

Trabajo Final de Licenciatura en Biotecnología y Biología
Molecular

Estudio del efecto de la patogenicidad viral en la expresión de genes relacionados a la apoptosis

Colina Santiago Emanuel

Director: Dr. Metz Germán Ernesto

Co-Directora: Dra. Echeverría María Gabriela

Laboratorio de Virología
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de la Plata
La Plata, 2020

Facultad de
Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Índice

Introducción	1
¿Qué es un virus?	1
Apoptosis.....	2
Los virus y la apoptosis.....	5
Virus de Arteritis Equina.....	5
Organización genómica	6
Proteínas de importancia en la partícula viral	7
Entrada del virus	8
Infecciones con el VAE	8
Otro arterivirus familiar: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino	9
Objetivos	11
Materiales y Métodos	12
Cepas virales.....	12
Cultivos celulares: Descongelado celular	12
Cultivos celulares: Tripsinado y ampliación de los cultivos	12
Infecciones virales	13
Titulación viral	13
Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE.....	14
Western blot	14
Análisis de los cambios morfológicos mediante tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (NA/BE).....	15
Cuantificación de cambios morfológicos mediante citometría de flujo	16
Extracción de ARN	16
RT-PCR	17
PCR estándar	17
qPCR	18
Resultados y Discusión	19
A. Analizar los cambios morfológicos asociados a la apoptosis en los cultivos celulares	19
B. Estudiar de manera cuantitativa, mediante citometría de flujo, los cambios morfológicos asociados a la apoptosis celular en los cultivos infectados	27
C. Analizar la expresión de diferentes mediadores de la apoptosis (caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9) mediante qPCR y su cuantificación relativa con la β -actina	29
Conclusiones finales	36
Bibliografía	37

Introducción

¿Qué es un virus?

Una de las primeras definiciones para describir a un virus fue dada por A. Lwoff en 1957 en donde expresó: “Un virus es una entidad estrictamente celular y potencialmente patogénica con una fase infecciosa, que posee un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), es incapaz de crecer y reproducirse por fisión binaria y carece de enzimas para producir energía”. Posteriormente en 1967, S. E. Luria y J. E. Darnell dieron su definición diciendo: "Los virus son entidades cuyo genoma son elementos de ácido nucleico que se replican dentro de células vivas usando la maquinaria de síntesis celular, determinando la formación de elementos especializados que permiten la transferencia del genoma viral a otras células" (Arbiza, 2002).

Hoy en día el concepto de virus se ha ampliado y se lo entiende como un conjunto complejo de macromoléculas orgánicas (ácido nucleico y proteínas), ordenadas tridimensionalmente y que no pueden replicarse fuera de células vivas.

Los virus son estructuras simples, ya que constan de una porción de material genético (ADN o ARN) cubierto de una cápside proteica, aunque existen algunos que poseen una segunda envoltura compuesta por lípidos y proteínas de membrana. Son unas 100 veces más pequeños que las bacterias y gracias a su capacidad de infectar y readecuar la maquinaria de una célula a sus propósitos, se dice que el célebre ganador del Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1960, Peter Medawar, los definía como "un trozo de ácido nucleico revestido de malas noticias".

En lo que respecta a la clasificación de los virus, esta puede realizarse de diferentes formas. Por ejemplo, teniendo en cuenta el tipo de ácido nucleído que porta, si este es ADN o ARN, si es mono o bicatenario, o si tiene sentido positivo o negativo. Otra forma de clasificarlos se basa en si solo poseen cápside (desnudos), si tienen una segunda envoltura (envueltos) o según su tropismo.

Una clasificación muy aceptada entre la comunidad científica para agrupar a los virus fue la desarrollada en el año 1971 por el científico estadounidense David Baltimore (figura 1).

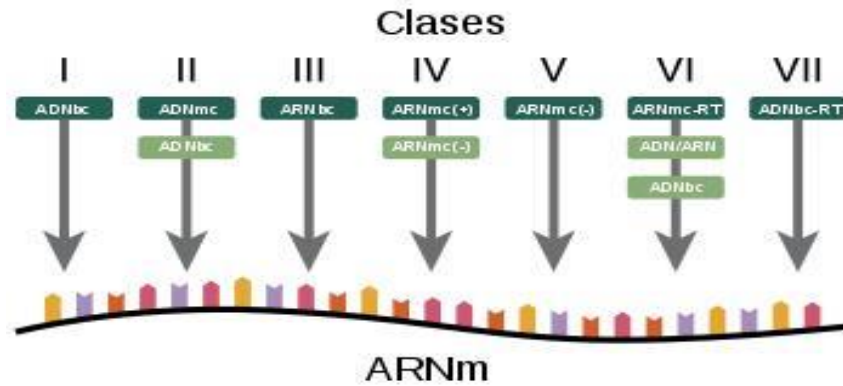


Figura 1. Clasificación de Baltimore.

En ella agrupa a los virus según el tipo de ácido nucleico que portan y su mecanismo de replicación (Baltimore, 1971).

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se considera vital para varios procesos fisiológicos normales de las células. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares (Elmore, 2007). También ocurre como un mecanismo de defensa, tal es el caso de las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por agentes nocivos externos (Norbury & Hickson, 2001).

Se ha demostrado que los virus son manipuladores moleculares y que han evolucionado para prosperar y sobrevivir en todas las especies. A su vez la apoptosis iniciada en una célula infectada se ha identificado como el principal mecanismo para reducir la propagación viral y, en consecuencia, los virus han desarrollado estrategias moleculares sofisticadas de modo tal que manipulan la apoptosis para su propio beneficio (Kvansakul, 2017).

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y moleculares típicos que suceden de manera ordenada. Las células en fase de muerte celular disminuyen de tamaño debido a la condensación de organelas, la envoltura nuclear y el citoesqueleto se desensamblan, el ADN se compacta y fragmenta y por último la célula se divide en

pequeñas vesículas membranosas denominadas cuerpos apoptóticos (Hacker, 2000). Todo esto sugiere que la apoptosis es llevada a cabo por un estricto programa celular.

Las dos vías moleculares mejor caracterizadas y estudiadas son la vía intrínseca y la vía extrínseca de la apoptosis. Estas involucran un conjunto de proteínas especializadas, de las cuales las mejor identificadas son las cisteinil aspartato proteasas también llamadas caspasas y las proteínas pro- y anti-apoptóticas pertenecientes a la gran familia de las Bcl-2 (Jayakiran, 2015).

La vía extrínseca de la apoptosis o vía de receptor de muerte celular se lleva a cabo mediante la unión de ligandos de muerte a receptores de muerte expuestos en la membrana celular. La unión genera una señal para iniciar el proceso de autodestrucción en la propia célula o instruye a otras células a destruirla. Los receptores de muerte bien conocidos son los de los ligandos TNF (los TNFR-1), FAS (los CD95) y los de los ligandos relacionados a TNF (DR4 o TRAIL-1 y DR5 o TRAIL-2) (French & Tschopp, 2003).

Los receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular, que atrae proteínas adaptadoras que dependen del tipo de ligando de muerte unido; en el caso de un ligando FAS, las proteínas adaptadoras son las FADD y en el caso de un ligando TNF, las proteínas adaptadoras son las TRADD las cuales reclutan en un segundo paso a las FADD para formar así el complejo señalizador inductor de muerte DISC (Schneider & Tschopp, 2000). Es este último, el encargado de activar a la Caspasa-8, por corte proteolítico de su forma inactiva denominada Procaspasa-8, y así iniciar una cascada de caspasas autoamplificante que llevará a la fase ejecutora de la apoptosis.

La vía intrínseca de la apoptosis significa que se inicia en el interior celular y esta involucra a la mitocondria. Ante señales ininterrumpidas de estrés celular como hipoxia, daño al genoma, etcétera, se produce un incremento en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria (controlada por un balance entre proteínas pro-apoptóticas, Bax y Bak y anti-apoptóticas, Bcl-2 y Bcl-X_L) (Reed, 1997). Esto induce la liberación de moléculas pro-apoptóticas encontradas en el espacio intermembranoso de esta organela; el citocromo-c, el AIF, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi.

El citocromo-c se une a la proteína citosólica Apaf-1 y junto a ATP forman el complejo denominado apoptosoma el cual se encarga de activar Caspasa-9, que luego activará a la Caspasa-3 ejecutora. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi son inhibidores de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis), por lo que se unen a estos acentuando las señales de muerte celular (LaCasse *et al.*, 2008). El AIF (factor inductor de apoptosis) viaja al núcleo para conducir la condensación de la cromatina y a la membrana celular para exponer a las fosfatidilserinas necesarias para la atracción de macrófagos.

Otra forma de controlar la apoptosis celular se basa en el uso de una familia de receptores específicos denominados "receptores dependientes" los cuales pueden tener dos actividades opuestas. En presencia de señales positivas de supervivencia, tales como los factores de supervivencia, la célula crece y se desarrolla normalmente debido a que se inhiben las proteínas pro-apoptóticas, no así las anti-apoptóticas. Pero, si estas señales de supervivencia son eliminadas, se disparan señales de muerte que permiten la actuación de las proteínas pro-apoptóticas y la inhibición de las anti-apoptóticas (Thibert & Fombonne, 2010). Esto último llevará al proceso irreversible de formación del apoptosoma y sus consecuentes actividades pro-apoptóticas.

Las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis se entrecruzan en un punto donde las señales de una vía pueden inducir en la otra, así una señal por vía extrínseca (mediada por receptores celulares), desencadena los procesos dominados en la vía intrínseca (mediada por mitocondria). Esto es posible debido a la existencia de la proteína Bid la cual es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2 con dominio del tipo BH3-Only (Wang *et al.*, 1996). Como consecuencia de la activación de la vía extrínseca, la Caspasa-8 puede escindir a la Bid por su extremo C-terminal obteniéndose así la forma truncada de Bid llamada t-Bid, la cual se introduce en la membrana mitocondrial externa y desencadena la liberación del citocromo-c y demás moléculas pro-apoptóticas (Luo *et al.*, 1998).

Así por lo tanto ambas vías terminan desencadenando la última fase de la apoptosis, la fase de ejecución dominada por las caspasas-3, -6 y -7, las cuales llevan a la activación de endonucleasas y proteasas responsables de los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas (Nagata, 2018).

Existe una tercer vía importante en el proceso de apoptosis la cual empezó a ser mejor caracterizada a principios del año 2000, la vía de estrés del retículo endoplásmico (RE). Los estudios *in vivo* demostraron que esta vía desencadena la apoptosis celular ante un estrés proteico ininterrumpido. Cuando la célula detecta acumulación en el tiempo de proteínas mal plegadas, se desencadenan respuestas que lleva a la actuación del par Bax/Bak (proteínas de la familia Bcl-2) y estas, junto a la caspasa-12 además de las moléculas de la vía intrínseca Apaf-1, p53, PUMA y NOXA, desencadenan la vía inducida por estrés del retículo que lleva a la muerte de la célula (Li *et al.*, 2006).

Los virus y la apoptosis

Es sabido que muchas, sino todas las células inician la apoptosis en respuesta a una infección viral de manera de reducir la progenie de estos agentes; en contra posición, los virus han ido más allá de manera que desarrollaron diferentes mecanismos para controlar la apoptosis de la célula huésped (Thomson, 2001). En particular, los virus de genoma ARN se han valido de esta exitosa estrategia para desarrollar la infección en sus huéspedes (Archambault & St-Laurent, 2000; St-Louis & Archambault, 2007; Maestre, *et al.*, 2011; Koyama, 1995).

Se sabe que los virus que infectan células animales, inducen este tipo de muerte celular luego de la infección; la razón está en permitir la rápida fagocitosis de las células infectadas por parte del sistema inmune innato y así evitar la lisis de la célula infectada y la generación de una consecuente respuesta inflamatoria en el sitio de infección (Koyama *et al.*, 2000). Por lo tanto, mediante este mecanismo se logra retrasar la respuesta inmune específica hacia el propio virus.

Virus de Arteritis Equina.

