



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO *IN VITRO*
DE UNA CEPA VIRAL DEL SÍNDROME
REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO DEL CERDO
(PRRSV) AISLADA EN CAMPO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

SAMANTHA MÁRQUEZ FLORES

Asesor: Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

Co-asesor: M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero



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.

**Agradezco el apoyo otorgado por la Cátedra de Investigación NCOS-07
(Morfología Veterinaria y Biología Celular) del programa PACIVE 2012
de la FES Cuautitlán.**

A mis padres:

**Marisela Flores Trejo y Manuel Márquez Mendoza,
por brindarme las herramientas para mi educación.**

1. Resumen

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV), produce una enfermedad clínica o subclínica, que se caracteriza por un incremento de abortos, de lechones nacidos muertos y/o débiles, disminución de la tasa de parición y un aumento en el porcentaje de mortalidad en lechones al destete. Este virus es endémico en la mayoría de los países productores de cerdos y se asocia con grandes pérdidas económicas. El PRRSV tiene un tropismo celular sumamente restringido, tanto *in vivo* como *in vitro*, de tal forma que todos los estudios *in vitro* realizados hasta ahora se han realizado en un grupo reducido de células (MARC-145, CL2621 y/o MA104). Un factor clave de este tropismo se debe a que su entrada a las células es a través de un mecanismo de endocitosis mediada por un receptor, donde el heparan sulfato, la sialoadhesina y el CD163 (Cluster of Differentiation 163) se han identificado como receptores esenciales. Sin embargo, los resultados reportados a la fecha son contradictorios e inconclusos. En este trabajo se logró el desarrollo del ciclo viral de PRRSV en las líneas celulares VERO, RK-13 y PK-15, asimismo se determinó la duración del ciclo de replicación y descripción de los efectos citopáticos y las modificaciones que el citoesqueleto de actina desarrolla por la interacción con este virus. La presencia del virus fue corroborada por la prueba de suero neutralización en donde se logró bloquear la infección con una dilución 1:250 del stock viral. Los efectos citopáticos fueron: presencia de células de diferente forma y tamaño, algunas células con apariencia rugosa por la presencia de vacuolas, formación de sincitios, emisión de filopodios y lisis celular, que se presentaron entre las 17 y las 23 horas posinfección (hpi). La infección de las células Vero y RK-13 indujo la formación de filopodios y lamelipodios como modificaciones del citoesqueleto de actina. También se exploró si existía alguna diferencia en la producción de partículas virales dependiendo de la línea celular, para esto se utilizaron cultivos de células RK-13 y Vero, los cuales fueron infectados con la misma cantidad de virus y, después de 72 hpi, se realizó la titulación de los viriones producidos por el método de Reed-Muench, con esto se determinó que prácticamente no hubo diferencia en la cantidad de partículas producidas pues el título viral obtenido en las células RK-13 fue de $10^{11.49}$ TCID₅₀ ml⁻¹ mientras que en las VERO fue de $10^{11.44}$ TCID₅₀ ml⁻¹. Resulta fundamental desarrollar trabajos adicionales que permitan un mejor entendimiento del ciclo de vida de los virus y de sus interacciones con el ambiente celular del huésped para conocer los detalles moleculares de la patogénesis viral y permitir el desarrollo de nuevas terapias antivirales y/o inmunológicas.

Palabras clave: PRRSV, ensayos *in vitro*, PK15, RK13, VERO, efecto citopático, receptor.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1.-RESUMEN	i
2.-INTRODUCCIÓN	4
2.1.-Antecedentes de PRRSV	4
2.2.-Signos Clínicos de la Enfermedad	5
2.3.-Diagnóstico Serológico de PRRSV	6
2.4.-Características del Virus	6
2.4.1.-Proteínas Virales	7
2.5.-Ciclo viral y estudios <i>in vitro</i>	9
2.6.-Citoesqueleto	10
3.-OBJETIVOS	14
3.1.-Objetivo general	14
3.2.-Objetivos particulares	14
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1.-Virus y Cultivos celulares	15
4.2.-Ensayo de infección en células PK15, RK13 y VERO	15
4.3.-Detección del virus de PRRS mediante Virus Suero Neutralización	16
4.4.-Estudio del Citoesqueleto/Marcaje de Actina	17
4.5.-Evaluación de la Producción de Partículas Virales	17
5.-RESULTADOS	19
5.1.-Ensayos preliminares	19

5.2.-Prueba de Suero Neutralización	19
5.3.-Desarrollo de Ciclo Viral de las Células PK15	21
5.4.-Desarrollo del Ciclo Viral de las Células RK13	23
5.5.-Desarrollo del Ciclo Viral de las Células VERO	25
5.6.-Efecto sobre el Citoesqueleto de Actina de las Células RK13	27
5.7.-Efecto sobre el Citoesqueleto de Actina de las Células VERO	29
5.8.-Producción de Partículas Virales (TCID ₅₀) en las Células RK13 y VERO	31
6.-DISCUSIÓN	35
7.-CONCLUSIONES	39
8.-REFERENCIA	40

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1. Principales pruebas serológicas usadas en el Dx. de PRRS	6
Tabla 2. Características de los animales muestreados	15
Tabla 3. Cuantificación de la producción de partículas virales en células RK-13 (TCID ₅₀)	32
Tabla 4. Cuantificación de la producción de partículas virales en células VERO (TCID ₅₀)	33
Tabla 5. Resumen de los ECP observados en células VERO, RK-13, PK-15 infectadas con PRRS	34

Páginas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del virus del PRRS	8
Figura 2. Ensayo de suero neutralización realizado en células RK-13	20
Figura 3. Cultivos de células PK-15 infectados con sueros positivos a PRRSV	22
Figura 4. Cultivos de células RK-13 infectados con sueros positivos a PRRSV	24
Figura 5. Cultivos de células VERO infectados con sueros positivos a PRRSV	26
Figura 6. Cambios en el citoesqueleto de actina de células RK-13 infectadas con el PRRSV	27
Figura 7. Cambios en el citoesqueleto de actina de células RK-13 infectadas con el suero 2	28
Figura 8. Cambios en el citoesqueleto de actina de células VERO infectadas con PRRSV	30
Figura 9. Cambios en el citoesqueleto de actina de una célula VERO infectada con el suero 2	31

2. Introducción

2.1 Antecedentes de PRRSV

En 1987 se describían, por primera vez en Carolina del Norte, EUA, epidemias de una enfermedad aguda porcina, previamente desconocida, caracterizada por un marcado aumento en abortos, lechones débiles nacidos muertos, disminución de la tasa de parición, altos porcentajes de mortalidad en cerdos destetados y retraso en el retorno al estro en cerdas. (Keffaber 1989; Loula 1991)

En el mismo año fueron reconocidas epidemias similares en Canadá (Dea *et al.*, 1992). En Japón en 1989 (Schimizu *et al.*, 1994), en Alemania en 1990 donde se designó “aborto epizootiológico de las cerdas” (Lindhaus y Lindhaus 1991), en Holanda, España, Francia y el Reino Unido en 1991 (Wensvoort *et al.*, 1991; White 1991; Meredith 1992), en Dinamarca en 1992 (Botner *et al.*, 1994) y, desde 1992, en la mayor parte del resto del mundo donde se crían cerdos (Meredith, 1992). También se le ha denominado como “enfermedad de la oreja azul” (por un cambio transitorio de color en las orejas de algunas cerdas), “síndrome de esterilidad y aborto porcino”, “síndrome epidémico respiratorio y abortivo porcino” y “aborto azul” (Molitor *et al.*, 1997).

Desde 1991 se propuso como denominación internacional “síndrome reproductivo y respiratorio porcino” (SRRP) (European Commission, 1991).

Aunque los datos epidemiológicos de los primeros casos indicaban que se trataba de una enfermedad infecciosa, no fue hasta varios años después que se pudo identificar con certeza el agente causal (Wensvoort *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992).

En 1992, Estrada, Díaz y Corona realizaron el primer reporte con la descripción clínica de la enfermedad en México. Este mismo año Correa y su grupo de trabajo reportaron la presencia de seroconversión en muestras de cerdos tomadas en rastros.

En 1997, Doporto *et al.*, realizan la primera descripción clínica, epidemiológica y productiva de la enfermedad debido a un brote de campo y, ese mismo año, Ramírez Necochea, Sierra y Ávila reportan el primer aislamiento del virus del PRRS a partir de muestras obtenidas en cuatro estados de la república mexicana (Guanajuato, Veracruz,

Estado de México y Puebla). Finalmente, hasta el año de 1999 las autoridades hacen el reconocimiento oficial de la presencia de la enfermedad en México (Díaz *et al.*, 2001).

Debido a que PRRSV es un virus ARN su genoma cambia continuamente por lo que surgen rápidamente cepas heterólogas que representan amenazas importantes para la industria porcina (Cavanagh, 1997).

Actualmente, este virus es endémico en la mayoría de los países productores de cerdos y se asocia con grandes pérdidas económicas (Díaz *et al.*, 2001).

2.2 Signos Clínicos de la Enfermedad

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) es una enfermedad clínica o subclínica. En cerdos de engorda causa problemas respiratorios que afectan la conversión alimenticia y la ganancia de peso, asimismo hay un aumento en la mortalidad en los cerdos jóvenes. En el pie de cría causa aborto e infertilidad de inicio súbito, momificaciones, nacimiento de lechones débiles o muertos y aumento en la mortalidad pre-destete. La formación de camadas infectadas que portan el virus hacia la etapa de lactancia se debe a la capacidad del virus del PRRS para ocasionar infección persistente y diseminarse de manera vertical y horizontal a partir de las hembras infectadas, tanto hacia el útero como a la descendencia antes del destete (Dee S., 2006). Las cerdas que se infectan en la fase final de la gestación pueden infectar a sus crías de manera transplacentaria y/o congénitamente mediante el semen de verracos infectados, lo cual propicia el nacimiento de animales persistentemente infectados (Benfield *et al.*, 1992). Adicionalmente, el virus de PRRS puede ser eliminado a través del calostro y leche (Wagstrom *et al.*, 2000). Por otra parte, la eliminación del virus por saliva, orina y quizás heces da como resultado la total contaminación del ambiente (Nauwynck *et al.*, 1999).

Los animales infectados con síntomas clínicos o recuperados son portadores inaparentes que se mantienen virémicos durante semanas y/o meses por lo que actúan como reservorios para los lechones destetados que han perdido la inmunidad materna. Existen huéspedes no porcinos aunque su papel en la epidemiología del PRRSV es incierto (Zimmerman *et al.*, 1997). Los roedores no son susceptibles a este virus (Hooper *et al.*, 1994).

Un componente muy importante de esta enfermedad es el desarrollo de infecciones secundarias. Los cerdos jóvenes son más susceptibles a la infección por PRRSV y más

propensos a tener infecciones secundarias asociadas con uno o varios patógenos, dentro de estos se destacan *Mycoplasma hyopneumonia* (Neumonía Enzoótica), *Salmonella cholerae suis* (Salmonelosis Porcina), *Haemophilus parasuis* (Enfermedad de Glässer), *Actinobacillus pleuropneumonia* (Pleuroneumonía Porcina), *Streptococcus suis*, *Paramyxoviridae* (Ojo Azul) y *Herpesviridae* (Aujeszky) (Zimmanman *et al.*, 2006)

Con fines de diagnóstico, el virus se ha aislado de muchos tejidos, principalmente de tonsilas, pulmones, bazo, timo, plasma, riñones, corazón y cerebro, aunque se prefiere utilizar el suero (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Magar *et al.*, 1995). No deben usarse sueros de animales recién vacunados con virus vivo modificado ya que la vacunación induce la eliminación del virus durante tres a seis semanas después de su administración (Méndez, 1996).

