



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL VIRUS DE PSEUDORRABIA
SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LAS CÉLULAS
RK13, PK15 Y VERO**

T E S I S

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

**PRESENTA
OMAR VILCHIS GONZÁLEZ**

**ASESOR: DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE
COASESOR: M. C. CRISÓFORO MERCADO MÁRQUEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2009



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.

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK13 y enterocitos del conejo durante la infección de Escherichia coli enteropatógena para conejo (REPEC)”, clave 1N203106-3 y por la Cátedra de Investigación “Morfología Veterinaria y Biología Celular”, clave PACIVE CONS105.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	15
Objetivos.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Resultados.....	19
Discusión.....	28
Conclusiones.....	32
Bibliografía.....	33
Anexo 1.....	38

RESUMEN

El virus de pseudorrabia o de la enfermedad de Aujeszky, es un Herpesvirus de la subfamilia Alphaherpesviridae cuyo único huésped natural es el cerdo. Se ha reportado que algunos virus utilizan el citoesqueleto de las células del huésped con el fin de facilitar aspectos importantes de su ciclo de vida como la entrada, egreso y difusión intercelular. Así existen múltiples evidencias de que los herpesvirus son capaces de modificar el citoesqueleto de actina durante su ciclo infeccioso. Sin embargo, la importancia biológica de estos eventos no está totalmente entendida. En este trabajo se investigaron las modificaciones que los filamentos de actina de las líneas celulares RK13, PK15 y VERO presentan por la interacción con el virus de pseudorrabia. Las células fueron infectadas con 5 μ l del aislado viral (TCID₅₀ $\times 10^{-2.92}$), marcadas con faloidina rodaminada y las modificaciones encontradas fueron observadas y documentadas mediante un microscopio confocal. Se encontró que todas las líneas celulares utilizadas mostraron la presencia de rearrreglos del citoesqueleto de actina cuando son infectadas con el virus de pseudorrabia, de éstos, los filopodios fueron la forma más sobresaliente. La línea celular RK-13 resultó ser la más receptiva a la interacción con el virus originando modificaciones del citoesqueleto de actina a las 15 hrs pi., mientras que en las células PK-15 se empezaron a observar a las 15 hrs pi., pero el desarrollo del ciclo viral fue mas lento que en las células RK-13. La línea celular VERO fue la más refractaria a la infección del virus de pseudorrabia, siendo notorio que los efectos citopáticos y los rearrreglos del citoesqueleto de actina inducidos por la infección viral se presentaron hasta las 19 hrs pi. Adicionalmente, es importante señalar que las modificaciones del citoesqueleto tuvieron diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares. Las diversas interacciones de los herpesvirus con la actina parecen depender del tipo celular y aunque ya se tienen varias evidencias acerca de los mecanismos subyacentes, no cabe duda que la red de proteínas virales y celulares involucradas será compleja. Finalmente podemos señalar que este estudio conforma un modelo adecuado en el cual profundizar el estudio de la interacción viral con el citoesqueleto de las células eucariontes.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1813 en el ganado vacuno que padecía de un intenso prurito y finalmente moría; en consecuencia la enfermedad fue denominada “locura prurítica”. El término “pseudorrabia” fue utilizado por primera vez en Suiza en 1849 debido a que los signos clínicos en el ganado vacuno eran similares a los de la rabia. En 1902 Aujeszky estableció que el agente etiológico no era bacteriano y en 1910 Schmiedhofer confirmó que era un virus por medio de experimentos de filtración. En 1934 Sabin y Wright lo identificaron como un herpes virus inmunológicamente relacionado al herpes simple. Otras características biológicas de los alfa herpesvirus son los ciclos de replicación lítica de menos de 24 horas y la capacidad de establecer infecciones latentes en los ganglios sensitivos del sistema nervioso y en el tejido linfoide de las tonsilas (Wheeler y Osorio, 1991).

El cerdo es el único huésped natural del virus de la pseudorrabia (PRV), aunque un gran número de especies pueden ser infectadas de manera natural o experimental. El PRV es infeccioso para bovinos, ovinos, cabras, perros y gatos. Por otra parte es muy difícil infectar equinos y aves. Los primates superiores, incluyendo el hombre, no son susceptibles a la infección (Pejsak y Truszczynty, 2000). También existen animales silvestres susceptibles a la infección mortal PRV, las más comunes son el mapache, la zarigüeya, zorros, ratas y ratones, todos los cuales se encuentran con frecuencia en los alrededores de las granjas de cerdos (Stevely, 1975).

La OIE (Oficina Internacional de Epizootias, 2003; OMSA, Organización Mundial de Sanidad Animal) ha reportado brotes de pseudorrabia en poblaciones porcinas de todo el mundo, resultando en grandes pérdidas económicas de los países afectados (Pomeranz, 2005). La distribución geográfica es amplia y comprende Estados Unidos, Gran Bretaña, Europa, norte de África, Sudamérica, Nueva Zelandia e Irlanda (Radostits y col., 2007).

En nuestro país, el SENASICA reportó en el año de 2004; 231 focos de infección y 414 casos clínicos de los cuales murieron 38 cerdos. Asimismo, señala que sólo ocho entidades federativas son libres de esta enfermedad; Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (SAGARPA, 2007).

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

El factor de riesgo más importante para la persistencia del virus es el tamaño de la piara y la densidad de población de las cerdas en la granja. El virus puede sobrevivir durante 2-7 semanas en un medio infectado dependiendo de fluctuaciones de la temperatura y del nivel de pH (Radostits y col., 2007).

El virus está presente en la secreción nasal y en la boca de los cerdos afectados desde el primer día de enfermedad y hasta 17 días después. La transmisión en el seno de las piaras se produce por contacto directo entre los cerdos infectados y susceptibles, y por aerosoles que proyectan las secreciones durante los estornudos, pero también se puede transmitir a través del agua o alimento. La transmisión de una piara a otra es consecuencia de la introducción de animales infectados.

Se piensa que la puerta de entrada son abrasiones de la piel o la mucosa nasal intacta. Se produce viremia con localización del virus en muchas vísceras, pero la multiplicación se realiza fundamentalmente en las vías respiratorias superiores. La diseminación al encéfalo se produce a través de los nervios olfatorio, glossofaríngeo o trigémino. Cuando el virus penetra en el cuerpo por una abrasión de la piel, invade rápidamente los nervios periféricos locales, desplazándose por transporte retrógrado axonal y provocando lesión en las neuronas. Es esta forma de progresión la que causa prurito local en las primeras fases de la enfermedad, y encefalomielitis en una etapa posterior. El virus puede estar presente en el ganglio trigémino de una cerda infectada naturalmente sin historia de enfermedad clínica. Asimismo, la tonsila palatina es un lugar primario de replicación del virus y sirve como zona de vigilancia de la liberación del virus durante la

infección aguda y la reactivación (Mettenleiter, 2000). Los cerdos que se recuperan de la infección son portadores latentes del virus de por vida. Se puede producir reactivación, seguida de la liberación y diseminación del virus, por estrés como el transporte o los partos, o por la administración de corticosteroides (Radostits y col., 2007).

Los principales signos de infección se encuentran en los sistemas respiratorio, nervioso y reproductor. La enfermedad del sistema nervioso es la manifestación principal, pero con algunas cepas, la afección respiratoria puede ser el rasgo de presentación inicial y más importante. Antes de la aparición de signos nerviosos se produce una reacción febril, con temperaturas de hasta 41.5° C. La falta de coordinación progresiva de las patas traseras va seguida de postración, temblores musculares finos y movimientos de pateo. En unos cuantos animales aparece desviación lateral de la cabeza, emisión de espuma por la boca, nistagmo, ligera secreción ocular y episodios convulsivos. Muchos cerdos afectados tienen una respiración con ronquidos y movimientos aparentes del abdomen, algunos presentan vómito y diarrea. La muerte se produce 12 horas después de la aparición de los primeros signos (Radostits y col., 2007). En adultos puede haber fiebre o no y la infección provoca sólo un síndrome leve de anorexia, embotamiento, agalactia y estreñimiento, sin embargo cepas virulentas pueden provocar enfermedad aguda en adultos. La infección al principio del embarazo suele provocar muerte del embrión o aborto y retorno rápido al celo. La infección en las fases tardías de la gestación provoca aborto o el parto posterior de fetos momificados. El aborto se produce por la fiebre o por la infección del feto (Pejsak y Truszczynky, 2006).

No existen lesiones macroscópicas típicas y constantes de la enfermedad, y el diagnóstico se basa en las pruebas de laboratorio. Cuando ha habido prurito, existe considerable lesión en zonas localizadas de la piel y un abundante edema subcutáneo. Los pulmones muestran congestión, edema y hemorragias. También puede haber hemorragias bajo el endocardio y líquido pericárdico en exceso. Se observa una discreta esplenomegalia, meningitis y pequeños focos necróticos en el bazo e hígado. Histológicamente, existe un daño grave y extenso de las neuronas de la médula espinal, los ganglios paravertebrales y el cerebro. En la sustancia gris existen manguitos perivasculares y necrosis focal, principalmente en la corteza del cerebelo. La presencia de lesiones

necrosantes con formación de cuerpos de inclusión en las vías respiratorias superiores y en pulmones son altamente sugestivas de pseudorrabia (Radostits y col., 2007).