El virus de la arteritis equina (VAE) es el agente causal de la enfermedad arteritis viral equina (AVE), de gran importancia en medicina veterinaria ya que pueden generar abortos en yeguas y persistencia viral en los machos enteros infectados.

El VAE es un virus de ARN simple cadena de polaridad positiva; taxonómicamente pertenece a la familia *Arteriviridae*, orden *Nidovirales*. En dicha familia viral se agrupan

numerosos virus de reciente descubrimiento, sin embargo, la única especie viral de gran importancia en medicina veterinaria es el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).

El VAE fue aislado por primera vez en el año 1953 en una granja cerca de la ciudad Bucyrus, Ohio, EEUU, durante un brote de abortos y enfermedades respiratorias equinas (Bryans *et al.*, 1957). Si bien en un principio era categorizado como una variante del virus de la influenza equina, fue en el año 1957, que el agente aislado del brote de Ohio fue nombrado como VAE debido a las lesiones vasculares que originaba, las cuales llevaban a la inflamación y ruptura de las arteriolas de los caballos mortalmente enfermos (Doll *et al.*, 1957). Hoy en día es este signo clínico característico el que podría ser consecuencia de la inducción de la apoptosis en las infecciones por el VAE (Abeyá *et al.*, 2018).

Organización genómica

Las partículas virales del VAE se componen de una nucleocápside compuesta por ácido nucleico de 12.704 pares de bases y cápside proteica de simetría icosaédrica de unos 30-35nm de diámetro, la cual a su vez se encuentra cubierta con una bicapa lipoproteica dando un tamaño aproximado entre 40-60nm (Snijder & Meulenberg, 1998) (figura 2).

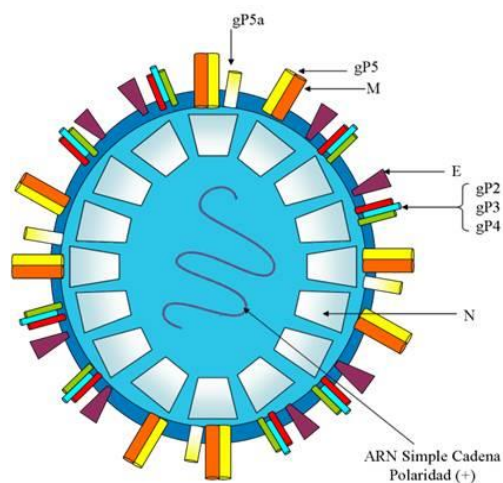


Figura 2. Representación del VAE.

El ARN genómico contiene 10 marcos de lecturas abiertos u ORF que van desde el ORF1 al ORF7. A su vez los ORF1, ORF2 y ORF5 se subdividen en dos, los cuales son ORF1a y ORF1b, ORF2a y ORF2b y ORF5a y ORF5 (figura 3).

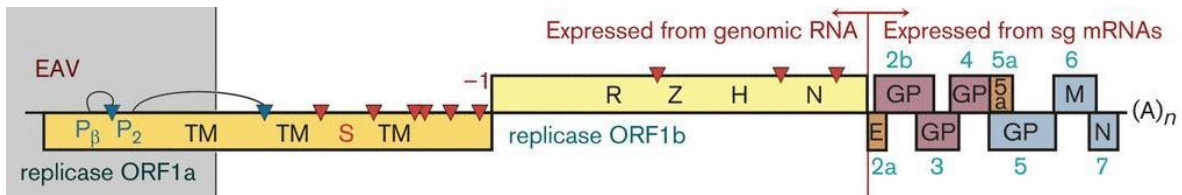


Figura 3. Esquema del genoma viral del VAE.

Los dos ORFs más grandes ORF1a y ORF1b se ubican hacia el extremo 5' de la cadena de ARN viral y codifican a 13 proteínas no estructurales (nsp) entre las que se encuentran las subunidades para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) (den Boon *et al.*, 1991).

Por otro lado, los restantes 8 ORFs ubicados hacia el extremo 3' del genoma, codifican a 8 proteínas estructurales (E, GP2, GP3, GP4, GP5, GP5a, M y N respectivamente) mediante la transcripción de ARNs más pequeños denominados ARN subgenómicos (ARNsg) (de Vries *et al.*, 1990; van Berlo *et al.*, 1986; de Vries *et al.*, 1992; Snijder *et al.*, 1999).

Proteínas de importancia en la partícula viral

Dentro de la envoltura del VAE, se encuentra la glicoproteína mayor GP5 que posee 768 nucleótidos, 255 aminoácidos, y presenta un rol importante dentro de la partícula viral. La glicoproteína GP5 puede variar en su tamaño entre 30 - 45 kDa. Esta variación depende de las glicosilaciones realizadas en las cadenas laterales durante el proceso de transporte desde el retículo endoplasmático hasta el complejo de Golgi (de Vries *et al.*, 1992).

En asociación con la glicoproteína GP5 se encuentra la proteína no glicosilada M. La única cisteína (Cis-8) presente en la región N-terminal de la proteína M, forma enlace disulfuro con la cisteína 34 del ectodominio de la glicoproteína GP5 (de Vries *et al.*, 1995). La proteína M (16 kDa) es codificada por el ORF6, no posee sitios de glicosilación y es la proteína estructural de envoltura más conservada en la familia Arteriviridae.

La envoltura viral contiene además cuatro glicoproteínas menores denominadas: GP2b, GP3, GP4 y GP5a de 25, 36-42, 28 y 2.8 kDa respectivamente. Se encuentra también la proteína menor no glicosilada de la envoltura, la proteína E de 8 kDa (Wieringa *et al.*, 2004).

Dentro de la nucleocápside viral encontramos la proteína N que es una proteína pequeña con un peso molecular de 12-15 kDa. Es expresada en abundancia en las células infectadas

y constituye del 20-40% del contenido proteico del virión (de Vries *et al.*, 1992; Faaberg & Plagemann, 1995)

Entrada del virus

Es conocido que el proceso de entrada del VAE a las células está mediado por variadas moléculas proteicas adaptadoras virales y sus respectivos receptores ubicados en la membrana plasmática de la célula diana. Similar a otros arterivirus, el VAE tiene como diana primaria a células del linaje de monocitos/macrófagos. Uno de estos receptores, es una proteína transmembrana glicosilada de 247 aminoácidos denominada EqCXCL16 perteneciente a la familia de las quimiocinas, y que se encuentra en la membrana de subpoblaciones de monocitos equinos CD14⁺. El mismo, fue confirmado como receptor primario ante el proceso de entrada del VAE a la célula, aunque es casi seguro que no es el único debido a la capacidad del virus de infectar numerosas líneas celulares, sean animales o humanas (Sarkar *et al.*, 2016).

Infecciones con el VAE

In vivo las infecciones con este arterivirus suelen ser generalmente asintomáticas (donde el hospedador es un portador asintomático). En general los signos clínicos son muy variados pasando por estadios con pirexia y/o leucopenia (características clínicas más observadas), también puede producir edema ventral afectando escroto y prepucio de sementales y glándulas mamarias en yeguas, erupción generalizada y generar episodios de abortos en yeguas. Otros signos menos frecuentes incluyen dificultad respiratoria, tos, diarrea, ataxia, erupciones dentro del labio superior, etc. La gravedad de los signos clínicos suele ser mayor en caballos muy jóvenes, muy viejos o debilitados como así también en yeguas preñadas cuando se infectan durante la preñez puede generar abortos. La mortalidad es muy poco frecuente y solo hay casos en potros recién nacidos que desarrollaron una neumonía fulminante (Timoney & McCollum, 1993).

Si bien por lo general, los caballos afectados se recuperan por completo desde el punto de vista clínico, se ha corroborado en un alto porcentaje, que en los sementales infectados se establece un estado de infección crónico, que los convierte en portadores del VAE (Timoney *et al.*, 1986).

Se han realizado distintos aislamientos del VAE tanto de poblaciones de animales con signología clínica (cepas patogénicas) como de animales donde no presentaban signos asociados a la infección (cepas no patogénicas).

In vitro, estudios en células VERO, han demostrado que ante una infección con el VAE se produce condensación de cromatina nuclear, fragmentación del ADN y activación de la cascada de caspasas, paralelamente a lo que sucede ante la inducción de apoptosis celular (Thomson, 2001). También en la misma línea celular se demostró la activación de la vía extrínseca de la apoptosis mediante la inducción de las enzimas caspasa-8 y caspasa-9 (Archambault & St-Laurent, 2000).

Otro grupo de trabajo, utilizando la línea celular BHK-21, pudo demostrar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis tras la infección con VAE (Cholleti *et al.*, 2013).

Trabajos recientes realizados en las líneas celulares RK-13, BHK-21 y VERO han reportado la activación de los diferentes marcadores moleculares asociados a las vías de apoptosis extrínseca, intrínseca y del retículo (Metz *et al.*, 2016; Metz *et al.*, 2019). Aún más, trabajos en cultivos de células de insecto, han demostrado la influencia de la proteína GP5 en la activación de la apoptosis celular (Metz *et al.*, 2014).

Otro Arterivirus familiar: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (SRRP) es una de las enfermedades de cerdos económicamente importante, se caracteriza por una falla reproductiva en cerdas y trastornos respiratorios en cerdos en crecimiento, así como una alta mortalidad en lechones (Plagemann, 2003; Rossow, 1998).

El síndrome se detectó casi simultáneamente en el Oeste de Europa y Norte América a finales de 1980 y se ha esparcido hasta convertirse en endémica en muchas naciones de Europa, Asia y las Américas productoras de cerdos. El agente etiológico de la enfermedad es un virus ARN sentido positivo, el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VSRRP) miembro de la misma familia que el VAE. (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).

Se han reportado dos cepas genotípicamente distintas del agente, la cepa Europea (tipo I) y la cepa Norte Americana (tipo II) que comparten genotípicamente el 60% de identidad nucleotídica y parece que han evolucionado de manera independiente antes de aparecer casi simultáneamente en los rebaños de cerdos comerciales (Forsberg, 2005; Hanada *et al.*, 2005; Plagemann, 2003).

Los macrófagos alveolares primarios (MAP) totalmente diferenciados, son predominantemente el target celular del VSRRP (Duan *et al.*, 1997; Duan *et al.*, 1997). Estudios previos demostraron que el heparán sulfato sirve como factor de anclaje para la unión y posterior internalización del VSRRP, aunque no necesariamente es requerida para la internalización (Delputte *et al.*, 2005).

Las partículas virales son internalizadas en vesículas cubiertas de clatrina y liberadas luego de una acidificación (Nauwynck *et al.*, 1999). Otros trabajos han demostrado que la proteína CD163, perteneciente a la súper familia de receptores ricos en cisteína, funciona como receptor celular para la infección con el VSRRP (Calvert *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el VSRRP induce apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*. En las células MARC-145 infectadas con VSRRP, se activaron procaspasa-8, -9 y -12 en la infección tardía, lo que demuestra las implicaciones de la vía extrínseca, la vía intrínseca y vía de estrés del retículo endoplásmico (ER) en la inducción de apoptosis.

El VSRRP también regula la apoptosis al manipular múltiples vías de señalización. En la infección tardía, el VSRRP activa la ruta c-Jun N-terminal quinasa (JNK) pero suprime la ruta Akt dependiente de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), para promover la apoptosis. Por el contrario, el VSRRP activa las vías PI3K/Akt y p53 en la etapa temprana de la infección, lo que suprime la apoptosis (Yin *et al.*, 2012; Huo *et al.*, 2013).

Objetivos

Los trabajos científicos hasta ahora, muestran evidencias de la inducción de la apoptosis celular con cepas seleccionadas del VAE. Sin embargo, no existen estudios de comparación de cepas de diferente patogenicidad y su relación con la magnitud de la activación del proceso de apoptosis celular.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la patogenicidad de las cepas del VAE está directamente relacionada con la magnitud de apoptosis observada en cultivos celulares.