2.3 Diagnóstico serológico de PRRS.

Además de los métodos virológicos, la serología representa una poderosa herramienta para la detección de PRRSV en poblaciones de cerdos con el fin de determinar el estado de salud de un hato (libre o infectado) y confirmar la participación de PRRSV en los signos clínicos observados. En la siguiente tabla se muestran las características de los métodos utilizados para la detección de anticuerpos contra PRRSV.

Tabla 1. Principales pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de PRRS.

Prueba	Título*	Fase Aguda	Fase Tardía	Tipo de Inmunoglobulina
Inmunofluorescencia	>20	5-7 días 7-11 días	21-28 días 1-2 meses	IgM, IgG
Inmunoperoxidasa	>20	5-9 días	10-11 meses	IgG
ELISA	>0.4	9-13 días	4-10 meses	IgG
Sueroneutralización	>2	9-28 días	>1 año	IgG

* = Título que se considera positivo en cada prueba. Tomado de Méndez, 1996.

2.4 Características del Virus

Una gran cantidad de estudios (Benfield *et al.*, 1992; Conzelman *et al.*, 1993; Dea *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992; Meulenberg *et al.*, 1993) indican que el PRRSV está estrechamente relacionado, desde el punto de vista biológico, estructural y genético, a los

virus de la arteritis equina (VAE), al de la láctico deshidrogenasa del ratón (VLD) y de la fiebre hemorrágica del simio (VFHS). En base a estas propiedades comunes, PRRSV se agrupa en el género *Arterivirus*, de la familia *Arteriviridae*, orden *Nidovirales* (Cavanagh 1997).

El PRRSV es un virus ARN envuelto, de cadena simple y polaridad positiva. El genoma del PRRSV es de 15-kb y contiene ocho marcos de lectura (ORFs) denominados ORF1a, ORF1b y ORFs 2 a 7 en sentido 5' a 3' que codifican proteínas virales específicas (Wootton *et al.*, 2002) y esta organización es similar a la de otros Arterivirus y Coronavirus (Plagemann y Moenning 1992).

Su nucleocápside es icosaédrica con un diámetro de 25-30 nm y posee una densidad de 1,18-1,19 g/ml en cloruro de cesio y de 1,13-1,15 g/ml en gradiente de sacarosa (Benfield *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992).

Dentro de sus características fisicoquímicas PRRSV es estable durante periodos prolongados (meses a años) a temperaturas de -70°C y -20°C. Pueden detectarse títulos bajos de virus infeccioso durante 1-6 días a 20-21°C; de 3 a 24 horas a 37°C y 6-20 minutos a 56°C. La estabilidad térmica en tejidos y suero es similar a la descrita, cuando el suero se mantiene a entre 4 y hasta -20°C, el virus se aísla del 85% de las muestras después de 72 horas (Van Alstine *et al.*, 1993). Es estable a pH 6.5-7.5, pero la infectividad se pierde con rapidez a pH por debajo de 6 y arriba de 7.5. (Benfield *et al.*, 1992; Bloemraad *et al.*, 1994)

Dada la gran diversidad existente entre los distintos tipos de PRRSV, estos se agrupan en dos grandes grupos antigénicos; europeo (virus de Lelystad) y americano (VR-2332) (Molitor *et al.*, 1997).

Entre las propiedades importantes de los arterivirus, desde el punto de vista clínico, está su capacidad para: 1) producir infecciones asintomáticas, persistentes, así como enfermedades graves y con frecuencia mortales; 2) replicarse en macrófagos y 3) mostrar una considerable plasticidad de su genoma (Plagemann, 2004).

2.4.1 Proteínas virales

Es importante mencionar que el virion de PRRSV contiene tres proteínas estructurales mayores o principales; GP5, M y N (figura 1). La proteína N es el componente principal de

la nucleocápside y se va a localizar en el nucléolo de la célula huésped. Aunque no es esencial para la replicación *in vitro*, juega un papel importante en la patogénesis del virus ya que, durante su replicación, es altamente antigénica y la más abundante en la partícula viral. Otro hecho importante es que contiene una región conservada en los aislados americanos y europeos (Rowland *et al.*, 2003). En la siguiente figura se ilustran los principales componentes del PRRSV.

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

MENORES

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

MAYORES

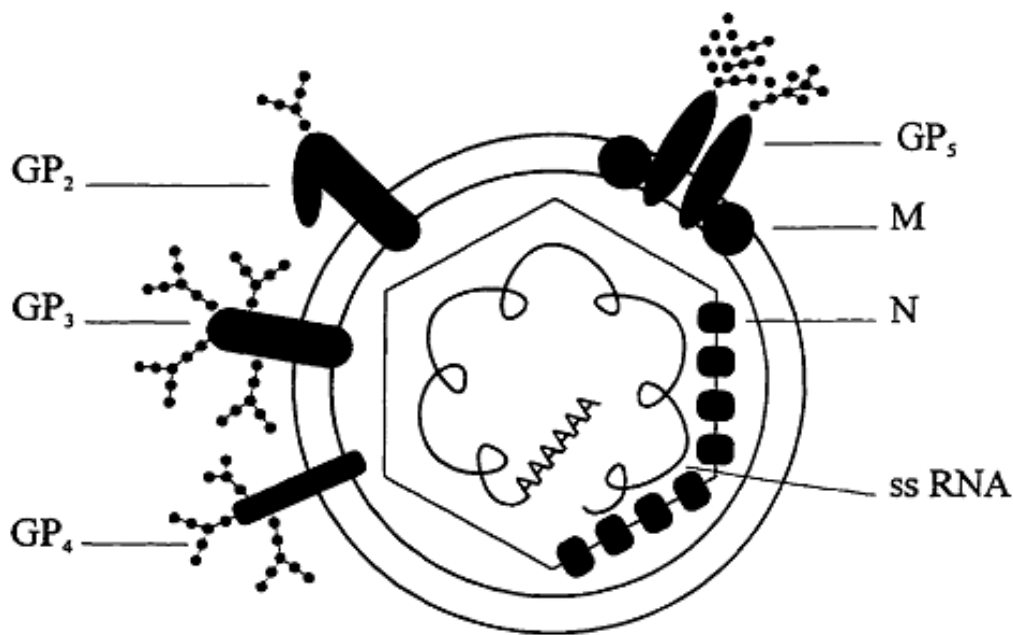


Figura 1. Representación esquemática del virus del PRRS. Se ilustran las *proteínas estructurales mayores*; **GP5**, Glicoproteína de envoltura, 25 kDa, codificada en el ORF5 (Otroski *et al.*, 2002; Wissink *et al.*, 2003; Plageman, 2004). **M**, Proteína de membrana, no glicosilada de 18 kDa codificada en el ORF6 (Bastos *et al.*, 2002; Delputte *et al.*, 2002). **N**, Proteína de la nucleocápside, de 15 kDa, codificada en la ORF7 (Rowland, 2003). Por otro lado, las *proteínas estructurales menores*; **GP2**, de 29 kDa. **GP3**, de 42 kDa. **GP4**, de 31 kDa, todas ellas glicosiladas y codificadas en las ORF2, ORF3 y ORF4, respectivamente (Meulenber,1997).

2.5 Ciclo viral y estudios *in vitro*

En su huésped el PRRSV tiene un tropismo celular restringido. Este virus fue aislado en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos (PAMs) y así, estas células tanto como los monocitos sanguíneos, son las únicas células porcinas que pueden efectivamente ser usadas para la propagación viral *in vitro*. Estudios de hibridación *in situ* han establecido que el virus también infecta macrófagos de bazo, hígado, placas de peyer, timo y microglia. Sin embargo, son refractarios los macrófagos peritoneales y las células de la médula ósea (Therrien 2000, Delputte *et al.*, 2007).

Existen dos clonas celulares no porcinas que son permisivas, MARC-145 y CL2621, ambas derivadas de la línea celular de riñón de mono, MA104, por lo que son usadas rutinariamente para propagación *in vitro* de cepas vacunales y de campo (Therrien 2000).

Se ha demostrado que la no unión de PRRSV a las células es un factor determinante de su tropismo celular. También se ha determinado que PRRSV entra a los PAMs y a las células MARC-145 por endocitosis mediada por un receptor (Therrien 2000).

En macrófagos, el heparan sulfato es el receptor que media la unión de PRRSV y se ha demostrado que la proteína de la matriz viral es una proteína de unión a heparina, sugiriendo su papel potencial como el ligando viral para el heparan sulfato (Delputte 2007). Asimismo, se ha identificado a la sialoadhesina (Sn) como un receptor esencial para PRRSV que media la unión y la internalización de PRRSV en los macrófagos (Delputte 2007). Deben existir otros factores, aún no identificados, esenciales para la infección productiva, dado que la expresión de Sn en células no permisivas a PRRSV, tales como PK-15, permite la internalización del virus pero no su desnudamiento, ni la liberación del genoma o la producción de virus infecciosos (Delputte 2007).

El PRRSV no sólo se une a células permisivas como los monocitos, PAMs y MARC145, sino que otras líneas celulares, conocidas por ser refractarias a la infección de PRRSV, también pueden unir al virus a su superficie. Sin embargo, la unión de PRRSV a las células huésped no necesariamente conduce a una infección productiva, las bases de la replicación restrictiva de PRRSV en ciertos tipos celulares también se basa en que los pasos subsecuentes tienen que ser superados exitosamente antes de que se puedan producir nuevas partículas virales (Therrien, 2000).

Diversos datos indican que las cepas Europeas de PRRSV son aisladas de manera más exitosa en PAMs, mientras que la gran mayoría de cepas Norteamericanas pueden ser aisladas en subpoblaciones establecidas de células de mono. Aún no se conocen las características compartidas entre estas líneas celulares y los PAMs que hacen posible el desarrollo de la infección por PRRSV (Therrien 2000).

La infección de PRRSV ha sido extensamente estudiada en MARC-145, una línea celular permisiva derivada del riñón de mono. Estudios previos han establecido que la replicación de PRRSV en células MARC-145 muestra un curso complejo; con la detección de antígenos de PRRSV después de 10-20 hpi y la emergencia de focos de daño ECP(Efecto Citopático) sobre los siguientes 3-4 días (Cafruny 2006).

Asimismo, se demostró la presencia de un crecimiento logarítmico de PRRSV en las células MARC-145 que culmina después de 3-4 días con la muerte de la mayoría de las células. La difusión secundaria de la infección de PRRSV ocurre por difusión célula a célula, como se demostró por la emergencia de grupos de células infectadas en monocapas confluentes de células MARC-145, lo cual precedió a los ECP inducidos por PRRSV (Cafruny 2006).

Los efectos citopáticos se caracterizan por el redondeo de las células, aglutinación y lisis, las células infectadas muestran la membrana citoplasmática erizada, observándose una marcada granulación posterior a la destrucción de la monocapa, dicho proceso transcurre entre 36 a 48 hpi (Benfield *et al.*, 1992; Mardassi *et al.*, 1994).

La cabal comprensión del tropismo celular restringido de PRRSV será muy útil para mejorar la comprensión de su patogénesis y para el diseño de estrategias preventivas y terapéuticas futuras (Cafruny 2006, Therrien 2000).