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

Características del virus

El virus de la pseudorrabia es un virus DNA, envuelto, que posee un genoma lineal de alrededor de 145 kb de DNA. Es lo suficientemente grande como para codificar alrededor de 100 proteínas. Las dimensiones globales del virus son de 150 a 180 nm de diámetro y la nucleocápside mide 105-110 nm. La nucleocápside está compuesta al menos por ocho proteínas que varían de 22.5 a 142 kDa, de las cuales las de 142, 34 y 32 kDa de peso molecular son las más importantes (Stevly, 1975). La envoltura del virus contiene por lo menos nueve proteínas estructurales con pesos moleculares que varían entre 50 y 130 kDa (Hampl y col., 1984; Simon y col, 1989; Klupp y col., 1992). Ocho de estas proteínas tienen residuos de azúcares y se denominan glucoproteínas. Originalmente, se designaban con números romanos o por su peso molecular. En los últimos años este sistema de nomenclatura ha sido reemplazado por el sistema de letras empleado para designar las proteínas de los herpes virus humanos (herpes simple tipo 1 y 2). La razón del cambio es facilitar la comparación de las propiedades biológicas de proteínas homólogas de diferentes herpesvirus (Kluge y col., 2000, Mettenleiter, 2000) (Cuadro 1).

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

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

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

Los genes que codifican muchas de las proteínas mencionadas anteriormente no son esenciales para la replicación del virus (Michael y col., 2006). Por ejemplo, las cepas vacunales del virus de pseudorrabia han sido manipuladas por ingeniería genética para que sean deficientes en una o más de las siguientes proteínas; gE, gC, gG y TK (Timidin-Cinasa). La virulencia del virus de la pseudorrabia está controlada en forma sinérgica por varios genes, más precisamente los genes que codifican a gE, gD, gI y TK (Simon y col, 1989; Kritas y col., 1994; Mulder y col., 1996).

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

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

Ciclo viral

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

El primer contacto entre el virus y la célula blanco involucra la interacción de gC con el proteoglicano heparan sulfato de la superficie celular (Rue y Ryan, 2003). Además, de gD y dos grupos de receptores celulares, proteoglicanos heparan sulfato y proteínas relacionadas con el receptor de poliovirus. La entrada requiere de la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral. El proceso de fusión involucra al menos a cuatro proteínas virales; gB, gH/gL y gD. La ausencia de cualquiera de estas glicoproteínas produce virus incapaces de realizar la fusión. Después de la translocación de la nucleocápside al citoplasma de la célula huésped, es transportada a la membrana nuclear. Dicho transporte se realiza a lo largo de los microtúbulos. La cápside es orientada hacia el poro nuclear de tal forma que el vértice se ubica opuesto al complejo del poro (Mettenleiter, 2000). El ADN abandona el virión y entra al núcleo a través de este vértice (Forest y col., 2005).

Al entrar el ADN lineal al núcleo se circulariza e inicia la transcripción. Primero se expresan los genes tempranos-inmediatos, los cuales codifican proteínas reguladoras, en PRV se trata de un solo gen, (IE 180). Este es un potente activador de genes tempranos, entre los que se encuentran aquellos que codifican proteínas requeridas para la replicación del ADN y otras funciones enzimáticas. Los genes tempranos se caracterizan por ser expresados antes de la replicación del ADN. La replicación del genoma viral requiere de la presencia de las proteínas UL5 (helicasa), UL8 (helicasa/primasa), UL9 (proteína de unión al origen de replicación), UL29 (proteína principal de unión al ADN), UL30 (ADN polimerasa), UL42 (proteína asociada a la polimerasa) y UL52 (primasa). La replicación del ADN de los herpesvirus se realiza por un mecanismo de círculo-rodante que conlleva a la síntesis de largas moléculas que necesitan ser cortadas en secuencias genómicas únicas. Los genes tardíos codifican para componentes de la cápside y envoltura, como gC. Las que

después de ser sintetizadas en el citoplasma, entran al núcleo y forman la base para el ensamble de la cápside. Este proceso es autocatalítico y requiere solamente de los componentes correspondientes (Figura 1) (Mettenleiter, 2000).

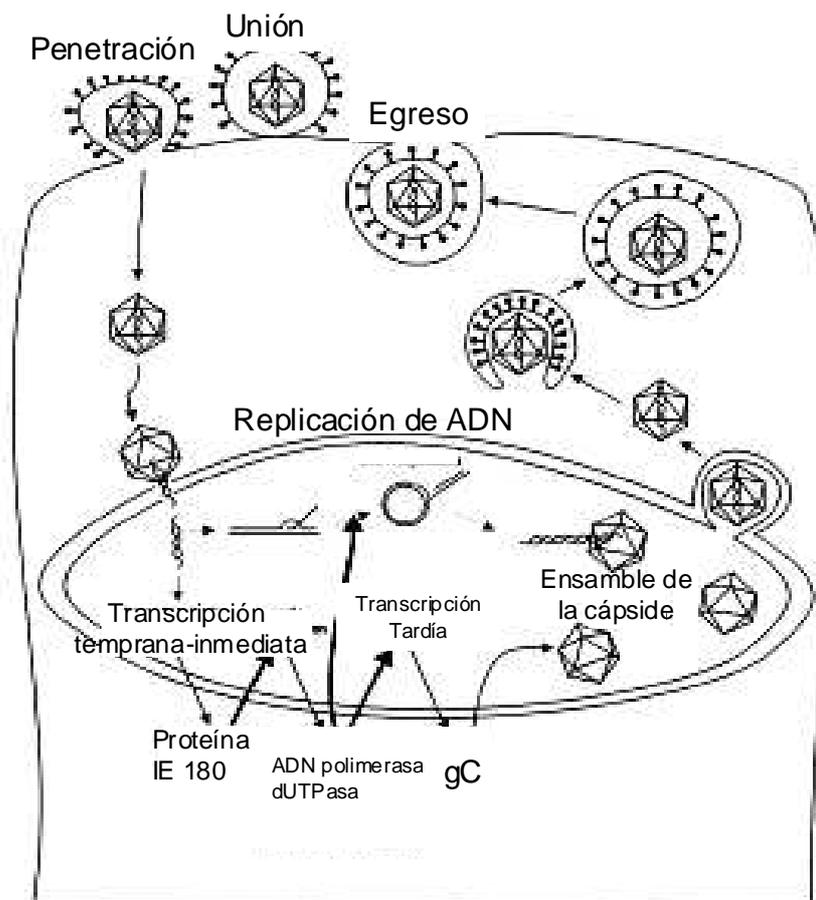


Figura 1. Esquema del ciclo viral (tomada de Mettenleiter, 2000).

Las cápsides completas salen del núcleo por gemación a través de la membrana interna del núcleo. Esta primera envoltura viral aparece “lisa” al microscopio electrónico lo cual indica la ausencia de glicoproteínas. Los viriones dejan el espacio perinuclear por fusión de la envoltura primaria con la membrana externa del núcleo resultando en la liberación de cápsides desnudas al citoplasma (Figura 1). Un proceso secundario de envolvimiento se desarrolla en el aparato de Golgi. En este paso, la envoltura muestra con claridad proyecciones que representan a las glicoproteínas. El resultado final de estos eventos de gemación es la presencia de una partícula viral completa dentro de una vesícula. Finalmente estas vesículas se dirigen hacia la membrana citoplasmática, se fusionan con ella y se liberan las partículas virales al espacio extracelular (Mettenleiter, 2000).

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

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

El citoesqueleto de las células eucariontes

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

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

La proteína citoesquelética más importante de la mayoría de las células es la actina, que se polimeriza para formar filamentos, los cuales son fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud, estos filamentos se organizan en estructuras de orden superior, formando haces o redes tridimensionales (Favoreel y col., 2005). El ensamblaje y desensamblaje de estos filamentos, sus uniones cruzadas para constituir haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (como la membrana plasmática) se regulan mediante diversas proteínas de unión a la actina (Alberts y col., 2008). Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que proporciona un soporte mecánico, determina la forma de la célula, y permite el movimiento de la superficie celular, lo que posibilita que las células puedan migrar, endocitar partículas y dividirse (Cooper, 2006).

La actina se aisló por primera vez en 1942 a partir de células musculares, en las que constituye el 20% de la proteína total de la célula. Es una proteína altamente conservada entre las diferentes células eucariotas. El primer paso en la polimerización de esta proteína, denominado nucleación, es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina. Los filamentos son entonces capaces de crecer por la adición

reversible de monómeros a ambos extremos, pero uno de ellos (el extremo más) crece de cinco a diez veces más rápido que el otro extremo (extremo menos) (Favoreel y col., 2005).