Por lo tanto, nuestros objetivos específicos de trabajo son:

- A. Analizar cambios morfológicos asociados a apoptosis en los cultivos celulares mediante diferentes técnicas de biología molecular.
- B. Estudiar de manera cuantitativa, mediante citometría de flujo, los cambios morfológicos asociados a la apoptosis celular en los cultivos infectados.
- C. Analizar la expresión de diferentes mediadores de la apoptosis (caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9) mediante qPCR y su cuantificación relativa con la β -actina.

Materiales y métodos

Cepas virales:

Para este trabajo se utilizaron dos cepas tituladas del VAE de diferente patogenicidad: la cepa de referencia Bucyrus de alta patogenicidad y la cepa LP01 de baja patogenicidad viral.

Cultivos celulares: Descongelado celular

La línea celular que se utilizó en este trabajo fue Baby Hamster Kidney 21 (BHK-21) del stock de células del Laboratorio de Virología. Se retiró un criovial de células BHK-21 almacenadas en tanques de nitrógeno líquido y se descongelaron de manera rápida en baño maría a 37°C. Posteriormente, se removió el medio de congelación conteniendo Dimetilsulfóxido (DMSO) mediante centrifugación a 1000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió e incubó en frascos T-25 a 37°C conteniendo medio esencial mínimo (MEM) suplementado con glutamina (como fuente de nitrógeno), penicilina y estreptomycinina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se realizó el seguimiento de los cultivos mediante inspección diaria en microscopio invertido Olympus.

Cultivos celulares: Tripsinado y ampliación de los cultivos.

Los frascos T-25 con células BHK-21 en confluencia del 100%, se tripsinaron y ampliaron siguiendo los protocolos básicos de cultivos celulares. De manera resumida, y como se observa en la figura 4, partiendo de frascos en confluencia alta (1) se descartó la totalidad del medio de cultivo del frasco T-25 (5 ml) y se adicionaron 2 ml de PBS sobre la monocapa celular de modo de lavar y eliminar restos de SFB que interfieren en la acción posterior de la tripsina (2). Seguidamente, se agregó 1 ml de tripsina sobre la monocapa y se incubó a 37°C hasta observar el desprendimiento total de las células del frasco T-25 (3).

Con las células desprendidas del frasco T-25 se realizó una dilución (4) y ampliación (5) a otro frasco T-25 a una dilución 1/5 completando finalmente cada frasco de cultivo con 5ml de medio MEM de crecimiento con 10% de SFB. Se realizó la inspección diaria mediante microscopía para observar el crecimiento y morfología celular.

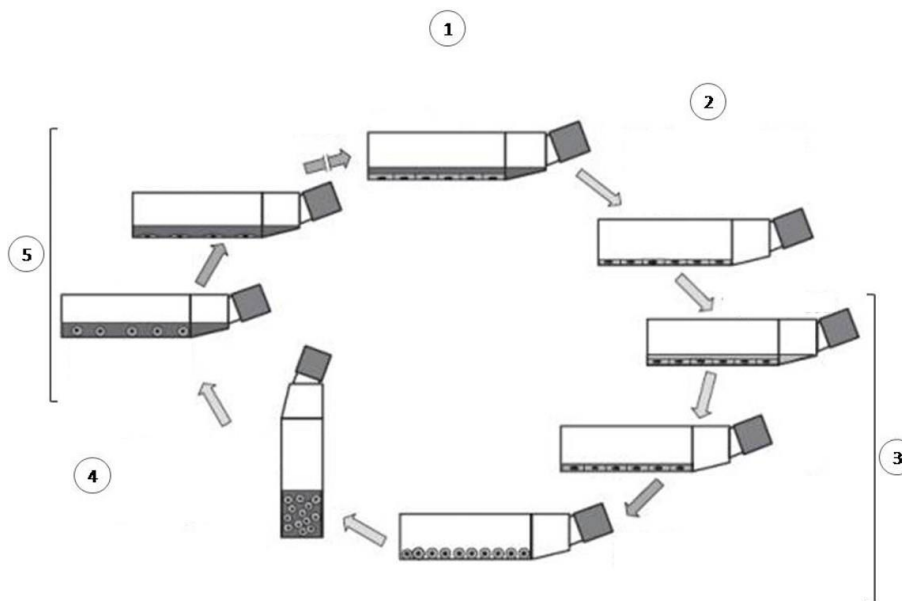


Figura 4. Esquema del proceso general de tripsinado celular.

Infecciones virales

De manera general, a monocapas de células BHK-21 en confluencia superior al 80% se les retiró el medio de cultivo de crecimiento, se lavaron con un volumen de PBS y se le agregó un volumen de inóculo viral de acuerdo a las experiencias a realizar. El inóculo viral se dejó adsorber por 1 hora a 37°C, período luego del cual se lo retiró y se agregó sobre las células medio MEM de mantenimiento (2% SFB). Dependiendo la experiencia, se levantaron las células infectadas a las 24 y 48 horas postinfección (hpi) y se procesaron acorde a la técnica a utilizar posteriormente.

Se utilizaron multiplicidades de infección (MOI) de 5 para los distintos ensayos de infección, es decir, 5 partículas virales por cada célula.

Titulación Viral

Luego de infectar un frasco T-25, levantar y fraccionar los 5 ml de sobrenadante viral, un vial del stock almacenado a -70°C se utilizó para el proceso de titulación viral.

Básicamente, se efectuaron diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-7}$) de los inóculos virales de la cepa patogénica Bucyrus y la cepa no patogénica LP01 en medio MEM como diluyente. Seguidamente se sembró 50 µl de cada dilución por sextuplicado, en microplaca de cultivo

de 96 pocillos y se agregó 100 μl de células RK-13 (3×10^4 células por pocillo). Se realizó un control de células en el cual se reemplazó el inóculo viral por 50 μl de medio MEM y sobre el que se adicionaron las células RK-13.

Luego de 3 días de incubación a 37°C en atmósfera de CO_2 , se analizaron cada uno de los pocillos y se definió como positivos todos aquellos en los cuales se observara al menos un foco de efecto citopático. Finalmente, se realizó la determinación del título viral de cada cepa mediante el cálculo estadístico de Reed y Muench a fin de determinar la distancia proporcional (DP) necesaria para el cálculo del título viral.

Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

De cultivos de células BHK-21 previamente infectados con cada una de las cepas virales a una MOI de 5, se tomaron muestras a las 48 hpi. Las células se removieron mecánicamente utilizando *scrapers*, seguidamente se centrifugó y descartó el sobrenadante; el pellet celular se lavó con buffer PBS y luego se lo trató con 100 μl de una solución de PBS (95 μl) y buffer de siembra 4X (5 μl).

La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida de 12,5% utilizando PageRuler™ Prestained Protein Ladder como marcador de peso molecular. Los geles se tiñeron utilizando tinción con colorante Coomassie Blue.

Western blot

Luego de la corrida electroforética, se equilibró el gel en buffer de transferencia, a fin de facilitar la remoción de sales y detergentes del buffer de corrida. Se cortaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 mm y papel de filtro del tamaño del gel las que también fueron humedecidas en buffer de transferencia para asegurar la correcta adhesión de las moléculas al soporte. Se armó el “sándwich” de transferencia evitando la formación de burbujas entre los distintos componentes. La electrotransferencia se realizó en sistema semiseco (BioRad) a 15 V durante 30 min.

Finalizado el tiempo de transferencia se retiró la membrana y se incubó toda la noche a 4°C en solución de leche descremada para bloquear los sitios libres de la membrana donde no

hubiera proteína unida. Luego del bloqueo, la membrana fue lavada 3 veces durante 5 min. con PBS-Tween 20 0,1% para eliminar los restos de solución de bloqueo.

Para la detección de las proteínas virales, se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti-VAE (suero obtenido de la sangre de animales inoculados con el virus de referencia) a una dilución de 1/500 por un período de 1,5 hs a 37°C y en agitación. En un segundo paso, las membranas se incubaron con antisuero anti-equino conjugado con enzima peroxidasa a una dilución de 1/1000. El revelado se realizó utilizando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y diaminobenzidina (DAB) como catalizador y cromógeno respectivamente.

Análisis de cambios morfológicos mediante tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (NA/BE)

En la técnica de tinción con NA/BE se emplea el colorante vital Naranja de Acridina que tiñe tanto células vivas como muertas de color verde. Por otro lado, el Bromuro de Etidio solo tiñe aquellas células que han perdido su integridad de membrana tiñéndolas de color naranja.

En una primera etapa se prepararon monocapas de células BHK-21 crecidas sobre cubreobjetos colocados en placas de 6 pocillos. En una segunda etapa, se realizaron las infecciones virales con cada una de las cepas del VAE como se describió previamente.

Como control negativo se utilizaron cultivos celulares sin infectar, mientras que como control positivo se utilizaron cultivos celulares incubados con Staurosporina (1 µg/µl), un inductor del proceso apoptótico. Luego, a las 48 hpi se retiró el medio de cultivo sobre los cubreobjetos, y se lavó con 1ml de PBS para eliminar células muertas que pudieran quedar sobre ellos. Posteriormente se incubó por 5 min. con una dilución 1/10 de solución de NA/BE (100 mg/ml NA y 100 mg/ml BE en PBS). Se retiró el exceso, se lavó con 1 ml de PBS eliminado los restos de NA/BE y los cubreobjetos coloreados se montaron sobre un portaobjeto utilizando solución de montar. Los cambios morfológicos se observaron en microscopio de fluorescencia (Modelo BHS; Olympus System Microscope).

Cuantificación de cambios morfológicos mediante citometría de flujo

Siguiendo los mismos procedimientos de infección previamente descritos, se recogieron las diferentes células infectadas y control. El pellet celular de cada una de las condiciones de trabajo se resuspendió en buffer comercial, y las células fueron marcadas con 5 μ l Anexina V-FICT (100 μ g/ml, BioLegend) y 1 μ l Ioduro de propidio -IP- (50 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific). Luego de 10 min. de incubación en la oscuridad, se realizó la medición por Citometría en el equipo FACScan del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos de la FCEX-UNLP-CONICET donde se detectaron las señales fluorescentes emitidas por ambos marcadores utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia. Las señales correspondientes a Anexina V-FICT fueron captadas por el filtro FL1-H, mientras que las propias del IP, por el filtro FL2-H. Para excluir a los desechos celulares se realizó el método de Scatter, analizando 10.000 eventos y graficando los resultados obtenidos mediante el uso del programa informático Flow Jo.

Extracción de ARN

Para la cuantificación de la expresión de los diferentes genes, el ARN mensajero (ARNm) total se extrajo a partir de cada uno de los cultivos de células infectados y controles mediante un protocolo de extracción con Trizol.

Las diferentes muestras provenientes de cultivos infectados a 24 y 48 hpi, se levantaron mecánicamente, y se tomó 500 μ l de cada una y se combinó en su propio tubo eppendorf con 500 μ l de Trizol y 220 μ l de cloroformo. Luego de vortear violentamente por 10 min., cada tubo se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. a una temperatura de 4°C. Seguidamente, se extrajo la fase acuosa superior y se trasvasó a otro tubo conteniendo 750 μ l de isopropanol, se mezcló e incubó toda la noche a -70°C.

Al segundo día, se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min. a una temperatura de 4°C, se descartó el sobrenadante y sobre la pared del tubo contraria al pellet, se agregó 500 μ l de alcohol 70°. A continuación, se centrifugó a 7.500 rpm por 5 min. y tras descartar el sobrenadante, el tubo se dejó secar en estufa para eliminar restos de alcohol que pudieran quedar sobre el ARN. El pellet se resuspendió en 40 μ l de agua e incubó por 10 min. a 60°C en bloque térmico.

RT-PCR

En principio, se tomaron 1 μg del ARN extraído tratado con ADNasa (siguiendo el protocolo de Fermentas Life Sciences DNase I, RNase-free) y se agregó 1 μl de Random Primers llevando a volumen final de 15 μl con agua. La mezcla total de 15 μl se incubó en bloque térmico a una temperatura de 70°C por un tiempo de 5min. Seguidamente, y esperando el descenso de la temperatura para no desnaturalizar la enzima, se adicionó 5 μl de buffer de transcripción, 1 μl de DNTPs, 3 μl de agua y 1 μl de enzima transcriptasa MMLV. Los 25 μl finales de cada tubo se incubaron a una temperatura de 37°C por un tiempo de 1 hr. Finalmente, los ADNc obtenidos se guardaron a una temperatura de -20°C hasta su empleo.

