UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Herpesvirus equino 1: evaluación de la apoptosis en cultivo de células heterólogas y homólogas, y en pulmón de ratones BALB/c, como mecanismo patogénico y de evasión de la respuesta inmune del hospedador.

MV. SCROCHI, Mariela R.

DIRECTORAS: Dra. Galosi, Cecilia M. y Dra. Zanuzzi, Carolina N.

CODIRECTORA: Dra. Muglia, Cecilia I.

Cátedras de Virología e Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. Dolcini, Guillermina.

Dr. Mórtola, Eduardo.

Dr. Ortega, Hugo.

2016

A la memoria de mi abuela Sara.

A mis papás, Eduardo y Mabel.

*Toda semilla para crecer
requiere ser sembrada en suelo fértil,
necesita del agua de lluvia
y de los rayos del sol.
Deberá esperar algo de tiempo para dar a conocer el color y la fragancia de sus flores,
y tendrá que soportar varios días nublados y con fuertes vientos.
A pesar de ello nunca pospondrá ni detendrá su crecimiento,
porque sabe,
que la fortaleza del árbol no se mide por el tamaño de su copa, sino...
por la profundidad de sus raíces.*

MRS (2011)

Gracias...

Quiero dar gracias a quienes colaboraron, ayudaron, formaron parte y permitieron que este trabajo sea posible:

a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET);

al Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD) y al *Institut für Virologie, Freie Universität*, Berlin, Alemania.

Gracias... por ser parte del suelo fértil.

A Cecilia, por su inmenso corazón y gran predisposición para transferir y compartir su conocimiento. Por su apoyo e interés en todo momento. Por su paciencia y confianza, gracias es poco...

A Carolina, por su enorme dedicación y responsabilidad, por su gran interés y predisposición. Por su gran apoyo y confianza.

A Ceci Muglia, por siempre brindarme una segunda alternativa para realizar los experimentos, por su buena predisposición y voluntad.

A Claudio por su continuo apoyo y generosidad, por confiar en mí.

A Matías por obrar como “piedra fundamental” en la propuesta de este tema de trabajo.

A mis compañeros de grupo y trabajo, Nadi, Mumi y Ale, por su generosa, continua e importante ayuda. Por las charlas, las risas, la confianza, el compañerismo y la amistad diaria.

A Eduardo Gimeno y Enrique Portiansky, por su colaboración y su apoyo.

A Fabián Nishida, por sus desinteresados e importantes aportes y su colaboración en el análisis estadístico de los datos.

A Gustavo Zapata por su colaboración en la obtención de las muestras para cultivo primario.

A María Emilia Pacheco y Liliana Bruzzzone de la Facultad de Ciencias Exactas -UNLP- por la ayuda en la lectura con el espectrofotómetro.

A todos mis compañeros de virología (Javi, Mer, Sole, Ger, Lau, Gaby, Lean, Hernán, Marco, Marcelo, Adri, Fito, Cande, Hernán, Vivi, Alejandra, Rocío y Pancho) por su ayuda y colaboración constante, por lograr que el trabajo sea un ambiente agradable y comfortable... por hacer de las risas... una rutina diaria.

A Armando Damiani, por su buena predisposición y colaboración. Por darme la oportunidad de una excelente experiencia para ampliar mi formación.

A Walid Azab y Alex Proft, por integrarme como par, y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A Mónica y Mariana, por la compañía compartida durante las horas de docencia, y por la ayuda y contención en momentos importantes.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme el conocimiento, la experiencia y la dedicación necesaria para mi continua formación como docente universitario.

Quiero agradecer al Colo y a Fiorella, porque a pesar de que no trabajamos juntos para éste trabajo de tesis, la inmensa y desinteresada nobleza al transmitirme sus conocimientos y estar en mis primeros pasos me ayudaron muchísimo.... Por su apoyo, su confianza y su constante buena energía.

Gracias.... a todos ellos, por ser parte de los nutrientes esenciales que me permitieron y me siguen permitiendo crecer.

A mis amigos Gise, Carla, Juli, Juanchi y Naidi. Paula. Checho, Eleana y Rocío. Inesita y Nicolás, por su ayuda mutua y desinteresada. A todos ellos, por ser cómplices y compañeros de aventuras, por el tiempo compartido juntos; por hacerme saber, que aunque el bosque sea grande... no estamos solos.

A Matías, por su noble y sincera compañía.

A mis sobrinos, Florencia, Martín y Carola, por ser los rayitos de sol que toda semilla necesita para crecer.

A mis hermanos, Jose y Carina.

A mis papás, por formar parte esencial de mis raíces, por ser mi lugar seguro en el mundo. Por su humilde y sincero corazón.

A todos y cada uno...

Gracias...

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES CON REFERATO

TRABAJOS COMPLETOS

Protective effects of intranasal immunization with recombinant glycoprotein D in pregnant BALB/c mice challenged with different Equine herpesvirus 1 strains. Fuentealba NA, Zanuzzi CN, **Scrochi MR**, Sguazza GH, Bravi ME, Cid de la Paz V, Corva SG, Portiansky EL, Gimeno EJ, Barbeito CG, Galosi CM. *J Comparative Pathol* 151: 384-393, 2014. Con referato (ISSN: 0021-9975) IF: 1,647

Production of equine herpesvirus 1 recombinant glycoprotein D and development of an agar gel immunodiffusion test for serological diagnosis. Fuentealba NA, Sguazza GH, **Scrochi MR**, Bravi ME, Zanuzzi CN, Corva SG, Gimeno EJ, Pecoraro MR, Galosi CM. *Journal of Virological Methods* 202: 12-14, 2014. Con referato (ISSN: 0166-0934) IF: 2,011

Modelos experimentales para el estudio de la patogenia de la muerte embrionaria en tritricomonosis bovina y herpesvirosis equina.

Galosi CM, Monteavaro C, Woudwyk MA, Zanuzzi CN, Portiansky EL, Fuentealba NA, **Scrochi MR**, Nishida F, Bravi ME, Eöry ML, Martin Ocampos GP, Cid de la Paz V, Barbeito CG, Gimeno EJ. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. LXVI, 239-332, 2013. Recopilación y actualización. Con referato (ISSN 0327-8093)

Interferencia del *Herpesvirus equino 1* (EHV-1) en la apoptosis inducida. (Scrochi MR, Zanuzzi CN: Premio estímulo a las vocaciones científicas 2013 (FVet UBA).

Scrochi MR, Zanuzzi CN, Muglia CI, Fuentealba NA, Nishida F, Gimeno EJ, Barbeito CG, Portiansky EL, Galosi CM. *Revista InVet*, en línea en la página web de la Facultad Cs. Veterinarias UBA, Volumen 15 N° 1-2, 2013; y en versión impresa Volumen 15 N° 1-2, 2013. Con referato (ISSN 1514-6634).

Effects of Equid herpesvirus 1 (EHV-1) AR8 and HH1 strains on BALB-c mice.

Zanuzzi CN, **Scrochi MR**, Fuentealba NA, Nishida F, Portiansky EL, Muglia C, Gimeno EJ, Barbeito CG, Galosi CM. *Archives of Virology*, 159(1):141-5, 2014 Con referato (ISSN: 0304-8608) IF: 2,111

RESÚMENES

Pathogenic and immunological study of Equine Herpesvirus 1 infection (EHV-1). New insights in prophylactic strategies.

Scrochi MR; Bravi ME; Fuentealba NA; Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Gimeno EJ; Portiansky EL, Barbeito CG; Muglia CI; Zanuzzi, CN; Galosi CG. *Virus Reviews and Research*. Vol 20. Suppl. 1. 219. 2015. Con referato ISSN 519 - 2563.

Modulation of apoptosis in equine herpesvirus-1 infected cells.

Scrochi MR, Zanuzzi CN, Fuentealba NA, Bravi ME, Gimeno EJ, Barbeito CG, Portiansky EL, Muglia CI, Galosi CM. *BIOCELL* 38 (Suppl. 2), A 67. 2014. Con referato ISSN 1667 - 5746 (Pub Med-Indexed for MEDLINE) Índice de Impacto 2013: 0,730

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Pathogenic and immunological study of Equine Herpesvirus 1 infection (EHV-1). New insights in prophylactic strategies.

Scrochi MR; Bravi ME; Fuentealba NA; Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Gimeno EJ; Portiansky EL, Barbeito CG; Muglia CI; Zanuzzi, CN; Galosi CG. XXVI Congresso Brasileiro de Virologia. X Encontro de Virologia do Mercosul. Florianópolis. Brasil. 11 al 14 de octubre de 2015. Póster.

Estudios patogénicos-moleculares asociados a la infección por Herpesvirus equino 1.

Bravi, ME; **Scrochi, MR**; Galosi, CM; Barbeito, CG; Cid de la Paz, V; Corva, SG; Fuentealba, NA; Gimeno, EJ; Muglia, CI; Nishida, F; Portiansky, EL; Sguazza, GH; Zanutzi, CN. XXIII Jornada de Jóvenes Investigadores. Grupo Montevideo. Universidad Nacional de La Plata. 25 al 27 de agosto de 2015. Póster.

El Herpesvirus equino 1 interfiere con la apoptosis en células infectadas.

Scrochi, MR; Bravi, ME; Fuentealba, NA; Gimeno, EJ; Portiansky, EL; Barbeito, CG; Zanutzi, CN; Muglia, CI; Galosi, CM. XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica, II Simposio de Virología Veterinaria “Dr. José L. La Torre”. Buenos Aires. 23 al 26 de junio de 2015. Póster.

Modulación de la apoptosis en cultivos celulares heterólogos y homólogos infectados con *Herpesvirus equino 1*.

Scrochi, MR; Bravi, ME; Nishida, F; Fuentealba, NA; Gimeno, EJ; Portiansky, EL; Barbeito, CG; Muglia, CI; Zanutzi, CN; Galosi, CM. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Santa Fe. 4 y 5 de diciembre de 2014. Póster.

***Herpesvirus equino 1*: evaluación de la apoptosis en cultivo de células heterólogas y homólogas, y en pulmón de ratones BALB/c, como mecanismo patogénico y de evasión de la respuesta inmune del hospedador.**

Scrochi MR. Jornada de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 28 de noviembre de 2014. Oral.

Evaluación de la interferencia en la muerte por apoptosis en células de cultivo infectadas con *Herpesvirus equino 1*.

MR Scrochi, CN Zanutzi, NA Fuentealba, ME Bravi, EJ Gimeno, CG Barbeito, EL Portiansky, CI Muglia CM Galosi CM. XV Jornada Anual de la Sociedad Argentina de

Biología (SAB) “A 60 años de la descripción de la estructura del ADN”. 4 – 6 de diciembre de 2013. Chascomús, Buenos Aires. Póster.

Evaluación de la modulación del Herpesvirus equino 1 en la muerte por apoptosis sobre cultivos celulares.

Scrochi MR, Zanuzzi CN, Fuentealba NA, Bravi ME, Gimeno EJ, Barbeito CG, Portiansky EL, Muglia CI, Galosi CM. XXXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV). 2 y 3 de diciembre de 2013. Oral.

Evaluación del clivaje de la citoqueratina 18 presente en células de cultivo infectadas con *Herpesvirus equino 1 (EHV-1)* e inducidas a la muerte por apoptosis.

MR Scrochi, CN Zanuzzi, NA Fuentealba, CI Muglia, EJ Gimeno, CG Barbeito, EL Portiansky, CM Galosi CM. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV). 4 – 7 de diciembre de 2012. Córdoba. Oral.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos.....	XIII
Palabras clave.....	1
Resumen.....	1
<i>Key words</i>	3
<i>Summary</i>	3
Introducción.....	5
Familia Herpesviridae - Generalidades.....	5
Herpesvirus equinos.....	16
Herpesvirus equino 1.....	17
Propiedades específicas de la estructura viral.....	17
Patogénesis viral.....	19
Signos clínicos – Patología.....	23
Epizootiología.....	30
Respuesta inmune.....	33
Diagnóstico.....	35
Prevención y control.....	38
Situación en Argentina.....	39
Modelo experimental para el estudio de EHV-1.....	40
Apoptosis - Generalidades.....	42
Muerte celular por apoptosis.....	47

Cambios morfológicos.....	47
Cambios bioquímicos.....	49
Vía extrínseca.....	54
Vía intrínseca.....	58
Activación de caspasas ejecutoras.....	63
Apoptosis independiente de caspasas.....	65
Modulación de la apoptosis por Herpesvirus.....	66
Hipótesis.....	75
Objetivo general.....	76
Objetivos particulares.....	76
Capítulo 1- Experiencias <i>in vitro</i>	77
Parte A - Estandarización del modelo <i>in vitro</i>	77
Materiales y métodos.....	78
Resultados.....	84
Discusión.....	91
Parte B - Detección de apoptosis en células heterólogas y homólogas infectadas...	94
Materiales y métodos.....	95
Resultados.....	110
Discusión.....	132
Capítulo 2 - Experiencias <i>in vivo</i>	142
Materiales y métodos.....	143
Resultados.....	149

Discusión.....156

Conclusiones generales.....160

Bibliografía.....161

Anexos.....181

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: grado centígrado

μl: microlitro

μg: microgramo

<: menor que

ABTS: azinodietilbenzotiazol-sulfonato

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxiribonucleico

Ag: antígeno

BoHV: Herpesvirus bovino

bp: pares de bases

BSA: seroalbúmina bovina

CapHV: Herpesvirus caprino

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

CO₂: dióxido de carbono

DAB: diaminobencidina

DICC₅₀: dosis infectante cultivo de células 50%

ECP: efecto citopatogénico

ED: células dermis equina

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EHV: herpesvirus equino

Genes IE: genes inmediatamente tempranos

Genes E: genes tempranos

Genes L: genes tardios

gp: glicoproteína

h: horas

HE: hematoxilina y eosina

HSV: Virus herpes simplex

ICTV: Comité internacional de Taxonomía de Virus

IHQ: inmunohistoquímica

IN: intranasal

kb: kilo pares de bases

KDa: kilodaltons

M: molar

MDBK: *Madin Darby Bovine Kidney cells*

MEM: medio esencial mínimo

MEM-C: MEM de crecimiento

MEM-M: MEM de mantenimiento

mg: miligramo

min: minutos

ml: mililitro

MOI: multiplicidad de infección

ORF: marco de lectura abierto

PAGE: geles de poliacrilamida

PBS: solución *buffer* de fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pi: postinfección

PM: peso molecular

pt: postratamiento

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNE: rinoneumonitis equina

RK13: *rabbit kidney cells*

SDS: dodecil sulfato de sodio

seg: segundos

SFB: suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SuHV: Herpesvirus suino

Ta: temperatura ambiente

TE: tris EDTA

Temed: N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina

UL: región única larga

US: región única corta

V: voltios

Vero: *African Green Monkey Kidney cells*

Herpesvirus equino 1: evaluación de la apoptosis en cultivo de células heterólogas y homólogas, y en pulmón de ratones BALB/c, como mecanismo patogénico y de evasión de la respuesta inmune del hospedador.

PALABRAS CLAVE

Herpesvirus equino 1, apoptosis, células ED, células MDBK, pulmones.

RESUMEN

El herpesvirus equino 1 (EHV-1) es uno de los patógenos más importantes de los equinos, debido a que puede causar signología respiratoria, nerviosa y abortos. En los potrillos el virus puede además desencadenar síndrome neonatal y provocar su muerte en las primeras 48 horas de vida. El EHV-1 posee un ciclo de replicación de 18 ~ 20 horas en células epiteliales. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada mediante la cual la célula activa enzimas que desencadenan cambios bioquímicos y morfológicos conduciendo a su muerte. Los virus pueden interferir o desencadenar apresuradamente la apoptosis en las células que infectan con diferentes propósitos. Muchos herpesvirus modulan la apoptosis de las células infectadas para asegurar su supervivencia y la propagación de su progenie. Con el objeto de conocer si el EHV-1 interfiere con la apoptosis de las células infectadas, se

evaluó su efecto en cultivos de células heterólogas y homólogas infectadas a las 3, 9 y 18 h posinfección (pi) de su ciclo de replicación, y posteriormente, se estudió la apoptosis en pulmones de ratones BALB/c a las 24, 48, 72 y 96 h pi. Se aplicaron técnicas que evidenciaron cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis y se compararon los resultados con controles negativos y positivos (éstos últimos inducidos a la apoptosis con sorbitol). Los resultados de los ensayos *in vitro* permiten inferir que el EHV-1 interfiere en la muerte por apoptosis de las células infectadas hacia la mitad de su ciclo de replicación. Los resultados obtenidos *in vivo* no presentaron diferencias significativas entre los animales control e infectados. Sin embargo, con los datos obtenidos y teniendo en cuenta la variabilidad de la cinética celular del órgano, la apoptosis podría estar actuando como un mecanismo para facilitar la propagación del virus a través de células fagocíticas.

Equine herpesvirus 1: evaluation of apoptosis in heterologous and homologous cell lines, and in lungs of BALB/c mice, as a pathogenic and avoidance mechanism of the host immune response

KEY WORDS

Equid herpesvirus, apoptosis, ED cells, MDBK cells, lungs.

SUMMARY

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) is one of the major worldwide causes of epidemic abortion, perinatal mortality, respiratory disease and neurological disorders in horses. The virus can also cause neonatal syndrome and the death of infected foals within the first 48 hours of life. EHV-1 has a replication cycle of 18 ~ 20 hours in epithelial cells. The infection can turn latent and be reactivated under stressful situations. Apoptosis is a type of programmed cell death in response to internal or external stimuli that induces the activation of enzymes and changes that lead to cell death. Viruses can trigger or interfere with the apoptosis with different purposes. Many herpesviruses modulate apoptosis of infected cells to ensure their survival or spreading of their progeny. In order to determine whether the EHV-1 interferes with apoptosis of infected cells, its effect on heterologous or homologous cell lines at 3, 9 and 18 h postinfection (pi) was evaluated. The apoptosis was also studied in lungs of

BALB / c mice at 24, 48, 72 and 96 h pi. The morphological changes and biochemical characteristics of apoptosis were compared in negative and positive controls. The results of in vitro tests suggest that the EHV-1 interferes with apoptosis of infected cells in the middle of its replication cycle. No significant differences were found between control and infected animals. However, taking into account that there is great cellular variability in the organ, apoptosis may be acting as a mechanism to facilitate the spreading of the virus through phagocytic cells.