Los monómeros de actina pueden unir ATP, el cual se hidroliza a ADP tras el ensamblaje del filamento. Aunque esta molécula no es necesaria para la polimerización, los monómeros de actina que la tienen unida polimerizan más rápido que aquellos que tienen unido ADP (Alberts y col., 2008). La unión y la hidrólisis del ATP desempeñan un papel clave en la regulación del ensamblaje y en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina. Debido a que la polimerización de actina es reversible, los filamentos se pueden despolimerizar por la disociación de los monómeros, lo que permite que estos filamentos se descompongan cuando sea necesario (Gouin y col., 2005). De esta forma, existe un equilibrio aparente entre monómeros de actina y filamentos, que depende de la concentración de los monómeros libres (Cooper, 2006).

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

El intercambio rotatorio en la célula, refleja el ensamblaje y desensamblaje dinámico de los filamentos de actina que requieren las células para moverse y cambiar de forma (Cooper, 2006; Alberts y col., 2008). La clave para comprender este proceso se obtuvo con el descubrimiento de un grupo de proteínas, el complejo Arp2/3 (proteínas relacionadas a actina), que se une a la actina/ATP presente en el extremo más (Schroer y col., 1994). Una vez activado, el complejo Arp2/3 se une a un filamento de actina cerca del extremo más y da origen a una nueva rama (Favoreel y col., 2005).

Las actividades de las proteínas asociadas a actina; cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controladas por una variedad de mecanismos señalizadores celulares, que

permiten que la polimerización de actina se regule apropiadamente en respuesta a estímulos ambientales (Gouin y col., 2005). Así, estas proteínas pueden actuar conjuntamente para estimular la renovación de los filamentos y la remodelación del citoesqueleto, lo que es necesario para una diversidad de movimientos celulares y cambios en la forma de la célula. Esto es una gran tarea y, en algunos tipos celulares, el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos es responsable de la mitad de la hidrólisis de ATP en la célula (Cooper, 2006).

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

En la periferia de la célula hay una elevada concentración de filamentos y de proteínas de unión a actina que forman una red tridimensional bajo la membrana plasmática (Alberts y col., 2008). Esta red, denominada corteza celular (Fig. 2), determina la forma de la célula y está implicada en diversas acciones de la superficie celular, incluyendo el movimiento. De esta manera, la asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es fundamental para la estructura y función celular (Cooper, 2006).

Las respuestas de la célula a las señales extracelulares con frecuencia suponen alteraciones en la motilidad y en la forma celular. Por lo tanto, el remodelado del citoesqueleto es un proceso fundamental en la respuesta de muchas células a los factores de crecimiento y a otros estímulos extracelulares. Dentro de estas remodelaciones se incluye la formación de evaginaciones de la superficie celular filopodios (proyecciones rígidas y delgadas), lamelipodios (proyecciones regulares delgadas y laminares) y ondulaciones en la membrana, así como la formación de adhesiones focales y fibras de tensión (Fig. 2) (Alberts y col., 2008).

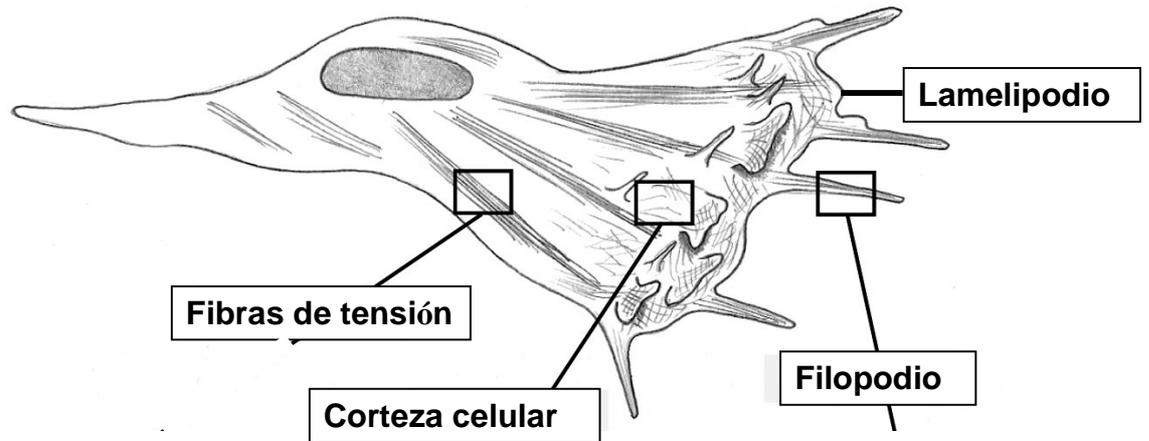


Figura 2. Representación esquemática de las principales remodelaciones del citoesqueleto (tomado y modificado de Alberts y col., 2008).

Los miembros de la familia Rho, Rac y Cdc42 proteínas pequeñas de unión a GTP involucradas en señalar los rearrreglos del citoesqueleto, (Rho, Rac y Cdc42) desempeñan un papel central en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, controlan diversos procesos celulares, incluidos motilidad, adhesión y citocinesis (Cooper, 2006). Sirven como reguladores universales del citoesqueleto de actina, acoplando las señales extracelulares a las variaciones en el movimiento y en la forma celular. Los miembros de la familia Rho pueden activar las vías de señalización de las MAP cinasas (protein-cinasas asociadas a mitógenos), dando lugar a cambios en la expresión génica, además de afectar a otras actividades de la célula como el transporte vesicular y la polaridad (Murata y col., 2005; Favoreel y col., 2005).

Se ha reportado que algunos virus explotan el citoesqueleto de las células del huésped en formas fascinantes para facilitar aspectos importantes de su ciclo de vida como puede ser la entrada, egreso y difusión intercelular. Por ejemplo, el poliomavirus SV40 interactúa con la actina y los microtúbulos para facilitar el transporte del virus al núcleo (Pelkmans y col., 2001), el virus Vaccinia interactúa con los microtúbulos e induce la formación de colas de actina para permitir el egreso eficiente y la difusión intercelular en la presencia de anticuerpos (Moss y Ward, 2001). Adicionalmente, se ha mostrado que

miembros de los herpesvirus, adenovirus y retrovirus usan transporte asociado a los microtúbulos para la liberación eficiente del genoma viral al núcleo (McDonald y col., 2002).

Los cambios morfológicos, como el redondeo y la pérdida de contacto con las estructuras subyacentes ya se han descrito *in vitro* e *in vivo* en células infectadas con PRV, los cuales generalmente están relacionados con alteraciones en la arquitectura celular del citoesqueleto (Minnebruggen y col., 2002). También, se ha observado el desensamble de las fibras de tensión de actina, la retracción y redondeo de las células y la formación de proyecciones conteniendo actina en estados tardíos del ciclo de replicación de los herpesvirus (Favoreel y col., 2006). Aún y cuando hay múltiples evidencias de que los herpesvirus pueden modificar el citoesqueleto de actina durante su ciclo infeccioso. Sin embargo, la importancia biológica de estos eventos no está totalmente entendida. Así tenemos que las diferentes interacciones de los herpesvirus con la actina y las Rho GTPasas parecen depender del tipo celular, esto es, el papel de la actina durante la entrada del virus parece depender fuertemente del tipo celular infectado (Favoreel y col., 2007).

JUSTIFICACIÓN

Aunque se conocen varios aspectos de los mecanismos subyacentes a la modificación del citoesqueleto de actina, las relaciones exactas de las proteínas involucradas, virales y celulares, aún no se conocen con total detalle. Asimismo, el estudio de las relaciones y el significado biológico de dichas interacciones nos permitirá conocer más de la biología celular de la actina, tanto como de los herpesvirus. En este estudio se investigarán las modificaciones que los filamentos de actina de las células RK13 (Monocapa epitelial de riñón de conejo), PK15 (Monocapa epitelial de riñón porcino) y VERO (Monocapa de fibroblastos de riñón de mono verde africano) presentan por la interacción con el virus de pseudorrabia con el fin de determinar si existe alguna diferencia entre ellas y, en caso de existir, sentar las bases para la realización de nuevos estudios en esta área de la biología celular.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si las modificaciones del citoesqueleto de actina inducidas por la interacción con el virus de pseudorrabia tienen el mismo comportamiento en las líneas celulares utilizadas.

Objetivos particulares:

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo Celular y virus

Para realizar este trabajo se utilizaron cultivos de las líneas celulares RK13 (Monocapa epitelial de riñón de conejo), PK15 (Monocapa epitelial de riñón porcino) y VERO (Monocapa de fibroblastos de riñón de mono verde africano). Estas células fueron mantenidas y manejadas en condiciones de esterilidad. Se mantuvieron en DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 mg/ml), en estufa de cultivo a 37°C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. El virus utilizado proviene de un brote de campo, fue aislado e identificado en el CENASA (Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal) como cepa Minnesota. En la suspensión original del aislado viral se determinó un título de $50 \times 10^{-2.92}$ mediante un ensayo de infectividad (TCID₅₀) realizado en células VERO.

