpes simplex virus, etc. Es claro que todas estas modificaciones dependen en gran parte de la susceptibilidad de la célula. En el caso de las células MDCK por sus características mencionadas en capítulos anteriores, han sido utilizadas para distintos estudios donde el citoesqueleto se modifica después de infectar con virus como el de la influenza A/WSN y el virus VSV (Gottlieb *et al*, 1993) en particular durante la endocitosis en monocapas polarizadas. Con el virus A/Udorn/72 se ha observado la morfología viral después de la inoculación (Roberts *et al*, 1998) entre otros estudios. El presente trabajo es primer reporte que pone de manifiesto la



susceptibilidad de las células epiteliales MDCK al virus del Dengue *in vitro* encontrando al virus a las 12hrs post inoculación y mostrando una modificación evidente del citoesqueleto a las 48hrs. Las células que hasta el momento muestran una clara susceptibilidad y replicación (infección productiva) a la infección del virus del Dengue son: a) los hepatocitos y células Kupffer (Bhamarapravati *et al* 1965), b) los monocitos circulantes (en bajo porcentaje), c) las plaquetas humanas (Boopuckanvig *et al*, 1979 y Funahara *et al*, 1982), d) las células del estroma de la médula ósea (Nakao *et al*, 1989) y e) células endoteliales (Andrews *et al*, 1978 y Bunjaratvej *et al*, 1997). Al igual que las células anteriormente mencionadas, la línea celular MDCK presentó una infección productiva con el virus del Dengue serotipo 2 con una consiguiente modificación del citoesqueleto de actina y tubulina relacionada con la progresión de la infección.

La actina en células normales se encuentra distribuida en distintas regiones de la célula y en mayor proporción formando parte de los filamentos los cuales se organizan de forma paralela unos con otros o formando ángulos entre ellos. Células TC7 infectadas con adenovirus, experimentan modificaciones de los filamentos de actina desde las 14-16hrs, después de la reorganización de los microtúbulos, encontrando pequeños filamentos en la zona distal del núcleo y mostrando una modificación progresiva de los filamentos de actina (Staufenbiel *et al*, 1986). Las células MDCK transfectadas, en este trabajo, a diferencia de los datos proporcionados por Staufenbiel (1986), al ser infectadas con VD-2, comenzaron a presentar modificaciones desde las primeras etapas de la interacción, a los 30min, y de forma más evidente a los 60min, mostrando agregados en la parte apical de la célula pero sin mostrar modificaciones dramáticas. Boschek *et al* (1981), encontraron resultados similares al infectar células de embrión de pollo ts-NY68 con el virus del sarcoma. Desde las 3hrs post infección se observaron acumulaciones de los filamentos en forma de espiral, ocasionalmente localizados en la periferia, algunas otras acumulaciones se muestran en la parte apical de las células formando pequeños agregados desde las 3hrs hasta las 6hrs al marcar las células con faloidina-rodamina. La infección de células en general provoca la interrupción de los filamentos de actina, lo cual es indicativo de una fragmentación y de procesos de despolimerización y polimerización, apareciendo desde etapas tempranas y de forma progresiva, esta reorganización de los filamentos de actina en las primeras etapas de interacción virus-célula probablemente esta relacionada con la agregación de los virus provocada por la interacción de proteínas virales con la membrana celular ya que se ha propuesto que el papel de la actina parece estar relacionado con los eventos de la membrana los cuales incluyen la entrada y salida de los virus (Higley *et al* 1997 y Ploubidou *et al*, 2001).

Por otro lado en algunos estudios se ha revelado que la actina en sus formas globular y filamentosa es utilizada como interfase en la morfogénesis de los virus en el interior de la célula involucrando procesos de polimerización y despolimerización de ésta (Straus, 1996). De alguna forma esta propuesta puede explicar un poco la reorganización de los filamentos de actina a las 48hrs post



infección formando estructuras filamentosas que colocalizan con la señal de la proteína E de la cápside del virus en tinciones indirectas con anticuerpos, que pueden tener relación con los procesos de morfogénesis del virus después de 48hrs de haber entrado a la célula.