2.6 Citoesqueleto

Debido a las muchas funciones celulares en las cuales está involucrada la actina, no es sorprendente que muchos patógenos intracelulares interactúen con la actina y sus vías de señalización (Stevens *et al.*, 2006). Se ha reportado que algunos virus explotan el citoesqueleto de las células del huésped en formas fascinantes para facilitar aspectos

importantes de su ciclo como puede ser la entrada, replicación, egreso, transporte y difusión intercelular (Sodeik B, 2000; Pelkmans *et al.*, 2001).

El citosol de las células eucariontes está sostenido por un citoesqueleto formado por tres redes muy organizadas de proteínas filamentosas. El citoesqueleto es el andamio estructural que se extiende por el citoplasma y brinda el mantenimiento de la morfología celular, y ayuda en funciones como *movilidad*, *migración* (de organelos y otras estructuras) y *división celular*. Siendo la estructura dinámica que se reorganiza continuamente según las células se mueven y cambian su forma (Cooper., 2006). Las redes del citoesqueleto están compuestas de filamentos de actina o microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos que se mantienen juntos y a su vez unidos a los organelos intracelulares y a la membrana plasmática mediante varias proteínas accesorias (Alberts., 2008). La Actina se considera el 20% de la proteína citoesquelética total de la célula, siendo la más importante de la mayoría de las células, ya que se polimeriza para formar filamentos (fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud), éstos filamentos se organizan en estructuras de orden superior, formando haces o redes tridimensionales (Favoreel *et al.*, 2005; Smith y Wood, 1997).

El ensamblaje y desensamblaje de estos filamentos, sus uniones cruzadas para constituir haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares, se regulan mediante las proteínas (ARPs) o de unión (ABPs) a actina globular (actina G) o filamentososa (actina F) (Alberts *et al.*, 2008).

Los filamentos de actina forman una red abundante debajo de la membrana plasmática (corteza celular) que proporciona propiedades sólidas y maleables al mismo tiempo que influyen en la forma y movimientos celulares lo que posibilita que las células puedan migrar, endocitar y dividirse (Cooper, 2006). El ensamblaje de los microfilamentos participa en el *comportamiento exploratorio* de células con cuerpo lábil es decir, la formación de filopodios, lamelipodios y ondulaciones de la membrana o *ruffling* (Dieguez, 2008).

Nucleación es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina, siendo el primer paso en la polimerización de esta proteína. Los filamentos son capaces de crecer por la adición reversible de monómeros en ambos extremos, pero uno de

ellos (el extremo mas) crece de cinco a diez veces más rápido que el otro extremo (extremo menos) (Favoreel *et al.*, 2005).

Por medio de la bioquímica y la genética tradicional se ha descubierto que los monómeros de algunos componentes del citoesqueleto presentan variaciones entre ellos, mismas que producen diferentes propiedades biológicas en los polímeros. 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 *et al.*, 2008). Siendo la polimerización de actina reversible los filamentos se pueden despolimerizar por la disociación de monómeros, lo que permite que estos filamentos se descompongan cuando sea necesario (Gouin *et al.*, 2005). De esta manera se realiza el equilibrio 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, lo que puede dar lugar al fenómeno conocido como intercambio rotatorio o “treadmilling”. 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. (Alberts *et al.*, 2008).

Cofilina, Profilina y el Complejo Arp2/3 son las proteínas asociadas a actina y sus actividades 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 *et al.*, 2005).

De esta manera, las 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 distintos papeles en la célula.

En los haces, los filamentos están entrecruzados por proteínas de unión a actina (fimbrina y 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 (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 *et al.*, 2008). Los microtúbulos son cilindros largos, huecos, hechos de tubulina y más rígidos que los filamentos de actina tienen un extremo unido a un centro organizador de microtúbulo, por su parte los filamentos intermedios son fibras similares a cuerdas formadas por proteínas como la (desmina, sinemina y vimentina) que construyen una familia heterogénea, algunos tipos se extienden por todo el citoplasma para dar la fuerza mecánica a la célula (Alberts *et al.*, 2008).

El remodelado del citoesqueleto es un proceso fundamental en la respuesta de muchas células a los factores de crecimiento y a otros estímulos extracelulares, de esta manera se incluye la formación de evaginaciones de la superficie celular llamados 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 (Alberts *et al.*, 2008).

Es necesario un mejor entendimiento del ciclo de vida de los virus y de las interacciones con el ambiente celular del huésped para conocer los detalles moleculares de la patogénesis viral y permitir el desarrollo de nuevas terapias antivirales y/o inmunológicas (Kallewaard *et al.*, 2004; Cafruny *et al.*, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Describir las características del ciclo viral y evaluar su desarrollo *in vitro*.

3.2 Objetivos Particulares

- a. Describir los efectos citopáticos y la duración del ciclo viral en las células VERO, RK-13 y PK-15.
- b. Corroborar por virus-sueroneutralización la presencia del virus del PRRS.
- c. Señalar las modificaciones que el citoesqueleto de actina desarrolla durante la interacción del virus del PRRS con las líneas celulares VERO y RK-13.
- d. Determinar el tiempo post-infección al cual se desarrollan los efectos citopáticos y las modificaciones del citoesqueleto de actina.
- e. Valorar la producción de partículas virales en las líneas celulares VERO y RK-13.

4. Materiales y Métodos

4.1 Virus y cultivos celulares

Para realizar este trabajo se utilizaron muestras de suero provenientes de cerdos infectados con el virus y con diagnóstico positivo previo realizado mediante ELISA (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; Virus Antibody Test Kit, PRRS 2XR; HerdChek* IDEXX® Laboratories), dichas muestras provenían de un brote de campo ocurrido en una granja comercial, ubicada en Mérida, Yucatán. Los cultivos celulares utilizados fueron: Vero (Epiteliales de Riñón de mono Verde Africano), RK-13 (Epiteliales de Riñón de Conejo) y PK-15 (Epiteliales de Riñón de Cerdo). Las células fueron crecidas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% y mantenidas a una temperatura de 37° C y en una atmósfera de CO₂ al 5%.

4.2 Ensayos de infección en células PK-15, RK-13 y VERO

Los sueros provenían de muestras de sangre obtenidas de 10 animales que habían presentado la signología característica de la enfermedad, además de tener el diagnóstico positivo por ELISA. En la tabla 2 se señalan algunas características de los animales muestreados.

Tabla 2. Características de los animales muestreados.

Muestra	Sexo	Otras características
1	-	Sin identificación
2	M	Raza Duroc
3	M	Raza Landrace
4	M	Lechón muerto por problema respiratorio
5	M	Lechón muerto por problema respiratorio
6	H	Raza Landrace (1)
7	H	Raza Landrace (2)
8	M	Cerdo de engorda (1)
9	M	Cerdo de engorda (2)
10	M	Cerdo de engorda (3)

Los sueros de los diez animales fueron utilizados como el medio de infección primario, de tal forma que se realizaron ensayos de infección en las líneas celulares RK-13, Vero y PK-15. Dichos ensayos fueron realizados en placas de cultivo de 24 pozos y cada uno de los cultivos fue infectado con 30 µl de suero y mantenidos en incubación durante las siguientes 72 horas, después de lo cual se realizó la observación al microscopio invertido y, finalmente, se obtuvieron las imágenes fotográficas. Estos ensayos fueron realizados por duplicado. Con cada ensayo de infección se manejo un cultivo sin infectar (cultivo control). Posteriormente, se realizaron nuevos ensayos de infección en cajas de 60 mm, estos cultivos fueron inoculados con 30 µl de los sueros seleccionados previamente (muestras 2, 4 y 7).

4.3 Detección del virus de PRRS mediante virus suero neutralización.

Para obtener suero hiperinmune se desarrolló un calendario de inmunización, en el que se inocularon dos cerdos de siete semanas de edad con una vacuna comercial (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.). El calendario de vacunación se mantuvo hasta alcanzar un total de 4 inmunizaciones en cada lechón, a su vez, cada semana se realizaba una toma de sangre y en el suero obtenido se monitoreaba el nivel de anticuerpos inducidos (kit de Elisa para la detección de Anticuerpos frente al virus de PRRS, laboratorio IDEXX Herd Chek, lote 06-04404-06). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar la muestra del animal en el cual se logró inducir el nivel más elevado de anticuerpos. Esta parte del trabajo se realizó en las instalaciones de CENASA en las áreas de Cuarentena y Desafío de biológicos. Los anticuerpos inducidos fueron usados para realizar la prueba de virus suero neutralización. Para ello, inicialmente se realizó la descomplementación del suero (56° C durante 30min). Por otro lado se realizaron diluciones seriadas del stock viral (1:10, 1:50, 1:250, 1:1250), se mezclaron 200 µl de cada una de las diluciones virales con 200 µl del suero hiperinmune y se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente. En esta prueba se utilizaron células RK-13 sembradas en una placa de 96 pozos.

Finalmente, se agregaron 100 µl de cada uno de estos tubos a un pozo con células RK13, se permitió la adsorción viral por 60 min, se retiró el virus no adsorbido y se agregaron 400 µl de DMEM con 5% de suero fetal bovino. Estos cultivos fueron incubados por 72 horas a 37° C antes de revisar los resultados.

4.4 Estudio del citoesqueleto

En una caja de Petri de 60 mm se sembraron tres cubreobjetos con células RK-13 y Vero, y para permitir su crecimiento fueron incubadas por 4 hrs a 37°C. Después de lo cual cada caja fue infectada con 30 µl del suero previamente seleccionado (M2) y se incubaron por otras 21 horas adicionales. Junto con estos cultivos se manejó otra caja con cultivos que no fueron infectados y que se utilizaron como cultivos control.

A las 19, 20 y 21 horas postinfección (hpi) se retiraron dos cubreobjetos; infectado y control. Cada uno de los cuales fue fijado con 1 ml de paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) por 10 min a temperatura ambiente (TA), posteriormente fueron lavados con PBS y bloqueados con una solución de albúmina al 1%. Se permeabilizaron con Tritón-X-100 al 0.5% en PBS. Sobre cada cubreobjeto se colocaron 50 µl de faloidina rodaminada (Sigma, cat. P1951) diluída 1:150 en PBS durante 30 minutos a TA en cámara húmeda, al final fueron lavados con PBS y agua desionizada, y montados sobre un portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Sc24941 (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, se hizo la observación al microscopio de fluorescencia y se realizó el registro fotográfico.

4.5. Evaluación de la producción de partículas virales

Para este propósito se realizaron cultivos de células RK-13 y VERO en una placa de 96 pozos. Por otra parte, se realizaron diluciones seriadas (1:10) de la solución stock del virus de PRRS. Para ello en cada tubo se depositaron 540 µl de DMEM.

Posteriormente, se depositaron 60 µl de la muestra 2 en el tubo 1 y, a partir de éste, se realizaron 14 diluciones seriadas (1:10). Para realizar la evaluación sólo se utilizaron las

últimas nueve diluciones (10^{-6} a 10^{-14}). Así, los pozos de las columnas 1 - 9 fueron infectados con las diluciones previamente elaboradas, mientras que los pozos de la columna 10 no fueron infectados (pozos control). Todos los cultivos fueron mantenidos por 72 horas en una incubadora a 37° C y bajo una atmosfera de CO_2 al 5%. Posteriormente, se hizo la revisión de los pozos y la evaluación de la prueba por el método Reed and Muench (tablas 3 y 4).