Ensayos de infección in vitro

Para realizar estos ensayos se sembraron las líneas celulares RK13, PK15 y VERO en cajas de petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 mg/ml), se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Cuando los cultivos alcanzaron un crecimiento uniforme, las células fueron recuperadas mediante su exposición a 800 µl de Tripsina 0.5% - EDTA (Gibco, Cat.15400) y cuantificadas en una cámara de Neubauer, después se realizaron las diluciones con medio DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico para obtener una concentración de 50×10^4 células/ml. Posteriormente se sembraron 10^4 (20 µl) células de cada uno de los cultivos en cajas de petri de 60 mm, y a las 36 hrs se infectaron con 60 µl del aislado viral diluido en 500 µl de DMEM, se dejaron adsorber por una hora, posteriormente se eliminó el medio de cultivo junto con las partículas virales libres y se agregaron 4 ml de DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico (Hierholzer 1996). Al día siguiente se observaron los efectos causados por la interacción con el virus de pseudorrabia en un microscopio invertido y se realizó el registro

fotográfico de los hallazgos con una cámara digital (Olympus, mod. SP-350 de 8.0 megapíxeles).

Marcaje de Actina

Para documentar los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la interacción con el virus de pseudorrabia, se realizara lo siguiente; las células utilizadas (RK13, PK15 y VERO) se sembraron sobre cubreobjetos de 20 × 20 mm, estériles, colocados dentro de una caja de cultivo de 100 mm de diámetro, se permitió que crecieran por 12 hrs (alcanzando una confluencia del 30%) y después se infectaron con 5 µl del aislado viral diluido en 1 ml de DMEM y se dejó adsorber por una hora, posteriormente el medio de cultivo con las partículas virales libres fueron eliminadas y se agregaron 8 ml de DMEM suplementado con 5% de SFB y antibiótico (Hierholzer 1996). Estos cultivos se mantuvieron en incubadora las siguientes 24 horas durante las cuales se fue tomando un cubreobjeto cada 2 horas, a partir de las 12 horas postinfección. Es importante señalar que a la par de los cultivos infectados también se procesaron cultivos que no fueron infectados, estos cultivos control sirvieron para identificar con certeza los rearrreglos del citoesqueleto inducidos en los cultivos infectados. Los cubreobjetos obtenidos se fijaron con paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) por 10 min a temperatura ambiente (TA), después de lo cual se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.5% en PBS y se bloquearon con una solución de albúmina al 1%. Sobre cada uno de los cubreobjetos se colocaron 50 µl de faloidina rodaminada (Sigma, cat. P1951) diluida 1:200 en PBS durante 30 min a TA en cámara húmeda, se lavaron con PBS y agua desionizada y, finalmente, se colocaron sobre un portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Sc 24941 (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se hizo la observación al microscopio confocal y se realizó el registro fotográfico.

Presentación de resultados

Las imágenes de cada una de las líneas celulares infectadas con el virus de pseudorrabia y tratadas con faloidina rodaminada se presentarán en un mismo panel y ordenadas de acuerdo con el tiempo transcurrido después del inicio de la infección.

RESULTADOS

1. Infección *in vitro* de las células RK-13, PK15 y VERO con el virus de pseudorrabia

Con el fin de estandarizar las condiciones de la interacción del virus con los cultivos celulares y de determinar el momento en el cual se vuelven más evidentes los efectos citopáticos, se desarrollaron una serie de ensayos de infección *in vitro* (Fig. 3).

Células RK-13

A las 15 hrs postinfección (pi.) se encontró un ligero proceso de vacuolización en las células, el cual fue progresando de tal forma que a las 19 hrs pi., que todas las células estaban redondeadas y con grandes vacuolas en su interior, asimismo fue evidente la presencia de *detritus* celulares y una menor cantidad de células por campo de observación, todo lo cual indica el desarrollo de una lisis celular generalizada. A las 23 hrs pi., se encontraron los mismos efectos y sólo se puede resaltar que existía un menor número de células, a pesar de lo cual se notó la presencia de fusiones celulares y de filopodios realizando contactos intercelulares.

Células PK-15

A las 15 hrs pi. todas las células presentaban una gran cantidad de vacuolas, se encontró la presencia de fusiones celulares y de filopodios los cuales daban origen a contactos intercelulares. Estos efectos se mantuvieron y progresaron de tal forma que a las 19 hrs pi., la presencia de fusiones y de *detritus* celulares era más evidente. Aún y cuando la lisis celular siguió avanzando a las 23 hrs pi. todavía se observaban filopodios y células en el campo microscópico.

Células VERO

En este tipo celular no fue sino hasta las 23 hrs pi. que se encontró una vacuolización evidente, un número importante de fusiones celulares y la presencia de filopodios. Asimismo, se observó pérdida de la arquitectura celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede señalar que la dinámica de la infección se desarrolló de manera distinta en cada una de las líneas celulares utilizadas (Fig. 3), así tenemos que la aparición de los efectos citopáticos y el desarrollo del ciclo viral completo ocurrió más rápido en las células RK-13 (15 hrs pi.), mientras que en las células PK-15 se tomó un tiempo intermedio (19 hrs pi) y en las células VERO se desarrolló de manera más lenta (23 hrs pi.).

Tabla 1. Resumen de los efectos citopáticos observados durante el desarrollo de los ensayos de infección *in vitro*.

Tiempo (hrs pi)	Efectos Citopáticos		
	RK-13	PK-15	VERO
15	Vacuolización generalizada de las células	Presencia de filopodios células vacuoladas y fusiones celulares	Células con apariencia normal
19	Células redondeadas y vacuoladas, presencia de <i>detritus</i> celulares. Y una cantidad escasa de células	Fusiones celulares y presencia de <i>detritus</i> celulares	Células con apariencia normal.
23	Se observaron los mismos efectos que a las 19 hrs pi., aunque se encontró un menor número de células. Presencia de filopodios	Presencia de filopodios y aún se encuentra un número importante de células por campo de observación	Células vacuoladas, presencia de filopodios cortos y gran cantidad de fusiones celulares

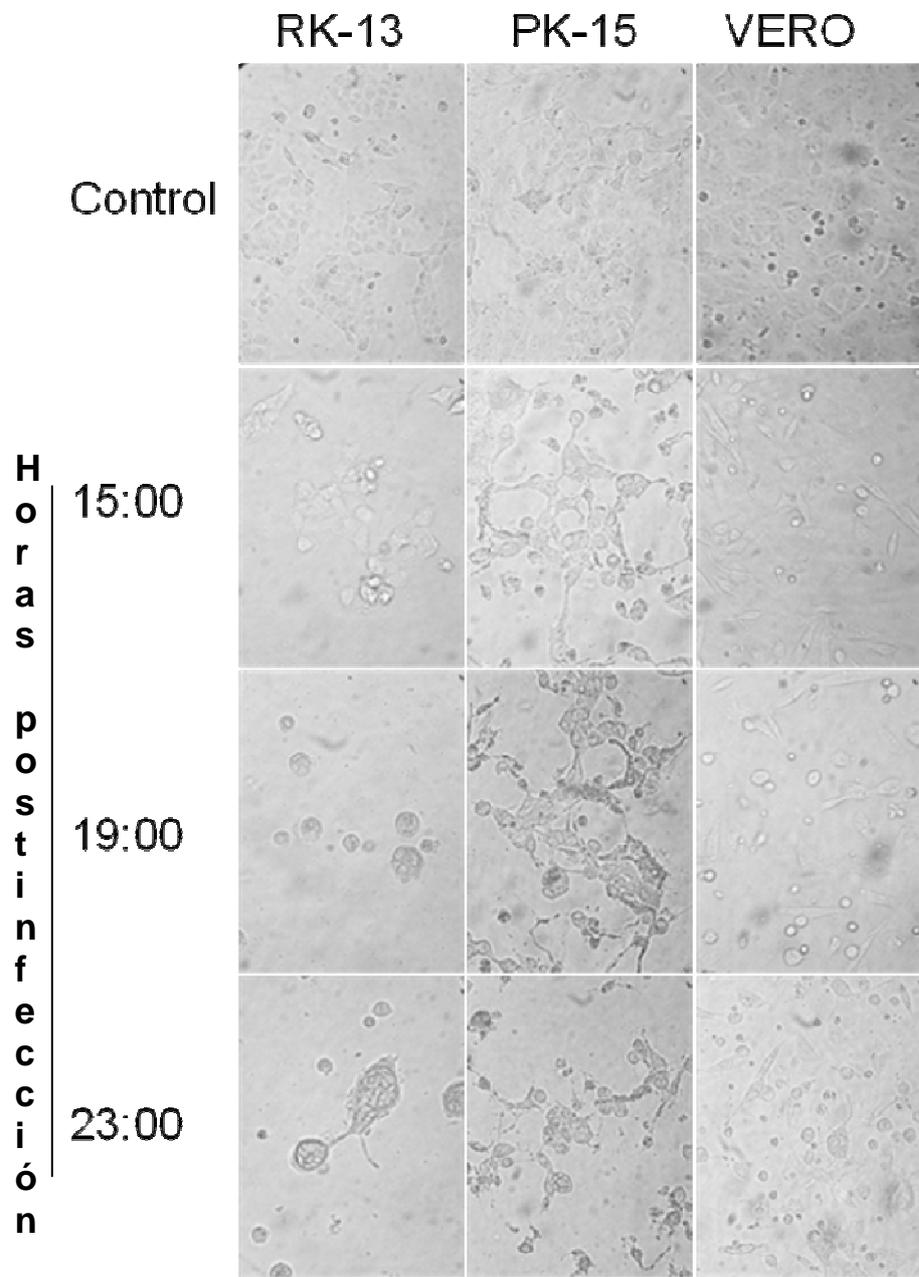


Figura 3. Ensayo de infección *in vitro* con el virus de pseudorrabia.

2. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células RK13

Con el fin de determinar la presencia de modificaciones en el citoesqueleto de actina se utilizaron cultivos de células RK-13 infectados con el virus de pseudorrabia y, posteriormente, la actina fue evidenciada con faloidina rodaminada. Al observar estas preparaciones al microscopio confocal se encontró que a las 14 horas pi. (Fig. 4B) las células RK-13 presentaban fibras de tensión bien definidas y cúmulos evidentes de actina en diversos puntos de las células, estos cúmulos presentaban pequeñísimas ramificaciones. A las 16 horas pi. (Fig. 4C) aún era evidente la presencia de fibras de tensión, mientras que a nivel subcortical se encontró actina filamentosa, de donde se originaban proyecciones celulares alargadas y ramificadas (filopodios) que iniciaban la formación de contactos intercelulares. A las 18 horas pi. (Fig. 4D), se encontró que las células aún presentaban fibras de tensión, así como cúmulos importantes de actina subcortical, de donde se originaban nuevos filopodios. A las 20 hrs pi. (Fig. 4E), se encontraron una serie de contactos intercelulares realizados por medio de los filopodios, los cuales llegaron a medir hasta 33 micrómetros aproximadamente. Asimismo fue evidente la presencia de actina por debajo de la membrana plasmática y el hecho de que algunas fibras de tensión fueron más aparentes y completas en esta preparación que en la de las 16 hrs pi. A las 22 hrs pi. se observaron fibras de tensión incompletas, cúmulos aparentes de actina en puntos específicos de las células, así como áreas puntuales de condensación de actina distribuidas de manera uniforme en toda la célula. Las fibras de tensión estaban desorganizadas y las células mostraban tendencia a redondearse (Fig. 4F).

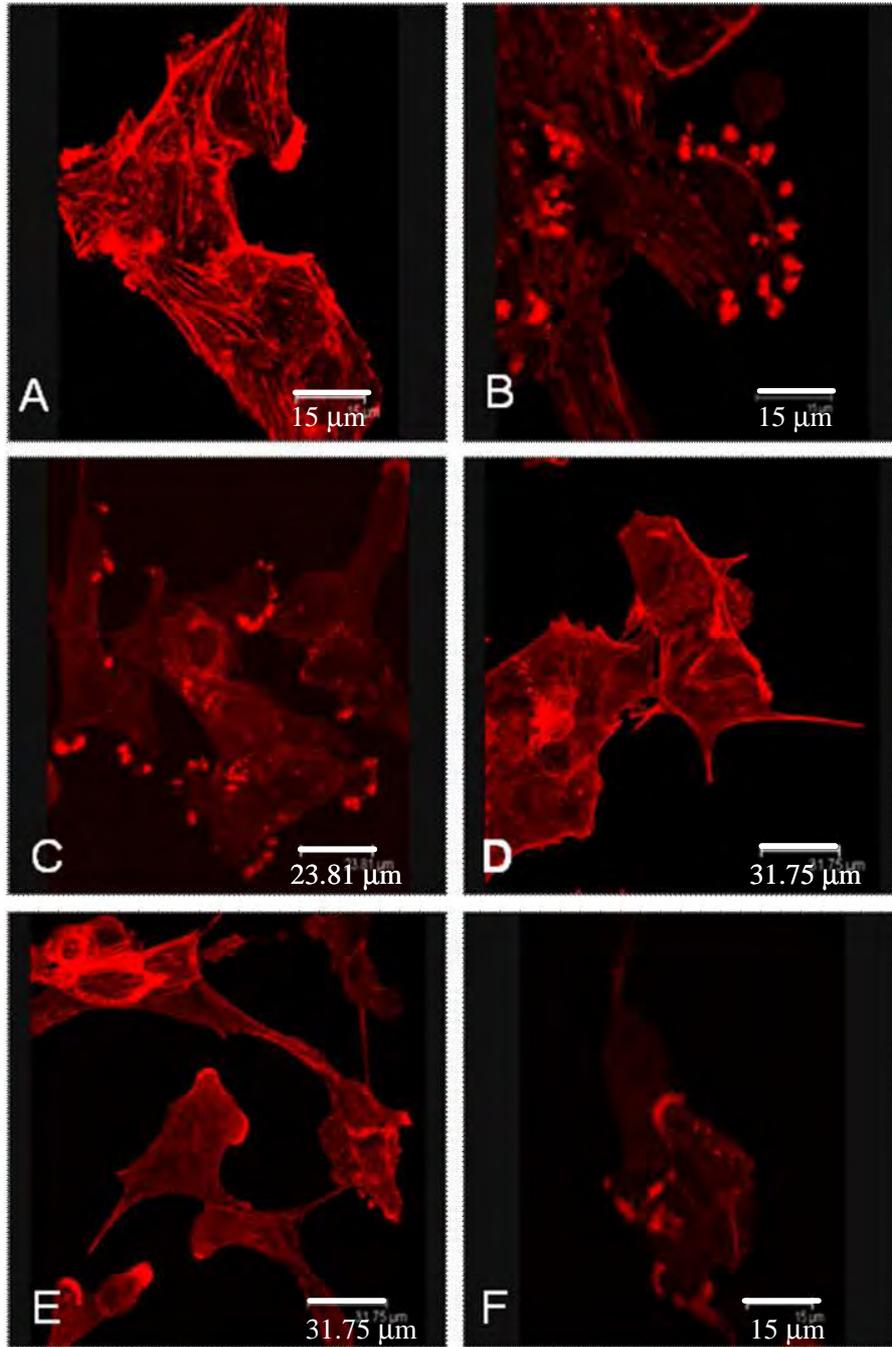


Figura 4. Citoesqueleto de actina en células RK-13 infectadas con PRV. A. Cultivo no infectado. **B.** Células RK-13 después de 14 hrs de iniciada la infección. **C.** Células RK-13 después de 16 hrs de iniciada la infección. **D.** Células RK-13 después de 18 hrs de iniciada la infección. **E.** Células RK-13 después de 20 hrs de iniciada la infección. **F.** Células RK-13 después de 22 hrs de iniciada la infección. Microscopia Confocal (A, D y E 130×; B, C y F 65×).

3. Efecto sobre el citoesqueleto de actina de las células PK15

Con el fin de determinar la presencia de modificaciones en el citoesqueleto de actina se utilizaron cultivos de células PK-15 infectados con el virus de pseudorrabia y, posteriormente, la actina fue evidenciada con faloidina rodaminada. Al realizar la observación de estas preparaciones al microscopio confocal se documentó a las 15 hrs pi. (Fig. 5B), la presencia de sincitios celulares y de filopodios largos y ramificados que estaban originando contactos intercelulares y no fue aparente la presencia de fibras de tensión. A las 17 hrs pi. (Fig. 5C) la actina tuvo una apariencia granular, se localizó por debajo de la membrana plasmática y su distribución fue difusa. Aún seguían sin ser aparentes las fibras de tensión. A las 19 hrs pi. (Fig. 5D) se encontraron sincitios celulares con cúmulos de actina de apariencia granular y filopodios bien definidos, también comenzó a ser evidente la presencia de actina filamentosa. A las 21 hrs pi. (Fig. 5E) fue evidente la presencia de filopodios y sincitios, se encontraron cúmulos focales de actina en sitios específicos, las fibras de tensión fueron escasas pero evidentes y en varias zonas la actina presentó una apariencia granular. A las 23 hrs pi. (Fig. 5F) aún persistían los cúmulos de actina subcortical y se encontraron filopodios bien definidos y largos realizando contactos intercelulares, es de notar que la actina que los formaba mostró una apariencia granular (Fig. 5F).