La red de microtúbulos es una estructura altamente dinámica que esta implicada en muchos aspectos de transporte de proteínas y la polaridad en muchos tipos de células. Los agregados de microtúbulos se encuentran orientados longitudinalmente en el eje apico- basolateral en células normales. Las células al ser infectadas por el virus Ki-MSV, presentan una disrupción de los microtúbulos apareciendo alrededor del núcleo como si lo envolvieran (Decloître *et al*, 1991). Estos cambios son generalmente referidos al efecto citopático que presentan las células. El virus vaccinia al infectar a las células, también desorganiza a los microtúbulos probablemente como consecuencia de la sobreexpresión de las proteínas del virus que interactúan con las proteínas asociadas a los microtúbulos destruyendo la función de centrosoma (Ploubidou *et al*, 2001). La organización normal de los microtúbulos comienza a observarse modificada desde las 12-14hrs post infección con adenovirus, desapareciendo el centro de organización de los microtúbulos y distribuyéndose en las partes periféricas de la célula (Staufenbiel *et al*, 1986). Los resultados obtenidos indican un comportamiento similar en las células MDCK al ser infectadas con el VD-2, observando después de 48hrs la disrupción de los microtúbulos que rodean al núcleo de las células confluentes. Por otro lado, en células sub-confluentes se observó una disrupción más marcada de los microtubulos lo cual sugiere que en células en estado de sub-confluencia los mucrotúbulos son más dinámicos y su modificación es más dramática al entrar en contacto con el virus.

La dinámica de los filamentos de actina de células transfectadas con la EGFP-actina, como ya se ha mencionado se ha analizado utilizando una gran variedad de estrategias para evaluar su comportamiento, pero se conoce poco sobre los procesos infectivos en los que participa el citoesqueleto de actina, Choidas *et al*, (1998) probaron las aplicaciones que puede tener la GFP unida a actina realizando distintos análisis. Utilizaron células HeLa transfectadas con la GFP-actina y las infectó con *Listeria monocitogenes* para mostrar la distribución de la actina fluorescente observando la formación de las llamadas "colas de actina" que son utilizadas por la bacteria para moverse dentro de la célula. Este tipo de análisis proporciona datos importantes ya que se pueden monitorear los procesos infectivos desde las primeras etapas de interacción hasta las etapas tardías, obteniendo mayor información del fenómeno que puede derivar en un mejor entendimiento que coadyuve en un momento dado a elaborar nuevas estrategias de estudio y prevención de la infección.

En resumen, al no afectar las características de las células MDCK, la expresión de la EGFP-actina es una herramienta con la cual se pueden evaluar los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a distintos estímulos ya que exhibe características similares a la F-actina y G-actina endógena. Al interactuar



las células transfectadas con agentes infecciosos se pueden evaluar las modificaciones del citoesqueleto en sus primeras etapas y también en etapas tardías. Ya que el citoesqueleto de actina esta involucrado con un gran número de funciones celulares, la expresión continua de la EGFP unida a actina puede ayudar a entender mejor los procesos en los que participa.

IZT.



X. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la EGFP-actina puede ser expresada en la línea celular MDCK y se localiza en los mismos sitios que la actina endógena, sin alterar las características de los filamentos formados por la proteína exógena.

La construcción del vector p(EYFP-actin)⁻ utilizado como control de transfección (control mock) en las células MDCK, mostró que las características de las células transfectadas no se ven alteradas por el proceso de transfección.

La selección con G-418 permitió la obtención de transfecciones estables de las células MDCK, las cuales al ser clonadas expresaron la EGFP-actina de forma más homogénea en todas las células.

Las células de origen epitelial MDCK mostraron infección productiva con el virus del Dengue Tipo-2. Gran número de partículas virales se observaron dentro de las células a las 48hrs post-infección.

Los cambios en el citoesqueleto ante la entrada del VD-2, se presentan en los filamentos de actina y también en los microtúbulos, en estos últimos se observan cambios dramáticos en la organización, particularmente en las células sub-confluentes.

La expresión de la EGFP-actina en las células MDCK, constituyó una herramienta adecuada con la cual se pueden observar y caracterizar los cambios en la dinámica de actina en las primeras etapas de interacción con el VD-2 así como en etapas tardías en que el virus ha penetrado a las células.



XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts Bruce, Dennys Bray, Lewis Julian, Raff Martín Keith Roberts And James D. Watson. 1993. *Molecular Biology of The Cell*. Ed. 3^{er}. Ed. Garland Publishing, Inc. New York USA. 1294pp.
- Alexander, Bahret, Chávez, Courts, D'lessio. 1992. *Biología*. Ed. Prentice Hall. USA. 717pp.
- Andrews B. S., Theofilopoulos A. N., Peters C. J., Loskutoff D. J., Brand W. E. and Dixon F. J. 1978. Replication of Dengue and Junin viruses in Culture Rabbit and Human Endothelial Cells. *Infection and Immunity*. **20**: 776-781.
- Ballemstrem Chr., Wehrle-Haller B. and Imhof B. 1998. Actin Dynamics in Living Mammalian Cells. *Journal of Cell science*. **111**: 1649-1658.
- Batard P. Jordan M. and Wurm F. 2001. Transfer of High Copy Number Plasmid into Mammalian Cells by Calcium Phosphate Transfection. *Gene*. **270**: 61-68.
- Bershadsky Alexander D. and Juri M. Vasiliev. 1988. *Cytoskeleton*. Ed. Pleum Press. New York, USA. 298pp.
- Bhamarapavati N and Nye SW. 1965. Pathology of Skin Rashes in DHF. Annual Report of SEATO Medical Research Laboratory. pp 15-20.
- Blum SM, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi Ruggero and Bender JR. 1997. Cytoskeletal Rearrangement Mediates Human Microvascular Endothelial Tight Junction Modulation by Cytokines. *American Journal Physiology*. (heart cir Physiology **42**): H286-H294.
- Bonner Seamus M. and M. Aideen O' Sullivan. 1998. Endothelial Cell Monolayers as model System to Investigate Dengue Shock Syndrome. *Journal of Virological Methods*. **71**: 159-167.
- Boonpuckanvig S, Vuttiviroj O, Bunnag, Bhamarapavati N and Nimmannitya S. 1979. Demonstration of Dengue Antibody Complex on the Surface of Plateles from Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **28**: 881-884.
- Boschek B. Jockusch B. Friis R. Back R. Grundmenn E. and Bauer H. 1981. Early Changes in the Distribution and Organization of Microfilament Proteins During Cell Transformation. *Cell*. **24**: 175-184.
- Bunjaratvej A, Butthep P, Yoksan S, and Bhamarapavati N. 1997. Dengue Virus Induce Cell Proliferation and Morphological Changes of Endothelial Cells. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*. **28**: 32-37.
- Carlier Marie- France. 1998. Control of Actin Dynamics. *Current Biology*. **10**: 45-51.
- Chodias Axel, Jungbluth A., SechiA., Murphy J., Ullrich A. and Marriott G. 1998. The Suitability and Application of a GFP-actin Fusion Protein for Long-term Imaging of the Dynamics of the Cytoskeleton in Mammalian Cells. *European Journal Cell Biology*. **77**: 81-90.
- Cudmure S., Reckmann I. And Way M. 1997. Viral Manipulations of the Actin Cytoskeleton. *Trends in Microbiology* **5**(4): 142-148.