PCR estándar

A fin de analizar cada uno de los primers a emplear (tabla 1), se realizó la técnica de PCR convencional para cada gen a estudiar. La misma consistió en realizar mezclas de reacción, de volumen final igual a 25 μl , en tubos eppendorfs de 200 μl . Se adicionaron 12 μl de Master Mix, 0.5 μl de primer forward, 0.5 μl de primer reverse (concentración final de primers de 0,2 μM), 11 μl de agua y por último 1 μl de muestra ADNc por vial. Seguidamente, se procedió a realizar la PCR en equipo de PCR modelo BIOER XP Cycler empleando el siguiente protocolo base de 35 ciclos totales constando cada ciclo de: desnaturalización inicial 94°C, 1 min.; hibridación 57°C, 1 min.; extensión 72°C, 1 min. y extensión final de 72°C, 5 min. Los tiempos y temperatura de hibridación fueron puestos a punto para cada par de primers.

Luego de cada ciclo de PCR, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% sembrando 10 μl de cada tubo de reacción y 4 μl de marcador de peso molecular, mezclados con buffer de corrida conteniendo glicerol y colorantes para poder seguir la corrida. Posteriormente se incubó el gel por 20 min. en Bromuro de Etidio y se observó con lámpara de luz UV en busca de las bandas correspondientes a la amplificación de cada gen.

Primer	Secuencia (5'-3')	Temperatura Hibridación	Tamaño fragmento
Caspasa-3	F: GTCTAACTGGAAAGCCCAAATC R: CTCAATGCCACAGTCCAGTTC	55°C	72 pb
Caspasa-8	F: AACAGCAGCAAGGAGGAGATG R: GCATGACCCTGTAGGCAGAAA	55°C	85 pb
Caspasa-9	F: CTCGAGGCAGGGACTTAGACA R: AAATTGACACGGCATCCA	53°C	98 pb
β -Actin	F: CGGAACCGCTCATTGCC R: ACCCACACTGTGCCCATCTA	53°C	289 pb

Tabla 1. Secuencias de primers forward y reverse a utilizar para amplificar los genes de interés.

qPCR

La cuantificación por qPCR se llevó a cabo empleando el Master Mix para PCR cuantitativa de Bio-Rad en un volumen final de 25 μ l de mezcla de reacción conteniendo: 1 μ l de primers específicos para los diferentes genes (0.5 μ l de primer forward y 0.5 μ l de primer reverse), 10 μ l de Master Mix, volumen de agua para llegar a 19.5 μ l finales y 0.5 μ l de muestra ARN libre de ADN.

Seguidamente, se procedió a realizar la reacción de qPCR en equipo de PCR modelo BIOER Line-Gene poniendo a punto cada reacción partiendo del siguiente programa: 40 ciclos totales constando cada ciclo de 94°C, 30 seg.; hibridación 57°C, 30 seg.; extensión 72°C, 30 seg. y extensión final de 72°C, 5 min.

Al final de cada reacción de qPCR se realizaron las curvas de melting a fin de determinar la identidad de cada producto de reacción.

Se empleó la β -actina para la normalización de la cuantificación mediante el método de doble delta CT (Livak & Schmittgen, 2001).

Resultado y Discusión

A. Analizar los cambios morfológicos asociados a la apoptosis en los cultivos celulares mediante diferentes técnicas de biología molecular

Para cumplir con todos los objetivos planteados en este trabajo se realizó primeramente una adaptación al Laboratorio de Virología. La misma involucró la búsqueda y lectura bibliográfica sobre el VAE y la realización de una pasantía de capacitación en cultivos celulares con el fin de aprender las diferentes técnicas básicas de uso rutinario en el laboratorio de cultivos.

Primeramente, se descongeló un vial de células BHK-21, realizando una inspección diaria de las células a fin de familiarizarse con su velocidad de crecimiento y la morfología de las células a medida que llegaban a confluencia (figura 5).

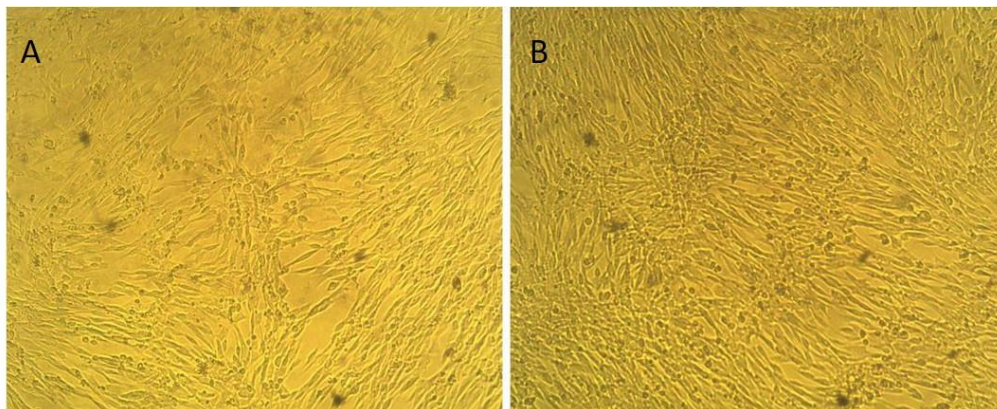


Figura 5. Microfotografías de cultivos de células en diferentes estadios de crecimiento.

Se puede observar en ambas microfotografías la morfología celular alargada tipo fibroblástica que adoptan las células adheridas. En A se distingue menor confluencia celular que en B, esto es debido a que cada microfotografía deriva de cultivos en estadios diferentes de crecimiento. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 10X.

Posteriormente, a partir de frascos T-25 con monocapas de células BHK-21 en confluencia alta, se realizó la técnica de tripsinado para hacer conteo celular, dilución y ampliación a fin de tener masa celular para la técnica de titulación y las distintas infecciones virales a realizar en este trabajo.

A partir de monocapas de células BHK-21 en frascos T-25, se infectaron con una alícuota de los stocks virales de cada una de las cepas como se mencionó previamente. Mediante observación microscópica diaria, se observó la progresión del efecto citopático durante 96 hs (figura 6).

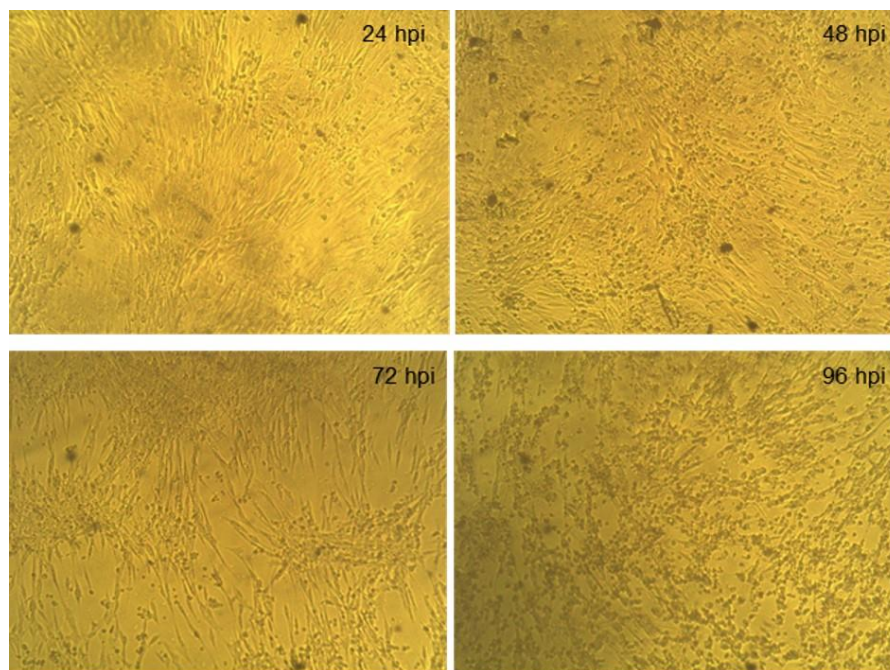


Figura 6. Microfotografías que muestran la progresión en el tiempo de la infección de células BHK-21 con la cepa patogénica Bucyrus.

Se puede observar la aparición de cúmulos celulares que pierden la morfología típica y refringencia a medida que transcurren los días, evidenciándose así la aparición del efecto citopático. Para el caso de la cepa no patogénica, este efecto es similar en progresión que los mostrados aquí por la cepa patogénica. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 10X.

Se recogió, fraccionó y almacenó el sobrenadante una vez manifestado suficiente efecto citopático sobre los cultivos, indicativo de la producción de una alta progenie viral.

A partir de uno de los viales de virus almacenados de cada una las cepas, se procedió a realizar la técnica de titulación viral (figura 7).

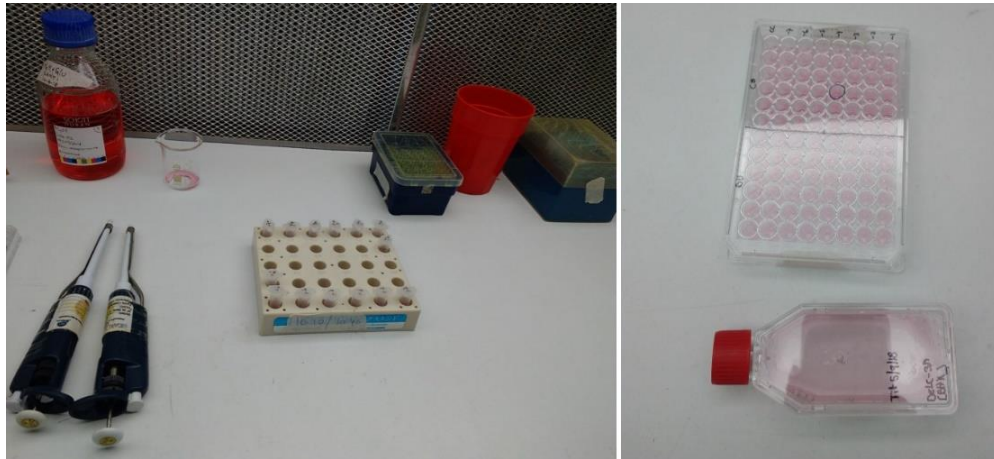


Figura 7. Preparación del material necesario para realizar la técnica de titulación viral.

Luego de realizada la técnica de titulación viral, se registró a las 72 hs la presencia del efecto citopático en cada una de las diluciones realizadas, obteniendo los datos mostrados en la tabla 2.

			Bu				
	Dil -1	Dil -2	Dil -3	Dil -4	Dil -5	Dil -6	Dil -7
Pocillos con ECP	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	2/6	0/6

			LP01				
	Dil -1	Dil -2	Dil -3	Dil -4	Dil -5	Dil -6	Dil -7
Pocillos con ECP	6/6	6/6	6/6	6/6	2/6	1/6	0/6

Tabla 2. Número de pocillos sobre el total con efecto citopático en cada una de las diluciones realizadas para cada cepa viral.

Con los valores encontrados se realizó la tabla necesaria para el cálculo de la distancia proporcional propuesta por Reed y Muench (tabla 3).

Bu						
dil/datos	N° +	N° -	Total +	Total -	+ / Total	%
-1	6/6	0/6	32	0	32/32	100%
-2	6/6	0/6	26	0	26/26	100%
-3	6/6	0/6	20	0	20/20	100%
-4	6/6	0/6	14	0	14/14	100%
-5	6/6	0/6	8	0	8/8	100%
-6	2/6	4/6	2	4	2/6	33,30%
-7	0/6	6/6	0	10	0/10	0%

LP01						
dil/datos	N° +	N° -	Total +	Total -	+ / Total	%
-1	6/6	0/6	27	0	27/27	100%
-2	6/6	0/6	21	0	21/21	100%
-3	6/6	0/6	15	0	15/15	100%
-4	6/6	0/6	9	0	9/9	100%
-5	2/6	4/6	3	4	3/7	42,85%
-6	1/6	5/6	1	9	1/10	10%
-7	0/6	6/6	0	15	0/15	0%

Tabla 3. Análisis de Reed y Muench.