5. RESULTADOS

5.1. Ensayos preliminares

Con el fin de determinar si las muestras de suero recibidas portaban el agente viral viable, se inocularon cultivos de las líneas celulares RK-13, PK-15 y VERO con 30 μ l de cada uno de los sueros (tabla 2), se incubaron por 36 horas y, posteriormente, se observaron al microscopio invertido. En todos los casos se encontró que las células habían desarrollado efectos citopáticos (ECP). En las células PK-15, el ciclo viral se desarrolló de manera tan rápida que a las 20 horas postinfección (hpi) las células ya presentaban lisis y no fue posible apreciar los ECP. En las células RK-13 y VERO los ECP fueron más evidentes por lo que se decidió que el resto de los experimentos sólo se realizarían en estas líneas. Asimismo, estos ensayos preliminares permitieron la selección de los sueros 2, 4 y 7 como el origen primario del virus para los ensayos subsecuentes ya que fueron capaces de inducir ECP evidentes a tiempos postinfección más cortos.

Los cambios celulares fueron observados al microscopio invertido, se obtuvo el registro fotográfico y, en cada imagen, se señalan los ECP encontrados. Cabe señalar que los cultivos fueron monitoreados durante las primeras 72 hpi, dado que los ECP no se presentan al mismo tiempo en todos los cultivos, y en cada una de las figuras se indica el tiempo postinfección al cual aparecieron.

5.2. Prueba de suero neutralización

De acuerdo a los hallazgos observados en los ensayos preliminares se buscó explorar si los cambios celulares eran producto de la replicación de PRRS y que no pudieran estar siendo provocados por otros factores, para esto se hizo la detección del virus mediante la prueba de suero neutralización empleando un suero hiperinmune producido por nosotros mismos a partir de la inoculación de dos lechones con la vacuna Ingelvac. Después de realizar esta prueba se determinó que la infección viral fue bloqueada a la dilución de 1:250 (figura 2).

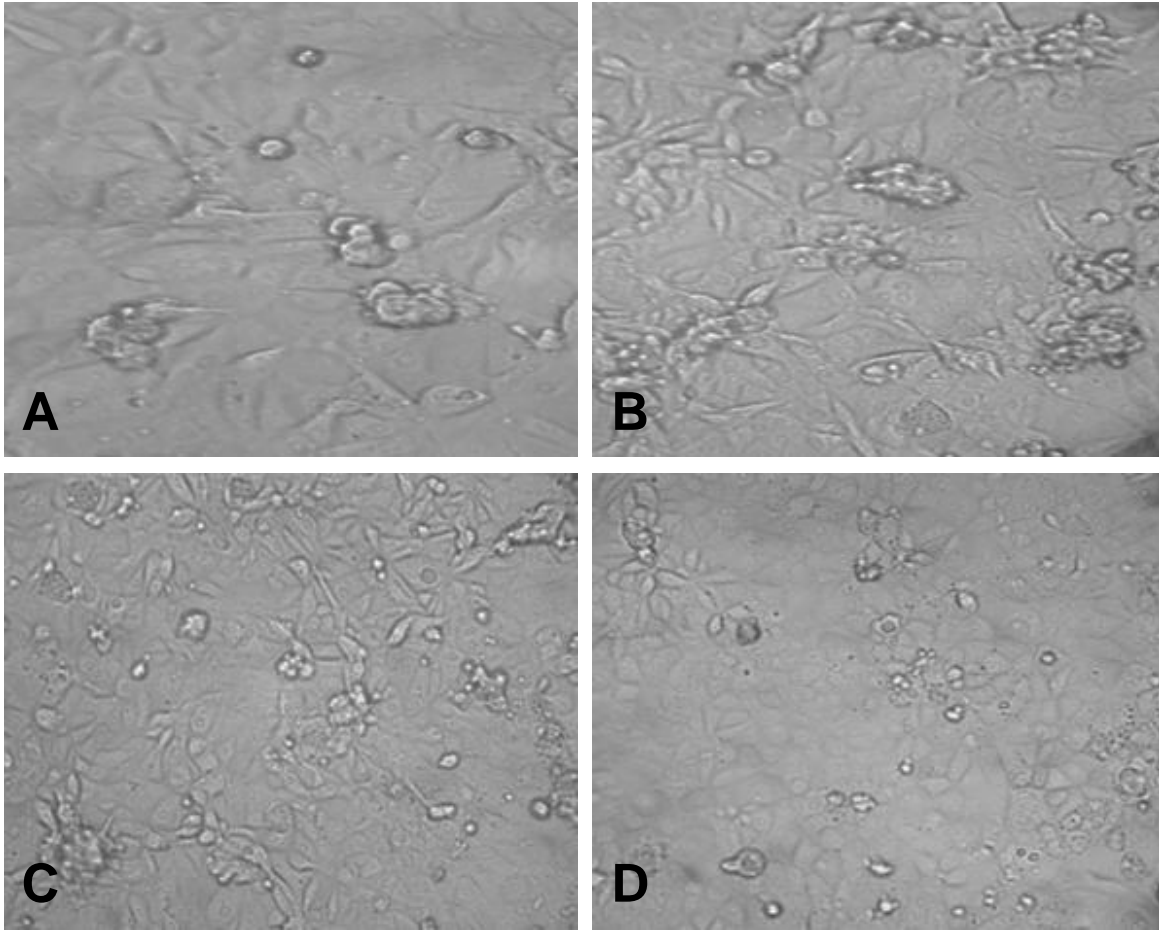


Figura 2. Ensayo de suero neutralización realizado en células RK-13. La infección *in vitro* fue bloqueada de manera específica mediante una prueba de suero virus neutralización. **A)** Cultivo sin infectar (-). **B)** Cultivo infectado con el stock viral (+). **C)** Cultivo infectado con una dilución 1:50 del stock viral bloqueado con suero hiperinmune, la presencia de ECP es evidente. **D)** Cultivo infectado con una dilución 1:250 del stock viral bloqueado con suero hiperinmune, a esta dilución el suero hiperinmune logra bloquear al virus y ya no hay signos de infección en el cultivo. Imágenes tomadas en el microscopio invertido, 250 \times .

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

Las células PK-15 son células derivadas de riñón de cerdo, por lo cual era interesante explorar la manera en que se podría desarrollar el ciclo viral de PRRSV, para ello se infectaron cultivos con los sueros seleccionados (2, 4 y 7) y se mantuvieron en observación hasta que los ECP aparecieron.

En la **figura 3**, se evidencia que los ECP no aparecieron al mismo tiempo, ni fueron similares a los cultivos anteriores, ya que con cualquiera de los inóculos empleados, entre las 20 y 23 hpi, las células ya presentaban lisis celular, sin que se pudiesen apreciar los ECP, exceptuando la vacuolización. Las células del cultivo control conservaron su morfología durante todo el estudio. Con este ensayo se encontró que en esta línea celular el tiempo empleado para desarrollar la lisis celular es tan rápido que no es posible observar los ECP, por este motivo se decidió no utilizar estas células en el resto de los experimentos.

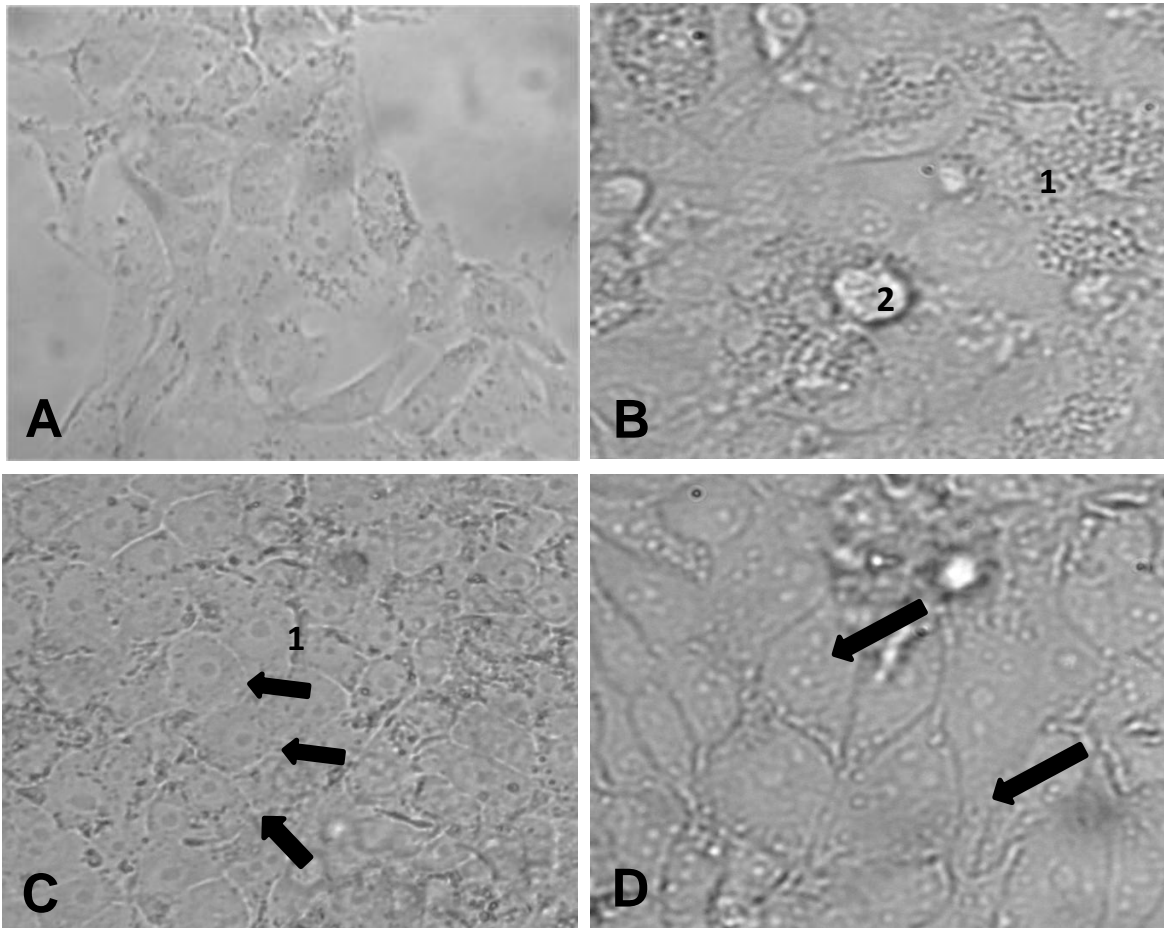


Figura 3. Cultivos de células PK-15 infectados con sueros positivos a PRRSV. Los cultivos fueron monitoreados en busca de ECP a diferentes tiempos postinfección. **A)** Cultivo control. **B)** Cultivo infectado con la muestra 2 a las 20 hpi se observa una completa vacuolización (1), pérdida de la forma celular (1) y lisis (2). **C)** Cultivo infectado con la muestra 4 a las 21 hpi, se aprecian células de diferente tamaño (flechas) y con apariencia rugosa (1). **D)** Cultivo infectado con la muestra 7 a las 23 hpi, observándose vacuolas dentro de las células (flecha). Imágenes tomadas en el microscopio invertido, 250×.

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

Con el fin de describir con mayor detalle el desarrollo de los ECP y determinar el tiempo post-infección al cual aparecen, se desarrollaron ensayos de infección en cultivos de células RK-13. Los resultados obtenidos (**figura 4**), indican que el cultivo inoculado con la muestra 2 fue el primero en el que aparecieron los ECP (17 hpi), algunas células estaban formando grupos, lo cual sugiere el inicio de la formación de sincitios, además se observó la presencia de vacuolas dentro del citoplasma y filopodios, y aunque no es evidente en la imagen, existía una lisis celular masiva por lo que se encontró una menor cantidad de células. Después de 18 hpi en el cultivo inoculado con la muestra 4 las células comenzaron a presentar los mismos cambios celulares ya descritos, excluyendo la lisis celular.