INTRODUCCIÓN

FAMILIA *HERPESVIRIDAE*

GENERALIDADES

El orden *Herpesvirales* está integrado por tres familias que agrupan a varias especies virales que han sido bien caracterizadas (ICTV, <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). La familia *Alloherpesviridae* incluye a virus de peces y ranas, la familia *Malacoherpesviridae* contiene virus que infectan a algunos moluscos y la familia *Herpesviridae* es la que se encuentra más ampliamente distribuida en la naturaleza e incluye virus que parasitan a un rango de especies mucho más amplio (Fauquet y col., 2005).

Todos los miembros de la familia *Herpesviridae* poseen similar estructura y tienen la capacidad de producir infecciones latentes en los huéspedes. De acuerdo a sus propiedades biológicas y sitio de latencia, se clasifican en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, cada una con sus respectivos géneros (Davison y col., 2009).

A continuación se describen las principales características de la familia *Herpesviridae*, teniendo en cuenta la clasificación en subfamilias y los géneros que las integran.

Subfamilia *Alphaherpesvirinae*: se caracteriza por presentar un amplio rango de hospedadores, un ciclo de replicación relativamente corto, una rápida diseminación en cultivo de tejidos con alta eficiencia en la destrucción de células infectadas (efecto citopatogénico -ECP- lítico) y la capacidad de establecer latencia

Estructura y propiedades de los herpesvirus

Los herpesvirus poseen una única molécula lineal de ADN de doble cadena, de tamaño variable entre 124 y 235 kilobases (kb), que se encuentra enrollada alrededor de una estructura proteica toroidal. El genoma codifica para 30-35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada. Este genoma posee secuencias repetidas internas y terminales que hacen variar su tamaño en hasta 10 kb. El estudio de organización del mismo otorga un criterio de clasificación diferente de los herpesvirus, el cual es ejemplificado en la figura 1.

Figura 1. Esquema de la organización genómica de los seis grupos establecidos para los miembros de la familia *Herpesviridae*. Las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas, largas (UL) o cortas (US). Las regiones repetitivas están representadas por rectángulos y barras verticales (||||). Las líneas oblicuas (↗) indican la orientación de las secuencias. En el grupo “A” las regiones repetitivas se designan repeticiones terminales izquierda (LTR) y derecha (RTR). En el grupo “B”, las secuencias terminales están reiteradas en varias ocasiones en ambos extremos y el número de repeticiones puede ser diferente en cada extremo. Para el grupo “C”, R1 a R4 indican repeticiones internas. En el grupo “D” se diferencian las repeticiones internas (IR) de las terminales (TR). El genoma del grupo “E” consiste en dos regiones: 1) UL limitada por “n” copias de la secuencia “a” (a_n) próxima a la secuencia denominada “b”, y por una secuencia repetida “a’_n” próxima a la secuencia denominada “c’”; y 2) UL flanqueada por “a’_nc’” y “ca”. Las terminaciones del grupo “F” no han sido descriptas. (Modificado a partir de Roizman y col., 1992).

La cápside es de simetría icosaédrica y está constituida por 162 capsómeros, de los cuales 150 son hexámeros y 12 (ubicados en los vértices) son pentámeros. Los viriones son envueltos y la envoltura es de naturaleza lipoproteica, trilaminar, con proyecciones glicoproteicas denominadas espículas o peplómeros. Entre la nucleocápside y la envoltura se encuentra el tegumento, compuesto por lipoproteínas, glicoproteínas (gp) y proteínas con actividad enzimática. Las gp virales juegan un rol importante en la replicación, durante el proceso de adsorción y penetración a la célula huésped, y son determinantes críticos del tropismo celular, de la propagación del virus de una célula a otra, de la patogénesis y de la inducción de la respuesta inmune humoral. El tamaño del tegumento y la pleomorficidad de la envoltura hacen que los herpesvirus posean un diámetro variable, de entre 150 y 300 nanómetros (nm). Debido a la presencia de envoltura, estos virus son sensibles a los solventes lipídicos, detergentes, y desinfectantes comunes, así como al calor y a las condiciones ambientales (Roizman y col., 1992).

La figura 2 sintetiza la estructura general de un herpesvirus.

Figura 2. Estructura del virión de un herpesvirus. La imagen de microscopía electrónica modificada (derecha) refleja las estructuras señaladas en el gráfico del lado izquierdo: la cápside de simetría icosaédrica (violeta), el tegumento representado en color verde y, las proteínas y glicoproteínas de la envoltura dibujadas como proyecciones. (Modificado a partir de Pomeranz y col., 2005)

Ciclo de replicación de los herpesvirus

El ciclo de replicación de los herpesvirus es similar en todos los miembros de la familia y sólo se observan diferencias en cuanto a la duración del mismo, que varía entre 18 a 96 horas (h) de acuerdo a la subfamilia a la que pertenezcan (Watson, 1973). En términos generales se describen diferentes etapas: adsorción, penetración, decapsidación, transcripción, replicación, ensamble, maduración y liberación. A continuación se explican brevemente éstas etapas, tomando como base lo conocido para el Herpesvirus HSV-1 (Roizman y col., 1985).

En la **adsorción** se produce la unión del virus a la célula a través de la interacción de las gp virales con receptores específicos de la membrana plasmática de la célula huésped. En la mayoría de los alphaherpesvirus esta etapa ocurre en tres fases: 1) se produce la unión lábil entre las gp virales y los glicosaminoglicanos

de las membranas celulares (Shukla y col., 2000); 2) algunas gp de la envoltura viral se unen al heparán sulfato de la matriz extracelular (Spear y col., 2003); finalmente se produce 3) la unión al receptor propiamente dicho (en muchos casos estos receptores son nectinas de la membrana plasmática de la célula infectada) (Flint y col., 2004).

En la **penetración** el virus ingresa a la célula, generalmente por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, aunque también puede hacerlo por endocitosis seguida por la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma. Ya sea por fusión o por endocitosis, las proteínas del tegumento y de la nucleocápside viral son posteriormente liberadas al citosol.

En la etapa de **decapsidación** se produce la liberación del ADN viral en el núcleo. El mecanismo de transporte de la nucleocápside hacia el núcleo celular es un proceso que aún no se conoce completamente. Se sabe que la proteína del tegumento asociada a la cápside (UL34 del HSV) se une a la dineína de los microtúbulos y cataliza el desplazamiento hacia el núcleo (Ye y col., 2000). El ingreso del ADN viral al núcleo ocurre por los poros nucleares y, una vez en su interior, el ADN se circulariza sin necesidad de la expresión de proteínas virales (Garber y col., 1993; Carter y Saunder, 2007).

La transcripción del ADN viral ocurre en el núcleo por acción de la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora. La expresión de los genes está regulada por un sistema de “*on-off*” que activa e interrumpe la lectura secuencial de los genes. De esta manera, se pueden distinguir tres grupos de genes dependiendo del momento de la infección en que se expresan: los genes α o genes inmediatos tempranos (*immediate early* -IE-), los genes β o genes tempranos (*early* -E-) y los

genes γ o genes tardíos (*late* -L-). A partir del momento en el que el ADN viral ingresa al núcleo, algunas proteínas del tegumento interactúan con el sistema transcripcional de la célula para estimular la transcripción de los genes α que a su vez activarán la expresión de los genes β y γ . Las proteínas codificadas por los genes β presentan su pico máximo de expresión entre las 4 y 8 h posinfección (pi) y están implicadas en el metabolismo de los nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. Las proteínas estructurales codificadas por los genes γ (entre los cuales tenemos a los γ 1 -tardíos precoces- y γ 2 -tardíos propiamente dichos-) se producen en gran cantidad en el citosol y en el retículo endoplásmico. Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las cápsides de la progenie viral. Los genes γ codifican para gp virales esenciales para lograr una infección productiva en tejidos, ya que están involucradas en la entrada de las partículas virales a las células, como así también para otras gp consideradas no esenciales (Davison y col., 2009).

La **replicación** del ADN está a cargo de una ADN polimerasa específica codificada por el virus. En un comienzo es de tipo θ pero luego cambia a un tipo de replicación ϕ (también conocida como círculo rodante), a partir de la cual se forman largas cadenas de concatémeros de ADN viral, el cual es clivado en sitios de señal de empaquetamiento e integrado en la nucleocápside madura.

Durante el **ensamble** una copia única de ADN viral ingresa a la cápside por el canal portal que se cree está formado por la proteína codificada por el gen denominado UL6. Esta nucleocápside se asocia a la cara interna de la envoltura nuclear alterada por la replicación viral, en esa localización adquiere el tegumento y la envoltura para poder ser liberada como una partícula viral completa. Los

mecanismos exactos de cómo sucede este proceso no se conocen en su totalidad, pero las evidencias hasta el momento indican que los pasos serían los siguientes: a) la nucleocápside obtendría una envoltura transitoria en su paso a través de la membrana nuclear interna; b) esta envoltura se fusionaría con la membrana nuclear externa y se liberaría la nucleocápside al citoplasma (Figura 3A); c) en el citoplasma la nucleocápside se uniría con las proteínas del tegumento (ahora reconocido como una estructura ordenada bastante regular con una porción interna y una externa) y penetraría en una vesícula proveniente del complejo de Golgi (Figura 3B). En esta **maduración** la partícula viral obtendría su envoltura definitiva contando con todas las gp virales, y quedaría encerrada en una vesícula (Figura 3C). Según este mecanismo, las gp sólo serían expresadas en la membrana de vesículas internas a la célula. Sin embargo, se sabe también que las gp son transportadas a la membrana plasmática de la célula, donde intervienen en distintos procesos como la fusión de células y la consecuente formación de sincitios, así como también en la propagación de la infección de célula a célula.

Por último, la vesícula con el virión se fusiona con la membrana plasmática y se produce la **liberación** al medio extracelular por exocitosis o citólisis de la célula (Figura 3D) (Granzow y col., 2001). La figura 4 esquematiza el proceso de replicación de los herpesvirus.

Figura 3. Mecanismo de liberación de la partícula viral. La imagen **A** muestra a una partícula atravesando la membrana nuclear interna. Una nucleocápside con su tegumento está siendo envuelta por una vesícula proveniente del Golgi (imagen **B**) para posteriormente pasar a observarse completamente envuelta (imagen **C**). En la imagen **D** se observan viriones abandonando el citoplasma. (Modificado a partir de Carter y col., 2007)

Figura 4. Ciclo de replicación de un Herpesvirus: (1) Adsorción (2) Penetración (3) Transcripción (4) Traducción de proteínas inmediatamente tempranas – IE-, tempranas – E- y tardías – L- (5) Replicación (6) Ensamblaje (7) Liberación. (Modificado de *Virology Principles and Applications*, Carter J y Saunders V. 2007)

HERPESVIRUS EQUINOS

Actualmente se han identificado varios herpesvirus que infectan a los miembros de la *Familia Equidae*: seis de ellos son alfaherpesvirus y tres son gamaherpesvirus. Dentro de los alfaherpesvirus se encuentran los *Herpesvirus equino* 1 (EHV-1), 3 (EHV-3), 4 (EHV-4), 8 (EHV-8) y 9 (EHV-9). Todos, a excepción del EHV-3 (virus del exantema coital equino) son patógenos respiratorios. Entre los gamaherpesvirus se hallan el EHV-2, el EHV-5 y el EHV-7. Otros virus relacionados al EHV-1 fueron aislados a partir de un feto abortado de un onagro (*Equus hemionus onager*) y de una cebra (*Equus grevyi*) (Patel y Hendens, 2005; Davison y col., 2009; ICTV).

Sobre la base de la estrecha relación genética y antigénica entre EHV-1 y los alfaherpesvirus aislados a partir de burros, cebras y asnos salvajes, y debido al potencial patogénico de EHV-1, se supone que este virus fue adquirido por el antepasado del caballo moderno y que, evolutivamente, en la transmisión reciente a otras especies, todavía no ha alcanzado el equilibrio patogénico completo con sus nuevos huéspedes (Crabb y Studert, 1990).

El EHV-2 está asociado experimentalmente con rinitis y conjuntivitis, aunque también se demostró su participación en el aborto equino (Galosi y col., 2005). Sin embargo, a pesar de ser altamente prevalentes a nivel mundial, EHV-2 y EHV-3 son considerados de menor importancia económica en veterinaria comparados con EHV-1 y EHV-4. Por otra parte, los datos de prevalencia para EHV-5 son escasos (Patel y Heldens, 2005).

HERPESVIRUS EQUINO 1

El EHV-1 es un virus mundialmente distribuido. La prevalencia varía, según los diferentes países, entre 30 y hasta 90 % (Walter y col., 2013). La infección por este virus produce importantes pérdidas económicas en la industria equina. Este impacto negativo se debe generalmente a su propiedad de producir abortos y muertes neonatales, enfermedad respiratoria (rinoneumonitis equina [RNE]) y desórdenes neurológicos.

Al igual que todos los miembros de la Familia *Herpesviridae*, el EHV-1 es filogenéticamente antiguo y, durante su prolongada co-evolución con el caballo, ha garantizado su supervivencia (Allen y col., 2004).

PROPIEDADES ESPECÍFICAS DE LA ESTRUCTURA VIRAL

Estructura genómica

Como todos los herpesvirus, el EHV-1 posee una molécula de ADN lineal de doble cadena, de 150,2 kb y 56,7% de G+C. El PM es de $9,2 \times 10^7$ Da (Roizman y col., 1992; Allen y col., 2004). Pueden generarse dos tipos isoméricos de ADN por la inversión del fragmento US respecto al UL. La secuenciación genómica realizada por Telford y col. (1992) demostró que los marcos abiertos de lectura (ORF) están organizados de manera compacta en ambas cadenas, sin solapamiento extensivo y con las regiones terminales cerca de los sitios candidatos a poliadenilación, o, están transcritos como miembros de familias 3' co-terminales. Posee 76 ORFs, y los productos de estos genes se agrupan dentro de cuatro categorías: 1) polipéptidos estructurales de la nucleocápside y del tegumento, 2) gps de transmembrana asociadas con la envoltura viral, 3) proteínas transactivadoras y reguladoras de la

transcripción, y 4) proteínas necesarias para la replicación viral, el ensamblaje, la morfogénesis y el egreso de los viriones de la célula huésped.

Proteínas virales

El genoma del virus codifica alrededor de 30 proteínas, de las cuales 6 (ORFs 22, 25, 3. 42, 43 y 56) forman la estructura del core y la nucleocápside, y otras 12 (ORFs 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 40, 46, 49, 51 y 76) se encuentran formando parte del tegumento. Constituyendo la envoltura viral hay al menos 12 proteínas glicosiladas, entre las cuales las más abundantes son: a) la proteína mayor de la cápside (ORF 42), b) la proteína del tegumento codificada por el ORF 13 (g10) y c) cinco gp denominadas gpB, gpC, gpD, gpM y gp300. Estas gp de la envoltura juegan un rol fundamental en la replicación (más precisamente en la entrada y penetración del virus a la célula huésped), son determinantes críticos del tropismo, la propagación del virus de célula a célula, la patogénesis y la inducción de la respuesta inmune. Se ha demostrado que son importantes inmunógenos y sirven de blanco en la neutralización por anticuerpos (Ac), siendo la gpB, gpC y gpD los antígenos (Ag) más inmunodominantes (Allen y Bryans, 1986; Molinkova y col., 2008).

Las gpB, gpD, gpH, gpL y gpK son esenciales para la replicación del virus mientras que las gpC, gpE, gpG, gpI, gpM y gp300 son clasificadas como no esenciales. Sin embargo, la delección experimental de los genes que codifican para estas gp reduce la virulencia de las cepas (Matsumura y col., 1996; 1998; Csellner y col., 2000).

Dentro de las células infectadas por EHV-1 se identificaron otras proteínas con función regulatoria (transactivadoras, reguladoras de la transcripción), enzimas replicativas (ADN polimerasa, ribonucleótido reductasa, helicasa-primasa, timidina quinasa) y proteínas con acción en la morfogénesis y egreso del virión de la célula huésped (Mc Geoch y col., 1993; 2006).

PATOGÉNESIS VIRAL

El virus ingresa a través de la mucosa de las vías respiratorias altas luego de producirse el contagio por inhalación de partículas virales, o por contacto con placentas o fetos abortados que contienen altas cantidades de partículas virales, o con fomites infectados (Dunowska, 2014). Luego de producirse el contacto con aerosoles también se puede infectar el epitelio conjuntival. El mecanismo y demás factores involucrados en el ingreso a la célula permanecen aún sin conocerse completamente; sin embargo, se han considerado a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-1) e integrinas, como receptores para EHV-1 (Dunowska, 2014). Desde las 12 h pi, en las células epiteliales de la nasofaringe, tráquea y bronquios se detecta el EHV-1 por inmunohistoquímica (IHQ) y por aislamiento viral. Rápidamente, el virus atraviesa el epitelio respiratorio y se propaga por células dendríticas, presentadoras de antígeno de la lámina propia, en las primeras 24 h pi pueden detectarse células blancas mononucleares infectadas en los linfonódulos del tracto respiratorio. Dentro de este tejido se produce una nueva multiplicación viral y el drenaje de leucocitos infectados a la circulación, iniciándose de esta manera la viremia asociada a células (van der Meulen y col., 2006). De esta manera el virus llega a los sitios de replicación terciaria, tales como el endotelio

vascular del útero y del sistema nervioso central (SNC). La infección de leucocitos y células epiteliales en el pulmón puede observarse desde el día 3 hasta el día 13 pi (Kydd y col., 1994). El virus generalmente es eliminado del tracto respiratorio dentro de las tres semanas de la infección primaria y, entre una y dos semanas, cuando se trata de reinfecciones (Gibson y col., 1992). En el estadio inicial de la infección nasal y conjuntival el virus accede a través de las terminaciones nerviosas y llega a las neuronas del ganglio trigémino a las 48 h pi aproximadamente (Slater y col., 1994) (Figura 5). El daño local de la mucosa respiratoria predispone a infecciones respiratorias por otros agentes infecciosos.

El EHV-1 se aísla de exudados de tracto respiratorio durante 10-12 días luego de iniciados los signos clínicos, aunque en equinos con enfermedad subclínica el virus es recuperado durante un período de tiempo más corto, sin embargo, a partir del 4to-5to día pi también puede ser recuperado de leucocitos circulantes. Se elimina a través de los exudados nasales, saliva y posiblemente también por heces durante el período de infección aguda, siendo además abundante en los fetos abortados, y en líquidos y membranas fetales (Allen y Bryans, 1986). La figura 5 resume la patogenia del EHV-1.