Una vez confeccionada la tabla, se procedió al cálculo de la distancia proporcional de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DP = \frac{\% + \text{superior al } 50\% - 50\%}{\% + \text{superior al } 50\% - \% + \text{inferior al } 50\%}$$

De esta manera, la DP para cada uno de las cepas a emplear en este trabajo fueron: DP Bu= 0,75 y DP LP01= 0,87. Así, los títulos virales para cada una de las cepas fueron los siguientes.

Título cepa Bucyrus: $10^{5.75}$ DICCC50%/50 μ l

Título cepa LP01: $10^{4.87}$ DICCC50%/50 μ l

Una vez calculado cada uno de los títulos virales, se realizaron las diferentes infecciones de las células BHK-21 empleando una MOI de 5.

Con el fin de confirmar que el efecto citopático observado era realmente debido a la infección viral, se realizó un gel de poliacrilamida para observar cambios en los patrones proteicos de las células BHK-21 infectadas respecto de las células control sin infectar (figura 8).

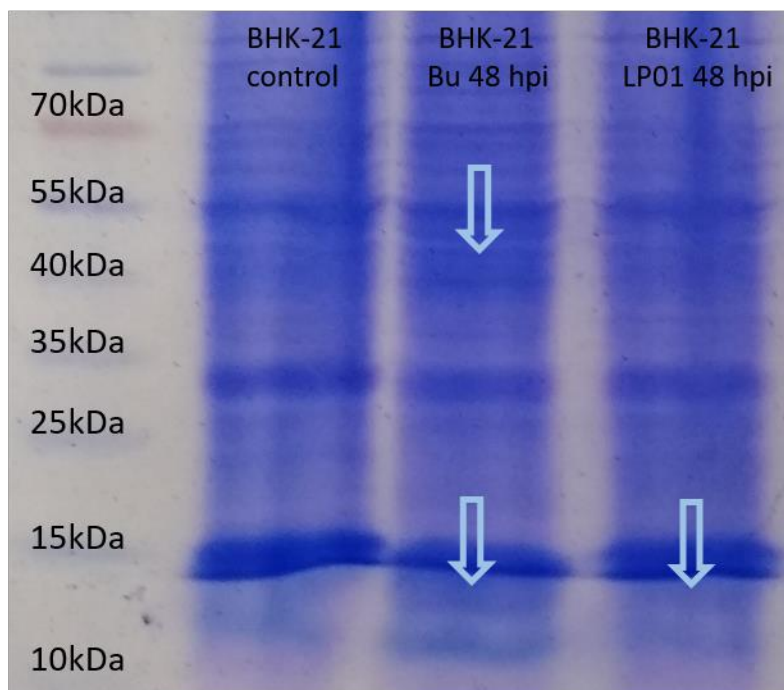


Figura 8. Fotografía del gel de electroforesis SDS-PAGE realizado con extractos proteicos de células BHK-21 sin infectar e infectadas con ambas cepas al tiempo de 48hpi.

En la corrida electroforética se observan diferencias en el patrón proteico entre las células infectadas y no infectadas. Inicialmente, las diferencias observables (marcadas con flechas) atribuible al VAE son la banda de aproximadamente 40 kDa en la calle de células infectadas con la cepa patogénica la cual correspondería a la glicoproteína GP5, y la banda de aproximadamente 12 kDa en las calles correspondientes a las infecciones con ambas cepas, que sería atribuible a la proteína N del VAE.

Para confirmar la identidad de las proteínas separadas electroforéticamente, se procedió a la transferencia de las proteínas a membrana de PVDF y revelado con anticuerpos específicos contra proteínas del VAE (figura 9).

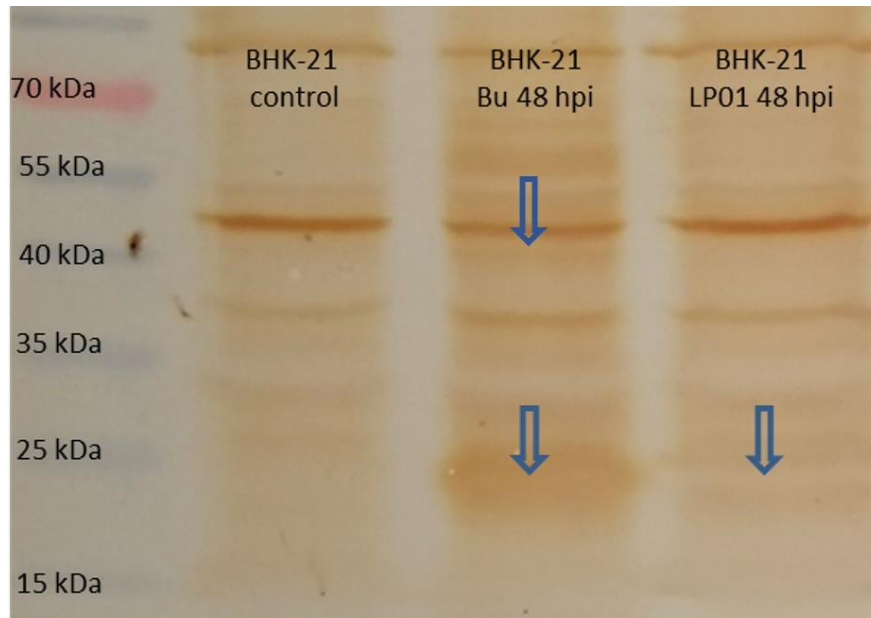


Figura 9. Fotografía del revelado del gel de electroforesis SDS-PAGE con anticuerpo policlonal contra el VAE.

En el Western blot se puede observar distintivamente una banda de reacción (flechas inferiores) en el peso aproximado de 16 kDa en las calles correspondientes a ambas muestras infectadas. Dicha banda de reacción, se corresponde con el peso de la proteína M del VAE la cual se observa con mayor intensidad en la cepa patogénica respecto de la cepa no patogénica. Del mismo modo, se puede observar una banda de reacción (flecha superior) en el peso correspondiente a la glicoproteína GP5 solo en la calle de la cepa patogénica Bucyrus.

La diferencia de intensidades observada podría deberse a que el suero empleado como anticuerpo primario es procedente de un animal positivo por inoculación en donde la cepa utilizada es la cepa Bucyrus.

La detección de la proteína M solo mediante esta técnica de revelado con anticuerpos y no con la técnica de electroforesis, demuestran la mayor sensibilidad del Western blot en la detección de proteínas virales (Manoussopoulos & Tsagris, 2015).

Por lo tanto, hemos confirmado que los cambios morfológicos observados en nuestros cultivos son debido a la infección viral por el VAE.

Con el fin de poner en evidencia cambios morfológicos asociados a la apoptosis inducida por el VAE, se procedió a infectar monocapas de células BHK-21 y analizar mediante tinción con NA/BE.

Los resultados obtenidos de las diferentes tinciones realizadas se observan en las siguientes figuras (figura 10 y 11).

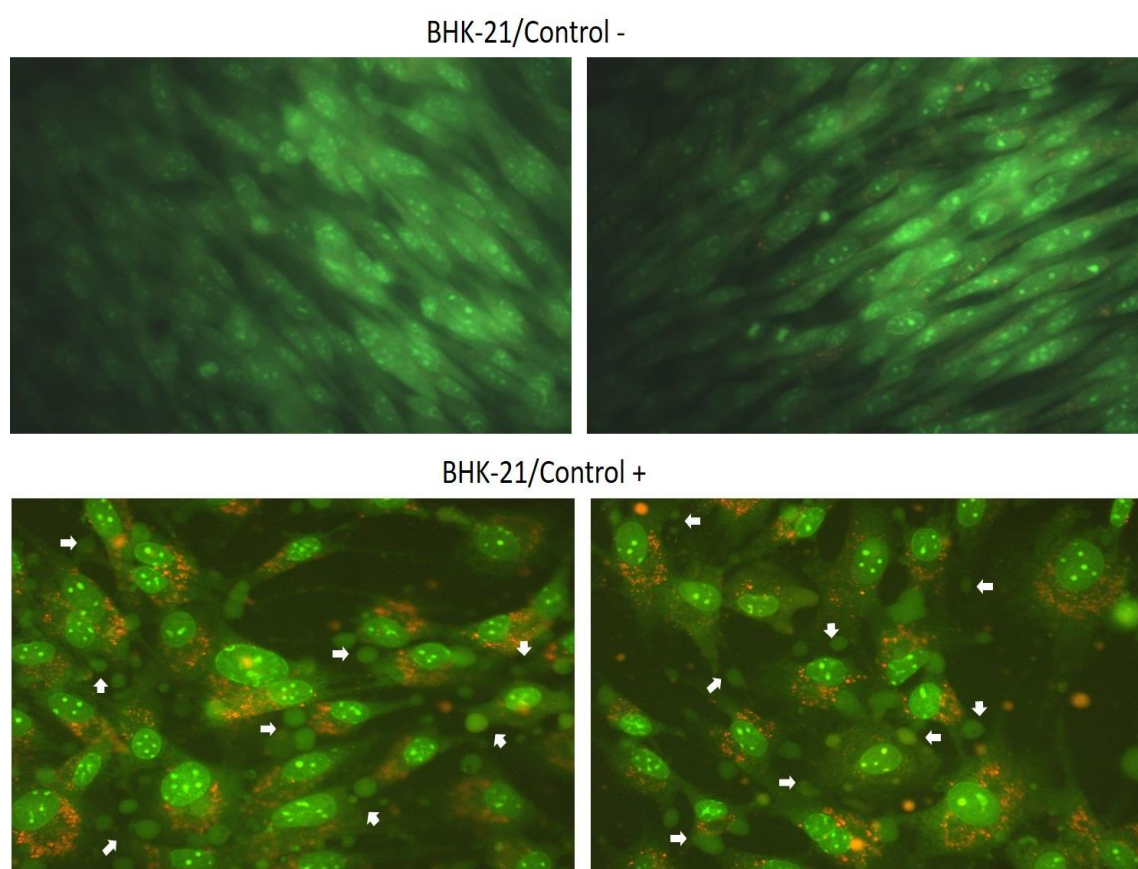


Figura 10. Microfotografías de cultivos celulares BHK-21 sin infectar e infectados con Staurosporina y teñidos utilizando NA/BE.

En el panel superior, correspondiente al control negativo, se observan todas las células de color verde con la morfología y disposición en monocapa acorde a la línea celular utilizada. Se observan también algunos puntitos de color naranja que no deberían estar presentes de acuerdo al fundamento de los colorantes. Sin embargo, esto ya ha sido reportado por otros autores (Metz *et al.*, 2019).

En el panel inferior, correspondiente al control positivo (Staurosporina), es posible observar los cambios morfológicos típicos de la apoptosis donde se observan en primer lugar los cuerpos apoptóticos característicos del proceso de muerte celular (flechas) y una evidente condensación nuclear.