El cultivo inoculado con la muestra 7 presentó, de la misma manera, filopodios, vacuolas y formación de grupos, cabe mencionar que en este cultivo el periodo empleado fue más largo (19 hpi). En contraste, las células del cultivo control conservaron hasta el final del periodo de observación la misma morfología.

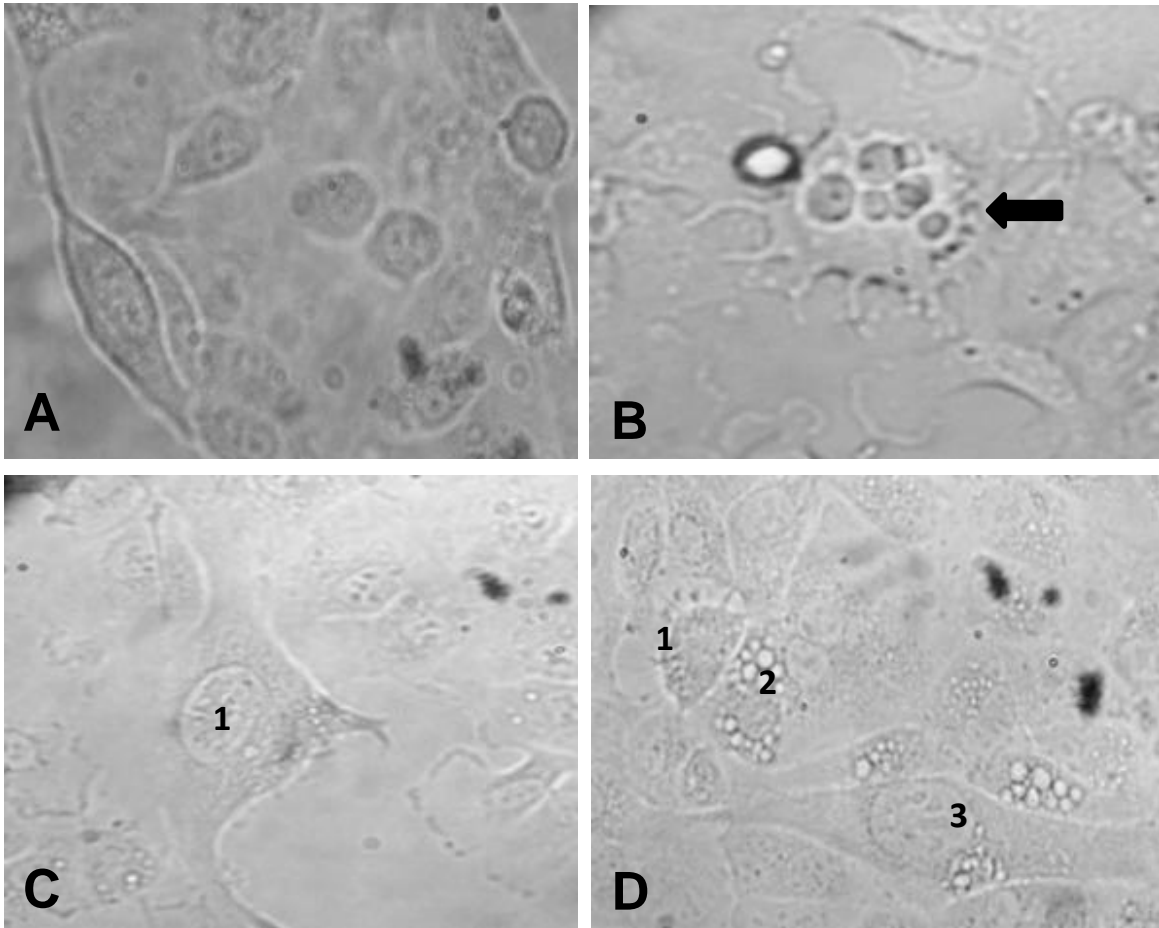


Figura 4. Cultivos de células RK-13 infectados con sueros positivos a PRRSV. Los cultivos fueron monitoreados en busca de cambios celulares a diferentes tiempos postinfección. **A)** Cultivo control. **B)** Cultivo infectado con la muestra 2 a las 17 hpi, mostrando una célula (flecha) con fuerte vacuolización y una gran cantidad de filopodios. **C)** Cultivo infectado con la muestra 4 a las 18 hpi, en el cual se observa la formación de un sincitio (**1**). **D)** Cultivo infectado con la muestra 7 a las 19 hpi, con presencia de pequeños filopodios (**1**), gran cantidad de vacuolas (**2**) y formación de sincitios (**3**). Imágenes tomadas en el microscopio invertido, 250×.

5.5. Desarrollo del ciclo viral en las células VERO

Con el propósito de describir el desarrollo del ciclo viral y determinar el tiempo post-infección al cual aparecen los ECP, se infectaron cultivos de células VERO con los sueros previamente señalados (2, 4 y 7) y se mantuvieron en observación hasta que las células desarrollaron los ECP.

Como se ilustra en la **figura 5**, el tiempo empleado para desarrollar los ECP, en general, fue más corto (17 hpi) que en las células RK-13, adicionalmente los ECP no fueron tan evidentes lo cual es una diferencia notable entre las células VERO y RK-13.

El cultivo inoculado con la muestra 2 presentó lisis celular masiva por lo que una gran parte de la monocapa está ausente y las pocas células presentes se observan completamente vacuolizadas, su apariencia es rugosa y hay pérdida de la morfología celular.

El cultivo inoculado con la muestra 4, a las 17 hpi ya presentaba células redondeadas y aglutinadas. Mientras que en el cultivo inoculado con la muestra 7, a las 20 hpi las células presentaban su forma alterada, de redonda a irregular y con proyecciones largas, que estaban formando puentes intercelulares, asimismo fue evidente que en esta muestra los ECP se desarrollaron un poco más lento (20 hpi). Por su parte las células del cultivo control conservaron sus características morfológicas hasta el final del periodo de observación.

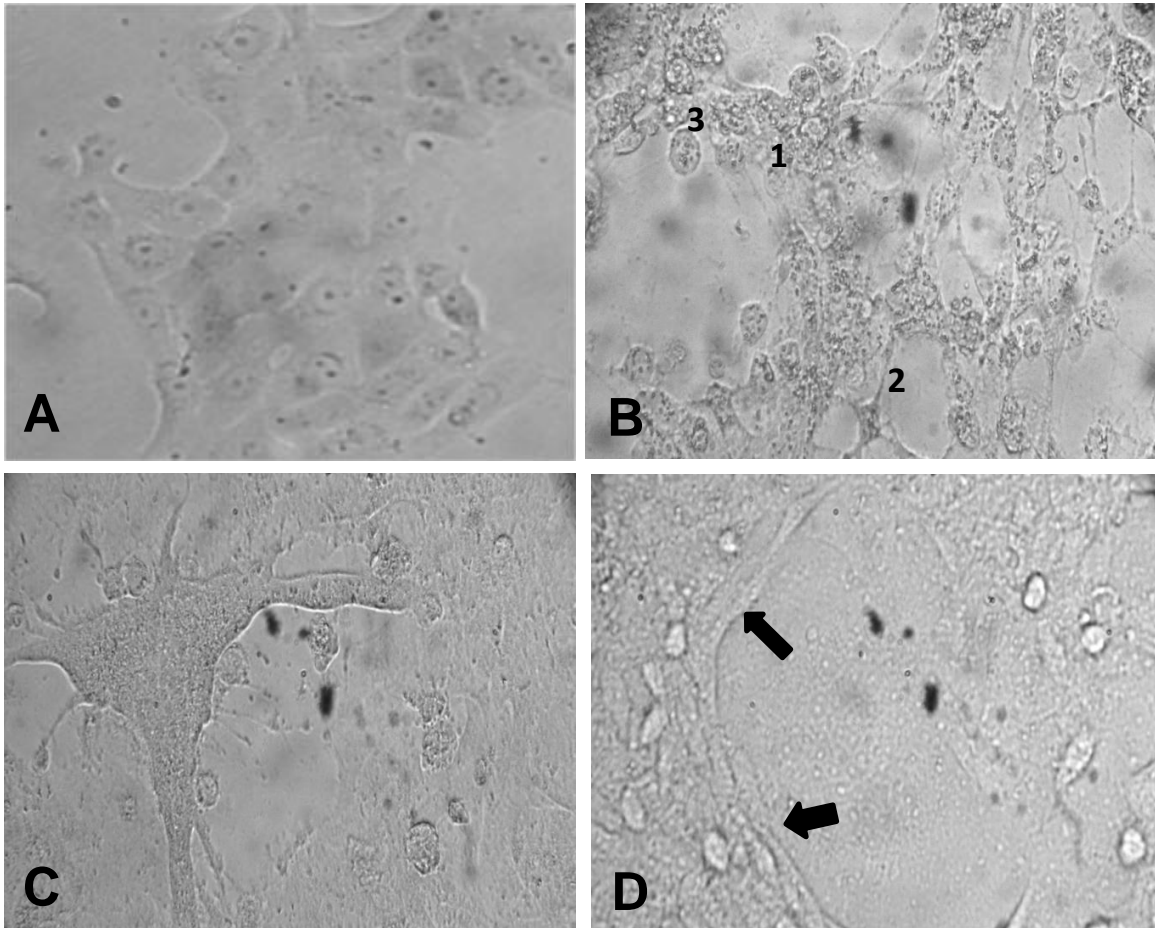


Figura 5. Cultivos de células VERO infectados con muestras de sueros positivos a PRRSV. Los cultivos fueron monitoreados con el fin de detectar la presencia de cambios celulares. **A)** Cultivo control. **B)** Cultivo infectado con la muestra 4 a 17 hpi, se observan células aglutinadas (1), grandes filopodios (2) y vacuolización (3). **C)** Cultivo infectado con la muestra 2 a las 17 hpi se observa una célula completamente vacuolada y con pérdida de la forma celular, sincitio y filopodios. **D)** Cultivo infectado con la muestra 7 a las 20 hpi, se observan células alargadas (flechas). Imágenes tomadas en el microscopio invertido, 250×.

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

Con el fin de determinar el papel que desempeña el citoesqueleto de actina en los cambios morfológicos observados durante el desarrollo del ciclo viral, se infectaron cultivos crecidos en cubreobjetos con la muestra 2 y, posteriormente, fueron expuestos a faloidina rodaminada y observados al microscopio de epifluorescencia.

Es importante indicar que desde las 18 hpi ya se aprecian cambios en la morfología celular. En las siguientes imágenes (Fig. 6 C y D) se destaca la presencia de *lamelipodios*, las cuales son láminas de espesor muy fino que rodean a la célula y, de la superficie de estas láminas, se emiten transitoriamente algunas prolongaciones delgadas y largas llamadas *filopodios*. Por su parte, al contacto de los lamelipodios con el sustrato, las células se extienden y muestran una apariencia alargada (Fig. 6 B, C y D) y aún son aparentes las *fibras de tensión* (Fig. 6 A, B y D).