Figura 5. Esquema que ilustra la ruta patogénica del Herpesvirus equino 1 desde el epitelio respiratorio, su llegada al útero preñado y/o al sistema nervioso central (SNC) y a su sitio de latencia (ganglio trigémino). (Modificado a partir de Allen y col., 2004)

Las secuelas más importantes de la infección por EHV-1 son el aborto y el síndrome neurológico, y para que éstos se produzcan, debe existir la viremia asociada a leucocitos que permite la diseminación del virus desde el aparato respiratorio. La patogenicidad de EHV-1 depende de su habilidad para establecer viremia asociada a células blanco, principalmente a linfocitos T CD5+/CD8+, sin

embargo, raramente se detecta virus libre en sangre. Las cepas de EHV-1 se diferencian en cepas de alta y baja virulencia según su endoteliotropismo. Las cepas de alta virulencia son capaces de establecer viremia de mayor magnitud que aquellas de baja virulencia (Dunowska, 2014). En inoculaciones experimentales, la viremia comienza desde el 3er día pi y puede persistir hasta 22 días. El intervalo entre la aparición de la viremia y el aborto puede variar entre 6 y 81 días, aunque no siempre el aborto sigue necesariamente a la viremia (Smith y col., 1998). En el caso de las cepas de alta virulencia, la infección de las células endoteliales en el útero preñado causa vasculitis que afecta principalmente a las arteriolas del endometrio en la base de los microcotiledones. Cuando estas lesiones son extensas, se observan vasculitis multifocal y microtrombosis que llevan a una isquemia generalizada. En este caso se puede producir el aborto antes de que el virus llegue al feto y sea detectado en tejidos fetales. En el caso de las cepas de menor virulencia o de menor endoteliotropismo, las lesiones son de menor magnitud, el aborto no es rápido y el virus alcanza a atravesar la barrera placentaria produciendo el aborto de un feto infectado que se detecta positivo por técnicas virológicas convencionales. También se ha observado que con cepas menos virulentas no se detectan Ag virales en útero y placenta, hecho que sugiere que el virus podría cruzar la placenta y llegar al feto dentro de los glóbulos blancos (Edington y col., 1991; Smith y col., 1992; 1993; 1996).

Cuando el virus llega al SNC también se produce vasculitis, con o sin hemorragias locales, y necrosis trombo-isquémica en cerebro y médula espinal. El EHV-1 fue aislado en pocas oportunidades del SNC de animales con signos clínicos, pero pudo demostrarse la presencia de Ag virales por IHQ. Los signos nerviosos

asociados a la infección por EHV-1 son el resultado de las lesiones isquémicas en el tejido nervioso. No existen pruebas suficientes que demuestren la replicación de virus en neuronas, como sí lo hacen algunos herpesvirus neurotrópicos en otras especies animales, y por eso, muchos autores sugieren que los signos clínicos aparecen como resultado de procesos tromboisquémicos causados por la respuesta inflamatoria que se produce frente a la infección de los endotelios vasculares del SNC (Wilson, 1997; Allen y col., 1998; 2004).

SIGNOS CLÍNICOS - PATOLOGÍA

Enfermedad respiratoria

El período de incubación es generalmente de 1-3 días, aunque en algunos casos puede extenderse hasta 10 días. Estas diferencias podrían deberse a la virulencia de la cepa actuante y al estado inmunológico del huésped. El animal comienza con un cuadro de enfermedad respiratoria caracterizado por rinofaringitis y traqueobronquitis; presenta tos, fiebre (evidenciada mediante una curva difásica con un segundo pico coincidente con la viremia), descarga nasal serosa que puede hacerse mucosa y hasta mucopurulenta por contaminación bacteriana secundaria, congestión e hiperemia de la mucosa conjuntival, anorexia y depresión generalizada. La infección es sistémica y la viremia se acompaña de neutropenia y linfopenia, generalmente seguida por leucocitosis durante la semana posterior a la infección, en coincidencia con un segundo pico de fiebre (Dunowska, 2014). Los signos clínicos permanecen por aproximadamente 7 días y las complicaciones bacterianas secundarias pueden conducir a la formación de abscesos en los nódulos linfáticos y tejido linfoide subepitelial de la faringe. Ocasionalmente se presenta

bronconeumonía que puede llegar a ser fatal (Allen y Bryans, 1986). Durante su recuperación, algunos caballos desarrollan el denominado "síndrome de bajo rendimiento", que puede estar asociado con un estado de hipersensibilidad bronquial no específica o con un síndrome parecido a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que ocasiona efectos perjudiciales a largo plazo sobre el rendimiento deportivo (Mumford y Rosedale, 1980) (Figura 6).

Las lesiones macroscópicas más relevantes consisten en hiperemia, necrosis y ulceración del epitelio de las vías respiratorias y centros germinales del tejido linfático asociado. Las lesiones microscópicas incluyen rinitis, bronquiolitis, alveolitis y edema pulmonar intersticial. Se observa infiltración de neutrófilos en los bronquiolos, infiltración mononuclear en la región perivascular, fluido serofibrinoso en los alvéolos y cuerpos de inclusión intranucleares (Allen y col., 1999; 2004).

Figura 6. Rinoneumonitis equina. Se observa descarga nasal serosa. (Imagen tomada de Allen y col., 2004)

Aborto

Las hembras abortan generalmente durante los últimos cuatro meses de gestación, entre los 15 y 120 días posteriores a la infección viral. El aborto sucede en forma súbita, sin signos premonitorios y generalmente sin evidencia de infección respiratoria previa. La placenta es expulsada con el feto que permanece con las membranas fetales intactas. El feto muere por asfixia asociada a la abrupta separación de la placenta del endometrio. Algunos fetos pueden nacer vivos pero mueren rápidamente debido a la insuficiencia respiratoria resultante de las lesiones pulmonares inducidas por la infección prenatal (Smith y col., 1992).

En la mayoría de los casos los abortos ocurren en forma aislada y esporádica, y en general las hembras abortan una sola vez, sin que se vean

afectadas futuras preñeces (Dunowska, 2014). En algunos establecimientos pueden observarse “tormentas de aborto” que pueden llegar a afectar al 75% de las hembras gestantes (Smith y col., 1996; Allen y col., 1999; 2004). Generalmente, esto sucede en aquellos lugares en los que los animales no habían tenido contacto previo con el virus (Figura 7).

Las lesiones encontradas difieren según la edad de los fetos. Si el aborto ocurre con posterioridad al 7mo mes, los fetos presentan diferentes grados de ictericia, petequias en diversas superficies serosas y mucosas, edema pulmonar, hidrotórax, esplenomegalia, moderada hepatomegalia y cascos teñidos de amarillo por el meconio. Microscópicamente se observa bronquiolitis, neumonitis y necrosis en la pulpa blanca esplénica, en el hígado y en las glándulas adrenales. Se encuentran cuerpos de inclusión en hígado, pulmones, timo y pulpa roja esplénica. En algunos casos puede observarse enteritis necrotizante. La placenta generalmente está libre de lesiones y de cuerpos de inclusión. Los fetos abortados antes del séptimo mes (que no son muy frecuentes) presentan severa autólisis, por lo tanto es difícil reconocer en ellos cambios microscópicos como la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares y reacción inflamatoria en los órganos afectados (Westerfield y Dimock, 1946).

Figura 7: Aborto causado por Herpesvirus equino 1. Se observa el feto con sus membranas fetales intactas y la placenta. (Imagen tomada de Allen y col., 2004)

Síndrome neonatal

En general esta forma clínica se presenta cuando el feto resulta infectado en el último tercio de la gestación, de manera que puede nacer vivo dando lugar a dos posibles cuadros: algunos animales nacen presentando un severo estado de depresión, con marcada leucopenia (Dunowska, 2104) que los lleva a la muerte dentro de las primeras 24 h de vida. En otros casos, nacen aparentemente normales e inmediatamente presentan un severo cuadro respiratorio y diarrea, que los conduce a la muerte en las primeras 72 h del nacimiento. Las lesiones anatomopatológicas en este último tipo de manifestación clínica consisten en pulmones y glándulas adrenales con edema y congestión. A la observación microscópica se describe alveolitis no supurativa, bronquitis y bronquiolitis necrotizante, con posible presencia de cuerpos de inclusión en el pulmón, en el timo y, raramente, en el hígado. En caso de que el potrillo sobreviva por más de 5-14 días, aparecen complicaciones bacterianas secundarias que generan bronconeumonía supurativa, enteritis necrotizante, septicemia y destrucción

necrótica masiva de la población de linfocitos tímicos y esplénicos (Murray y col., 1998).

Trastornos en sementales

Puede observarse edema escrotal y pérdida de libido. La fiebre prolongada tiene efecto perjudicial sobre la espermatogénesis que se traduce en la reducción del número de espermatozoides normales. Algunos investigadores mencionan la presencia de partículas virales en semen, pero su importancia desde el punto de vista epidemiológico para la transmisión venérea de la infección es todavía incierta (Mc Cartan y col., 1995; Tearle y col., 1996).

Síndrome neurológico

La aparición de los signos nerviosos puede suceder entre los 6 a 10 días posteriores a la infección respiratoria y afecta a animales de cualquier edad. Sin embargo, también podría suceder como causa de una reactivación del virus latente (endógeno) (Dunowska, 2014). Los signos dependen de la extensión y localización de las lesiones, la cual se define como una mieloencefalopatía de aparición repentina y usualmente sin enfermedad respiratoria. Los signos clínicos nerviosos tienen un pico de intensidad a los 2-3 días de su inicio y varían desde moderada ataxia, hasta parálisis completa de miembros torácicos y pelvianos con incontinencia urinaria. El pronóstico para los caballos que no están en decúbito es favorable, pero aquellos que permanecen en esa posición por más de 2 días generalmente tienen complicaciones fatales, como neumonía, cólicos o rotura vesical.

Las lesiones primarias consisten en vasculitis no supurativa, hemorragias focales y trombosis. Las hemorragias afectan en general a la sustancia blanca, principalmente en la región lumbosacra y caudal de la médula espinal. Los cambios necróticos son de escasa extensión, pueden localizarse en áreas variables y generalmente son secundarios a los cambios vasculares (Whitwell y Blunden, 1992).

Infección ocular

Las lesiones oculares se manifiestan como uveítis o coriorretinitis. La uveítis fue encontrada en potrillos durante un brote de enfermedad neurológica que afectó a yeguas y sementales. La coriorretinitis, se puede observar 3-5 semanas después de la infección del tracto respiratorio y se presenta como lesiones multifocales, focales o difusas. Las lesiones focales y multifocales no afectan la visión, pero las lesiones difusas pueden producir un daño severo de la retina con la consecuente ceguera (Slater y col., 1992; McCartan y col., 1995).

Infección vasculotrópica pulmonar

Se observa ocasionalmente en caballos jóvenes. Se caracteriza por fiebre alta, anorexia, depresión severa y dificultad respiratoria. Desde el punto de vista epidemiológico, presenta una elevada mortalidad. Los animales afectados suelen encontrarse muertos ya que el inicio de la enfermedad es repentino y su progresión hasta la muerte es rápida. El hallazgo dominante en la necropsia es una vasculitis multisistémica, particularmente importante en los pequeños vasos sanguíneos de los pulmones (Del Piero y Wilkins, 2001).

EPIZOOTIOLOGÍA

El EHV-1 produce infección clínica y subclínica, y la mayoría de los caballos adultos poseen Ac para este virus. La permanencia del virus en la naturaleza se debe a diferentes motivos, entre los cuales se citan:

- la infección generalizada de caballos jóvenes,
- la alta morbilidad (hasta el 90%) y baja mortalidad de la enfermedad,
- la alta prevalencia de animales con infecciones latentes, y
- la continua liberación de partículas virales infecciosas de animales

portadores, que favorece la transmisión eficiente y sin interrupciones del virus a las nuevas generaciones de equinos (Figura 8).

Figura 8. Ciclo de transmisión del Herpesvirus equino 1. (Adaptado a partir de Allen, 2002)

El contagio se produce por vía aerógena o por el contacto con fómites, fetos abortados y restos placentarios infectados. La forma respiratoria es común en potrillos al destete o cuando los animales ingresan a los centros hípicas, mientras

que la infección subclínica se presenta en animales de diferentes edades debido a reinfecciones sucesivas. La principal fuente de contagio de los potrillos la constituye el fenómeno de reactivación de virus latentes de los adultos convivientes. La liberación de virus a través de las secreciones respiratorias de animales infectados por primera vez puede sucederse hasta 15 días pi, mientras que en los casos de reactivaciones es de 2-4 días (Gibson y col., 1992).

Luego del primer ciclo replicativo en el tracto respiratorio se produce la fase virémica, en la cual el virus es transcripcionalmente activo, hay expresión de Ag virales en las células sanguíneas y se puede recuperar con facilidad por co-cultivo con células permisivas. Cuando el EHV-1 entra en estado de latencia en los linfocitos T CD8+ y en el ganglio trigémino, la transcripción de su genoma se encuentra restringida como sucede en todos los alfa herpesvirus; por lo tanto, las proteínas virales no se expresan, la célula es resistente a los mecanismos inmunológicos, y el virus es difícil de recuperar por co-cultivos celulares (Welch y col., 1992; Slater y col., 1994; Baxi y col., 1995; Chesters y col., 1997). Se estima que la frecuencia de células con infección latente es de 1 cada 50.000 células mononucleares de sangre periférica. La reactivación de virus latente se produce cuando los animales se encuentran bajo situaciones estresantes como transporte, medidas de manejo, destete, movimientos de potreros, tratamientos con corticoides o prácticas deportivas exigentes. Estas reactivaciones son generalmente silentes y la viremia que sigue a la reactivación puede conducir el virus a los endotelios del útero, causando aborto, y del SNC, produciendo síndrome neurológico. Por lo tanto, el aborto puede ocurrir sin el requisito previo de una infección respiratoria epitelial lítica o de una viremia detectable. El EHV-1 es el primer alfa herpesvirus para el que se ha

descrito reactivación en los linfocitos, además de la reactivación en el ganglio trigémino.

La latencia y la reactivación desempeñan un papel particularmente importante en la epidemiología del aborto por EHV-1, ya que la mayoría de los abortos son en general consecuencia de la reactivación viral y no de una infección respiratoria reciente (Mumford y col., 1985). Durante la fase de latencia, el virus no se replica ni expresa ninguna glicoproteína en la membrana plasmática celular, de esta manera la mayoría de sus genes son silenciados, excepto aquellos que codifican los transcritos denominados LAT (*Latency associated transcripts*), los que tampoco son traducidos, pero son el único vestigio de expresión génica viral en las células con infección latente (Slater y col., 1994; Smith y col., 1998). A algunos de estos genes se les atribuyen funciones modulatorias de la apoptosis, pero los mecanismos no han sido aún del todo comprendidos. No obstante, la célula con infección latente no es reconocida por el sistema inmune, y el animal se encuentra clínicamente normal (Figura 9).

Figura 9. Esquema representativo del estado de latencia y reactivación de EHV-1. (Adaptado a partir de Dunowska, 2014)

La forma nerviosa puede presentarse concomitantemente con abortos y es precedida generalmente por signos clínicos respiratorios (Allen y col., 2004).

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune de los equinos a una infección por EHV-1 es similar a la de otras especies infectadas por herpesvirus. El mecanismo es complejo y se conoce poco sobre el mismo. Incluye a la respuesta innata y adaptativa, tanto celular como humoral (Allen y Bryans, 1986; Allen y col., 2004). Los Ac maternos transmitidos por el calostro protegen a los potrillos de la infección natural. La

inmunidad conferida por ellos depende de su concentración en el calostro y del volumen ingerido por el potrillo en las primeras 24 h de vida. Los Ac calostrales poseen una vida media de 26 días y decaen exponencialmente, de manera que entre los 4-6 meses de edad los potrillos pueden ser infectados naturalmente. Sin embargo, se ha comprobado que a los 30 días pos parto los Ac calostrales son prácticamente indetectables (Allen y col., 2004).

La infección natural del tracto respiratorio de los equinos es seguida por la rápida aparición de Ac en sangre, aunque el título decae de manera exponencial; por lo tanto, los animales se tornan nuevamente susceptibles al virus entre los 4 y 5 meses posteriores a su recuperación. La resistencia a la reinfección durante este período se encuentra garantizada por: 1) los elevados niveles de Ac en sangre y en mucus nasofaríngeo, 2) la actividad proliferativa de linfocitos T CD4+ activados por el virus, 3) la presencia de precursores de linfocitos T citotóxicos CD8+ virus específicos, 4) la actividad de células *natural killer* y 5) la citotoxicidad celular dependiente de Ac virus específico (Allen y col., 2004). Cuando estos mecanismos de resistencia decaen, la mucosa respiratoria puede ser nuevamente reinfectada por el virus en forma repetida. Estas múltiples reinfecciones, no producen signos clínicos de enfermedad respiratoria, aunque pueden generar manifestaciones de enfermedad neurológica o abortiva. Si bien se sabe que la inmunidad mediada por células puede modificar la frecuencia de la enfermedad, contribuir a la recuperación de los animales y a la inhibición de la replicación viral *in vitro*, aún no se ha podido dilucidar exactamente el rol que la misma desempeña *in vivo*. El mecanismo por el cual el virus escapa a la neutralización por Ac en su pasaje al feto está estrechamente relacionado a la viremia asociada con células, de manera que el virus

puede llegar al útero preñado sin ser afectado por la acción de los Ac. La leucopenia que se observa durante la fase virémica es más intensa en hembras preñadas, y debido a que sólo abortan una vez, se han sugerido alteraciones cualitativas de la inmunidad mediada por células (Mumford y col., 1994) aludiendo que la protección contra EHV-1 es compleja (Dunowska, 2014).

Los herpesvirus, incluyendo EHV-1, han desarrollado sofisticados mecanismos para evitar ser eliminados mediante la respuesta inmune del hospedador, entre los que se encuentran: disminuir la expresión de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-1), evitar la lisis mediada por células *natural killer*, y permanecer quiescentes dentro de neuronas y linfocitos mediante el desarrollo de latencia (Huang y col., 2014).