- Decloitre F., Cassingena R., Estrade S. and Martín M. 1991. Concomitant Alterations of Microfilaments and Microtubules in Human Epithelial Cells (HBL-100) in Relation to Their Malignant Conversion. *Tumor Biology*. **112**: 111-119.
- Fanahara Y, Okuno Y, Fujita N, Okamoto S, Fukai K and Hotta T. 1982. In vitro Decrease of Human Platelet Count Due to Binding of the Specific Antibody on the Dengue virus Bound to the Platelet. *International Center of Medical Research Annals (Kobe Japan)*. **1**: 35-42.
- Gorman C., Merllino G., Willingham M., Pastan I. and Howard B. 1982. The Rous Sarcoma Virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukariotic cell by DNA- mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6777-6781.
- Gottlieb Th., Ivanov I., Adesnik M. And Sabatini D. 1993. Actin Microfilament Play a Aritical Role in Endocytosis the Apical but not the Basolateral Surface of Polarized Epitelial Cells. *The Journal of Cell Biology*. **123** (3): 695-710.
- Gómez Dantés H., Ramos García C., Flores Glaxiola A., Arredondo Jiménez J., Muñoz Moreno L., Ruiz Ordaz B., Ibáñez Bernal S., Briceño García B., Ruiz Matus C., Rodríguez E., Gallardo Díaz E., López Antuñano F. 1999. Diez Problemas Relevantes de Salud Pública en México. Serie formación e información. De la Fuente J. R., Sepúlveda, A. J. Compiladores. 1^{ra}. ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Herget-Rosenthal S., Hosford M., Kribben A., Atkison S., Sandoval R. and Molitoris B. 2001. Characteristics of EYFP-actin and Visualization of Actin Dynamics During ATP Depletion and Repletion. *American Journal Physiology Cell Physiology*. **281**: C1858-C1870.
- Higley S. and Way M. 1997. Actin and Cell Pathogenesis. *Current Opinion Cell Biology*. **9**: 62-69.
- Jordan M., schallhorn Ann., and Wurn F. 1996. Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-phosphate Precipitate Formation. *Nucleic Acids Research*. **24** (4): 596-601.
- Kabsch W. and Vandekerckhove J. 1992. Structure and Function of Actin. *Annual Reviews Biomol. Structure*. **21**: 49-76.
- Kaji D. M., Bates J., Goyzueta J. D., Prasadán K. And Kumar S. 1996. Transfection Alters ion Transport in MDCK Cells. *Journal Membrane Biol*. **149**: 49-55.
- Kurane I and Ennis FA. 1994. Cytokines in Dengue Virus Infection: Role in Cytokines in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Seminars in Virology*. **5**: 443-448.
- Ledezma Palacios Angélica Ruth. 2001. La Sobreexpresión del Isotipo β I de Tubulina en las Células MDCK Interfiere con la Adhesión y la Extensión Celular. CINVESTAV, Depto. Biología Celular, México D. F. Tesis de doctorado.
- Lieser J., Molitoris B. A. 1993. Disease Process in Epithelia: The role of the Actin Cytoskeleton and Altered Surface Membrane Polarity. *Bioch. Biophys. Acta* **1225**: 1-13.