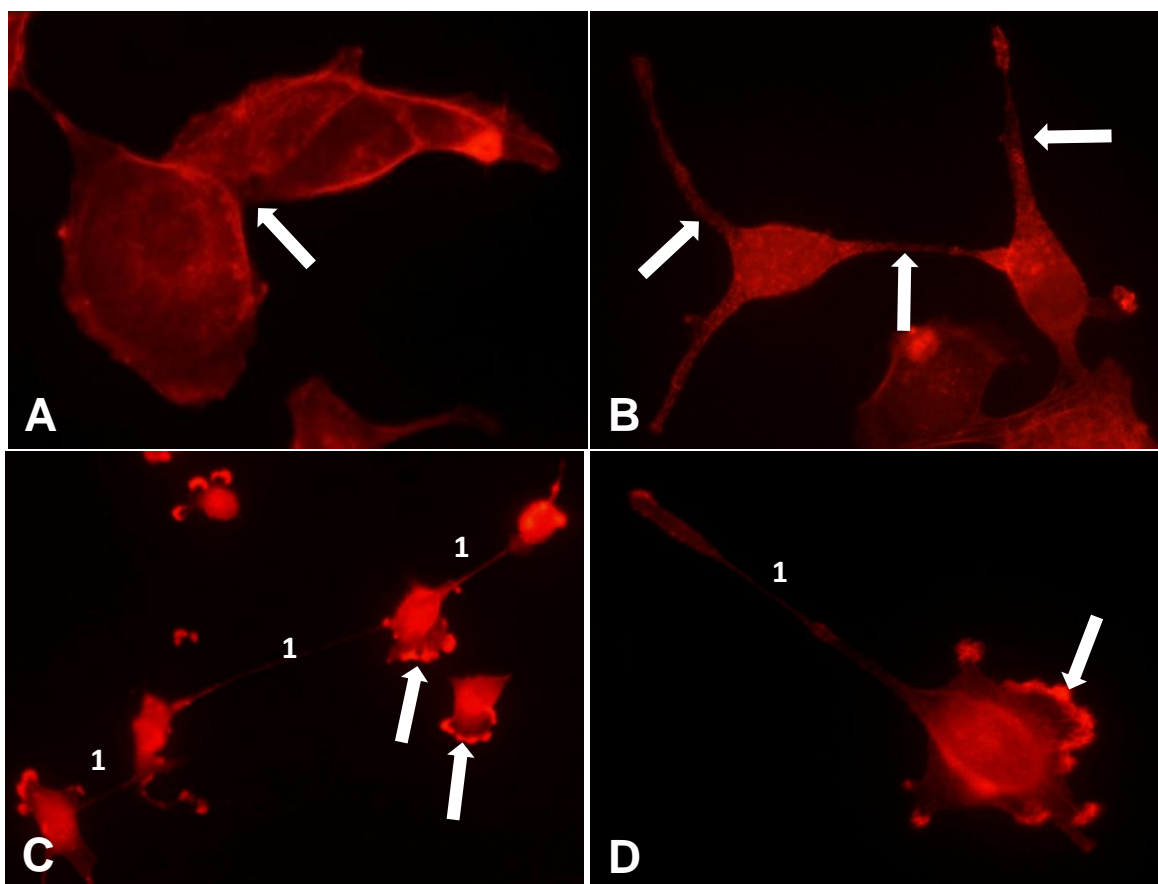


Figura 6. Cambios en el citoesqueleto de actina de células RK-13 infectadas con el

PRRSV. **A)** Cultivo control, se observan las células con corteza definida y organizada (flecha). **B)** A las 18 hpi, se observan largos filopodios (flechas). **C)** A las 19 hpi, se observan células dispersas y con un gran número de filopodios (1) y lamelipodios (flechas). **D)** A las 20 hpi, se muestran lamelipodios (flecha) y un larguísimo filopodio (1). Imágenes tomadas en el microscopio de epifluorescencia: C 200×; A, B y D 400×.

También se muestra en detalle el cambio morfológico de las células RK-13 a las 19 hpi (Fig. 7), se observa una célula muy grande con un sinnúmero de filopodios de diferentes tamaños y condensaciones focales de actina en los extremos de dichos filopodios (Fig. 7 A). Esta gran célula parece corresponder a un *sincitio*, lo cual se corrobora con la figura 7 B, en la que se aprecian tres núcleos contenidos en la gran célula y teñidos de color azul (colorante DAPI).

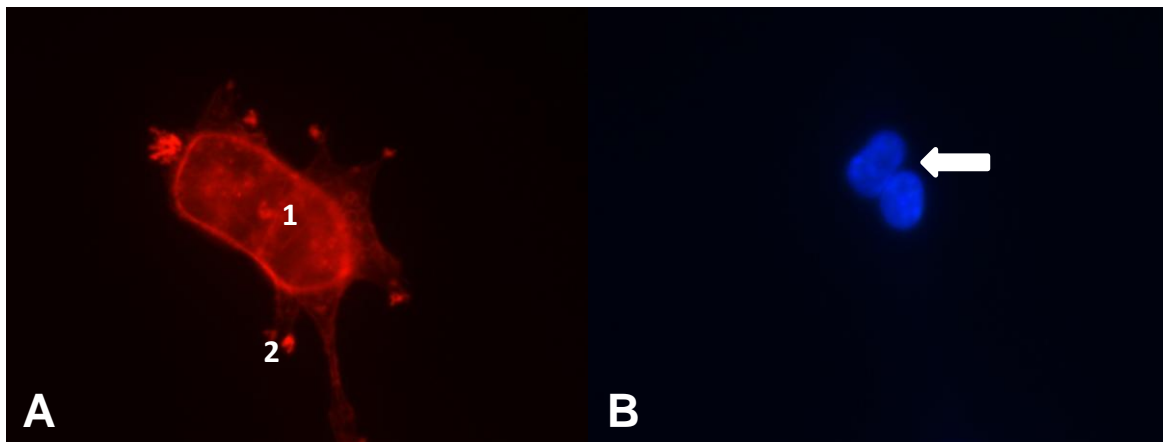


Figura 7. Cambios en el citoesqueleto de actina de células RK-13 infectadas con el suero 2. Cultivo de células RK-13 a las 19 hpi y expuesto a faloidina rodaminada. **A)** Se observa la formación de un sincitio (1) y varios filopodios (2). **B)** Se muestra el mismo campo óptico, pero en esta imagen se evidencian tres núcleos de color azul que corresponden a las células que están formando parte del sincitio (flecha). Imágenes tomadas en el microscopio de epifluorescencia, A y B 400×.

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

Con el fin de observar y evidenciar los cambios inducidos en el citoesqueleto de actina se utilizaron cultivos de células VERO, crecidos en cubreobjetos e inoculados con la muestra 2, posteriormente fueron expuestos a faloidina rodaminada y observados al microscopio de epifluorescencia.

En todas las células del cultivo control se puede apreciar una corteza delgada pero bien definida, así como sus fibras de tensión (Fig. 8 A). A las 18 hpi, se muestra una célula que con una corteza sumamente gruesa y que emite largos filopodios (Fig. 8 B). A las 19 hpi, se observan células con contornos irregulares por la presencia de lamelipodios y filopodios (Fig. 8 C). A las 20 hpi, se observan dos células fusionadas que tienen una corteza definida y gruesa, adicionalmente están emitiendo una gran cantidad de filopodios (Fig. 8 D). De manera general las células VERO no son proclives a desarrollar modificaciones evidentes y masivas del citoesqueleto de actina lo cual puede deberse a su alto índice de proliferación por lo que en sus cultivos no existen grandes espacios entre las células por lo que no se favorece la aparición de proyecciones intercelulares (filopodios).

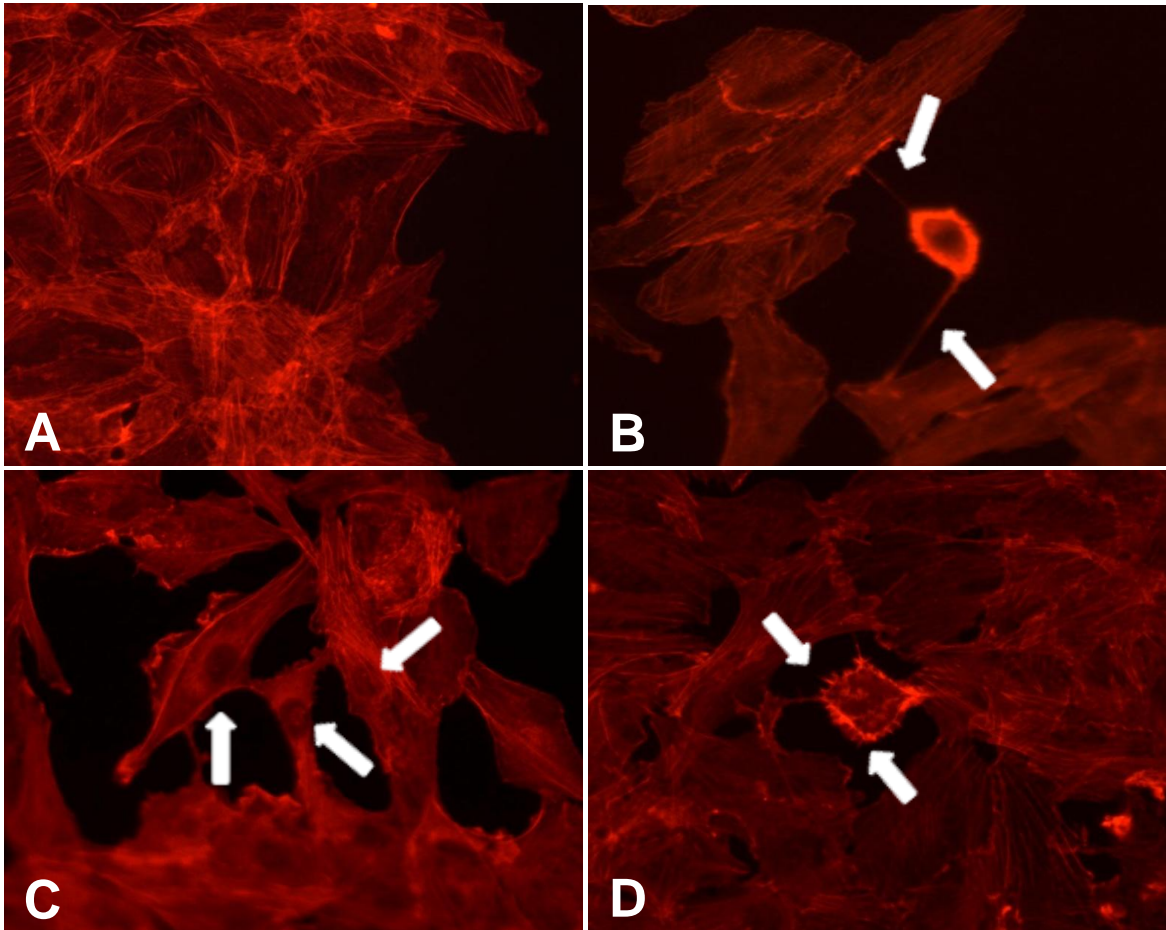


Figura 8. Cambios en el citoesqueleto de actina de células VERO infectadas con PRRSV. **A)** Cultivo control, se observa a las células con una corteza bien definida, asimismo son evidentes las fibras de tensión. **B)** A las 18 hpi, se observa la presencia de largos filopodios (flechas) y una corteza sumamente gruesa. **C)** A las 19 hpi, se observan varias células de contorno irregular (flechas) por la presencia de numerosas prolongaciones cortas. **D)** A las 20 hpi, se observan dos células con corteza bien definida y una gran cantidad de filopodios cortos (flechas). Imágenes tomadas en el microscopio de epifluorescencia, a 200×.

En la figura 9 se muestra una célula de corteza gruesa y con filopodios (Fig. 9 A). En la figura 9B se observan los núcleos de las células mostradas en la figura anterior teñidos con DAPI, como se puede apreciar dentro de los límites de la célula descrita previamente se distinguen dos núcleos que evidencian la formación de un sincitio.