DIAGNÓSTICO

La rápida identificación en un establecimiento del agente etiológico causante de la RNE y del aborto equino es esencial para tomar las decisiones respecto al tratamiento, planear las estrategias para controlar la diseminación epizootica de la infección y evitar los posibles abortos subsecuentes. Es importante realizar el diagnóstico diferencial con otros agentes, como el virus de la influenza equina, el adenovirus, el rinovirus y el virus de la arteritis equina. Dado que los signos clínicos son insuficientes por sí mismos para diferenciar a los herpesvirus de otras causas comunes de enfermedad respiratoria, son necesarias pruebas de laboratorio para confirmar el agente etiológico (Allen y col., 2004; Dunowska, 2014).

Los métodos disponibles para el diagnóstico de laboratorio son: el aislamiento viral (técnica de referencia), la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), la detección de Ag virales por inmunofluorescencia directa o por inmunoperoxidasa, y las pruebas serológicas.

El diagnóstico por aislamiento viral se basa en determinar la presencia de virus activo en secreciones, en leucocitos de sangre periférica de los animales afectados o en órganos de fetos abortados. El éxito de este diagnóstico se ve influenciado por los procedimientos utilizados para la toma, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras clínicas. Los hisopados nasales deben realizarse dentro de las 48 h del comienzo de las primeras manifestaciones clínicas, cuando los animales presentan fiebre y descarga nasal serosa. El período óptimo para lograr el aislamiento del virus a partir de sangre es entre 4-10 días del comienzo de la enfermedad respiratoria. En caso de tratarse de fetos abortados, las muestras deben tomarse y transportarse en forma estéril, inmediatamente de sucedido el aborto. El diagnóstico por aislamiento viral es confirmatorio, pero presenta la desventaja de insumir mucho tiempo para obtener un resultado (Rimstad y Hyllseth, 1994).

La amplificación de ADN viral mediante PCR es un ensayo rápido, sensible y utilizado frecuentemente a partir de muestras clínicas (Rimstad y Evensen, 1993). Para el mismo no es indispensable contar con virus viable, debido a que la técnica determina presencia de genoma viral.

El diagnóstico de la enfermedad respiratoria se realiza mediante detección del virus en secreciones nasofaríngeas por aislamiento viral o PCR; mientras que para casos de aborto o enfermedad neonatal, es recomendable tomar muestras del feto/neonato, debido a que las concentraciones de virus más elevadas se encuentran en pulmón, hígado y bazo fetales, así como también de la placenta. El

diagnóstico *ante-mortem* de la enfermedad neurológica es difícil debido a que los signos clínicos se asemejan a aquellos producidos por otros virus. Asimismo, el comienzo de las manifestaciones clínicas, entre 4 y 9 días pi dificulta la detección del virus.

La detección de Ac en suero puede realizarse mediante técnicas de ELISA, pruebas de neutralización viral (NV) o pruebas de fijación de complemento. Debido a que no hay técnicas estandarizadas internacionalmente para realizar dichas pruebas serológicas, las determinaciones del título de Ac en un mismo suero pueden ser diferentes de un laboratorio a otro. La prueba de ELISA y la de fijación de complemento tienen la ventaja, por sobre la NV, de dar resultados más rápidos y de no requerir el uso de cultivos celulares. Todas las pruebas serológicas mencionadas detectan la presencia de Ac en sangre, pero éstos tienen reacciones cruzadas entre el EHV-1 y el EHV-4, siendo difícil la diferenciación antigénica mediante el uso de sueros policlonales, sólo existe un ensayo ELISA específico de tipo, que puede distinguir entre Ac contra el EHV-1 y el EHV-4, (Hartley y col., 2005) y que está disponible comercialmente (Boehringer Ingelheim Svanova). La prueba de microneutralización es un ensayo serológico sensible que se utiliza ampliamente para detectar Ac contra EHV-1/EHV-4.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de incrementos notables en los títulos de Ac en sueros pareados tomados durante las fases aguda y de convalecencia de la enfermedad. La muestra de suero inicial (fase aguda) debe obtenerse lo antes posible después de la aparición de los signos clínicos y la segunda muestra de suero (fase de convalecencia) debe tomarse entre 2 y 4 semanas después. La detección de un incremento de cuatro veces o más en el título

de Ac frente a EHV-1 o EHV-4 a lo largo de la enfermedad es una confirmación serológica de infección reciente con alguno de estos virus. Los resultados de las pruebas realizadas con sueros de una toma individual puntual suelen ser imposibles de interpretar con una cierta seguridad. Los sueros de las yeguas después de los abortos, o de los caballos con enfermedad neurológica debida a EHV-1, pueden contener ya títulos máximos de Ac contra EHV-1, sin que haya un aumento detectable en el título de los sueros recogidos con posterioridad. La detección de Ac contra EHV-1 en sangre procedente de corazón, cordón umbilical o de otros líquidos fetales puede tener valor diagnóstico en casos de fetos abortados que son negativos a las técnicas de reconocimiento viral (Smith y col., 1996).

PREVENCIÓN Y CONTROL

El objetivo de vacunar contra EHV-1 es el de proteger a los equinos de la enfermedad respiratoria y del aborto. Se han producido vacunas (ya sea para EHV-1 solo o en combinación con EHV-4) con virus inactivado, generalmente con formaldehído, y asociadas a diferentes tipos de adyuvantes de uso común para ser administradas vía parenteral. Este tipo de vacunas, si bien son seguras porque carecen de virus activo, presentan el inconveniente de inducir una respuesta inmune de corta duración, lo que exige la repetición de dosis. Si el propósito de una vacuna es prevenir la enfermedad, reducir la incidencia, la duración de los signos clínicos y el periodo de eliminación viral, las vacunas inactivadas cumplen con estos objetivos. Sin embargo, si tenemos en cuenta que el EHV-1 produce viremia asociada a células, se puede inferir que estas vacunas no son totalmente efectivas y algunas

partículas virales pueden llegar al feto y producir el aborto (Kydd col., 1994; Heldens y col., 2001; Allen y col., 2004; Patel y Hendels, 2005; Goehring y col., 2010).

Estudios recientes han demostrado que la inmunización intranasal con la gpD en ratones BALB/c, induce una respuesta inmune humoral local con secreción de inmunoglobulinas A que protege a los animales de la posterior infección experimental; sugiriendo que este tipo de vacunas podría ser una alternativa viable a ser utilizada en potrillos antes del destete (Fuentealba y col., 2014).

SITUACIÓN EN ARGENTINA

La existencia de RNE en la República Argentina fue comunicada por primera vez por los Dres. Monteverde y Garbers en 1949 (De Diego, 1974). Posteriormente, se detectaron Ac específicos contra el EHV-1 mediante estudios serológicos (Matumoto, 1965). En el año 1980 se aisló el virus a partir de un feto equino abortado (Etcheverrigaray y col., 1982) y esta cepa, denominada SP1, fue utilizada posteriormente para la obtención de un Ag precipitante en cultivos celulares (Nosetto y col., 1985). En el año 1984 se describieron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa asociada con este virus (Nosetto y col., 1985). En 1985 se realizó un nuevo aislamiento viral a partir de leucocitos de un equino con cuadro clínico respiratorio (Galosi y col., 1989), y desde ese momento se han aislado varias cepas a partir de casos aislados de abortos, tormentas de abortos y enfermedad neonatal. El análisis de estas cepas, utilizando enzimas de restricción, demostró que el genoma EHV-1B está presente en Argentina desde el año 1996 (Galosi y col., 1998; Martinez y col., 2006). Posteriormente se realizó el primer análisis filogenético de aislamientos argentinos demostrándose que presentan el mismo origen que cepas británicas y

japonesas (Martin Ocampos y col., 2009). Por otro lado, un estudio retrospectivo realizado en el año 2009 demostró que el 7% de las cepas aisladas en Argentina son mutantes neuropatogénicas (Vissani y col., 2009).

En relación al control de la infección por EHV-1 en Argentina, si bien la vacunación de animales no es obligatoria, en algunos establecimientos se emplean planes de vacunación siguiendo los esquemas propuestos por otros países, donde se recomienda el uso de vacunas inactivadas. Los programas de vacunación consisten en inmunizar hembras preñadas y potrillos jóvenes, para prevenir abortos y enfermedad respiratoria, respectivamente. Las crías que van a ser destetadas a los 6 meses de edad reciben dos dosis de vacuna con 3 a 4 semanas de intervalo entre ellas y un refuerzo a los 6 meses de la segunda dosis. Las hembras preñadas reciben tres dosis al 5°, 7° y 9° mes de gestación. En caso de tratarse de hembras preñadas que recién arriban a un establecimiento, se vacunan cada dos meses hasta el parto. El resto de los animales reciben una dosis ante cualquier circunstancia que pueda producirles estrés, o bien previamente a la llegada de nuevos animales. Las vacunas atenuadas no están oficialmente permitidas por el SENASA (www.senasa.gov.ar).

MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE EHV-1

Muchos de los principales avances en el estudio de la patogenia de la infección por EHV-1 se realizaron mediante el uso de modelos animales de experimentación (Awan y col., 1990; Awan y col., 1991). El modelo experimental en ratones ha permitido resolver los inconvenientes vinculados con el desarrollo de

ensayos en el hospedador natural, los que, son más costosos, requieren gran número de caballos, en lo posible libres del virus y de patógenos específicos (calidad *SPF*, del inglés *Specified Pathogen Free*), una amplia disponibilidad de espacio y el cuidado por parte de personal veterinario calificado. El modelo en ratones más estudiado es la infección en la cepa BALB/c, que repite con similitud los signos clínicos y las lesiones a nivel histológico que ocurren en el hospedador natural en todos los sistemas (Awan y col., 1990, 1995; van Woensel y col., 1995; Walker y col., 1999a, 1999b; Galosi y col., 2004, 2006) y ha sido empleado para estudiar el potencial de varios inmunógenos (Walker y col., 1999a), el efecto de posibles agentes antivirales (de la Fuente y col., 1992), y las características patogénicas de diferentes cepas (Awan y col., 1995; van Woensel y col., 1995; Walker y col., 1999a). Asimismo, la existencia de aborto en yeguas y ratonas infectadas con el virus y la semejanza en la patogenicidad de las distintas cepas cuando infectan ambas especies, apoyan el empleo de este modelo experimental para profundizar los estudios (Awan y col., 1995; Walker y col., 1999a; Galosi y col., 2004).

APOPTOSIS

GENERALIDADES

La palabra **apoptosis** proviene del griego antiguo (*apo*: de, desde separar y *ptosis*: caer) y se empleó para describir la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. En el contexto de la biología celular, se acuñó para describir un tipo de muerte celular programada caracterizada por la formación de pequeñas vesículas esféricas, denominadas cuerpos apoptóticos, que se separan de las células que están atravesando este proceso (Kerry col., 1972).

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada por la cual las células mueren a través de un proceso secuencial, ordenado y finamente regulado en respuesta a una variedad de estímulos o factores, tanto extra como intracelulares (Dubin y Stooppani, 2000; Cooper y Hausman, 2009).

La muerte apoptótica implica una gran reestructuración de la célula que incluye tanto al compartimiento nuclear como al citoplasmático y finaliza con el desmantelamiento celular. Los cambios nucleares ocurren principalmente a nivel de la cromatina, mientras que en el citoplasma tienen lugar eventos cruciales que alteran la estructura y función de las organelas (Bottone y col., 2013).

Durante la apoptosis la célula sufre importantes cambios morfológicos, entre los cuales se describen: la disminución del volumen celular y de las organelas (debido fundamentalmente a la pérdida de agua), alteraciones del citoesqueleto y vesiculización de la membrana plasmática sin ruptura de la misma. Los cambios en el compartimiento nuclear comienzan con la condensación de la cromatina en la periferia de la envoltura nuclear adquiriendo una forma cóncava que se asemeja a

una media luna. Luego la envoltura nuclear se desintegra, la lámina nuclear se degrada y, por último, se produce la dispersión de fragmentos nucleares en el citoplasma, los que junto con los constituyentes de este último, son empaquetados y envueltos por fragmentos de la membrana plasmática. Estas estructuras se denominan cuerpos apoptóticos. Cuando la apoptosis sucede *in vivo*, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas, principalmente por macrófagos, pero también por otras células, como fibroblastos o células epiteliales (que no son habitualmente células fagocíticas) sin desencadenar ninguna reacción inflamatoria en el tejido, debido fundamentalmente a que durante todo el proceso la membrana plasmática se mantiene íntegra y no se produce la dispersión del contenido celular (Dubin y Stoppani, 2000; Hengartner, 2000; Cooper y Hausman, 2009).

La contraparte de la muerte celular programada es la muerte por **necrosis**, proceso por el cual las células “estallan” liberando su contenido al medio externo. En el caso de ocurrir *in vivo* se produce una respuesta inflamatoria. La necrosis es un proceso que afecta a grupos de células, y no de células aisladas como generalmente ocurre en la apoptosis. Por otra parte, en la necrosis no se mantiene ni la integridad ni la funcionalidad de la membrana plasmática, y la fragmentación nuclear ocurre completamente al azar. Las diferencias entre necrosis y apoptosis se presentan en la tabla 1 y la figura 10.

Característica	Apoptosis	Necrosis
Número de células	Células individuales o pequeños grupos	Generalmente grandes cantidades
Volumen celular	Encogimiento celular	Tumefacción celular, citólisis
Efecto en la integridad de la membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en núcleo	Condensación y fragmentación de la cromatina	Fragmentación y lisis nuclear
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Inflamación usualmente presente

Tabla 1. Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis. (Adaptada de Elmore, 2007)

Figura 10. Esquema que representa los principales cambios morfológicos ocurridos durante la muerte celular por necrosis y apoptosis. (Diez y col., 1999)

En los últimos años se han descripto y clasificado otros tipos de muerte celular programada con diferencias bioquímicas y morfológicas respecto de la apoptosis. La existencia de diferentes modalidades de muerte generó controversias en la nomenclatura de cada proceso, y por ello se decidió la creación del Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular (NCCD, Nomenclature Committee on Cell Death) el cual recomienda incluir como muerte celular programada a los siguientes procesos:

- **Necroptosis**, o también denominada necrosis programada, se caracteriza por el “*bledding*” (vesiculización) de la membrana plasmática, seguido por el reclutamiento del material celular hacia la periferia, asemejándose a un “balón” (Figura 11).

Figura 11. Representación esquemática de una célula muriendo por necroptosis. La membrana plasmática presenta un burbujeo o “bledding” y el contenido celular es reclutado en un extremo de la célula. (Tomada del curso: Apoptosis y Cáncer – FCE - UBA - 2015)

- **Autofagia:** se caracteriza por la formación de autofagosomas y su posterior combinación con lisosomas para la degradación del material citoplasmático. En un principio, es un mecanismo de supervivencia celular ante

situaciones de privación de alimento, pero si esta situación escapa al control y la regulación celular, la célula muere con procesos de autofagia, pero por algún otro tipo mecanismo de muerte.

- **Catástrofe mitótica:** ocurre por alteraciones durante el proceso de división celular por mitosis y se caracteriza por la presentación de multinúcleos.
- **Anoikis:** es un tipo de apoptosis específica que ocurre debido a la pérdida de adhesión a otras células y/o medio extracelular.
- **Paraptosis:** este tipo de muerte se caracteriza por la formación de vacuolas citoplasmáticas y condensación nuclear, aunque esta última suceda sin la posterior fragmentación ni formación de cuerpos apoptóticos.

Existen otros prototipos de muerte celular programada, pero que generalmente ocurren en tipos celulares específicos o bajo condiciones particulares. Muy probablemente *in vivo* sucedan combinaciones e interacciones entre los mismos. En la actualidad poco es lo que se conoce sobre los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en todos ellos (Kroemer y col., 2009).

MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Durante la apoptosis las células disminuyen su volumen y se vuelven más esféricas perdiendo el contacto con sus células vecinas. La plasticidad que este proceso requiere está dada por una reorganización del citoesqueleto mediada por cambios conformacionales en los microfilamentos y microtúbulos. Debido a la disminución en el volumen celular, el citoplasma se vuelve más denso y las organelas se encuentran más comprimidas (Ziegler y Groscurth, 2004; Elmore, 2007; Bottone y col., 2013).

En el núcleo, la cromatina se condensa y fragmenta. El clivaje internucleosomal del ADN genera fragmentos de 180 a 200 pares de bases de longitud. La condensación es inicialmente periférica y forma una estructura de anillo o medialuna cercana a la cara interna de la membrana nuclear. El núcleo se condensa (picnosis) y en estadios avanzados se fragmenta (cariorrhexis), mientras que la célula conserva la membrana plasmática intacta. Posteriormente, los fragmentos del núcleo son encapsulados en los cuerpos apoptóticos (Lawen 2003; Ziegler y Groscurth, 2004).

En el citoplasma se producen cambios en varias organelas. Las mitocondrias cambian dinámicamente su estructura, debido a procesos de fusión y fisión por los que atraviesan, y que en condiciones normales se encuentran en perfecto equilibrio. Durante la apoptosis, se genera un desbalance en este fino equilibrio que induce un aumento en la fisión mitocondrial. Además, las mismas cambian su localización y

terminan adoptando una posición perinuclear (Youle y Karbowski, 2005; Bottone y col., 2013).

El retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi son también organelas dinámicas y las membranas de sus cisternas son capaces de fusionarse y fisionarse homotípicamente en condiciones fisiológicas. Durante la apoptosis, el RE se agranda y el aparato de Golgi se vesiculiza (Mukherjee y col., 2007; Pfeffer, 2010; Bottone y col., 2013).

La membrana plasmática se vuelve más activa y se genera un burbujeo (en inglés: *blebbing*), a la vez que las uniones célula-célula se pierden. En la medida que el desmantelamiento celular avanza, se pueden observar vesículas de distintos tamaños que encierran al contenido celular: los cuerpos apoptóticos. Estas estructuras contienen organelas estrechamente comprimidas, que pueden estar condensadas, pero se encuentran aparentemente intactas tanto química como estructuralmente. Entre las modificaciones que sufre la membrana plasmática, la exposición de la fosfatidilserina constituye una señal “*eat me*” (comeme, es decir, lista para ser fagocitada) que permite el reconocimiento de las células apoptóticas por parte de los macrófagos, y otros tipos celulares, para su posterior fagocitosis. Dado que no hay liberación del contenido celular al exterior, este tipo de muerte ocurre generalmente sin inflamación (Kerry col., 1972; Lawen, 2003).