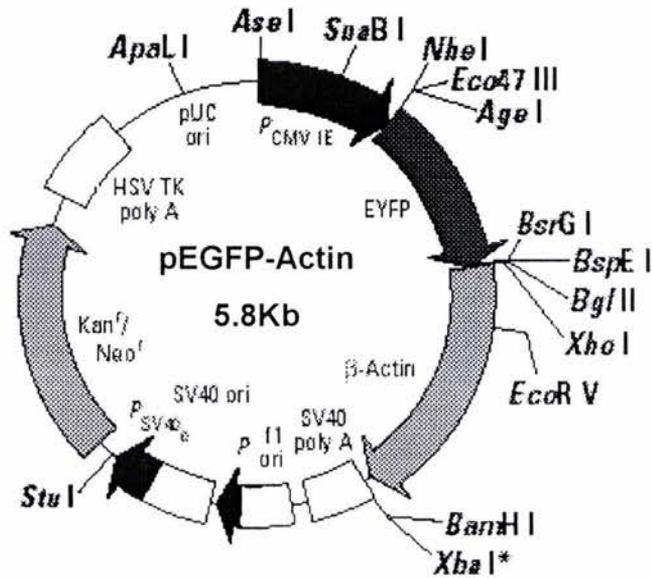
- Madin S. H., Darby N. B. 1958. As Catalogued in American Type Culture Collection Catalog of Strains. **2**: 47.
- Mitic LL and Anderson JM. 1998. Molecular Architecture of Tight Junctions. Annual Review of Physiology. **60**: 121-142.
- Montes de Oca G., Ledesma R., Mondragón R., Castillo A. M. and Meza I. 1997. Myosin I Interactions with Actin Filaments and Trans-golgi Derived Vesicles in MDCK Cell Monolayers. Archivied. Medical. Research. **28**: 1-7.
- Nakao S, Lai CJ, and Young NS. 1989. Dengue Virus and Flavivirus, Propagates in Human Bone Marrow Progenitors and Hematopoietic Cell Lines. Blood. **74**: 1235-1240.
- Ott D., Coren L., Kane B., Busch L., Johnson D., Sowder II R., Chertova E., Arthur L. and Henderson L. 1996. Cytoeskeletal Proteins Inside Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions. Journal of Virology. **70** (11): 7734-7743.
- Pang Ming K. Lee E. and Knecht D. 1997. Use of a Fusion Protein Between GFP and Actin-binding Domain to Visualize Transient Filamentous-actin Structures. Current Biology. **8**: 405-408.
- Paul C Roberts. and Compans Richard W. 1998. Host Cell Dependence of Viral Morphology. Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 5746-5751.
- Ploubidou Aspasia and Way Michael. 2001. Viral Transport the Cytoskeleton. Current Opinion Cell Biology. **13** (1): 97-105.
- Pollard J. W. and Walker John M. 1990. Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology. Vol 5. Ed. Humana Press. USA. 713pp.
- Ponce Pérez Lourdes. 1998. Inhibición Transitoria de la Actividad de la Calmodulina en las Células MDCK: Implicaciones para su Función. CINVESTAV-IPN. Depto. Biología Celular. México D. F. Tesis de Maestria.
- Revilla R., Tsutsumi V. y Frixione E. 1986. Temas Selectos de Biología de Celular. Ed. COSNET. México D. F. 406pp.
- Rigau-Peréz JG., Clark GJ., Gubler JD., Reiter P., Sanders JE and Vomdam VA. 1988. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. The Lancet. **352**: 971-977.
- Ronald Atlas M. Phd. 1995. Principles of Microbiology. Ed. Mosby Year Book Inc. USA. 888pp.
- Rupprecht Anneli P. and Coleman David L. 1991. Transfection of Adherent Murine Peritoneal Macrophages with a Reporter Gene Using DEAE-Dextran. Journal of immunological Methods. **144**: 157-163.
- Sambrook J., Fritsch E. F. And Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. 2^{da} ed. Ed. Vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Schevzov G., Lloyd C. and Gunning P. 1992. High Level Expression of Transfected β - and γ - Actin Genes Differentially Impacts on Myoblast Cytoarchitecture. The Journal of Cell Biology. **117** (4): 775-785.
- Small J. V., Rottner K. and Kaverina I. 1999. Functional Design in the Actin. Cytoskeleton. **11**: 54-60.



- Staufenbiel M., Epple P. and Deppert W. 1986. Progressive Reorganization of the Host Cell Cytoskeleton During Adenovirus Infection. *Journal Virology*. **60**(3): 1186-1191.
- Strauss Evelyn J. 1996. Intracellular pathogens: A Virus Joins the Movement. *Current Biology*. **6** (5): 504-507.
- Tsien Roger Y. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review Biochemical*. **67**: 509-544.
- Vouret-Craviari Valerie, Gral D., Flatau G., Pouyssegur J., Boquet P., and Obberghen- Schilling EV, 1999. Effects of Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Lethal Toxin on Actin Cytoesqueleton and VE- Cadherin Localization in Human Endothelial Cell Monolayers. *Infection and Immunity*. **67** (6): 3002-3008.
- Vasioukhin Valeri and Fuchs Elaine. 2001. Actin dynamics and Cell-cell Adhesion in Epithelia. *Current Opinion Cell Biology*. **13** (1): 76-84.
- Wear M., Schafer D. A. and Cooper J. 2000. Actin Dynamics: Assembly and Disassembly of Actin Networks. *Current Biology* **10** (24): R891-895.
- Westphal M., Jungbluth A., Heidecker M., Mühlbauer B., Heizer C., Schwartz J. Marriot G. And Gerisch. 1997. Microfilament Dynamics During Cell Movement and Chemotaxis Monitored Using a GFP-actin Fusion Protein. *Current Biology*. **7**: 176-183.
- Wittenmayer N., Rothkegel M., Jockusch and Schlüter K. 2000. Functional Characterization of Green Fluorescent Protein-profilin Fusion Proteins. *European Journal Biochemical*. **267**: 5247-5256.
- Wolfe Stephen L. 1993. *Molecular and Cellular Biology*. Ed. Wadworth. California USA. 1145 pp.
- Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr. (1996). Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology*. **14**, 1246-1251.
- Yeman C., Grindstaff K. K., Nelson, W. J. 1999. New Prespectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiology Reviews*. **79**: 73-98.