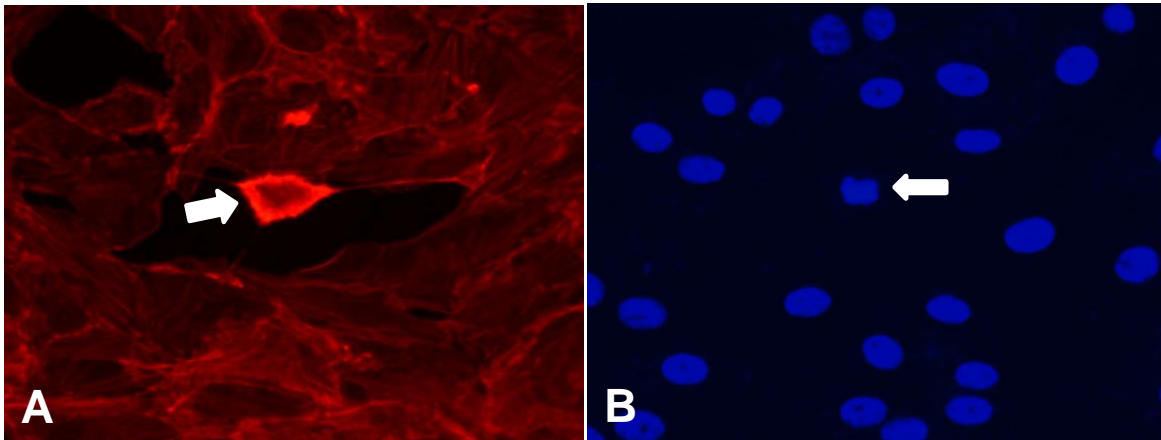


Figura 9. Cambios en el citoesqueleto de actina de una célula VERO infectada con el suero 2. **A)** A las 20 hpi se observa una célula con corteza gruesa y definida que está emitiendo varios filopodios (flecha). **B)** Es el mismo campo óptico expuesto a luz ultravioleta con el fin de evidenciar los núcleos teñidos con DAPI, se señalan los núcleos que están formando parte del sincitio (flecha). Imágenes tomadas en el microscopio de epifluorescencia, 200×.

5.8. Producción de partículas virales en células RK-13 y Vero (TCID)

Con el fin de explorar si había alguna diferencia en la producción de partículas virales dependiendo de la línea celular utilizada, cultivos de células RK-13 y Vero fueron infectados con diluciones seriadas realizadas a partir del mismo stock viral, se observaron después de 72 hpi y se realizó la titulación viral, para lo cual se utilizó el método de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938).

De manera general se puede señalar que la diferencia encontrada en la producción de partículas virales entre los cultivos utilizados es mínima, ya que las células RK-13 obtuvieron una titulación de $10^{11.49}$ TCID₅₀ ml⁻¹ y en las células VERO se obtuvo un título menor, siendo de $10^{11.44}$ TCID₅₀ ml⁻¹.

Tabla 3. Cuantificación de la producción de partículas virales en células RK-13 (TCID₅₀).

Dilución	Unidad Infectada	Infectados Acumulados		Número de Infectados (A/A+B)	Porcentaje (%)
		A	B		
10 ⁻⁶	5/5	30	0	30/30	100
10 ⁻⁷	5/5	25	0	25/25	100
10 ⁻⁸	5/5	20	0	20/20	100
10 ⁻⁹	5/5	15	0	15/15	100
10 ⁻¹⁰	4/5	10	1	10/11	90.90
10 ⁻¹¹	3/5	6	3	6/9	66.66
10 ⁻¹²	2/5	3	6	3/9	33.33
10 ⁻¹³	1/5	1	10	1/11	9.09
10 ⁻¹⁴	0/5	0	15	0/15	0

Sustitución de Fórmula:

$$\frac{(66.66) - 50\%}{(66.66) - 33.33} = \frac{16.66}{33.33} = 0.499 \text{ DP}$$

$$(-11)(-1) + 0.499 = 11.499$$

$$\text{Titulación Viral} = 10^{11.499} \text{ TCID}_{50} / 0.6 \text{ ml}$$

Tabla 4. Cuantificación de la producción de partículas virales en células VERO (TCID₅₀).

Dilución	Unidad Infectada	Infectados Acumulados		Número de Infectados (A/A+B)	Porcentaje (%)
		A	B		
10 ⁻⁶	5/5	29	0	29/29	100
10 ⁻⁷	5/5	24	0	24/24	100
10 ⁻⁸	5/5	19	0	19/19	100
10 ⁻⁹	4/5	14	1	14/15	93.33
10 ⁻¹⁰	4/5	10	2	10/12	83.33
10 ⁻¹¹	3/5	6	4	6/10	60.0
10 ⁻¹²	2/5	3	7	3/10	30.0
10 ⁻¹³	1/5	1	11	1/12	7.69
10 ⁻¹⁴	0/5	0	16	0/16	0

Sustitución de Fórmula:

$$\frac{(66) - 50\%}{(66) - 30} = \frac{16}{36} = 0.44 \text{ DP}$$

$$(-11)(-1) + 0.44 = 11.44$$

$$\text{Titulación Viral} = 10^{11.44} \text{ TCID}_{50} / 0.6 \text{ ml}$$

Tabla 5. Resumen de los ECP observados en células VERO, RK-13 y PK-15 infectadas con PRRSV.

CÉLULAS	Efectos Citopáticos	Ciclo Viral
		Tiempo Postinfección
VERO	Células con forma alargada, prominentes filopodios y formación de sincitios.	17 – 126 hrs
PK-15	Es difícil apreciar los límites de algunas células, se observan de diferente tamaño y con apariencia rugosa, vacuolización y lisis celular.	20 – 88 hrs
RK-13	Formación de sincitios, presencia de filopodios y vacuolización celular.	17 – 144 hrs

6. DISCUSIÓN

El virus utilizado en este trabajo proviene de un brote de campo ocurrido en una granja comercial ubicada en Mérida, Yucatán, en donde adicionalmente a la signología clínica se realizó el diagnóstico de PRRS mediante ELISA (Botner, 1997). Considerando estos antecedentes, se intentó el aislamiento viral en cultivos de células RK-13 a partir de muestras de suero (Méndez, 1996)

En los primeros ensayos de infección se utilizaron todos los sueros y fue muy revelador que en todos los pozos hubo presencia de ECP, aunque estos fueron de diferente grado y aparecieron a tiempos distintos, debido probablemente a la concentración viral presente en cada uno de los sueros. Sin embargo, el tipo de ECP y el tiempo empleado en el desarrollo del ciclo viral correspondió con lo reportado en la literatura para PRRSV (Plagemann, 2004; Benfield *et al.*, 1992; Mardassi *et al.*, 1994).

Los antecedentes y estas primeras evidencias señalaban la posibilidad de que estuviera involucrado el virus de PRRS, y para corroborarlo se desarrolló una prueba de suero neutralización con anticuerpos específicos para el virus, esta prueba resultó positiva ya que se logró bloquear la infección *in vitro* a una dilución de 1:250 del stock viral (figura 2D) y nos dio la certeza de que los cambios celulares observados realmente se debían al virus del PRRS (Botner., 1997).

En los cerdos, el PRRSV tiene un tropismo celular restringido, ya que se aisló en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos (PAMs) y, hasta la fecha, estas células junto con los monocitos sanguíneos son las únicas células porcinas que son usadas en la propagación viral (Benfield *et al.*, 1992; Hennings *et al.*, 2008; Plagemann, 2004; Therrien *et al.*, 2000). Sin embargo, existen dos subclonas celulares no-porcinas; MARC-145 y CL2621, ambas derivadas de MA104 (células de riñón de mono verde africano), que también son usadas rutinariamente en la propagación *in vitro* de PRRSV (Delrue *et al.*, 2010; Pol JMA *et al.*, 1997, Therrien *et al.*, 2000).

Un factor clave del tropismo restringido de PRRSV es que su entrada a las células PAMs y MARC-145, es a través de un mecanismo de endocitosis mediada por un receptor (Therrien

et al., 2000, Delputte *et al.*, 2007), donde el heparan sulfato, la sialoadhesina y el CD163 se han identificado como receptores esenciales. Adicionalmente, también se sugiere que el colesterol es crítico para la entrada de PRRSV. Sin embargo, los resultados existentes son contradictorios e inconclusos ya que incluso las células MARC-145 no expresan sialoadhesina (Huang *et al.*, 2011).

Therrien *et al.*, en el 2000, determinaron que las células PK-15 y RK-13 son capaces de unir al PRRSV con una eficiencia comparable a las células MARC-145 y a las PAM's. Sin embargo, comentan que estas líneas celulares parecen no ser permisivas para PRRSV.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas considerando su origen; las PK-15 (células epiteliales de riñón de cerdo), RK-13 (células epiteliales de riñón de conejo) y Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) se caracterizan por ser epiteliales y provenir de riñón. De manera particular, las células Vero son equivalentes a las MARC-145 de tal suerte que, en este trabajo, fungieron como control positivo, mientras que las PK-15 por ser de origen porcino tenían altas probabilidades de ser permisivas a la infección con PRRSV. Por su parte las RK-13 representaban una incógnita, aunque se puede señalar que se han utilizado previamente en el laboratorio en ensayos de infección con virus como IBR y enfermedad de Aujeszki, y en todos los casos ha sido una de las líneas más permisivas produciendo excelentes resultados (Alcántar M F, 2011; Gonzáles OOV, 2009; Ruiz LEV y Sánchez M M; 2012). Así, en este trabajo se exploró si era posible desarrollar el ciclo viral de PRRSV y la generación de ECP en las líneas celulares PK-15 y RK-13.

A pesar de los trabajos en los que se señala que estas líneas celulares no son permisivas para el PRRSV (Therrien *et al.*, 2000, Benfield *et al.*, 1992; Hennings *et al.*, 2008; Plagemann, 2004) en este estudio fue posible desarrollar la replicación *in vitro* del PRRSV en cultivos de células PK-15, RK-13 y Vero. Asimismo, se documentó el desarrollo de los ECP en relación al tiempo empleado por el virus para desarrollar su ciclo de replicación. Los ECP encontrados fueron; presencia de células de diferente forma y tamaño, células de apariencia rugosa por la presencia de vacuolas, formación de sincitios, emisión de filopodios y lisis celular. Estos ECP fueron evidentes entre las 17 y las 23 hpi, resultados que concuerdan con lo señalado por otros autores (Plagemann, 2004; Benfield *et al.*, 1992; Mardassi *et al.*, 1994).

En las células PK15, la lisis celular se presentó en un lapso muy breve, de tal manera que no permitió apreciar con detalle los ECP. Así, de las líneas celulares empleadas en este estudio, las células PK-15 fueron las más permisivas. Por este motivo, se decidió no utilizarlas para explorar la posibilidad de que el PRRSV indujera modificaciones en el citoesqueleto de actina, a la luz de esta discusión resulta evidente que será necesario e importante realizar investigaciones adicionales con las células PK-15.

Los resultados obtenidos con RK-13 y VERO concuerdan con lo reportado en la literatura, tanto en lo que respecta a los ECP, como a las modificaciones del citoesqueleto y el tiempo empleado por el virus (Cafruny *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2011).