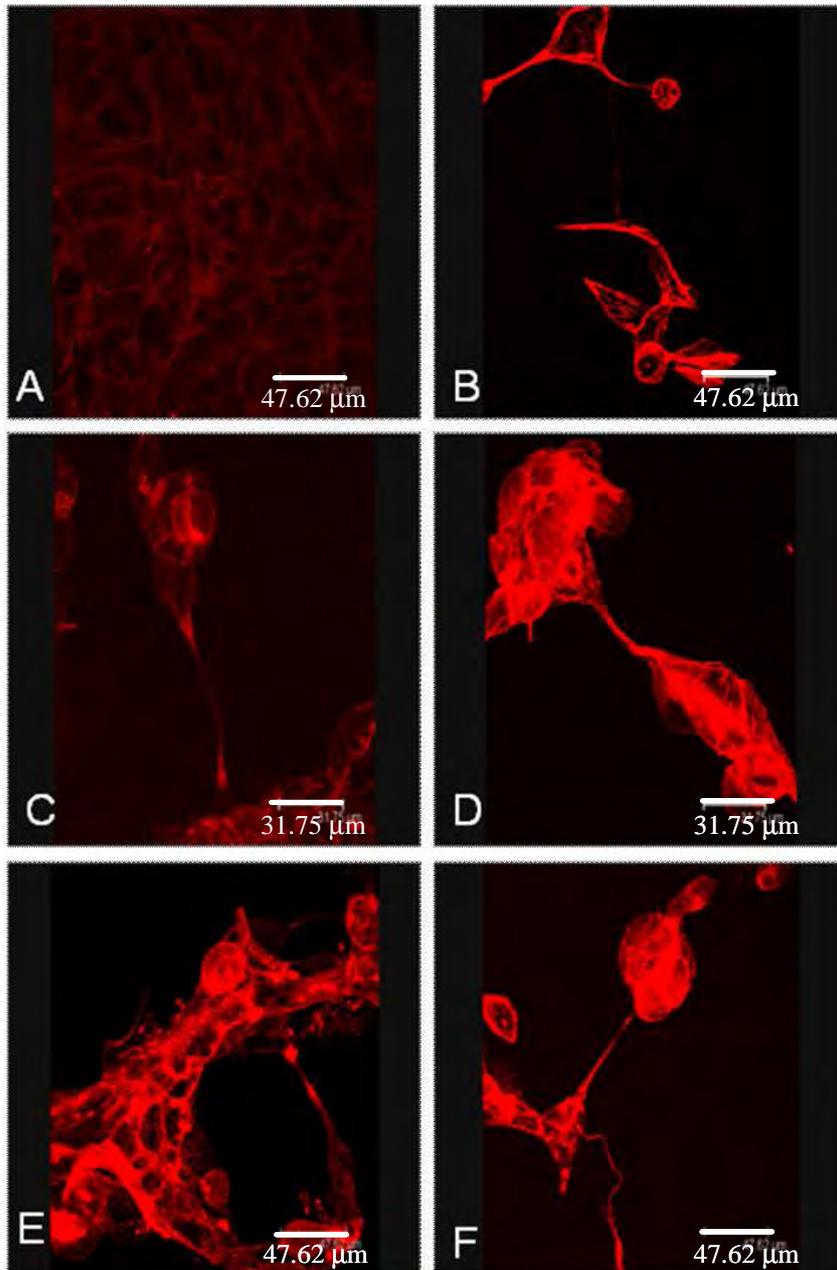


Figura 5. Citoesqueleto de actina en células PK-15 infectadas con PRV. A. Cultivo no infectado. **B.** Células PK-15 después de 15 hrs de iniciada la infección. **C.** Células PK-15 después de 17 hrs de iniciada la infección. **D.** Células PK-15 después de 19 hrs de iniciada la infección. **E.** Células PK-15 después de 21 hrs de iniciada la infección. **F.** Células PK-15 después de 23 hrs de iniciada la infección. Microscopia Confocal (A, B y C 65×; D, E y F 130×).

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

Para determinar la presencia de modificaciones en el citoesqueleto de actina se utilizaron cultivos de células VERO infectados con el virus de pseudorrabia y, posteriormente, la actina fue evidenciada con faloidina rodaminada. Al observar estas preparaciones al microscopio confocal encontramos que, a las 13 hrs de iniciada la infección las células mostraban una apariencia normal ya que se apreciaba la presencia de fibras de tensión y pequeños puntos de condensación de actina localizados por debajo de la membrana plasmática (Fig. 6B). A las 17 hrs pi. aún eran evidentes las fibras de tensión, sin embargo, comenzaba la acumulación de actina filamentosa por debajo de la membrana plasmática (Fig. 6C). A las 19 hrs pi. se notaron cúmulos evidentes de actina localizada por debajo de la membrana plasmática, dicha actina mostraba características particulares en el sentido de que en algunas partes de la célula su apariencia era filamentosa y, en otras, granular. En esta preparación se notó la presencia de filopodios cortos pero bien definidos (Fig. 6D). A las 21 hrs pi. se encontraron sincitios celulares, que tendían a tomar una forma redondeada con presencia de múltiples filopodios largos, delgados y sumamente ramificados, los cuales daban origen a contactos intercelulares. La mayor parte de la actina se encontraba por debajo de la membrana plasmática y mostraba una apariencia filamentosa, mientras que la del citoplasma lucía granular (Fig. 6E). A las 23 hrs pi., los filamentos de actina estaban concentrados en los filopodios, aunque también se localizaban por debajo de la membrana plasmática, en esta preparación ya eran inaparentes las fibras de tensión y resalta la presencia de una gran cantidad de *detritus* celulares (Fig. 6F).

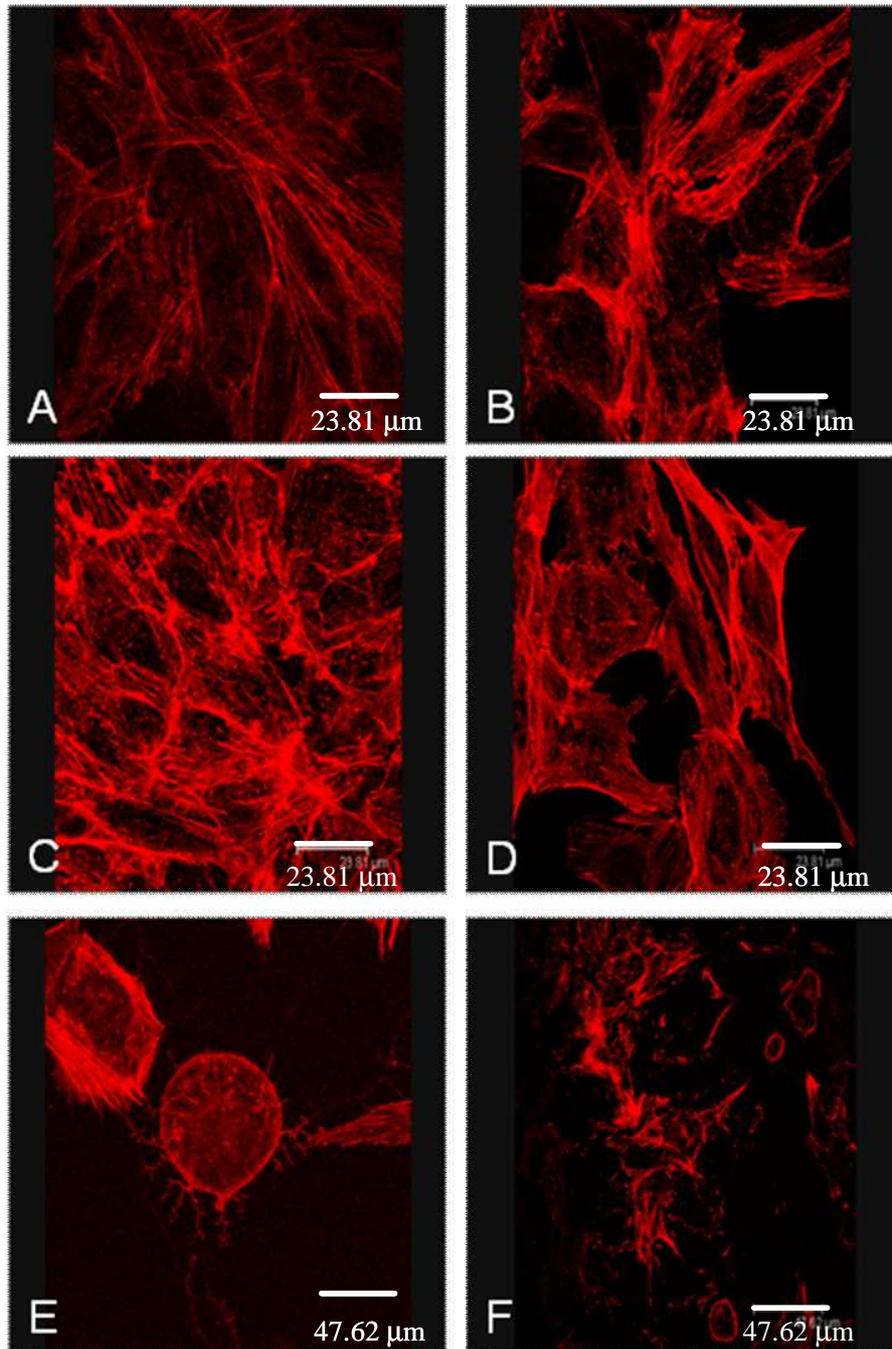


Figura 6. Citoesqueleto de actina en células VERO infectadas con PRV. A. Cultivo no infectado. **B.** Células VERO después de 13 hrs de iniciada la infección. **C.** Células VERO después de 17 hrs de iniciada la infección. **D.** Células VERO después de 19 hrs de iniciada la infección. **E.** Células VERO después de 21 hrs de iniciada la infección. **F.** Células VERO después de 23 hrs de iniciada la infección. Microscopia Confocal (A, B, C, D y F 65×; E 130×).