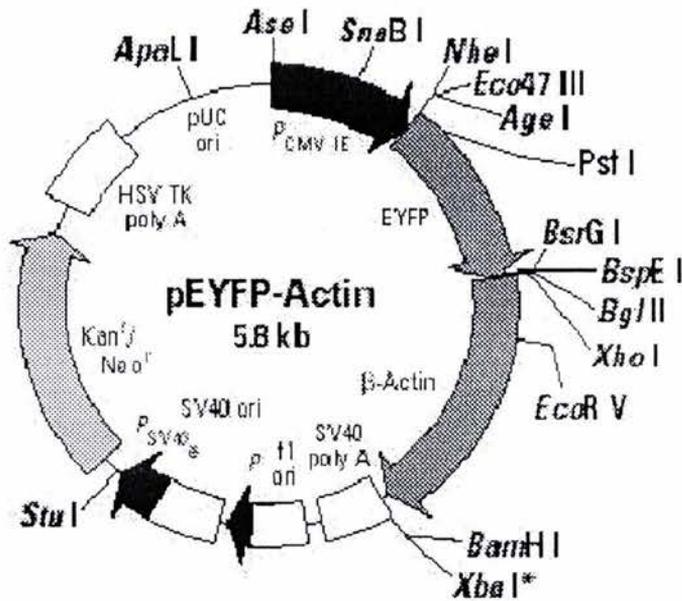


XII. APÉNDICE.



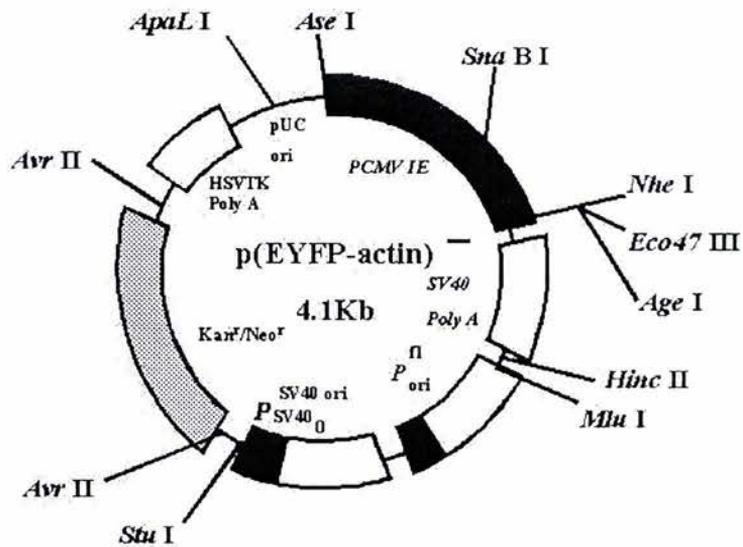
Mapa de restricción del vector de información de la proteína verde fluorescente fusionada con β -actina (pEGFP-Actin) de 5.8 Kb. Todos los sitios de restricción que se muestran son de un solo corte. El sitio *Xba* I está metilado. Este vector fue utilizado para los





Mapa de restricción del vector de información de la proteína amarilla fluorescente fusionada con β -actina (pEYFP-Actin) de 5.8 Kb. Todos los sitios de restricción que se muestran son de un solo corte. El sitio *Xba* I está metilado. Los sitios de las enzimas *Pst* I y *Bam*H I, se localizan en las regiones terminales de la quimera EYFP-Actin que fue deletada para la construcción del control mock.





Mapa de restricción de la construcción del control mock, basado en el vector pEYFP-Actin. Los sitios *Pst* I y *Bam*H I, se perdieron como consecuencia del rellenado con la enzima T4 DNAPolimerasa. El tamaño del vector obtenido es de 4162pb.