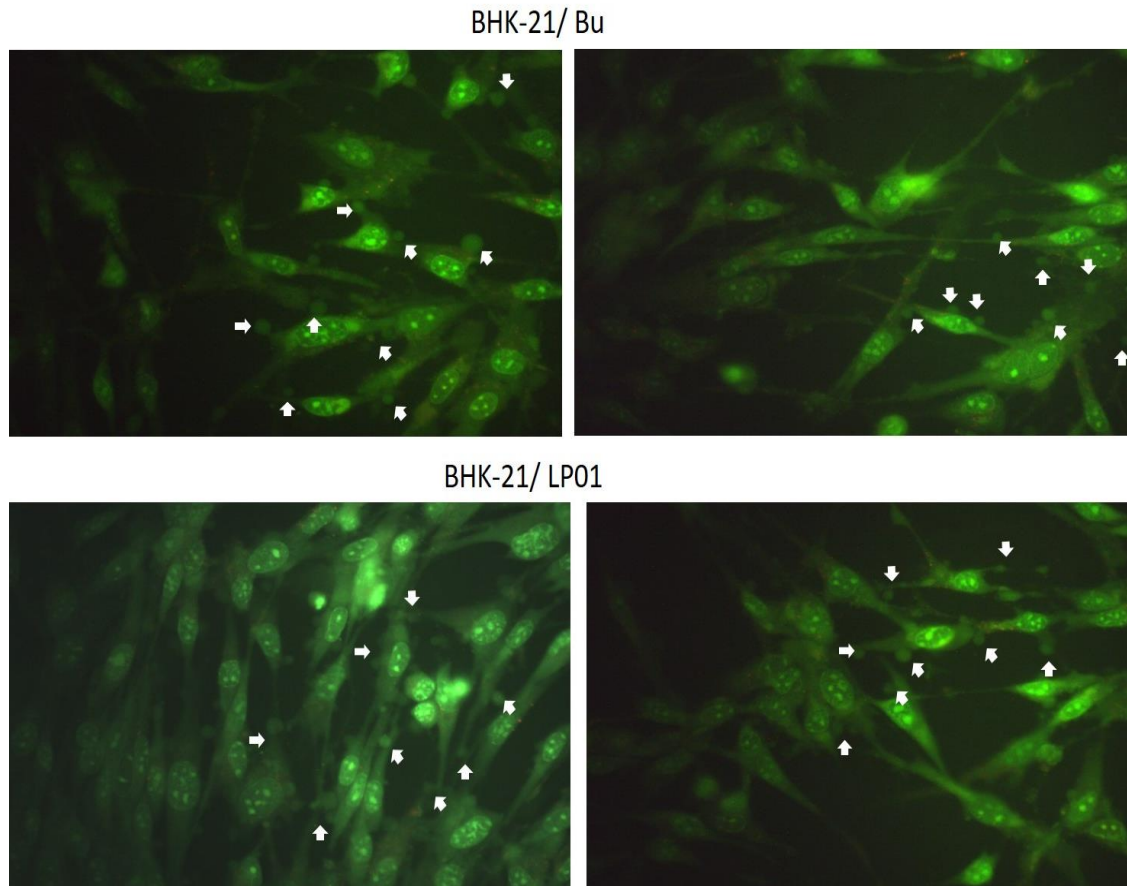


Figura 11. Microfotografías de cultivos celulares BHK-21 infectados con la cepa patogénica, Bucyrus y no patogénica, LP01 y teñidos utilizando NA/BE.

En el panel superior correspondiente a la infección con la cepa patogénica Bucyrus, se encuentran señalados con flechas, los cuerpos apoptóticos. Aunque las células poseen una morfología mucho más alargada en comparación con el control positivo utilizado (figura 10), es posible distinguir los cuerpos apoptóticos, los cuales aparecen en pequeños focos de infección. No obstante, estos se encuentran en menor proporción que en el control positivo.

En el panel inferior correspondiente a la cepa no patogénica, se observa un proceso similar al descrito anteriormente.

Así, mediante esta técnica se pudo evidenciar el efecto apoptótico del VAE recurriendo a la observación de los cambios morfológicos característicos. Sin embargo, no es posible inferir los niveles de apoptosis o estimar si existen diferencias entre ambas cepas respecto a la inducción de este proceso.

B. Estudiar de manera cuantitativa, mediante citometría de flujo, los cambios morfológicos asociados a la apoptosis celular en los cultivos infectados.

Para poder cuantificar de manera certera los niveles de células en apoptosis, se procedió a analizar las muestras mediante citometría de flujo. Para los tiempos 24 y 48 hpi y siguiendo el protocolo antes descrito, se obtuvieron los siguientes resultados presentados en las figuras 13 y 14.

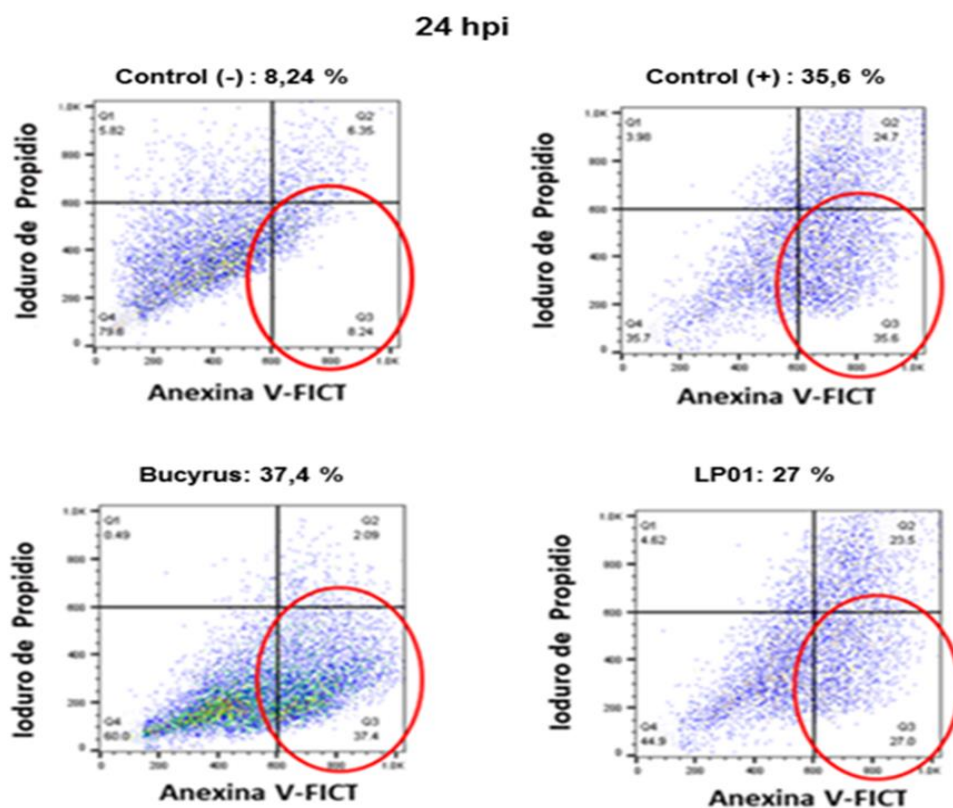


Figura 13. Datos de la técnica de citometría de flujo en cultivos tratados a las 24 hpi.

Se muestran resaltados en cada una de las gráficas de citometría, los valores correspondientes al cuadrante Q3, los cuales reflejan la proporción de células en estadio de apoptosis temprana.

De los resultados obtenidos, se puede observar que la cepa patogénica induce un porcentaje de apoptosis similar al control positivo siendo los valores de 37,4% y 35,6%, respectivamente. Por otro lado, la cepa no patogénica con 27% de inducción de apoptosis, produce un 25% menos de apoptosis respecto al control positivo.

La comparación entre ambas cepas, demostraron niveles de apoptosis 1,4 veces mayor para la cepa patogénica respecto de la no patogénica.

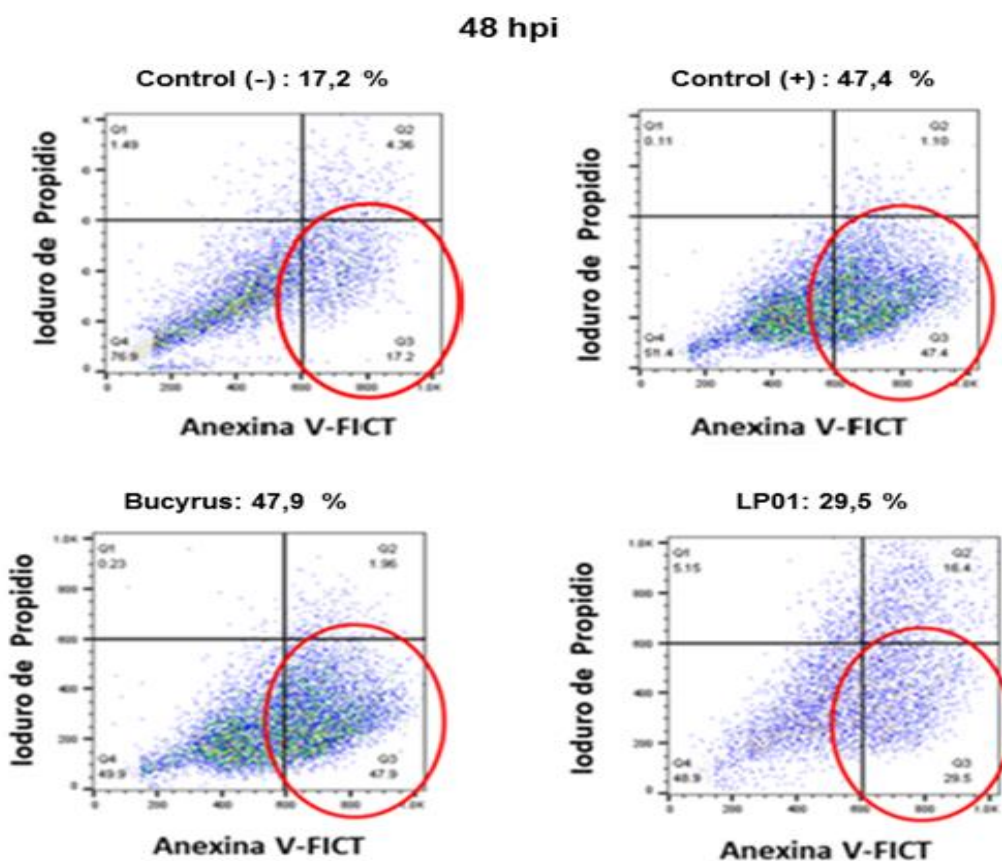


Figura 14. Datos de la técnica de citometría de flujo en cultivos tratados a las 48 hpi.

De forma similar a la figura 13, se muestran resaltados en cada una de las gráficas de citometría, los valores correspondientes a células en estadio de apoptosis. De manera global, se puede observar un aumento de los valores de apoptosis celular en todos los cultivos en comparación al tiempo previamente analizado.

Al igual que lo ocurrido a las 24 hpi, los valores de apoptosis en la cepa patogénica (47,9%) son semejantes a los obtenidos en el control positivo inducido con Staurosporina (47,4%).

Para la cepa no patogénica, se observa un incremento en la diferencia con respecto al control positivo de aproximadamente 60%.

La diferencia entre ambas cepas, evidenciaron un aumento de 1,6 veces en los niveles de apoptosis de la cepa patogénica respecto de la no patogénica.

Entre ambos tiempos ensayados, la apoptosis inducida con la cepa patogénica se incrementó aproximadamente un 30% respecto al tiempo anterior, mientras que para la cepa no patogénica este valor fue de tan solo un 10%.

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran cambios morfológicos asociados a las infecciones virales con ambas cepas del VAE. Del mismo modo, los valores de citometría, evidencian efectivamente un mayor nivel de apoptosis en los cultivos infectados con la cepa patogénica Bucyrus en comparación con la cepa no patogénica LP01.

C. Analizar la expresión de diferentes mediadores de la apoptosis (caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9) mediante qPCR y su cuantificación relativa con la β -actina.

Luego de confirmar mediante tinción con NA/BE los cambios morfológicos asociados a la apoptosis en los cultivos infectados con VAE y de cuantificar los valores de apoptosis mediante citometría de flujo, se procedió a analizar los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la apoptosis.

Inicialmente, se comenzó nuestro estudio con primers específicos para los genes de las caspasas-8,-9,-3 y β -actina como normalizador. Para poner a punto las temperaturas de hibridación de cada par de primers antes de realizar la técnica de qPCR, se llevaron a cabo diferentes reacciones de PCR convencional a fin de analizar la detección de una sola banda de reacción a la temperatura empleada (figura 15).