DISCUSIÓN

La actina filamentosa es una estructura clave del citoesqueleto en todas las células y está involucrada en muchos procesos celulares cruciales (Favoreel y col., 2007). Las formaciones de actina filamentosa mejor caracterizadas son los filopodios, lamelipodios y las fibras de tensión. La estructuración de estas formaciones está estrictamente regulada por vías de transducción de señales que dependen de las proteínas Rho GTPasas (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Las mejor caracterizadas son; RhoA (fibras de tensión), Rac1 (lamelipodios) y Cdc42 (filopodios). La transición de estas Rho GTPasas, de la forma activa a la inactiva está acompañada por fosforilación y activación de diferentes moléculas efectoras que inician las vías de traducción de señales y los subsecuentes rearrreglos en el citoesqueleto de actina (Favoreel y col., 2007).

Debido a las muchas funciones celulares en las cuales está involucrada la actina, no es sorprendente que muchos patógenos intracelulares interactúen con ella y las vías de señalización regulatorias. Estas interacciones pueden ocurrir en diversos momentos del ciclo de vida de los patógenos, incluyendo; la internalización, el movimiento intracelular y la difusión intercelular (Stevens y col., 2006; Gouin y col., 2005).

Este trabajo se realizó con la finalidad de explorar si la interacción del virus de pseudorrabia era capaz de inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina de diferentes líneas celulares. Con el fin de aumentar la probabilidad de que se desarrollara adecuadamente el ciclo viral se buscó que las líneas celulares utilizadas tuvieran un linaje u origen similar, por esta razón se decidió utilizar a las células RK13, PK15 y VERO, en el sentido de que todas ellas provienen del riñón y poseen un linaje epitelial (RK-13 y PK-15) o mesenquimatoso (VERO), siendo la especie de origen la principal diferencia. La interacción del virus de pseudorrabia con las líneas celulares utilizadas provocó diversas modificaciones del citoesqueleto de actina, entre las cuales podemos resaltar la formación de filopodios, por lo que se puede señalar que conforman un modelo adecuado en el cual estudiar las interacciones del virus de pseudorrabia con el citoesqueleto de actina.

De acuerdo con múltiples evidencias se considera que los filopodios permiten a la célula infectada establecer una gran cantidad de interacciones celulares y contactos íntimos

con células adyacentes que permitan a las partículas virales migrar por dentro de las proyecciones hacia las puntas y es a partir de estas interacciones que el virus desarrolla la difusión intercelular de la infección (Favoreel y col., 2005). Este tipo de difusión permite la evasión de los anticuerpos neutralizantes en un huésped inmunizado (Spear, 1993).

En trabajos previos se señala la necesidad de colocar anticuerpos en el medio con el fin de inducir la formación de filopodios (Favoreel y col., 2006). En este estudio no se colocaron anticuerpos neutralizantes en el medio y a pesar de ello se formaron los filopodios, sin embargo, fue necesario que las células estuviesen sembradas a una confluencia del 30% para que fuera evidente la presencia de filopodios.

Las evidencias mostradas (Figs. 4, 5 y 6) indican que la propagación intercelular de la infección, en este estudio, se realizó mediante la fusión de la membrana plasmática de la célula infectada con la de las células adyacentes no infectadas, dando como resultado la formación de sincitios gigantes y multinucleados en los tres cultivos estudiados. Este tipo de propagación de la infección presenta la ventaja de ocurrir con mayor rapidez. Las células no infectadas son reclutadas en sincitios en mucho menos tiempo del que tarda una célula infectada en producir viriones (Demmin y col., 2001). Es necesario señalar que no todos los tipos celulares se fusionan cuando son infectadas por estos virus, lo que indica que es necesario un ambiente celular específico (Dingwell y col., 1994). Lo cual refrenda el hecho de que los cultivos utilizados conforman un modelo adecuado en el cual estudiar detalles finos de las interacciones entre el virus de pseudorrabia y el citoesqueleto celular, ya que dicho “ambiente celular específico” no se encuentra descrito en la literatura.

Se encontraron diferencias evidentes con respecto al tiempo empleado por el virus para inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina según la línea celular utilizada. En el caso de las células VERO se pudo observar que resultaron ser las más refractarias a la infección del virus (Fig. 6, 23 hrs pi) y, por consecuencia, las modificaciones del citoesqueleto de actina son más tardías, mientras que, por su parte, las células RK-13 fueron las más permisivas (Fig. 4, 15 hrs pi). Existen trabajos previos en los que se reportan los mismos hallazgos aunque utilizando otros tipos celulares, así tenemos que las células MDCK (epitelial de riñón de canino) son extraordinariamente refractarias a la infección en comparación con las células VERO o HEp-2 (epitelial de humano) (Demmin y col., 2001).

A la fecha aún no se conocen los factores que probablemente estén provocando esta variación en el tiempo empleado por el virus para desarrollar su ciclo replicativo de acuerdo con el tipo celular empleado.

Es necesario señalar que la propagación de la infección intercelular requiere un mayor repertorio de proteínas virales del que requiere la infección con viriones libres (Spear, 1993). Dentro de las proteínas virales que suelen expresarse durante la infección con el virus de pseudorrabia está la proteína US3, la cual es una cinasa de serina/treonina que produce el desensamble de las fibras de tensión de actina en diferentes tipos celulares (Frame y col., 1987; Van Minnebruggen, 2003). La proteína US3 está conservada entre los alfa herpesvirus y, aunque no es esencial para su replicación, está implicada en varios aspectos de la infección, tales como egreso de la progenie viral desde el núcleo y protección a la apoptosis de las células infectadas (Klupp y col., 2001; Pol y col., 1991; Schumacher y col., 2005; Ogg y col., 2004; Galvan y Roizman, 1998; Hata y col., 1999). Por otra parte, el papel desempeñado por US3 para la protección ante la apoptosis es un aspecto que ha sido ampliamente estudiado en los últimos años (Ogg y col., 2004; Geenen y col., 2005). El desensamble de las fibras de tensión inducido por US3, también se asocia con el redondeo de las células y, adicionalmente, con la inducción de proyecciones de actina, largas y frecuentemente ramificadas, en células que se encuentran sembradas de manera dispersa (Murata y col., 2000; Favoreel y col., 2005).

La inhibición de los rearrreglos de actina inducidos por US3, mediante el uso de la droga estabilizadora de actina, el jasplakinolido, redujo significativamente la difusión intercelular del virus de pseudorrabia, lo cual sugiere que la US3 desempeña un papel importante durante el proceso de difusión intercelular (Favoreel y col., 2005). A pesar del papel central que parece desempeñar la proteína US3 en las modificaciones del citoesqueleto de actina durante el proceso de infección, para este trabajo no fue posible realizar ningún tipo de experimento con esta proteína. La significancia biológica de estos eventos no está, en varios casos, bien entendida, las diferentes interacciones de los herpesvirus con la actina y las Rho GTPasas parece depender del tipo celular y aunque varias evidencias han sido descubiertas acerca de los mecanismos subyacentes, la red exacta de proteínas virales y celulares involucradas no cabe duda que será compleja

(Favoreel y col., 2007). Asimismo, en estudios posteriores será interesante dilucidar la significancia biológica y los mecanismos subyacentes de los rearrreglos de actina inducidos por la proteína US3.