Como ya se había señalado, diversos autores (Bautista *et al.*, 1993; Benfield *et al.*, 1992; Hennings *et al.*, 2008; Plagemann, 2004; Therrien *et al.*, 2000) reportan la presencia de una alta selectividad con respecto al tropismo de PRRSV, es importante destacar que los resultados del presente estudio difieren con estos artículos, en el sentido de que fue posible que el PRRSV desarrollará su ciclo viral en cultivos de células PK-15 y RK-13, lo cual se puede constatar en las figuras 3, 4 y 5, imágenes que muestran una gran cantidad de células con ECP.

Un factor que pudiera explicar estos hallazgos es la dosis viral infectiva usada, pues en los artículos consultados se postula que se logra una mayor eficiencia usando una dosis infectiva mínima (Kim *et al.*, 2002), la cual es del orden de TCID = 10^5 / ml (Reiner *et al.*, 2010) mientras que en este estudio se utilizó una dosis mayor (TCID = 10^{11} / 0.6 ml), la cual podría provocar que este virus, que si se une a las líneas celulares exploradas (Therrien *et al.*, 2000), pudiera desarrollar su ciclo viral completo. De cualquier manera será necesario realizar estudios adicionales que permitan corroborar y explicar los hallazgos encontrados en este estudio.

Cafruny *et al.* en 2006, realizan un estudio, en donde la infección de PRRSV es inhibida con colchicina y citocalasina D (dos inhibidores del citoesqueleto), demostrando el papel crítico del citoesqueleto en la permisividad viral y en la transmisión intercelular.

En este estudio la interacción del PRRSV con células Vero y RK-13 indujo modificaciones evidentes en el citoesqueleto y gracias a las preparaciones realizadas con faloidina rodaminada es posible señalar que la actina es la responsable de las proyecciones filamentosas observadas (Favoreel *et al.*, 2005; Smith y Wood, 1997). En las figuras 6, 7, 8

y 9, se observa la participación de la actina (de color rojo) en la formación de filopodios, lamelipodios y ondulaciones de la membrana o *ruffling* (Dieguez, 2008; Alberts *et al.*, 2008).

Así, en este trabajo se desarrolló la infección del PRRSV en las células PK-15 y RK-13, se describen los ECP y se señala que la interacción de este virus induce modificaciones en el citoesqueleto de actina durante el desarrollo de su ciclo viral. Sin embargo, es necesario un mejor entendimiento del ciclo de vida de este virus y de sus interacciones con el ambiente celular del huésped para conocer los detalles moleculares de la patogénesis viral y permitir el desarrollo de nuevas terapias antivirales y/o inmunológicas (Kallewaard *et al.*, 2004; Cafruny *et al.*, 2006).

7. CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) a partir de muestras de suero.
- Se logró la replicación *in vitro* del PRRSV en las líneas celulares VERO, PK-15 y RK-13.
- Se observaron células de diferente forma y tamaño, de apariencia rugosa por la presencia de vacuolas, formación de sincitios, emisión de filopodios y lisis celular.
- Las células PK-15 fueron las más permisivas, mientras que en Vero y RK-13 la duración del ciclo replicativo coincide con lo reportado en la literatura (17-23 horas).
- Se corroboró la presencia de modificaciones del citoesqueleto de actina durante el desarrollo del ciclo viral del PRRSV.
- La línea celular RK-13 se manifestó como una opción adecuada para realizar la proliferación *in vitro* del PRRSV.

8. REFERENCIA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. 3th ed. New York and London: Garland Publishing Inc, 1994.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science, 2008: 965-983.
- Alcántar M F. Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por el virus de pseudorrabia en las células 3T3, MDCK y C6 (tesis de licenciatura). FES Cuautitlán, UNAM, 2011.
- Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, Doster AR, Nelson E, Osorio FA. Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium Bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2002 21: 21-29.
- Bautista ME, Goyal MS, Yoon JI, Joo SH, Collins EJ. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest* 1993 5: 163-165.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) Virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 1992 4: 127-133.
- Bloemraad M, Kluijver EP, Petersen A, Burkhardt GE, Wensvoort G. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet Microbiol* 1994 42: 361-371.
- Botner A. Diagnosis of PRRS. *Vet Microbiol* 1997 55: 295-301.
- Botner A, Nielsen J, Bille-Hansen V. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 1994 40: 351-360.
- Cafruny AW, Duman GR, Wong HWG, Said S, Ward-Demo P, Rowland RRR, Nelson AE. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact

cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection. *Virology Journal* 2006 3: 90

Cavanagh D. *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol* 1997 142: 629-633.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Althouse GC, Lunney J. Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Anim Health Res Rev* 2008 9: 59-69.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca D, Chladek D. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet Diagn Invest* 1992 4: 117-126.

Conzelmann KK, Visser N, Woensel VO, Thiel HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory virus a member of Arterivirus group. *Virol* 1993 193: 329-339.

Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3ª ed. Madrid: Marbán Libros, 2006: 435-444 y 574-575.

Dea S, Bilodeau R, Athanassious R, Sauvageau R, Martineau GP. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can Vet J.* 1992 33: 801–808.

Dee Scott A. Etiología y signos clínicos (01-03-2006) Universidad de Minnesota. EE.UU. Vías de transmisión indirectas (10-04-2006). Métodos de diagnóstico (20-04-2006). Bioseguridad (23-05-2006). Erradicación (07-06-2006). Experiencias norteamericanas en la erradicación del PRRSV (21-06-2006). URL: <http://www.3tres.com>

- Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin-like receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2002 76: 4312-4320.
- Delputte PL, Van Breedam W, Barbé F, Van Reeth K, Nauwynck HJ. INF- alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 27: 757- 766.
- Delrue I, Gorp VH, Doorselaere VJ, Delputte LP, Nauwynck JH. Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CK163. *BM Biotechnology* 2010 10:48.
- Díaz E, Rodríguez S, Lara H. Situación actual de la enfermedad de PRRS en México. Boehringer Ingelheim. Seminario PRRS. Precongreso AMVEC, Querétaro 2001.
- Dieguez FL. Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agrosoma de actina (Tesis doctoral) Barcelona, España, Departamento de biología celular y Anatomía patológica, Universidad de Barcelona, 2008.
- European Commission, Directorate General for Agriculture. The new pig disease: Conclusions reached at the seminar. In the New Pig Disease: Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome. A Report on the Seminar/Workshop Held in Brussels on; 1991: 29-30 Apr; 82-86.
- 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.
- González OOV. Efecto de la interacción del virus de pseudorrabia sobre el citoesqueleto de actina en las células RK13, PK15 y VERO (tesis de licenciatura). FES Cuautitlán, UNAM, 2009.
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2005 8: 35-45.

- Hennings- Christopher J, Nelson EA, Althouse GC, Lunney J. Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Anim Health Res Rev* 2008 9: 59 - 69.
- Hooper CC, Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanitz CL. Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J. Vet Diagn Invest* 1994 6: 13-15.
- Huang L, Zhang YP, Yu YL, Sun MX, Li C, Chen PY, Mao X. Role of lipid rafts in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in MARC- 145 cells. 2011 414: 545-550.
- Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter* 1989 1: 1-10.
- Kim TS, Benfield DA, Rowland RRR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Research* 2002 85: 133- 140.
- Lindhaus W and Lindhaus B. Ratselhafte Schweinekrankheit. *Der Praktische Tierarzt* 1991 5: 423-425.
- Loula T. Mystery pig disease. *Agri-practice* 1991 12: 23-34.
- Magar R, Robinson Y, Dubuc C, Larochelle R. Evaluation of the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig carcasses. *Vet Record* 1995 137: 559-561.
- Mardassi H, Mounir S, Dea S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virology* 1994 75: 681-685.
- Méndez TA. Diagnóstico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Memorias de la II Jornada de Producción Porcina; UNAM-FMVZ, Depto. de Producción en credos, 1995: 12-17.
- Meredith M J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: Blue Ear Disease of Pigs. Pig Disease Information Centre, University of Cambridge. 1992.

URL: http://isbndb.com/d/publisher/pig_disease_information_centre.html

Meulenbergh JJM, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PLJM, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJM. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Virology* 1993 192: 62-72.

Meulenbergh, J. J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G. & Moormann, R. J. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 1997 55: 197- 202.

Molitor TW, Bautista EM, Choi CS. Immunity to PRRSV: Double-edged sword. *Vet Microbiol* 1997 55: 265-276.

Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 1999 80: 297-305.

Otroski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, López OJ. Identification of neurofrazing and non-neutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol* 2002 76: 4241-4250.

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.

Plagemann PG, Moenning V. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Virus Res* 1992 41: 99-192.

Plagemann PG. GP5, ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus res* 2004 102: 225-230.

Pol JMA, Van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C. Pathological ultrastructural and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced

- infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Vet Quarterly* 1991 13: 137-143.
- Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, 1938 27: 493-497.
- Reiner G, Willems H, Pesch S, Ohlinger VF. Variation in resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Pietrain and Miniature pigs. *J Anim Breed Genet*, 2010 127: 100- 106.
- Rowland R, Lawson S, Rossow K, Benfield D. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet Microbiol* 2003 96: 219-235.
- Ruiz LEV y Sánchez M M. Identificación y características del crecimiento *in vitro* de una cepa del virus de rinotraqueítis infecciosa bovina aislada en campo (tesis de licenciatura) FES Cuautitlán, UNAM, 2012.
- Schimizu M, Yamada S, Murakami Y, Morozumi T, Kobayashi H, Mitani K, Ito N, Kubo M, Kimura K, Kobayashi M, Yamamoto K, Miura Y, Yamamoto T, Watanabe K. Isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J Vet Med Sci* 1994 56: 389-391.
- Smith CA, and Wood EJ. *Biología Celular*. Wilmington, Delaware (U.S.A). Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. 1997.
- Stevens JM, Galyov E, Stevens MP. Actin- dependent movement of bacterial pathogens. *Nature Review Microbiology* 2006 4:91-101.
- Sodeik B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Tends in Microbiology* 2000 8: 465- 472.
- Therrien D, St-Pierre Y, Dea S. Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells. *Arch Virol* 2000 145: 1099-1116.
- Van Alstine WG, Kanitz CL, Stevenson GW. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissue in experimentally infected piglets. *J Vet Diag Invest* 1993 5: 621-622.

- Wang X, Eaton M, Mayer M, Li H, He D, Nelson E. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol* 2007 152: 289–303.
- Wagstrom EA, Chang CC, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in mammary secretions of sows. *Am J Vet Res* 2000 62: 1876-1880.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991 13: 121-130.
- Wensvoort G, de Kluyver EP, Luitze EA, den Besten HL, Collins JE, Christianson WI, Chladek D. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet Diagn Invest* 1992 4: 134-138.
- White M. Blue ear disease of pigs. *Vet Rec* 1991 128: 574.
- Wissink EH, van Wijk HA, Kroese MV, Weiland E, Meulenbergh JJ, Rottier PJ, van Rijn PA. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 2003 84: 1535-1543.
- Wootton S, Rowland RR, Yoo D. Phosphorylation of the nucleocapsid protein of PRRS virus. *J. Virol* 2002 76: 10569-10576.
- Zhou P, Zhai S, Zhou X, Lin P, Jiang T, Hu X, Jiang Y, Wu B, Zhang Q, Xu X, Li J, Liu B. Molecular characterization of transcriptome-wide Interactions between Highly pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Alveolar Macrophages in vivo. *Int J Biol Sci* 2011 7: 947- 959.
- Zimmerman JJ, Yoon KJ, Pirtle EC, Wills RW, Sanderson TJ, McGinley MJ. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol* 1997 55: 329-336.
- Zimmenman JJ, Benfield D, Murtaugh M, Osorio F, Stevenenson G, Torremoreli M (2006) Disease swine. Chapter 24. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine Arterivirus) 347-417.