Los principales cambios morfológicos ocurridos durante la apoptosis se muestran en la figura 12.

Figura 12. Morfología celular en la apoptosis. **A.** Se muestran imágenes obtenidas por microscopía de barrido de una célula normal (izquierda) y de otra muriendo por apoptosis (derecha). En esta última, las vesículas que rodean a la membrana plasmática son los denominados cuerpos apoptóticos (Monacky col., 1997). **B.** El esquema representa los cambios celulares luego del disparo de la muerte celular apoptótica: fragmentación de la cromatina, aumento de la fisión mitocondrial y del aparato de Golgi, burbujeo de la membrana y formación de cuerpos apoptóticos. Esquema tomado del curso de Apoptosis y Cáncer. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Buenos Aires. 2015. Dra. Gorjob, Roxana.

CAMBIOS BIOQUÍMICOS

Los cambios morfológicos descriptos son resultado de mecanismos moleculares y bioquímicos que preceden a la desintegración celular. La gran mayoría de estos cambios son característicos de la apoptosis, por lo que pueden ser utilizados como indicadores de este modo de muerte celular. Uno de los complejos

enzimáticos más importantes y ampliamente estudiados es el de las cisteinil-aspartato proteasas, mejor conocidas como caspasas. El término caspasa hace referencia a dos propiedades catalíticas de esta familia de enzimas: la letra "**C**" se refiere a su actividad cisteín-proteasa, mientras que el término "**Aspasa**" indica su capacidad de romper enlaces proteicos a nivel de residuos de ácido aspártico.

Las caspasas tienen un rol protagónico en la apoptosis, ya que provocan la degradación de diversas proteínas celulares. Se encuentran en las células en forma inactiva, como procaspasas, y su activación se produce ante determinados estímulos, los que pueden ser internos o externos, determinando así dos vías de activación de la apoptosis: la intrínseca y la extrínseca, respectivamente.

Este grupo de proteínas está integrado por al menos 14 enzimas que se dividen desde el punto de vista funcional en dos grupos básicos: caspasas apoptóticas, las que se clasifican a su vez en iniciadoras y ejecutoras, según su función en dicho proceso; y caspasas inflamatorias.

- Caspasas iniciadoras: corresponden a las caspasas 2, 8, 9, 10 y 12. Se activan directamente por estímulos internos o externos y su función está dirigida a la activación de la cascada de caspasas.
- Caspasas ejecutoras: corresponden a las caspasas 3, 6 y 7. Son activadas por las caspasas iniciadoras y actúan sobre proteínas del citoesqueleto y de la matriz nuclear produciendo su lisis (Breckenridge col., 2003; Riedl y Shi, 2004).
- Caspasas inflamatorias: No están relacionadas a la muerte celular programada, sino vinculadas a la secreción de algunas citoquinas proinflamatorias, son las caspasas 1, 4, 5, 11, 13 y 14.

Estas proteínas se sintetizan como zimógenos inactivos compuestos por tres dominios: un pro-dominio N-terminal que es removido durante la activación, un dominio largo p20 y un dominio corto p10. Los dominios p20 y p10 se separan por proteólisis y se conservan en la enzima madura. La especificidad de cada caspasa se encuentra determinada por los cuatro residuos que se encuentran en posición N-terminal al sitio de corte. Si bien en la mayor parte de los casos el clivaje inactiva a la proteína blanco, en otros puede eliminar un dominio o una subunidad reguladora, llevando a la activación de la misma (Hengartner, 2000; McConkey, 2008). La enzima activa consiste en un heterotetrámero compuesto por los dominios p10 y p20, cada uno de ellos con un sitio activo (Hengartner, 2000; Crawford y Wells, 2011). En la tabla N° 2 se muestran las caspasas descriptas hasta el momento, para cada una de ellas la posición de hidrólisis de la procaspasa, el centro activo y la secuencia de reconocimiento.

Caspasa	Posición de hidrólisis de la procaspasa	Centro activo	Secuencia de reconocimiento
Caspasa-1	Asp 103, Asp 119, Asp 297, Asp 316	WFKD	WEHD
Caspasa-2	Asp 152, Asp 316, Asp 330	DQQD	DEHD
Caspasa-3	Asp 9, Asp 28, Asp 175	IETD	DEVD
Caspasa-4	Asp 104, Asp 270, Asp 289	WVRD	W/LEHD
Caspasa-5	Asp 121, Asp 311, Asp 330	WVRD	W/LHD
Caspasa-6	Asp 23, Asp 179, Asp 193	TEVD	VEHD
Caspasa-7	Asp 23, Asp 198	IQAD	DEVD
Caspasa-8	Asp 210, Asp 216, Asp 374, Asp 384	VETD	LETD
Caspasa-9	Asp 130, Asp 315, Asp 330	PEPD	LEHD
Caspasa-10	Asp 219, Asp 372	IEAD	LEAD
Caspasa-11	-	MAED	-
Caspasa-12	-	ATAD/ADTD	-
Caspasa-13	-	WVSD	-
Caspasa-14	-	LGGD	-

Tabla 2. Clasificación de las caspasas, posición de la hidrólisis de las procaspasas, centro activo y secuencia de reconocimiento. (Adaptado de Jordán, y col. 2000)

Las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos portadores de dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs) o dominios efectores de muerte (DED - *Death Effector Domain*) que les permiten unirse a complejos de andamiaje que se forman en respuesta a distintos estímulos apoptóticos. Las caspasas efectoras, por el contrario, poseen pro-dominios cortos y requieren para su activación, del procesamiento por parte de las caspasas iniciadoras. En la figura 13 se esquematizan los diferentes dominios presentes en las caspasas. Una vez activas, clivan un amplio espectro de proteínas blancos celulares conduciendo a la muerte celular. El modelo de proximidad inducida sugiere que la concentración local elevada del zimógeno permite el procesamiento homotípico de caspasas de baja actividad intrínseca. En este sentido, las pro-caspasas iniciadoras podrían auto-activarse en complejos de andamiaje, y conducir a la activación de las cascadas de señales apoptóticas.

Figura 13. Clasificación de las caspasas. Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos compuestos por un prodominio, una subunidad larga p20 y una subunidad corta p10. Las caspasas apoptóticas se clasifican como iniciadoras o ejecutoras. CARD: Dominio de Reclutamiento de Caspasas. DED: Dominio Efecto de Muerte (siglas en inglés). Figura adaptada de McIlwainy col. (2013).

La activación de la apoptosis ocurre principalmente por dos vías transduccionales conocidas como la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis, aunque a pesar de esta clasificación existen interconexiones entre ambas vías (Dubin y Stoppani, 2000; Jordan 2003; Dash 2006; Kroemer y col., 2009).

VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca de señalización involucra interacciones mediadas por receptores específicos localizados en la membrana plasmática. Estos receptores, comúnmente llamados receptores de muerte, son miembros de la superfamilia de receptores **factor de necrosis tumoral (TNF)**. Sus miembros comparten dominios extracelulares que son abundantes en cisteína y se caracterizan por poseer un dominio citoplasmático, el dominio de muerte (*DeathDomain*- DD), que juega un rol crucial en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelulares. Entre ellos se destacan Fas (APO-1/ CD-95), el receptor 1 de TNF (TNFR1), y los receptores 1 y 2 del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL-R1 y TRAIL R2 o DR4 y DR5, respectivamente) (Ashkenazi y Dixit, 1998; Aggarwal, 2003; Fulda y Debatin, 2006). La vía extrínseca de la apoptosis se inicia por ligandos extracelulares, como TNF, FasL y TRAIL, que al unirse al dominio extracelular de los receptores de muerte, conducen a la trimerización del receptor y a la unión de una proteína adaptadora conocida como FADD (dominio de muerte asociado a Fas). El reclutamiento de las caspasas 8 y 10 al DED (dominio efector de muerte) de FADD conduce a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), compuesto por el receptor, la proteína adaptadora y las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca (Figura 14). En este contexto, ocurre el clivaje de las caspasas por el mecanismo de proximidad inducida que lleva a su consecuente activación. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras clivan y activan a las caspasas efectoras transmitiendo la señal apoptótica (Fulda y Debatin, 2006; Riedl y Salvesen, 2007).

Los modelos FAS Ligando/ FAS Receptor son los que mejor caracterizan los eventos de la vía extrínseca de la apoptosis y los que más se han estudiado hasta el momento, aunque no son los únicos que pueden desencadenar la muerte por apoptosis. También se describe la participación de otros receptores, como DR3 (Apo3, LARD), DR4 (TRAILR1) y DR5 (TRAILR2).

El receptor FAS es el único miembro de la superfamilia TNF que se cree interviene únicamente en procesos de apoptosis.

Figura 14. Modelo de señalización mediado por TNF Fas, activación de caspasas e inducción de la señal de muerte celular. La reacción TRAIL con TRAIL-R provoca el acoplamiento de la proteína adaptadora FADD (proteína con región de muerte asociada a Fas) al dominio de muerte del receptor (DD) que a su vez se une a la caspasa iniciadora pro-caspasa 8, la activa e integra, de esta manera, al complejo señalizador de inducción (Tomado de: Nature Reviews, Cancer.

http://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Receptors%2C+Tnf-Related+Apoptosis-Inducing+Ligand&lang=1)

La activación del receptor TNFR1 no sólo desencadena la apoptosis, sino que también puede estimular la proliferación y diferenciación celular; la decisión final dependerá del balance e interacción entre el receptor y el ligando con el contexto celular. Cuando el ligando se une al receptor TNFR1 se desencadena una señal

apoptótica similar a la descrita anteriormente, aunque en esta oportunidad FADD no se une directamente al DD del receptor, como sucede en la apoptosis mediada por FAS, sino que participa otra proteína adaptadora denominada TRADD (TNF-R *Adopter protein via Death Domain*), la cual es capaz de interaccionar con FADD y activar la cascada de muerte. En la figura 15 se muestran los dos mecanismos capaces de ser desencadenados por la activación de TNFR1.

Figura 15. Modelos de señalización mediados por TNF para apoptosis y supervivencia celular. El esquema de la izquierda muestra la vía de señalización de muerte celular, donde la interacción de TNF-TNFR1 provoca el acoplamiento de la proteína adaptadora FADD (proteína con región de muerte asociada a Fas) junto con otra proteína adaptadora TRADD (proteína adaptadora al dominio de muerte de TNF) al dominio de muerte del receptor (DD), que a su vez se une a la caspasa iniciadora pro-caspasa 8 para activarla, integrando de esta manera el complejo de señalización de inducción. El esquema de la derecha muestra la vía de señalización de supervivencia celular, donde la interacción de TNF-TNFR1 provoca el acoplamiento de la proteína adaptadora TRADD (proteína adaptadora al dominio de muerte de TNF) junto con otra proteína adaptadora, para desencadenar la cascada de las quinasas mediante la activación del factor de transcripción NF-κB.

(http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema03_apoptosis/06_3tnfr.htm)

Los demás receptores capaces de desencadenar la muerte por apoptosis, también son capaces de desencadenar otro tipo de respuesta celular: DR3 tiene un mecanismo de acción similar a TNFR1, mientras que DR4 y DR5 actúan de manera similar a FAS (McConkey, 2008).

VÍA INTRÍNSECA

La vía intrínseca de la apoptosis, también denominada mitocondrial, es desencadenada por causas que son internas al ambiente celular, como el daño en el ADN o el estrés oxidativo.

Muchos de los estímulos que desencadenan esta vía de la apoptosis están dirigidos y direccionados por genes supresores de tumores, como la proteína p53, una proteína de 53 KDa, encargada de censar diferentes estímulos estresantes que recibe la célula. En células normales, la concentración de p53 es baja debido a que se encuentra asociada a la proteína Mdm2, que induce su ubiquitinación y destrucción por el proteasoma. Los daños en el ADN y otras señales de estrés pueden hacer que p53 no se una a Mdm2, y como resultado de ello, se incrementa su concentración citoplasmática, permitiéndole actuar como factor de transcripción (Ou y col., 2007). El factor de transcripción p53 desencadena cambios con la finalidad de reparar el daño o eliminar la célula, tales como, detener el ciclo celular, activar enzimas de reparación del ADN, permitir la entrada en senescencia, o activar la apoptosis si el daño es irreparable. El mecanismo por el cual se desencadena la apoptosis es mediante la expresión de genes pro-apoptóticos que activan la vía intrínseca (Vijayakumuran y col., 2015; Park y col., 2016).

En la vía intrínseca de muerte por apoptosis las proteínas de la familia Bcl-2 tienen un rol protagónico, ya que actúan controlando la integridad de la membrana mitocondrial. El balance y la interacción entre los miembros de esta familia determinan la decisión entre la vida y la muerte celular. La primera descripción de estas proteínas se realizó en el nematode *Caenorhabditis Elegans*, y luego se encontraron homologías con proteínas de las células de mamífero.

Los miembros de la familia Bcl-2 son proteínas multidominio que comparten una estructura globular similar con dominios de homología a Bcl-2 (BH) (Figura 16). Estas proteínas regulan la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante interacciones complejas, interviniendo en la vía intrínseca/mitocondrial de muerte apoptótica. Según su rol en este proceso, los miembros de esta familia pueden ser clasificados como proapoptóticos o antiapoptóticos (Chipuk y col., 2010; Johansson y col., 2010; Oberle y col., 2010; Llambi y col., 2011).

Las proteínas antiapoptóticas están representadas por Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1/A1, y se caracterizan por poseer cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-4). Se encuentran generalmente en la membrana mitocondrial externa (MME) y preservan la integridad de la misma inhibiendo directamente a las proteínas proapoptóticas de la familia (Chipuk y col., 2010; Llambi y col., 2011).

Las proteínas proapoptóticas se dividen en efectoras con dominios BH1-4, en este grupo se incluyen Bax, Bak y Bok; y “BH3-*only*” que contienen únicamente un dominio BH3, cuyos representantes son Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa y Bmf. Luego de su activación, las efectoras Bak y Bax sufren un cambio conformacional, se insertan en la MME, se oligomerizan y forman poros induciendo la permeabilización de la misma, para lo cual se han planteado diferentes modelos

de acción directa o indirecta mediante los cuales las proteínas BH3-*only* podrían promover la apoptosis. En la figura 16 se representan todos los miembros de la familia Bcl2 conocidos hasta el momento.

Las proteínas antiapoptóticas previenen la formación de poros en la MME secuestrando a activadores directos como Bid y Bim, o directamente a los efectores, Bax y Bak (Chipuky col., 2010; Llambi y col., 2011).

Figura 16. Representación esquemática de las proteínas de la familia Bcl2, clasificadas según su función en la muerte por apoptosis. BH: Dominio de homología con Bcl-2. TM: Dominio de unión a membrana. (Tomado de: *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, Taylor y col., 2008)

Los miembros de la familia Bcl-2 se asocian y neutralizan entre sí, formando dímeros u oligómeros a través de sus dominios BH. Se pueden formar homodímeros, es decir con miembros que cumplen la misma función (ej. dos

proteínas antiapoptóticas), o heterodímeros, con proteínas que cumplen funciones antagónicas (ej. una proteína antiapoptótica y una proteína proapoptótica). El balance final entre estas proteínas regula la formación de poros en la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas desde las mitocondrias.

Cada una de las proteínas de la familia Bcl-2 son sensibles a diferentes procesos o estímulos capaces de desencadenar la muerte por apoptosis, así por ejemplo el daño en el ADN, activa la proteína p53, la cual determina la activación de las proteínas proapoptóticas Puma y Noxa, desencadenando la apoptosis.

La vía intrínseca, se caracteriza por la alteración de la integridad de la MME, produciendo la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (un gran canal no selectivo), pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma, tales como el citocromo c, las proteínas Smac/Diablo, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G.

Cuando el citocromo c es liberado de la mitocondria al citosol se une a un cofactor proteico denominado APAF-1, el cual en presencia de ATP, produce la oligomerización con la formación final de un complejo circular denominado apoptosoma, constituido por 7 moléculas de APAF-1, que dejan hacia el interior un dominio denominado CARD, semejante al dominio presente en la procaspasa 9, esto permite la unión de esta proenzima al complejo apoptosoma y su posterior activación (Figura 17).

Figura 17. Activación de la vía intrínseca de caspasas con formación del apoptosoma para la activación de la caspasa iniciadora 9. **A.** proteína APAF monomérica, **B.** formación del apoptosoma (Adaptado de *Nature Review, Molecular Cell Biology*, http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Apoptosomas&lang=2)

Las proteínas Smac/Diablo en el citosol, actúan como inhibidores de moléculas denominadas IAPs (proteínas que previenen la activación no regulada de las caspasas).

ACTIVACIÓN DE CASPASAS EJECUTORAS (VÍA EN COMÚN)

Aunque la activación de las dos vías es diferente, ambas convergen en evento final común, la activación de caspasas efectoras. Las caspasas 3, 6 y 7 activan ADNsas endógenas, tales como el factor de fragmentación del ADN (DFF40), la ADNasa activada por caspasa (CAD) y NUC70. Estas DNAsas cortan la región internucleosomal del ADN de doble hebra, generando fragmentos de ADN de 180-200 pares de bases (pb); simultáneamente se activan Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), alfa fodrina, la proteína nuclear NuMA, y proteasas que degradan proteínas del citoesqueleto, incluyendo citoqueratinas, entre otras. La

aparición de estos procesos son los responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos de las células apoptóticas.

En la figura 18 se resumen las vías de activación de la apoptosis.

Figura 18. Resumen de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis dependiente de caspasas. (Tomado de *Molecular Cell Biology, Nature Reviews*)

APOPTOSIS INDEPENDIENTE DE CASPASAS

A pesar del importante rol que posee la familia de proteínas caspasas en la iniciación y ejecución de la apoptosis, este tipo de muerte también puede ser desencadenada y ejecutada independientemente de la participación de estas enzimas (Bröker y col., 2005; Tait y Green, 2008).

Cuando se produce la apertura de poros en la membrana mitocondrial externa, se liberan del espacio intermembrana el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G, ambos intervienen en el clivaje del ADN en fragmentos de aproximadamente 1500 pb. Paralelamente, se produce el cese de síntesis de ATP y la generación de especies reactivas de oxígeno. Se ha comprobado que aunque las caspasas sean inhibidas experimentalmente, ante la liberación de éstos factores desde el espacio intermembranoso de la mitocondria, se produce irreversiblemente la muerte por apoptosis independiente de caspasas (Bröker y col., 2005; Tait y Green, 2008).