CONCLUSIONES

1. Se encontró la presencia de rearrreglos del citoesqueleto de actina en todas las líneas celulares utilizadas cuando son infectadas con el virus de pseudorrabia y de dichos rearrreglos el más evidente fue la formación de filopodios.
2. La línea celular RK-13 resultó ser la más receptiva a la interacción con el virus evidenciando cambios importantes en el citoesqueleto de actina a las 14 hrs pi, lo cual sugiere que la maquinaria celular de esta línea celular es más permisiva a la infección.
3. En la línea celular PK-15 se comenzaron a notar las modificaciones en el citoesqueleto de actina a las 15 hrs pi, sin embargo el desarrollo completo del ciclo viral fue más lento que en las células RK-13.
4. La línea celular VERO fue la más refractaria a la infección del virus de pseudorrabia, siendo notorio que los efectos citopáticos y los rearrreglos del citoesqueleto de actina inducidos por la infección viral tardaron más en presentarse (19 hrs pi).
5. Las modificaciones del citoesqueleto fueron de diferente forma y tamaño en cada una de las líneas celulares estudiadas.
6. Este estudio conforma un modelo adecuado en el cual profundizar el estudio de la interacción viral con el citoesqueleto de las células eucariontes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed., Garland Science, New York, 2008 pp. 965-983.
2. Bolin SR, Bolin CA. Pseudorabies virus infection of six-and-ten-days-old porcine embryos. *Theriogenology* 1984 22: 101-108.
3. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3^a. edición, Marbán Libros, Madrid, 2006 pp. 435-444 y 574-575.
4. Demmin GL, Clase AC, Randall JA, Enquist LW, Banfield BW. Insertions in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. *Journal of Virology* 2001 75: 10856-10869.
5. Dingwell KS, Brunetti CR, Henendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ, Johnson DC. 1994. Herpes simplex virus glycoprotein E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* 68: 834-845.
6. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002 420: 629-635.
7. Favoreel HW, Enquist LW, Feierbach B. Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends in Microbiology* 2007 15: 426-433.
8. Favoreel HW, Minnebruggen GV, Adriaensen D, Nauwynck HJ. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 102: 8990-8995.
9. Favoreel HW, Minnebruggen GV, Van de Walle GR, Ficinska J, Nauwynck HJ. Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies and hiding from antibodies. *Veterinary Microbiology* 2006 113: 257-263.
10. Forest T, Barnard S, Baines JD. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol* 2005 7: 429-431.
11. Frame MC, Purves FC, McGeoch DJ, Marsden HS, Leader DP. 1987. Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J Gen Virol* 68: 2699-2704.

12. Galvan V, Roizman B. 1998. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cell from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3931-3936.
13. Geenen K, Favoreel HW, Olsen L, Enquist LW, Nauwynck HJ. The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* 2005 331: 144-150.
14. Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2005 8: 35-45.
15. Hampl H, Ben-Porat T, Ehrlicher L, Habermehl KO, Kaplan AS. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein H. *J Virology* 1984 52: 583-590.
16. Hata S, Koyama AH, Shiota H, Adachi A, Goshima F, Nishiyama Y. Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect* 1999 1: 601-607.
17. Hierholzer JC, Killington RA. Quantitation of virus. In: Mahy BWJ, Kangro HO (eds). *Virology Methods Manual*. Academic Press, Boston, USA, 1996, pp. 35-45.
18. Iglesias GJ, Trujano M, Lokensgard J, Molitor T. Study of the potential involvement of pseudorabies virus in swine respiratory disease. *Can J Vet Res* 1992 56: 74-77.
19. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. Seudorrabia (enfermedad de Aujeszky). En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (Eds.) *Enfermedades del Cerdo*. 8ª edición, Intermédica Argentina, 2000, pp. 227-238.
20. Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *Journal of General Virology* 2001 82: 2363-2371.
21. Klupp BG, Visser N, Mettenleiter TC. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein H. *J Virology* 1992 66: 3048-3055.
22. Kritas SK, Pensaert MB, Mettenleiter TC. Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathway of the pig. *J General Virology* 1994 75: 2319-2327.

23. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells to track the behavior human immunodeficiency virus (HIV)-1 in the cytoplasm of infected cells we have tagged virions by incorporation of HIV vpr fused to the GFP observation of the GFP-labeled particles in living cells revealed that they moved in. *J Cell Biology* 2002 159: 441-452.
24. Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: The virus and molecular pathogenesis- State of the art, June 1999. *Vet Res* 2000 31: 99-115.
25. Mettenleiter TC. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: State of the art. August 1993. *Acta Vet Hung* 1994 42: 153-177.
26. Michael K, Klupp BG, Mettenleiter TC, Karger A. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47 or UL49 or envelope glycoprotein E. *J Virol* 2006 80: 1332-1339.
27. Minnebruggen GV, Van de Walle GR, Favoreel HW, Nauwynek HJ, Pensaert MB. Temporary disturbance of actin stress fibers in swine kidney cells during pseudorabies virus infection. *Veterinary Microbiology* 2002 86: 89-94.
28. Moss B, Ward BM. High-speed mass transit for poxviruses on microtubules. *Nat Cell Biol* 2001 3: 245-246.
29. Mulder W, Pol J, Kimman T, Kok G, Priem J, Peeters B. Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron-to-neuron transmission in its natural host, then pig, but not after additional inactivation of gE or gI. *J Virology* 1996 70: 2191-2200.
30. Murata T, Goshima F, Daikoku T, Takakuwa H, Nishiyama Y. Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes to Cells* 2000 5: 1017-1027.
31. Ogg PD, McDonnell PJ, Ryckman BJ, Knudson CM, Roller RJ. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* 2004 319: 212-224.
32. Pejsak ZK, Truszczynski MJ. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine*. 9th ed., Blackwell, Iowa, 2006 pp. 419-433.

33. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Simian virus 40 (SV40) is unusual among animal viruses in that it enters cells through caveolae, and the internalized virus accumulates in a smooth endoplasmic reticulum (ER) compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 3: 473-483.
34. Pol JMA, Wagenaar F, Gielkens A. 1991. Morphogenesis of three pseudorabies virus strains in porcine nasal mucosa. *Intervirology* 32: 327-337.
35. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurobiology and veterinary medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2005 69: 462-500.
36. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Elsevier, New York, 2007 pp. 1394-1404.
37. Rue CA, Ryan P. A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparin sulfate and which involves the actin cytoskeleton. *Virology* 2003 307: 12-21.
38. SAGARPA, 2007. Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).
http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/diagnostico_y_constatacion/Centro_Nacional_de_Servicios_de_Diagnostico_en_Salud_Animal_CENASA.html
39. Schroer TA, Fyriberg E, Cooper JA, Waterson RH, Helfman D, Pollard TD, Meyer DI. Actin-related protein nomenclature and classification. *J Cell Biology* 1994 127: 1777-1778.
40. Schumacher D, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N. The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J Virol* 2005 79: 3987-3997.
41. Simon A, Mettenleiter TC, Rziha HJ. Pseudorabies virus displays variable numbers of a repeat unit adjacent to the 3' end of the glycoprotein gII gene. *J General Virology* 1989 70: 1239-1246.
42. Spear PG. 1993. Entry of alphaherpesvirus into cells. *Semin Virol* 4:167-180.
43. Stevely WS. Virus-induced proteins in pseudorabies-infected cells II. Proteins of the virion and nucleocapsid. *Journal of Virology* 1975 16: 944-950.

44. Stevens JM, Galyov E, Stevens MP. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2006 4: 91-101.
45. Van Minnebrugen G, Favoreel HW, Jacobs L, Nauwynck H. Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol* 2003 77: 9074-9080.
46. Wheeler JG, Osorio FA. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *American Journal of Veterinary Research* 1991 52: 1799-1803.

Anexo 1

Medio de Cultivo DMEM

REACTIVOS	CANTIDAD
DMEM (Gibco)	26.8 g
NaHCO ₃ (Sigma)	7.4 g
Agua destilada cbp.	2000 ml

Procedimiento:

Generalmente se preparan dos litros de medio de cultivo y estos deben ser esterilizados por filtración. Para preparar este medio se requieren los reactivos ya mencionados, enseguida en un recipiente se vacían alrededor de 1800 ml de agua, después se agrega el medio DMEM (2 paquetes) y 7.4 g de NaHCO₃, estos reactivos se mezclan con la ayuda de un agitador magnético; se ajusta el pH a 7.2 y se afora a 2000 ml. El siguiente paso es prefiltrar con membranas de 0.45 µm, posteriormente se filtra con membranas de 0.22 µm y se va depositando en frascos de 500 ml, todos estos pasos deben ser realizados en condiciones de esterilidad. Una vez que se terminó de filtrar se toman 10 ml del contenido de cada uno de los frascos, se colocan en un tubo Falcon de 15 ml nuevo y se dejan dentro de la incubadora a 37° C por 24 horas como prueba de esterilidad. Los frascos con el medio de cultivo se almacenan en refrigeración a 4° C.

Antes de utilizarse el medio debe ser suplementado con suero fetal bovino (SFB) y con antibióticos (penicilina-estreptomicina).

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)

REACTIVOS	CANTIDAD
NaH ₂ PO	2.6 g
NaH PO ₄	2.17 g
NaCl	90 g
Agua	1000 ml

Procedimiento: Para preparar este amortiguador se necesitan los reactivos ya mencionados, se mezclan en un recipiente, pero solo se colocan 900 ml de agua; una vez mezclados se debe ajustar a un pH de 7.4 y al final se afora a 1000 ml.