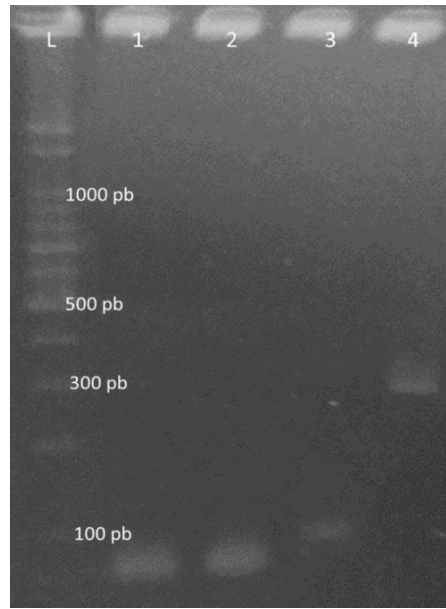


Figura 15: Gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos con cada uno de los primers mencionados en la tabla 1. L: Marcador de 100 pb; 1: producto PCR caspasa-3; 2: producto PCR caspasa-8; 3: producto PCR caspasa-9; 4: producto PCR β -actina.

En la tabla 4 se muestran los valores de temperatura seleccionados para realizar nuestros análisis de qPCR.

Temperaturas de hibridación	
Caspasa-3	58°C
Caspasa-8	58°C
Caspasa-9	58°C
β -actina	58°C

Tabla 4: Temperatura de hibridación seleccionadas para la técnica de PCR.

De la técnica de qPCR, se obtuvieron las curvas de fluorescencia para cada gen que se muestran en la figura 16.

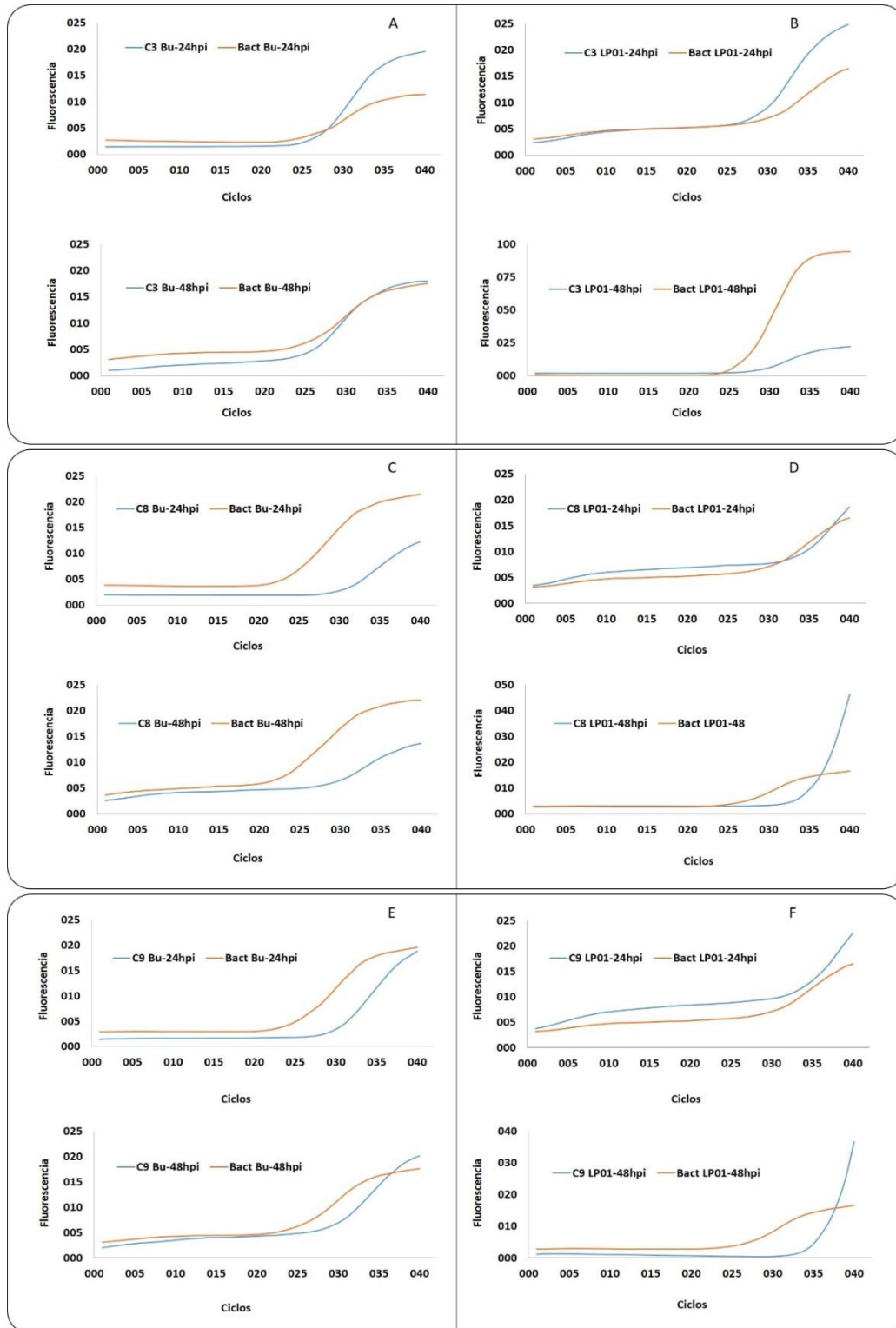


Figura 16. Curvas de fluorescencias versus ciclos para los genes de caspasa-3, -8 y -9 ensayados. El primer recuadro corresponde al análisis de la expresión del gen caspasa-3 para la cepa patógena (A) y no patógena (B), el recuadro central muestra el análisis de la expresión del gen caspasa-8 para la cepa patógena (C) y no patógena (D), y el último recuadro, corresponde al gen caspasa-9 para la cepa patógena (E) y no patógena (F).

Debido a que se realizó la reacción de qPCR con SyberGreen, al finalizar cada ciclo de reacción se procedió a realizar la temperatura de melting de los productos amplificados a fin de confirmar la presencia del gen de interés (figura 17).

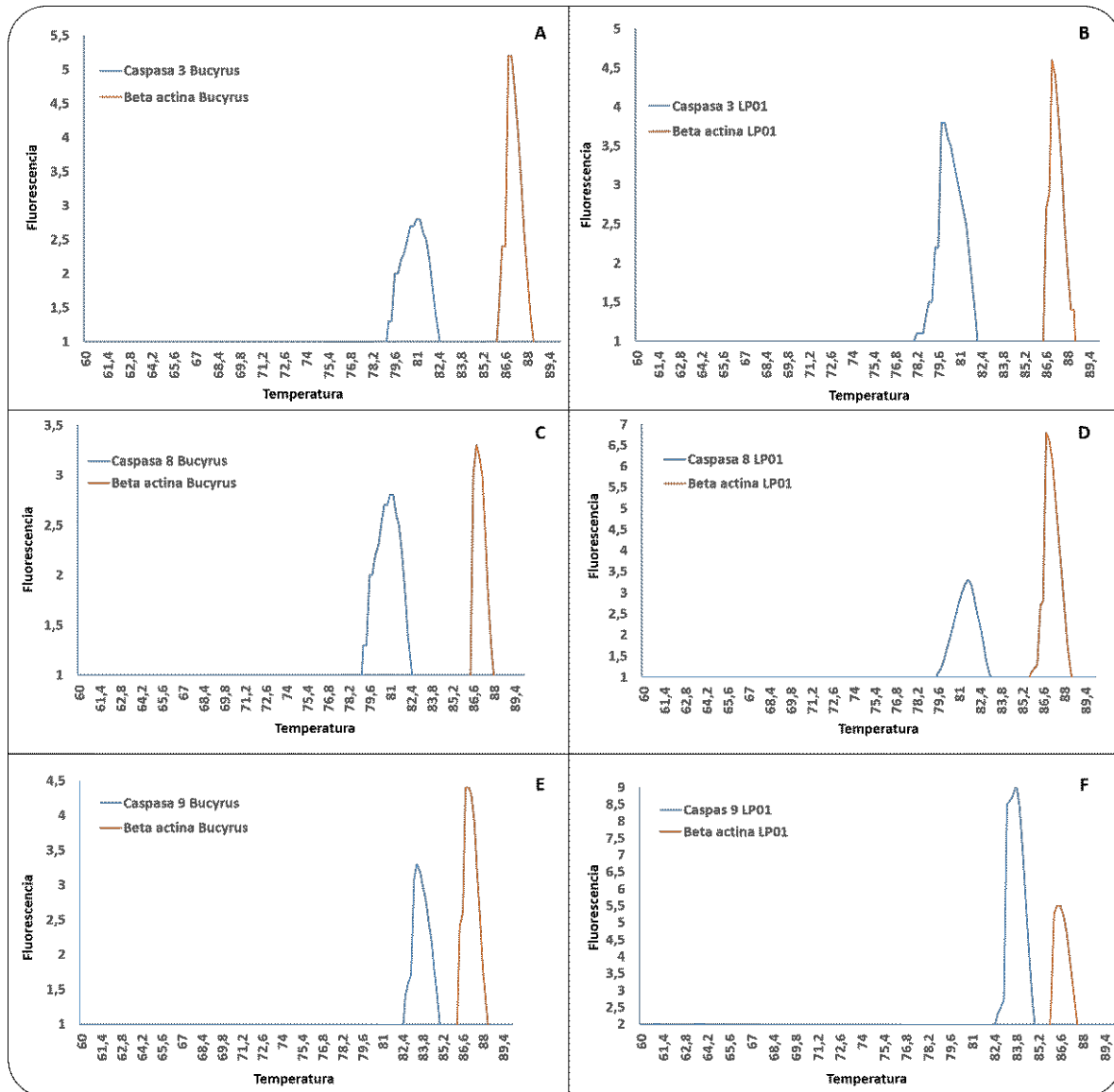


Figura 17. Temperatura de melting de los productos de reacción de qPCR para cada uno de los genes ensayados. (A) Gen caspasa-3 para la cepa patogénica; (B) Gen caspasa-3 para la cepa no patogénica; (C) Gen caspasa-8 para la cepa patogénica; (D) Gen caspasa-8 para la cepa no patogénica; (E) Gen caspasa-9 para la cepa patogénica y (F) Gen caspasa-9 para la cepa no patogénica.

Confirmada que la fluorescencia obtenida es debida al producto de la amplificación del gen deseado, se procedió a la cuantificación de cada uno de los genes mediante cuantificación relativa empleando el método del doble delta CT normalizado con la β -actina.

Los valores obtenidos en cada experiencia que se llevó a cabo se muestran en la tabla 5.

Caspasa-8		Caspasa-9		Caspasa-3	
Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi	Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi	Bucyrus 24hpi	LP01 24hpi
0.050	0.646	0.080	16.592	0.441	7.821
Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi	Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi	Bucyrus 48hpi	LP01 48hpi
0.055	0.056	0.679	0.151	0.479	0.456

Tabla 5. Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de los genes de las caspasa-8, -9 y -3 a las 24 y 48 hpi.

Los valores de cuantificación relativa de la caspasa-8 en los cultivos infectados con la cepa patogénica Bucyrus son casi nulos a ambos tiempos ensayados indicando la ausencia de activación de la vía extrínseca. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en donde tampoco se detectó la activación de la vía extrínseca de apoptosis mediante tinción *in situ* empleando anticuerpos anti caspasa-8 (Metz *et al.*, 2019). Sin embargo, no ocurre lo mismo para el caso de la cepa no patogénica en donde se detecta una activación inicial de caspasa-8 solo a las 24 hpi. Cholleti y colaboradores si detectaron activación de la caspasa-8 en cultivos infectados con una cepa no patogénica, sin embargo, dicha cepa era una cepa atenuada proveniente de la cepa Bucyrus (Cholleti *et al.*, 2013).

Estos resultados podrían deberse a componentes proteicos diferentes entre ambas cepas, lo que generaría interacciones diferenciadas con los receptores celulares. Por ello, la cepa patogénica no induce la vía extrínseca mientras que la cepa no patogénica si activa esta vía de muerte celular.