La duración de la apoptosis es variable, pero generalmente es un proceso relativamente corto (3-6 horas), incluso es más breve que la duración de la mitosis (Kerr y col., 1972).

MODULACIÓN DE LA APOPTOSIS POR HERPESVIRUS

La apoptosis es uno de los mecanismos por los cuales el organismo se protege de las infecciones virales. La penetración del virus a la célula, la expresión de genes virales y el comienzo de la replicación son algunos de los sucesos que alteran la homeostasis celular e inducen a la célula a iniciar un proceso que podría conducir a la muerte celular programada (Benetti y col., 2003). Este mecanismo, llevado a cabo en forma temprana en células infectadas por virus, actúa como una respuesta no específica del organismo para limitar la replicación viral y reducir o eliminar la diseminación del virus en el hospedador; constituyendo de esta manera un mecanismo de control natural de los focos de infección (Hay y Kannourakis, 2002).

A pesar de ello, en su proceso evolutivo muchos virus han seleccionado mecanismos específicos para eludir las defensas del hospedador utilizando diferentes estrategias. Entre ellas, algunos virus durante la infección codifican factores inhibitorios de la apoptosis para prolongar el ciclo celular y poder completar satisfactoriamente su ciclo de replicación. Otros virus inducen la apoptosis de la célula infectada para favorecer la diseminación de las partículas virales englobadas en los cuerpos apoptóticos, y ser fagocitadas por células vecinas facilitando así, la diseminación de la progenie viral hacia otras células (Teodoro y Branton, 1997; Nguyen y Blaho, 2009; Sciortino y col., 2008). Por lo tanto, la relación entre la infección viral y la apoptosis es bidireccional (Clarke y Tyler, 2009) y puede tener importantes efectos en su replicación y patogénesis (Kieff y Shenk, 1998)

La inhibición o modulación negativa de la apoptosis en células infectadas puede involucrar la disminución de la expresión de receptores celulares de muerte, la codificación de proteínas antiapoptóticas homólogas a las celulares, la inactivación de proteínas proapoptóticas y/o la interferencia con moléculas de señalización intracelular secretadas por la célula (Berrueta y col., 2007). La interferencia con la muerte por apoptosis, generalmente suele resultar en un incremento de la progenie viral, aunque también pueden ser requeridas otras estrategias para que su propagación sea efectiva (Miller y White, 1998).

Si bien los herpesvirus replican inicialmente en células epiteliales, tienen la capacidad de eludir la respuesta inmune del hospedador y establecer latencia en células no epiteliales. Durante este período expresan un número mínimo de genes virales, que son los estrictamente necesarios para mantener el virus en las células del hospedador (Berrueta y col., 2007); uno de los más estudiados es el LAT, al que se le han atribuidos acciones antiapoptóticas (Gupta y col., 2006; Shenk y Jones, 2008).

Estudios realizados in vitro con el Herpesvirus simple (HSV-1), en células homólogas (Galvan y col., 1999; Aubert y col., 2007) y heterólogas (Jerome y col., 2001) demostraron que durante su ciclo de vida, el virus modula negativamente la muerte por apoptosis asegurando la supervivencia de las células huéspedes durante el tiempo necesario para completar su ciclo de replicación (Jerome y col., 2001). Se comprobó que el HSV-1 bloquea la muerte celular (Perng y col., 2000; Jin y col., 2004; Aubert y col., 2007; Sciortino y col., 2008) mediante mecanismos dependientes e independientes de caspasa 3 (Galvan y col., 1999). Resultados

similares fueron descritos en cultivo de células de ganglio trigémino de ratón infectadas con HSV-1; esta acción podría relacionarse con el establecimiento de la latencia en células nerviosas (Jin y col., 2004).

Por otra parte, experiencias con el Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) en cultivo de células bovinas y no bovinas, demostraron que este virus modifica la relación entre las proteínas mitocondriales de la familia Bcl2, priorizando la actividad antiapoptótica hacia el tercio medio del ciclo de replicación viral, de esta manera interfiere con la activación de caspasas (De Martino y col., 2003; 2007).

Del mismo modo el Herpesvirus suino 1 (SuHV-1) interfiere con la apoptosis en células heterólogas y homólogas, produciendo notables cambios en los filamentos de actina, componentes del citoesqueleto involucrados en el transporte de la progenie viral, aunque esto no afecta el título viral final (Deruelle y col., 2010; Van den Broeke y col., 2011). Cuando se analizaron cortes de tejido de ganglio trigémino de cerdos experimentalmente inoculados con SuHV-1, se encontró que la apoptosis era regulada de manera negativa en respuesta a la infección viral, a modo tal que en los animales infectados se observó un menor número de células en apoptosis, respecto de los no infectados; jugando un rol importante en la reducción de la inmunoreactividad y enmascaramiento de sitios antigénicos (Alemañ y col., 2001). Si bien, la habilidad de SuHV-1 para inhibir la apoptosis en neuronas infectadas del ganglio trigémino es importante para el establecimiento y mantenimiento del estado de latencia, dicha inhibición no sería absoluta, sino temporaria, ya que durante largos estadios de la infección se identificaron cambios ultraestructurales característicos de la muerte por apoptosis, además de la activación de la caspasa 3.

Este fenómeno fue identificado también en cerebro y en ganglios espinales (Marcaccini y col., 2006).

En los distintos alphaherpesvirus se han identificado proteínas que bloquean la activación de la apoptosis durante la infección viral, entre ellas se ha demostrado que la glicoproteína G (gpG) (Jin y col., 2003), la proteína Us3 (Ladelfay col., 2011) y la proteína UL14 del BoHV-1 protegen a las células de riñón de feto bovino (MDBK) y de mieloma humano (K562) de la apoptosis inducida por shock osmótico mediante sorbitol (De Martino y col., 2007). Por su parte, el HVS-1 ejerce un efecto antiapoptótico mediante la expresión de la gpD (Zhou y col., 2003; Sciortino y col., 2008), la gpJ (Jerome y col., 2001a), las proteínas quinasas Us3 (Munger y Roizman, 2001; Munger y col., 2001; Benetti y Roizman, 2004; Poony col., 2006), Us5 (Jerome y col., 1999), la proteína Us11 (Javouhe y col., 2008; Sciortino y col., 2008), las proteínas g134.5, ICP4 (Sciortino y col., 2008), ICP22, ICP27 (Aubert y col., 1999) y el transcripto LAT (Thompson y Sawtell, 2000; Perng y col., 2000). Asimismo, las proteínas ICP4 (Leopardi y Roizman, 1996), la quinasa US3 (Deruelle y col., 2010) y el transcripto LAT (Geenen y col., 2005) también son expresados por el SuHV-1. Este virus suprime la apoptosis en células del ganglio trigémino en el hospedador natural (Alemañ y col., 2001), acción mediada por la proteína quinasa US3 (Deruelle y col., 2010).

Como se mencionó, la replicación de los alphaherpesvirus conlleva a la formación de diversos transcriptos que se denominan de acuerdo al momento del ciclo viral en el que se producen. Muchas de las proteínas antes mencionadas son codificadas por los genes inmediatamente tempranos (ICP27 y ICP4), tempranos (ICP10 PK), y tardíos (Us3, GpD, GpJ y LAT) (Nguyen y Blaho, 2009). Se han

encontrado homología entre los genes que codifican para bloquear la apoptosis en los diferentes herpesvirus, por ejemplo en Us3, ICP27, ICP4, ICP22 y LAT (Carpenter y col., 2007). La importancia de la identificación de proteínas involucradas en dichos mecanismos podría dar lugar a aplicaciones terapéuticas, tales como el desarrollo de fármacos específicos dirigidos a interferir con la función de dichas moléculas (Galvan y col., 1999).

A pesar del reconocido efecto antiapoptótico temporal descrito en varios miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, también se han descrito efectos inductores o desencadenantes de la muerte celular en algunos tipos celulares. Estos efectos pueden ocurrir al comienzo del ciclo de replicación viral (Miles y col., 2007) como resultado de una respuesta primogénica a la infección, o hacia el final del mismo para beneficiar la diseminación viral (Devireddy y col., 1999; Munger y Roizman, 2001).

De esta manera, durante la infección con el Herpesvirus caprino 1 (CpHV-1) se demostró que el porcentaje de apoptosis en cultivos de linfocitos infectados era mayor que en aquellos no infectados, hallazgo acompañado por un incremento de la actividad de caspasa 3 en los primeros (Pagnini y col., 2005). La modulación positiva de la apoptosis llevada a cabo por este virus involucra la vía extrínseca y la intrínseca, debido a la activación de las caspasas 8 y 9 (Longo y col., 2009).

Sin embargo, en la interacción con la apoptosis no todos los herpesvirus parecen seguir un patrón estable, así por ejemplo, el BoHV-1 es capaz de desencadenar la muerte en cultivos de linfocitos de sangre periférica (Hanon y col., 1999), en células de linfoma bovino B (Geiser y col., 2008), en neuronas sensoriales

(Delhon y col., 2002) y en células epiteliales MDBK luego de completar su ciclo de replicación viral (Xu y col., 2012). De la misma manera, el SuHV-1, a pesar de desencadenar una modulación negativa sobre la apoptosis, en algunos tipos celulares ha desarrollado eficientes estrategias para evadir la respuesta inmune celular mediante la inducción de la apoptosis en células del sistema inmune, tales como macrófagos y linfocitos citotóxicos (Alemañ y col., 2001). Otros autores describieron que el incremento de la actividad de caspasa 3 es directamente proporcional al tiempo de infección viral en cultivos de células heterólogas infectadas con SuHV-1 (Cheung y col., 2000), hecho que demuestra la capacidad del virus para manipular la muerte en la células huéspedes (Koyama y Adachi, 1997).

En experiencias con el Herpesvirus humano 3 (virus de la Varicela Zoster) en las que se infectaron líneas celulares homólogas (cultivos de neuronas sensoriales y fibroblastos), se encontraron diferentes porcentajes de apoptosis luego de la infección; si bien las neuronas no mostraron cambios morfológicos característicos de la apoptosis, sí se observaron en los fibroblastos, hecho que sugiere que la respuesta a la apoptosis en las células infectadas es dependiente del tipo celular. La habilidad viral para establecer un exitoso estado de latencia depende de la viabilidad de las neuronas infectadas durante este proceso. Asimismo, la función de modulación viral de la apoptosis puede jugar un importante rol durante la reactivación del virus, permitiendo la exitosa producción de nuevos viriones y el transporte de los mismos por vía axonal (Hoody col., 2003).

Por lo tanto, los herpesvirus serían capaces de mediar de distinta manera la apoptosis según las circunstancias. El motivo por el cuál en algunas células la

infección con herpesvirus desencadena la muerte por apoptosis, mientras que en otras el mecanismo opuesto, podría deberse a un equilibrio por parte del virus en lograr establecer largos períodos de supervivencia en algunos tipos celulares, sacrificando la replicación viral en otros (Kieff y Shenk, 1998).

De todas maneras, algunos de los trabajos sobre la capacidad de inducir o desencadenar la muerte por apoptosis, datan principalmente de momentos posteriores al primer ciclo de replicación de los alphaherpesvirus (Koyama y Adachi, 1997), entre las 24 y 72 h pi (Pagnini y col., 2005; Longo y col., 2009) y no, dentro del ciclo de replicación viral (18-20 h).

Hay otros herpesvirus (Virus Epstein-Barr - EBV, Citomegalovirus humano) que portan, a la vez, genes que pueden tanto bloquear como inducir la apoptosis. Aparentemente, el desencadenar la muerte por apoptosis sería un evento favorable durante los estadios tardíos del ciclo de replicación viral, mientras que su inhibición podría ser un paso importante en el cambio a la fase de latencia. Por lo tanto, los cambios de la fase de latencia a la fase lítica serían dependientes, al menos en parte, de la regulación de la apoptosis (Teodoro y Branton, 1997).

El control de la maquinaria apoptótica celular por los virus podría ser crítico para su replicación y para la provisión de un adecuado medio de propagación de la progenie viral.

En los últimos años se comenzó a estudiar cuál sería la interacción del EHV-1 con la muerte por apoptosis en las células infectadas, en cultivos de neuronas murinas infectadas con cepas locales de EHV-1 (Polonia). La apoptosis se evaluó por marcación de Anexina V/Ioduro de propidio a través de citometría de flujo,

coloración nuclear y determinación de cambios nucleares morfológicos, fragmentación internucleosomal del ADN por la técnica de TUNEL, y actividad de caspasas 3 y 7. Luego de la infección muchas neuronas permanecieron sin cambios apoptóticos o necróticos por más de ocho semanas (Cymerys y col., 2013). En otros estudios se demostró la aparición de cambios en la polimerización de los microfilamentos de actina en células heterólogas (Vero) y homólogas (ED) infectadas por EHV-1. De esta manera, a las 24 hs pi la conformación del citoesqueleto en las células infectadas había sufrido drásticos cambios, respecto al control, los que podrían deberse a modificaciones intracelulares a beneficio del transporte de viriones (Turowska y col., 2010).

En la mayoría de las experiencias encontradas en la bibliografía, la muerte por apoptosis fue inducida experimentalmente sobre cultivos de células, mediante su incubación con distintos estímulos, tales como *shock* térmico (Carpenter y col., 2007; Javouhey y col., 2008) y osmótico, empleando sorbitol y manitol (Galván y col., 1999; Perkins y col., 2002; De Martinoy col., 2003; Geenen y col., 2005), exposición a fármacos tales como estaurosporina (Van den Broeke y col., 2011) y cicloheximida (Ladelfa y col., 2011) o mediante ligandos de muerte como TNF α y FAS (Bertin y col., 1997; Jerome y col., 2001a; Nguyen y Blaho, 2009). Se ha encontrado que concentraciones elevadas de sorbitol producen alteraciones en la membrana plasmática, activando los receptores de muerte, mientras que la incubación con estaurosporina, un inhibidor de la proteína quinasa C, induce la activación de caspasa 3 a través de la vía mitocondrial (Greenen y col., 2005).

El descubrimiento de moduladores virales de la muerte celular y la señalización innata ampliarán la adquisición de las herramientas necesarias para el control de la infección viral (Postigo y Ferrer, 2009). La identificación de nuevos blancos moleculares para el desarrollo oportuno de agentes antivirales y el diseño de vacunas dependerán del conocimiento que se tenga sobre los mecanismos de escape utilizados por los virus y la respuesta inmune antiviral (Geenen y col., 2005; Berrueta y col., 2007).

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que se desconoce de qué manera interactúa el EHV-1 con el mecanismo de respuesta apoptótica de las células infectadas, se plantean las siguientes hipótesis:

- 1) el EHV-1 modifica la respuesta apoptótica de la célula infectada,
- 2) el EHV-1 detiene la apoptosis de líneas celulares homólogas y heterólogas infectadas,
- 3) el EHV-1 interfiere con el mecanismo de la apoptosis dependiente de la activación de la vía de las caspasas,
- 4) existen diferencias en los porcentajes de apoptosis en pulmones de ratones BALB/c infectados experimentalmente, con respecto a los pulmones de los animales control.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la apoptosis como mecanismo patogénico y de evasión de la respuesta inmune del hospedador ante la infección por *Herpesvirus equino 1*.

Objetivos particulares

- 1- Analizar *in vitro* la existencia de mecanismos de interferencia con la apoptosis en células infectadas por EHV-1.
- 2- Estudiar en pulmones de animales infectados el efecto de la infección por EHV-1 sobre la apoptosis.

CAPÍTULO 1:

EXPERIENCIAS *IN VITRO*

OBJETIVO

Analizar *in vitro* la existencia de mecanismos de interferencia en la apoptosis de células infectadas por EHV-1.

PARTE A: ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO *IN VITRO*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarización de los modelos de líneas celulares a utilizar.
- Estandarización de la concentración necesaria y el tiempo de acción óptimos de las sustancias inductoras de apoptosis a utilizar.

El EHV-1 replica en cultivo de células epiteliales de origen equino y no equino, su ciclo de replicación es de aproximadamente 18 – 20 h. La manifestación visible de su replicación en monocapas de células es un efecto citopático lítico, con producción de sincicios (Dunowska, 2014).

El sorbitol y otros agentes como por ejemplo la estauroporina, son utilizados para inducir la muerte por apoptosis *in vitro* (Koyama y col., 2000; De Martino y col., 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

• Estandarización de los modelos de líneas celulares

Elección del modelo celular:

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se evaluaron:

- a) cultivos de diversas líneas celulares heterólogas (células no equinas): MDBK (células de riñón de feto bovino), RK13 (células de riñón de conejo) y VERO (células de epitelio renal de mono);
- b) cultivos de células homólogas (células equinas): cultivo primario de células de córnea equina y células de línea ED (dermis equina) (Anexo A).

La selección de estas líneas celulares se realizó teniendo en cuenta que el EHV-1 replica y produce efecto citopático en todas ellas.

Las líneas celulares heterólogas utilizadas fueron provistas por la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC). La línea ED fue cedida por el Instituto Biológico de San Pablo y los cultivos primarios de córnea fueron producidos en la Catedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Todas las líneas fueron conservadas en nitrógeno líquido (-196°C).

Para el desarrollo de los cultivos se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, Invitrogen, USA) suplementado con 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, USA), 100 UI/ml de penicilina – 100 µg/ml de estreptomicina (Ritchet, Buenos Aires, Argentina), 100 UI/ml de nistatina (Parafarm, Buenos Aires, Argentina) y 10 % de

suero fetal bovino (SFB) (MEM-C). Para el mantenimiento (MEM-M) el SFB fue reducido a 2 %.

Para la remoción de las células se utilizó tripsina (0,25 % w/v) – EDTA (0,2 % w/v) (Sigma – Aldrich, USA) (Anexo B).

Para la producción del *cultivo primario de células de córnea equina* se siguió el protocolo tradicional de explanto. Las muestras de córneas equinas fueron cedidas gentilmente por el Dr. Gustavo Zapata (Hospital Escuela de la FCV-UNLP). Luego de su extracción las muestras fueron transportadas de forma refrigerada (4°C) en MEM suplementado con antibióticos (penicilina y estreptomicina) y antimicóticos (nistatina), y libre de SFB. Una vez en el laboratorio se lavaron 4 veces en solución salina tamponada (PBS) con antibióticos y antimicóticos (Anexo). Posteriormente se cortaron secciones de aproximadamente 3 x 3 mm y se colocó a cada una de ellas en un pocillo de una placa de 6 (Cellstar, GreinerBio-One), con el objetivo de lograr la adhesión del tejido a la placa. Luego de aproximadamente 1 h, y una vez confirmada la adhesión, se agregaron 3 ml de MEM-C, se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y se observaron a diario con un microscopio invertido (Olympus CK 2, ULWCD 0.3. Japón). Cuando la monocapa celular estuvo formada se disgregó con tripsina– EDTA y se diluyó 1: 2 con MEM-C.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó mediante la tinción con azul de tripán (concentración 5%), y el recuento celular se realizó en cámara de Neubauer mediante microscopía óptica (Microscopio Olympus BH-2), utilizando:

5×10^5 células viables/ ml.

Las células fueron cultivadas en frascos T25 y T75 (Greiner bio-one, International GmbH, Kremsmünster, Austria), en placas de 6 ó 24 pocillos (Greiner bio-one, International GmbH, Kremsmünster, Austria) o en cubreobjetos (Chance, Inglaterra), según la experiencia a desarrollar.

- **Estandarización de la concentración necesaria y el tiempo de acción óptimos de las sustancias inductoras de apoptosis a utilizar.**

Inducción de la apoptosis:

Los ensayos que se describen a continuación estuvieron destinados a establecer la concentración y el tiempo adecuados para obtener la máxima inducción de muerte por apoptosis. Se utilizó sorbitol (Anedra, Indonesia) tanto en cultivos de células heterólogas como en homólogas (Jerome y col., 2001; De Martino y col., 2003; Jin y col., 2004; Aubert y col., 2007, Sciortino y col., 2008).

Para evidenciar los mecanismos de muerte en los cultivos celulares no infectados se cultivaron las células en placas de cultivo de 6 pocillos con MEM-C y

se les indujo la muerte por apoptosis mediante la incubación con las siguientes concentraciones de sorbitol: 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 M durante 1 h a 37°C. Al cabo de dichos períodos de tiempo, se retiró el sorbitol y se colocó MEM-M. Posteriormente se realizó un ensayo similar recolectando las células a diferentes tiempos post inducción: 30 minutos (min), 1, 2, 3, 4 y 5 h.

La diferenciación morfológica entre células apoptóticas y necróticas se realizó mediante tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina (bromuro de etidio –EB, 200g/ml y naranja de acridina –AO, 200g/ml) (solución de Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.). La tinción con AO permite discriminar entre células normales, apoptóticas y necróticas. Las células normales y apoptóticas en un estadio temprano se tiñen de color verde brillante, mientras que las células apoptóticas en un estadio tardío y las necróticas se tiñen de color anaranjado brillante por EB, debido a la pérdida de la integridad y función de la membrana plasmática. Los cambios morfológicos nucleares que se evaluaron para determinar la apoptosis celular fueron la presencia de condensación y formación de cúmulos de cromatina (Sciortino y col., 2008) conjuntamente con la coloración verde brillante otorgada por AO.

Para ello, las células se recolectaron con tripsina-EDTA, se lavaron dos veces con solución de PBS, se tomaron muestras de 50 µl de la suspensión celular con ~ 5000 células viables por cada grupo, se mezclaron con 3µl de la mezcla EB-AO y 5 µl de cada mezcla se extendieron en portaobjetos y se cuantificaron con microscopio óptico (BX51, Olympus Co., Japón) a una magnificación de 40X utilizando un objetivo de 40X (NA 0,75). Por cada grupo experimental se contaron ~ 500 células

que se clasificaron según las características nucleares en células normales o apoptóticas

Infección celular por EHV-1

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa viral argentina de EHV-1 denominada AR8. Esta cepa se aisló en la Cátedra de Virología, de la FCV-UNLP en el año 1996, a partir del hígado de un feto abortado proveniente de un establecimiento ubicado en la ciudad de Magdalena (Provincia de Bs. As.) que en el año 1995 había registrado una tormenta de abortos (dato no publicado). Dicha cepa fue multiplicada en cultivos de la línea celular RK13 con MEM-C. Desde su aislamiento se realizaron 7 pasajes sobre células RK13 y se preparó un *stock* viral que fue titulado por el método de Reed y Muench (1934) y conservado a -70°C . Parte de este *stock* viral se conserva actualmente en N_2 líquido. El título utilizado fue de $10^{5.5}$ dosis infectante para cultivo de células 50% por ml ($\text{DICC}_{50}/\text{ml}$) y fue controlado cada 4 meses.

Para corroborar la replicación viral en dos de las líneas celulares utilizadas en este trabajo (MDBK y ED), se determinó el número de copias del gen que codifica para la glicoproteína C (gpC) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La qPCR se realizó utilizando un par de cebadores específicos de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 369 pb correspondiente a una región conservada del gen gpC de EHV-1:

5'-CAAC AATCGGGGAGGCGTCATA-3' (posición 21582 - 21603) y

5'-GTAGCATAGACTGGTACAGGGA-3' (posición 21929 - 21950).

Se cultivaron las células con MEM-C en placas de 6 pocillos durante aproximadamente 24 h, hasta que se completó la monocapa. Se infectaron con la cepa AR8 (MOI 10), se retiró el inóculo luego de 1 h y se incubaron con MEM-M hasta el momento de su recolección mediante *scrapers*, a diferentes tiempos posinfección (pi) (0, 3, 9 y 18 h pi). La extracción del ADN celular de cada una de las muestras se realizó utilizando un *kit* comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) según las indicaciones del fabricante.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (uniCyclerBio-Rad, EE.UU.), con un volumen final de 25 µl, utilizando los siguientes reactivos y volúmenes: 2,5 µl de Taq Buffer 10 X con KCl, 1,5 µl de Cl_2Mg , 0,75 µl de dNTP, 0,75 µl de Taq DNA *polymerase* (Fermentas, EP0403), 1 µl del oligonucleótido directo (10 µM), 1 µl del oligonucleótido indirecto (10 µM), 14,5 µl de agua libre de nucleasas y SYBRGreen (Promega). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 40 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min (Galosi y col., 2001).

Diseño experimental

Una vez estandarizadas las variables de línea celular a utilizar, concentración y tiempo de exposición del inductor de apoptosis, se formaron 3 grupos experimentales para el desarrollo de la parte b de esta tesis:

- I. Células no infectadas, utilizadas como control negativo de infección (**Cc**),
- II. Células no infectadas, inducidas a apoptosis, utilizadas como control positivo de apoptosis (**Apo+**),

III. Células infectadas por EHV-1, cuyos índices de muerte por apoptosis fueron evaluados a diferentes horarios pi **(Inf)**,

Considerando que el ciclo de replicación viral del EHV-1 se completa en aproximadamente 18 h, se pretendió tomar un punto horario representativo de cada etapa de replicación viral: etapa temprana, media y tardía de la infección. Los horarios pi elegidos para evaluar la apoptosis en los grupos infectados **(Inf)** fueron los siguientes:

- 3 h
- 9 h
- 18 h

RESULTADOS

Elección del modelo celular

Modelo de línea celular heterólogo

De las tres líneas ensayadas, la línea celular MDBK fue la seleccionada para la realización de todos los experimentos. La selección se basó en su rápido crecimiento (24 – 36 h) (Figura 19).

Figura 19. Monocapa de células MDBK normales observadas con microscopio invertido a 5X (imagen izquierda) y 20X (imagen derecha) de aumento.

Modelo de línea celular homólogo

Para las experiencias con células homólogas se seleccionó la línea celular ED (Figura 20), debido a su mayor crecimiento, estabilidad y homogeneidad en comparación con el cultivo primario de células corneales (Figura 21).

Figura 20. Monocapa de células ED observadas con microscopio invertido a 5X.

Figura 21. Monocapa de células de cultivo primario de córnea equina observadas con microscopio invertido a 5X.

Inducción de la apoptosis

Se ensayaron distintas concentraciones y tiempos de inducción de apoptosis con sorbitol. Para el recuento celular de ambos parámetros, se consideraron células apoptóticas a aquellas teñidas con naranja de acridina (verde) y en necrosis a aquellas células teñidas con bromuro de etidio (anaranjado), debido a que durante este proceso la membrana celular pierde su capacidad de regular la permeabilidad selectiva. La figura 22 muestra los cambios nucleares ocurridos durante la apoptosis en células teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio.

Figura 22. Células en apoptosis teñidas con naranja de acridina (verde) con evidencia de compactación y fragmentación nuclear, conjuntamente con células necróticas teñidas con bromuro de etidio (naranja).

Las figuras 23 y 24 muestran el porcentaje de células apoptóticas luego del tratamiento con sorbitol a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento, respectivamente, en las líneas celulares MDBK y ED.

Figura 23. Porcentaje de células MDBK (células de riñón de feto bovino) y ED (células de dermis equina) inducidas a la apoptosis con diferentes concentraciones de sorbitol. Tinción con bromuro de etidio/ naranja de acridina.

Figura 24. Porcentaje de células MDBK (células de riñón de feto bovino) y ED (células de dermis equina) inducidas a la apoptosis con sorbitol 1 M. Tinción con bromuro de etidio/ naranja de acridina.

De estos resultados se desprende que la concentración de sorbitol 1 M fue la que indujo el mayor porcentaje de células en apoptosis mientras que de los tiempos ensayados, 1 h de tratamiento fue el tiempo óptimo para la recolección de la mayor cantidad de células en apoptosis.

Infección celular por EHV-1

La capacidad del EHV-1 para infectar las células MDBK y ED se corroboró mediante la determinación de los números de copias para el gen que codifica para la gpC por qPCR.

Los resultados obtenidos para ambos tipos celulares marcaron una tendencia similar. Se evidenció un aumento en la expresión de la gpC en relación al avance del ciclo de replicación viral (Figura 25), desde las 3 a las 18 h pi.

Figura 25. Números de copias del gen que codifica para gpC de EHV-1 en lisados de células MDBK y ED infectadas, a diferentes horarios post infección.

DISCUSIÓN

En este estudio se trabajó con diferentes tipos de células epiteliales, las cuales permiten la replicación y adaptación adecuada del EHV-1. Al tratarse de células epiteliales nos permiten inferir que nuestros resultados probablemente sean extrapolables a lo que sucede *in vivo* en el epitelio nasofaríngeo, sitio de replicación primaria durante la infección por el virus en el hospedador natural (Dunowska, 2014). El uso de células epiteliales permitió estandarizar *in vitro* la metodología a aplicar en el desarrollo de esta tesis. Dichas líneas celulares se encuentran dentro de aquellas recomendadas por la OIE para el diagnóstico y diferenciación entre la infección por EHV-1 y EHV-4 (OIE, 2008).

El cultivo primario realizado a partir de células corneales equinas no resultó adecuado para las experiencias, debido a los inconvenientes encontrados para su crecimiento, ya que no pudo ser multiplicado por más de 3 pasajes, y a la diversidad de características morfológicas que presentaban sus células.

La elección de líneas celulares con un crecimiento rápido (24 – 36 h) se fundamentó en permitir que expresen en un tiempo corto la totalidad de los receptores de membrana que utiliza el virus como puerta de entrada (Flint y col., 2004). La cepa viral elegida fue de un aislamiento realizado en Argentina que no posee cambios genómicos de significativa importancia, en comparación con las cepas abortigénicas de referencia más ampliamente estudiadas (Ab4 y V592) (Martin Ocampo y col., 2009; Fuentealba y col., 2011). Se trabajó con un MOI 10 en base a otros trabajos tomados en cuenta como bibliografía de referencia (Jerome y col., 1999; Nakamichi y col., 2001; Longo y col., 2009; Van den Broeke y col., 2011;

Soboll Hussey y col., 2014), en donde se sugiere que al utilizar MOI elevados, se asegura la infección del 100 % de las células (Aubert, et al. 2007).

Las células homólogas (ED) mostraron una mayor tendencia de expresión de la gpC respecto de las células heterólogas (MDBK), a lo largo de todo el ciclo de replicación viral. La gpC es una proteína estructural del virus, y el aumento en su expresión confirmó su replicación dentro de las células. El incremento en el número de copias génicas para la gpC fue coincidente con lo demostrado por otros investigadores para la gpB, otra de las glicoproteínas de la envoltura viral (Soboll Hussey, y col. 2014).

El sorbitol ha sido utilizado ampliamente como inductor de muerte por apoptosis. Los resultados hallados en las experiencias sobre la estandarización de la concentración y tiempo de inducción concuerdan con los obtenidos por otros autores (Murata y col., 2002; De Martino y col., 2003, 2007). El recuento de células en apoptosis y su diferenciación con células que estaban atravesando por un proceso necrótico, se llevó a cabo por una técnica que contempla la presencia de cambios morfológicos junto a la permeabilidad de la membrana plasmática.

Al comenzar el desarrollo de este trabajo de tesis se había incluido dentro del diseño experimental a un grupo que contemplaba células infectadas con EHV-1 e inducidas con sorbitol a la muerte por apoptosis, analizadas a diferentes horarios pi **(Inf-Apo)**, con la finalidad de evaluar cómo respondían al estímulo apoptótico las células infectadas, y si esta respuesta tenía algún tipo de vinculación con el momento de replicación viral. Sin embargo, al comprobarse que los resultados no diferían estadísticamente de los controles positivos de muerte **(Apo+)**, sumado a que

producían un análisis confuso con el resto de los grupos, se decidió no utilizar a este grupo experimental.

CAPÍTULO 1:

EXPERIENCIAS IN VITRO

OBJETIVO

Analizar *in vitro* la existencia de mecanismos de interferencia en la apoptosis de células infectadas por EHV-1.

PARTE B: DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS HETERÓLOGAS Y HOMÓLOGAS INFECTADAS

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Analizar *in vitro* la existencia de mecanismos modulatorios y/o de interferencia en la apoptosis de células infectadas con EHV-1.

Muchos virus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* modulan la respuesta apoptótica en las células infectadas como parte de una estrategia para evitar que mueran en forma prematura, y así poder completar su replicación y establecer, en algunos casos, una fase de latencia (Perng y col., 2000; Munger y col., 2001; De Martino y col., 2003; Aubert y col., 2007). Sin embargo, los mecanismos pro-apoptóticos que pueden ser activados después de la replicación podrían mejorar la eficiencia en la difusión de la progenie viral a las células vecinas (Cheung y col., 2000; Pagnini y col., 2005; Longo y col., 2009).

La apoptosis puede detectarse en base a los cambios morfológicos y bioquímicos que suceden en las células y que permiten diferenciarla de los demás tipos de muerte celular.

En investigaciones con EHV-1, Cymerys y col. (2012) demostraron el efecto inhibidor del virus sobre la apoptosis de cultivos de células neuronales de ratón infectadas. Para el desarrollo de este objetivo específico, se estudió el efecto de EHV-1 en dos líneas de células epiteliales diferentes, para caracterizar su comportamiento sobre la apoptosis de células huésped.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y condiciones de cultivo

Las células heterólogas MDBK y homólogas ED fueron utilizadas en la totalidad de los ensayos. Ambas líneas celulares crecieron y se mantuvieron de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 Parte A.

Las células se cultivaron en frascos de 25 cm², placas de 6 pocillos (10 cm²), o sobre cubreobjetos de aproximadamente 2 cm², dependiendo del método de detección de apoptosis a utilizar.

Diseño experimental

Para todas las experiencias *in vitro*, se trabajó con el diseño descripto:

- a- Células no infectadas, utilizadas como control negativo de infección (**Cc**),
- b- Células no infectadas, inducidas a apoptosis, utilizadas como control positivo de apoptosis (**Apo+**),

c- Células infectadas por EHV-1 (**Inf**), cuyos porcentajes de muerte por apoptosis fueron evaluados a diferentes horarios pi,

- i. 3 h pi (**Inf 3**),
- ii. 9 h pi (**Inf 9**),
- iii. 18 h pi (**Inf 18**).

En la totalidad de los grupos se removió el MEM-M, y se reemplazó en el grupo (**Cc**) por MEM libre de SFB; en el grupo (**Apo+**) por 2 ml de Sorbitol 1M; y en los grupos (**Inf**) por el inóculo de la cepa viral con un MOI 10.

Todos los grupos se incubaron por 1 h a 37°C, posteriormente se retiraron todos los tratamientos, las monocapas celulares se lavaron con 2 ml de PBS estéril y finalmente se reincubaron con MEM-M.

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Determinación de cambios morfológicos por coloración nuclear:

Ambas líneas celulares (MDBK y ED) cultivadas en frascos de 25 cm² e inoculadas de acuerdo al diseño experimental, se recolectaron con tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C. Se realizaron dos lavados con PBS, se tomaron muestras de 50 µl de cada suspensión celular con ~ 12500 células viables por cada grupo, y se mezclaron con 3 µl AO/EB. Posteriormente, se extendieron 5 µl de cada mezcla sobre un portaobjetos, y se observaron con un microscopio óptico (BX51, Olympus

Co., Japón) a una magnificación de 40X con una apertura numérica de 0,75, para su cuantificación.

Por cada grupo experimental se contaron ~ 500 células que se clasificaron según sus características tintoriales y morfológicas nucleares en células normales o apoptóticas.

Determinación de cambios ultraestructurales:

Se identificaron cambios ultraestructurales característicos de la muerte por apoptosis mediante la visualización de células por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para el crecimiento de las células en este caso se utilizaron placas de 6 pocillos de 10 cm² cada uno, de manera que 2 pocillos fueron infectados con virus y observados a las 9 h pi, y dos de cada uno de los restantes se incubaron con sorbitol o MEM-M, de acuerdo al diseño.

Al cabo del tiempo estipulado todos los pocillos se lavaron 3 veces con PBS para eliminar la totalidad del medio de cultivo, ya que trazas del mismo podrían interferir con el agente fijador utilizado en el procesamiento formando cristales que dificultan la realización de los cortes. Las monocapas celulares fueron fijadas con 1 ml de glutaraldehído por pocillo durante 2 h a 4°C, se recolectaron con *scraper* y fueron colocadas en tubos *ependorf*, y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. Las muestras se conservaron refrigeradas hasta que fueron llevadas al servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, en donde y continuando con la preparación de las muestras se incluye el tratamiento con

tetraóxido de osmio. Para la visualización se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1200EXII (Japón) del mencionado servicio.

Se evaluó la presencia de partículas virales dentro de las células, y cambios que caracterizan a la muerte por apoptosis como condensación y fragmentación nuclear.