La expresión individual de proteínas del VAE o de otros arterivirus como el VSRRP, han demostrado resultados variables frente a su participación individual de dichas proteínas en el proceso de apoptosis celular. Respecto al VAE, se ha demostrado la participación de proteína GP5 en la inducción de la apoptosis y en la activación de la caspasa-3, pero no se sabe su participación en la activación de la caspasa-8 (Metz *et al.*, 2014). La proteína no estructural NSP4 del VSRRP ha sido asociada a la inducción de la caspasa-8 *in vitro* en

células MARC-145 (Yuan *et al.*, 2016). Por lo tanto, sería interesante expresar dicha proteína de manera individual y a partir de cada una de las cepas a fin de analizar su participación en el proceso de activación de la caspasa-8.

Respecto a la caspasa-9, se observa un aumento en la expresión de este gen involucrado en la activación de la vía intrínseca de apoptosis para ambas cepas. Este mismo aumento en el tiempo fue reportado para el caso del VSRRP (Lee & Kleiboeker, 2007). Sin embargo, el patrón de activación es diferente ya que en la cepa patogénica se activa esta vía a 48 hpi, mientras que para la cepa no patogénica se observa a las 24 hpi.

La activación de la vía intrínseca se ha detectado en infecciones del VAE en varias líneas celulares (Cholleti *et al.*, 2013; Metz *et al.*, 2016; St-Louis & Archambault, 2007). Por lo cual, se considera una vía de muerte celular clave dentro del proceso de patogénesis de este virus.

Por último, analizando la caspasa-3 efectora, se observa una activación de la misma a ambos tiempos posinfección para las dos cepas en estudio. Entre ambas cepas, la cepa no patogénica parece activar un mayor nivel de caspasa-3 efectora, lo cual podría atribuirse como consecuencia de su activación tanto por la vía intrínseca como extrínseca de apoptosis.

Si bien, este trabajo fue realizado con la hipótesis de que, a mayor patogenicidad de la cepa interviniente, mayores serían los niveles de apoptosis, es posible que estos últimos resultados estén en relación con lo que ocurre en las infecciones *in vivo*. Así, un mayor nivel de expresión del gen de caspasa-3, por ende, de mayor apoptosis inducido por la cepa no patogénica, generaría una mayor intervención del sistema inmune, y de esa manera un menor grado de signos clínicos en el animal infectado. Por el contrario, un menor nivel de expresión del gen caspasa-3 inducido por cepas patógenas, generaría menor participación del sistema inmune y por ende la posibilidad que el animal infectado desarrolle mayor signología clínica. Sin embargo, es necesario estudiar con mayor detenimiento el proceso inmune llevado a cabo luego de la infección con cada una de las cepas.

La apoptosis desarrolla un rol importante en la patogenia del VAE como de muchas virosis de interés veterinario. La regulación de las diferentes vías que generan la muerte celular es

clave para la replicación viral y el desarrollo de la enfermedad. Nuestro trabajo evidenció diferencias en los patrones de activación de apoptosis entre cepas patogénicas y no patogénicas de un mismo virus lo cual requerirán mayores estudios para confirmar los orígenes de estas diferencias.

Conclusiones finales:

- Se detectó cambios morfológicos mediante tinción con NA/BE asociados a la apoptosis en los cultivos infectados con ambas cepas virales.
- La cuantificación de los cambios morfológicos mediante citometría de flujo demostró mayores niveles de células en apoptosis para los cultivos infectados con la cepa patogénica respecto de la cepa no patogénica.
- El patrón de expresión de genes relacionados con la apoptosis fue diferente entre ambas cepas virales:

No se detectó activación de la caspasa-8 con la cepa patogénica.

Se detectó activación de la caspasa-9 con ambas cepas virales. Sin embargo, con la cepa no patogénica se demostró un aumento sustancial en la expresión de este gen a las 24 hpi respecto de la cepa patogénica.

Se detectó activación de la caspasa-3 con ambas cepas virales con diferentes niveles de expresión entre ambas cepas siendo mayor para la cepa no patogénica.

Bibliografía

Abeyá, M.M., Metz, G.E., Cruz, R.F., Correas, I., Osorio, F.A., & Echeverría, M.G. (2018). Equine arteritis virus cytopathic effect: caspase-dependent cell death as the major consequence observed. *Journal of Microbiology & Experimentation*, (2), 171-173.

Arbiza, J.R. (2002). *BIOLOGIA DE LOS VIRUS*. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%201.pdf>.

Archambault, D., & St-Laurent, G. (2000). Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes*, 20, 143-147.

Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.*, 35(3), 235-241.

Bryans, J.T., Crowe, M.E., Doll, E.R., & McCollum, W.H., 1957. The blood picture and thermal reaction in experimental viral arteritis of horses. *Cornell Veterinarian*, 47(1), 42-52.

Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., & Welch, S-K.W. (2007). CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *J. of Virology*, 81(14), 7371-7379.

Cholleti, H., Paidikondala, M., Munir, M., Hakhverdyan, M., & Baule, C. (2013). Equine arteritis virus induced cell death is associated with activation of the intrinsic apoptotic signaling pathway. *Virus Res*, 171(1), 222-226.

de Vries, A.A.F., Chirnside, E.D., Bredenbeek, P.J., Gravestien, L.A., Horzinek, M.C., & Spaan, W.J.M. (1990). All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res*, 18, 3241-3247.

de Vries, A.A.F., Chirnside, E.D., Horzinek, M.C., & Rottier, P.J.M. (1992). Structural proteins of equine arteritis virus. *J. Virol*, 66, 6294-6303.

de Vries, A.A.F., Post, S.M., Raamsman, M.J.B., Horzinek, M.C., & Rottier, P.J.M. (1995). The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers, *J. Virol*, 69, 4668-4674.

Delputte, P.L., Costers, S., & Nauwynck, H.J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparin sulfate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.*, *86*, 1441-1445.

den Boon, J.A., Snijder, E.J., Chirnside, E.D., de Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., & Spaan W.J.M. (1991). Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J. Virol*, *65*, 2910-2920.

Doll, E.R., Bryans, J.T., McCollum, W.H. & Crowe, M. (1957). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Veterinarian*, *47*, 3-41.

Duan, X., Nauwynck, H.J., & Pensaert, M.B. (1997). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.*, *142*, 2483-2497.

Duan, X., Nauwynck, H.J., & Pensaert, M.B. (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, *56*, 9-19.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495-516.

Faaberg, K.S., & Plagemann, P.G.W. (1995). The envelope proteins of lactate dehydrogenaseelevating virus and their membrane topography. *Virology*, *212*, 512-525.

Forsberg, R. (2005). Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol. Biol. Evol.*, *22*, 2131-2134.

French, L.E., & Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*, *10*(1), 117-123.

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, *301*, 5-17.

Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., & Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol. Biol. Evol*, *22*, 1024-1031.

Huo, Y., Fan, L., Yin, S., Dong, Y., Guo, X., Yang, H., & Hu, H. (2013) Involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation. *Virology*, *444*, 233-240.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). *ICTV 9th Report*. Recuperado de https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/220/arteriviridae.

Jayakiran, M. (2015). Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. *Clinical and Experimental Pathology*, *5*,1. doi: 10.4172/2161-0681.1000205.

Koyama, A.H. (1995). Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*, *37*, 285-290.

Koyama, A.H., Fukumori, T., Fujita, M., Irie, H., & Adachi, A. (2000). Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect*, *2*(9), 1111-1117.

Kvansakul, M. (2017). Viral Infection and Apoptosis. *Viruses*, *9*(12), 356.

LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, & R.G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, *27*(48), 6252-6275.

Lee, S.M., & Kleiboeker, S.B. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology*, *365*(2), 419-434.

Li, J., Lee, B., & Lee, A.S. (2006). Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis multiple pathways and activation of p53-upregulated modulator of apoptosis (puma) and noxa by p53. *J Biol Chem*, *281*, 7260-7270.

Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, *94*, 481-490.

Maestre, A.M., Garzon, A., & Rodriguez, D. (2011). Equine Torovirus (BEV) induces caspase-mediated apoptosis in infected cells. *Cells PLoS ONE*, (6), 22972.

Manoussopoulos, I. N., & Tsagris, M. (2015). *Native Electrophoresis and Western Blot Analysis (NEWeB): Methods and Applications. Western Blotting*, 343–353

Metz, G.E., Abeyá, M.M., Serena, M.S., Panei, C.J., & Echeverría, M.G. (2019). Evaluation of apoptosis markers in different cell lines infected with equine arteritis virus. *Biotech Histochem*, *94*(2), 115-125.

Metz, G.E., Galindo, I., Abeyá, M.M., Echeverría, M.G., & Alonso, C. (2016). Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Res*, *213*, 219-223.

Metz, G.E., Serena, M.S., Abeyá, M.M., Dulbecco, A.B., Massone, A., Díaz, S., & Echeverría, M.G. (2014). Equine arteritis virus gP5 protein induces apoptosis in cultured insect cells. *Virus Res*, *183*, 81-84.

Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, *36*, 489-517.

Nauwynck, H.J., Duan, X., Favoreel, H.W., Van Oostveldt, P., & Pensaert, M. B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.*, *80*, 297-305.

Norbury, C.J., & Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *41*, 367-401.

Plagemann, P.G. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg. Infect. Dis.*, *9*, 903-908.

- Plagemann, P.G. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg. Infect. Dis.*, *9*, 903-908.
- Reed, J.C. (1997). Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol*, *34*(4 Suppl 5), 9-19.
- Rossow, K.D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol*, *35*, 1-20.
- Sarkar, S., Chelvarajan, L., Go, Y.Y., Cook, F., Artiushin, S., Mondal, S., Anderson, K., Eberth, J., Timoney, P.J., Kalbfleisch, T.S., Bailey, E., & Balasuriya, U.B. (2016). Equine Arteritis Virus Uses Equine CXCL16 as an Entry Receptor. *J. Virol*, *90*(7), 3366-3384.
- Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv*, *74*(2-3), 281-286.
- Snijder, E.J. & Meulenberg, J.M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen Virol*, *79*, 961-979.
- Snijder, E.J., van Tol, H., Pedersen, K.W., Raamsman, M.J.B., & de Vries, A.A.F. (1999). Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J. Virol*, *73*, 6335-6345.
- St-Louis, M.C., & Archambault, D. (2007). The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology*, *367*, 147-155.
- Thibert, C., & Fombonne, J. (2010). Dependence receptors: mechanisms of an announced death. *Cell Cycle*, *9*(11), 2085-2091.
- Thomson, B.J. (2001). Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*, *82*(2), 65-76.
- Timoney, P.J. & McCollum, W.H. (1993). Equine Viral Arteritis. *Science Direct*, *9*(2), 295-309.
- Timoney, P.J., McCollum, W.H., Roberts, A.W., & Murphy T.W. (1986). Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Research in Veterinary Science*, *41*, 279-280.

van Berlo, M.F., Rottier, P.J.M., Spaan, W.J.M., & Horzinek, M.C. (1986). Equine arteritis virus-induced polypeptide synthesis. *J. Gen. Virol*, *67*, 1543-1549.

Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., & Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Dev*, *10*, 2859-2869.

Wieringa, R., de Vries, A.A.F., van der, Meulen J., Godeke, G., Onderwater, J., van Tol, H., Koerten, H., Mommaas, M., Snijder, E., & Rottier, P.J.M. Structural Protein Requirements in Equine Arteritis Virus Assembly. *J. Virol*, *78*, 13019-13027.

Yin, S., Huo, Y., Dong, Y., Fan, L., Yang, H., Wang, L., Ning, Y., & Hu, H. (2012) Activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced apoptosis but not for virus replication. *Virus Res.*, *166*, 103-108.

Yuan, S., Zhang, N., Xu, L., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., & Yang, H. (2016). Induction of Apoptosis by the Nonstructural Protein 4 and 10 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *PLoS One*, *11*(6), e0156518. doi: 10.1371/journal.pone.0156518.