Determinación del patrón de fragmentación de ADN celular:

a- Mediante corrida electroforética en gel de agarosa

La muerte por apoptosis produce la fragmentación del ADN a nivel internucleosomal, generando fragmentos de aproximadamente 180 – 200 pb (Jin y col., 2004), y un patrón característico en escalera cuando el ADN es sometido a electroforesis en geles de agarosa.

Las células de todos los grupos experimentales cultivadas en frascos de 25 cm² se inocularon según el diseño experimental descrito, se recolectaron con tripsina-EDTA, y se lavaron con PBS estéril. La extracción de ADN se realizó utilizando un *kit* comercial (Promega, Madison, EE.UU) según las indicaciones del fabricante. La corrida electroforética de las muestras se realizó en gel de agarosa al 1,5 % durante 4 h a 80V, y posteriormente se tiñó con EB 0,5g/ml, y se observó bajo luz UV. El tamaño de las bandas se calculó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen, Milán, Italia) (Anexo D1).

b- A través de TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling)

Durante la apoptosis las endonucleasas que digieren el ADN dejan los extremos 3'hidroxilo terminales libres, los que se pueden marcar mediante la incorporación catalítica de nucleótidos marcados con fluorescencia - trifosfatodesoxiuridina F-dUTP, por medio de la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT).

Las células cultivadas en cubreobjetos se incubaron durante 1 h a 37°C con el *kit In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche, Mannheim, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego fueron lavadas dos veces con PBS con 0,5% de *Tween* 20 (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemania). Los núcleos se tiñeron con 5 µg/ml de DAPI (6-diamidino-2-fenilindol - Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó el medio de montaje acuoso FluoroSave™ (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) y se realizó la observación mediante microscopía confocal (FV1000, Olympus Co., Japón) con el *software* FV10-ASW 4,0 (Olympus, Japón). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X, NA 0,95 UPLSAPO. Para marcación positiva del TUNEL se utilizó el fluoróforo Texas Red, cuya máxima absorción se obtiene a una longitud de onda de 559 nm y bajo el microscopio se observa con una fluorescencia roja, mientras que para la marcación de todos los núcleos se utilizó el fluoróforo DAPI (4',6-díamino-2-fenilindol), cuya máxima absorción se obtiene a una longitud de onda de 358 nm y bajo el microscopio se observa con una fluorescencia azul. Los filtros utilizados fueron el filtro BA575-675 y el BA430-455 (anexo H1) para ambos fluorocromos respectivamente. El recuento de células apoptóticas se realizó usando la función basada en el histograma automático del *software*.

Relación anexina V/ ioduro de propidio

Durante la muerte por apoptosis se produce la traslocación del fosfolípido fosfatidilserina, desde la hoja citosólica hacia la hoja extracelular de la membrana plasmática. Este cambio puede ser detectado con el uso de anexina V, que en combinación con ioduro de propidio (IP), permite discriminar también células apoptóticas de necróticas. La anexina V se une a la fosfatilserina, aunque no es capaz de ingresar al interior de las células que aún poseen su membrana plasmática íntegra, posibilitando de esta manera la detección de la externalización del fosfolípido solo en las células que se encuentran en apoptosis temprana. El IP, por su parte, es una tinción vital que permite reconocer a células que poseen alterada la membrana celular, evento que ocurre durante la apoptosis tardía y la necrosis. Por lo tanto, la combinación de anexina V con IP hace posible diferenciar entre células apoptóticas tempranas (anexina V positiva), células apoptóticas tardías/ células necróticas (anexinaV/IP positivos), células necróticas (positivas a IP) y células vivas (sin ninguna tinción).

Teniendo en cuenta dichas propiedades, se utilizó una doble tinción con anexina V-FITC/IP y se analizó cuantitativamente por citometría de flujo. Las células cultivadas en placas de 6 pocillos de 10 cm² e inoculadas fueron lavadas con PBS estéril, recolectadas mediante el uso de *scrapers*, resuspendidas en 500 µl de PBS, lavadas dos veces e incubadas con anexina V al 1% (BD Biosciences, San Jose, EE.UU.) durante 20 min en oscuridad. Inmediatamente antes de la cuantificación en citómetro, se añadió IP al 10%. La apoptosis temprana (anexinaV+/PI-) fue diferenciada de la apoptosis tardía (anexinaV+/PI+) y se cuantificaron los eventos

para cada una de ellas. Se utilizó un citómetro FACS Calibur (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.UU.). La población de células se seleccionó usando los parámetros de tamaño y complejidad celular (FSC y SSC respectivamente) en las muestras de control, utilizándose posteriormente el mismo parámetro para cada una de las muestras experimentales.

Determinación de la participación de caspasas

a-Determinación de la activación y acción de caspasas efectoras por inmunofluorescencia:

Las caspasas se encuentran en las células en estado inactivo (como procaspasas), su activación se desencadena durante la apoptosis. Si bien existen otros mecanismos apoptóticos que no involucran la activación y acción de esta familia de enzimas, la activación de ciertas caspasas es un fiel indicador de muerte celular por apoptosis, debido a que algunas de ellas solamente son activadas bajo estas circunstancias. La caspasa 3 es una de las más reconocidas, y una de las responsables de romper proteínas estructurales de la célula, como aquellas del citoesqueleto y otras proteínas, como la *ADP-ribose polymerase* (PARP). Entre las proteínas del citoesqueleto, la citoqueratina 18 es uno de los blancos de las caspasas efectoras, que luego de ser escindida deja libre un producto que es reconocido específicamente por el Ac monoclonal M30 Cyto Death (Roche, Mannheim, Alemania).

Según lo mencionado, se determinó y cuantificó el clivaje de la citoqueratina18 en cultivos de células MDBK y ED, mediante el uso del *kit* comercial. Las monocapas celulares cultivadas en cubreobjetos se fijaron con acetona fría durante 30 min; una vez secas se conservaron a temperatura ambiente (Ta) hasta completar el diseño programado. Una vez completado, se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min y se incubaron durante 1 h a 37°C con el Ac monoclonal de ratón M30 CytoDeath diluido 1:10 en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%. Luego, se lavaron dos veces con PBS con 0,5% de *Tween* 20 (Merck), y se incubaron durante 1 h a 37°C con el Ac secundario anti-ratón Alexa Fluor™ 488 producido en cabra (Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EE.UU.) y diluido 1:1000 en BSA al 0,1%. Para la tinción de los núcleos, se utilizó DAPI durante 15 min a Ta. Finalmente, luego de dos lavados con PBS, se realizó el montaje de los cubreobjetos utilizando el medio acuoso FluoroSave™, y los preparados fueron analizados con microscopía confocal. La cuantificación de las células se realizó utilizando un analizador de imágenes, reconociendo como positivas a M30 a aquellas células con fluorescencia citoplasmática verde (Anexo H1). El experimento se repitió tres veces y los resultados se expresaron como la media $\pm$ 1 desviación estándar.

b-Determinación de la activación de caspasas efectoras por western blot:

Se estudió la presencia de caspasas activas mediante *western blot*. Para ello las células de todos los grupos experimentales fueron recolectadas con *scrapers*, lavadas 3 veces con PBS estéril con centrifugaciones de 5000 rpm durante 20 min

entre cada lavado, y el *pellet* se lavó 2 veces con *buffer* TE (Tris-EDTA) intercalado con centrifugaciones de 5000 rpm durante 15 min. El *pellet* final fue resuspendido en Tris con 1% de Nonidet P40 en un volumen 100 veces menor que el sobrenadante de cultivos original durante 1 h; al cabo de ese tiempo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min, se descartaron los restos celulares y el sobrenadante se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 h. Finalmente, el nuevo sobrenadante fue fraccionado y conservado a -20°C.

Debido a la baja sensibilidad de la técnica, las células del grupo (Apo+) (incubado con sorbitol 1M durante 1 h) fueron recolectadas a diferentes tiempos pos tratamiento (pt) (1, 3 y 5 h) con el objetivo de obtener un control positivo del Ac.

Separación de proteínas en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizaron en un sistema vertical con mini geles de 10x10 cm, utilizando un gel separador con una concentración de acrilamida de 12% y un gel de apilamiento con acrilamida al 5%:

Gel separador		Gel de apilamiento	
12%		5%	
Acril-Bis	2,5 ml	Acril-Bis	660 µl
Tris-HCl pH 8.8	1,5 ml	Tris-HCl pH 6.8	1,25 ml
Agua	1,9 ml	Agua	3 ml
10% SDS	60 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	40 µl	10% APS	75 µl
Temed	4 µl	Temed	5 µl

Para la siembra en los geles, las muestras tomadas en cada ensayo se mezclaron en partes iguales con el *buffer* de carga con reductor (Anexo D2). Se sembraron 20 µl de la mezcla resultante por cada calle del gel.

La corrida electroforética se llevó a cabo en una cuba *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad) a un voltaje de 60 V durante 2 a 3 h.

Detección de proteínas por *Western blot*

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema de *sándwich* semi-húmedo *Trans-blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad). Para ello se humedecieron 6 rectángulos de papel secante y la membrana de nitrocelulosa en *buffer* de transferencia (Anexo), y se colocaron sobre el polo positivo del equipo de transferencia para formar el *sándwich* de la siguiente manera: 3 papeles de filtro, membrana de nitrocelulosa, gel y los 3 papeles restantes. La transferencia se realizó a 15 V durante 30 min. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se incubó con la solución de bloqueo (Anexo F) durante toda la noche a 4°C y luego se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en solución de lavado (Anexo F). A continuación se colocó el Ac primario policlonal anti-procaspasa 3 y anti-caspasa 3 activa (Cell Signaling, protocolo 9662, hecho en conejo) diluido 1/1000 en solución de bloqueo y se incubó durante 60 min a Ta. Se realizaron 3 lavados y se incubó con el Ac secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido 1/500 en solución de bloqueo, en las mismas condiciones de incubación que el Ac primario. Por último, se incubó la membrana con la solución de revelado (Anexo F) hasta visualizar la presencia de las bandas.

La determinación de caspasa 3 activa (procaspasa 3: 32 Kd y caspasa 3 activa: 17 Kd) y de PARP (Poli ADP ribosa polimerasa: 89 Kd) de manera conjunta con B-actina en lisados de células infectadas mediante la técnica de *western blot*, fue realizada durante la estadía en el *Institut für Virologie, Freie Universität Berlin*, Alemania.

El protocolo utilizado fue similar al descrito anteriormente, con algunas diferencias que se detallan a continuación:

Células: se utilizaron células epiteliales heterólogas MDCK (Células de riñón de feto canino) y HeLa (células humanas) crecidas sobre placas de 6 pocillos (10 cm²).

Cepas virales: se usaron dos cepas de referencia de EHV-1, (Ab4 y RacL11) con un MOI 10, y se recolectaron las células infectadas a las 3, 6, 9, 15 y 18 h pi.

Control de apoptosis: se utilizó estaurosporina diluida 1/1000 en MEM.

Lisis celular y extracción de proteínas: las células de la totalidad de los grupos experimentales fueron recolectadas con *scrapers*, lavadas 3 veces con PBS estéril con centrifugaciones de 10000 rpm durante 5 min entre cada lavado. Para la obtención de las proteínas los *pellets* de células se resuspendieron en 500 µl de solución de congelación (Anexo), se sometieron a tres períodos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (37°C); se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 h y, luego de descartar el sobrenadante, los *pellets* fueron resuspendidos en 70 µl de solución “Ripa 1” (Anexo E) con 0,5 µl de Benzonasol, incubándose en hielo durante 20 min. Posteriormente se adicionaron 70 µl de solución “Ripa 2” (Anexo E) incubándose nuevamente durante 20 min. Finalmente, se centrifugaron a 14000 rpm durante 15

min y se recolectaron los sobrenadantes para conservarlos a -80°C como lisado proteicos.

Separación de proteínas en geles de poliacrilamida: la corrida electroforética se llevó a cabo en una cuba *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad) a un voltaje de 75 V durante 20 min, seguidos por 30 – 40 min a 150 V.

Detección de proteínas por Western blot: La transferencia de proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó durante 1 h con un voltaje de 7 V, utilizando el sistema de *sándwich* semi-húmedo.

Una vez realizada la transferencia de proteínas, la membrana se incubó con la solución de bloqueo durante 1 h a 37°C y luego se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con solución de lavado (Anexo F). A continuación se colocaron los siguientes Ac primarios preparados en solución de PBS con leche en polvo al 2,5%:

- Ac policlonal anti-procaspasa 3 y caspasa 3 activa diluido 1/1000 (Cell Signaling, protocolo 9664).
- anti-PARP diluido 1/1000 (Cell Signaling, protocolo 5625).
- anti actina diluido 1/500.

Luego de una incubación de 60 min a T_a , se realizaron 3 lavados y la incubación con el Ac secundario anti-conejo conjugado con HRP diluido 1/1000 en solución de leche en polvo al 2,5%, bajo las mismas condiciones de incubación que el Ac primario.

La lectura se realizó por quimioluminiscencia.

c- Determinación de actividad de caspasa 3 por incubación con el sustrato específico:

Se evaluó la actividad de la enzima caspasa 3 presente en lisados de células. Las mismas recolectadas con *scrapers* en tubos *ependorfs* y lavadas dos veces con PBS, y centrifugaciones de 2000 rpm durante 15 min. El *pellet* de células se resuspendió con *buffer* de lisis para actividad de caspasa (60 µl por tubo) (Anexo G), se incubó en hielo durante 5 min, y al cabo de este tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron en tubos a -70°C.

Se determinaron los niveles de actividad caspasa 3 mediante la incubación de los lisados celulares con el sustrato fluorogénico específico, Ac-DEVD-AFC (Biomol International Inc. Lot # H1758a). Duplicados de estas muestras fueron incubadas con el inhibidor específico para caspasa 3, Ac-DEVD-CHO. Las mezclas de reacción se confeccionaron de la siguiente manera:

	Buffer ensayo	Extracto celular	Inhibidor
Sin inhibidor	30 µl	20 µl	-
Con inhibidor	15 µl	20 µl	15 µl
Blancos	50 µl	-	-

Se incubó el extracto celular con el inhibidor y el *buffer* de ensayo durante 30 min a 37°C, al cabo de ese tiempo se agregó el sustrato, 50 µl por cada reacción, el cual

se dejó incubar durante 4 h a 37°C. Posteriormente todas las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su análisis. Para la lectura, se diluyeron los 100 µl de la reacción en 1900 µl de agua destilada y, la misma se llevó a cabo mediante espectrofluorometría. Se utilizaron filtros de excitación de 400 nm de longitud de onda y filtros de emisión de 505 nm.

d- Determinación de la vía de caspasas implicada en la infección por EHV-1, mediante la incubación con el sustrato específico para caspasa 8 y 9:

Para caracterizar la vía de caspasas implicada en el proceso apoptótico, se evaluó conjuntamente la actividad de las caspasas iniciadoras 8 y 9 utilizando los sustratos fluorescentes N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (LETD – Biomol International Inc. Lot # 3H2669b) y N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC (LEHD - Biomol International Inc. Lot # 3H2232b), respectivamente.

Para diferenciar la actividad específica de estas caspasas de la caspasa 3, se evaluó conjuntamente la actividad de caspasa 3 con y sin inhibidor.

El esquema utilizado para la evaluación de caspasas 8 y 9 incluyó solamente el estudio de las células ED con el mismo diseño experimental que se planteó para todo el desarrollo de la tesis.

Cada muestra fue fraccionada en cuatro y se prosiguió según el siguiente esquema:

	Buffer ensayo	Extracto celular	Inhibidor
Caspasa 3	30 μ l	20 μ l	-
Caspasa 3 con inhibidor	15 μ l	20 μ l	15 μ l
Caspasa 8	30 μ l	20 μ l	-
Caspasa 9	30 μ l	20 μ l	-
Blancos	50 μ l	-	-

Se incubó el extracto celular con el inhibidor y el *buffer* de ensayo (Anexo G), durante 30 min a 37°C, se agregaron 50 μ l de sustrato por cada reacción incubándose durante 4 h a 37°C. Posteriormente todas las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su lectura mediante espectrofluorometría. Para ello, se tomaron los 100 μ l de la reacción y se diluyeron en 1900 μ l de agua destilada. Se utilizaron filtros de excitación de 400 nm de longitud de onda del láser, y filtros de emisión de 505 nm.

Análisis estadístico

Para la totalidad de las experiencias *in vitro* en células heterólogas y homólogas se realizaron tres repeticiones para cada uno de los tiempos analizados. La variable a analizar para ambos modelos fue el recuento de células apoptóticas.

Los resultados se muestran como media $\pm$ 1 desviación estándar (DS).

Para el análisis de datos se utilizó la prueba de *Test de Student* y ANOVA de una vía, seguida por el test post-hoc LSD. Los valores de $p < 0,05$ fueron tomados como diferencias significativas.

RESULTADOS

Determinación de cambios morfológicos por coloración nuclear:

Se estudiaron los cambios morfológicos y tintoriales nucleares presentes en la línea celular MDBK. Los grupos (Inf) mostraron un mayor número de células apoptóticas que los correspondientes grupos (Cc) para cada horario estudiado, aunque las diferencias fueron significativas solo a las 18 h pi (Inf18) ($p < 0,05$). El menor número de eventos apoptóticos se registró a las 9h pi (Inf9), sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figuras 26 y 27)

Figura 26. Células MDBK teñidas con Naranja de acridina (AO)/ Bromuro de etidio (EB). Nótese la fragmentación y compactación de la cromatina, y la tinción verde brillante de la célula apoptótica (izquierda), en comparación con la morfología nuclear de las células normales (derecha).

Figura 27. Porcentaje de células MDBK apoptóticas. Evaluación morfológica mediante tinción con naranja de acridina (AO) y bromuro de etidio (EB). Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Cc) e (Inf) a las 18 h pi ($p < 0,05$).

En las células ED el número de células apoptóticas determinado para los grupos (Cc) fue significativamente menor que el obtenido para los grupos (Inf3) e (Inf18) ($p < 0,05$), sin embargo, en el grupo (Inf9) no se observaron diferencias significativas respecto al grupo (Cc) (Figura 28).

Figura 28. Porcentaje de células ED apoptóticas. Evaluación morfológica mediante tinción con naranja de acridina (AO) y bromuro de etidio (EB). Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Cc) e (Inf) a las 3 y 18 h pi ($p < 0,05$).

Determinación de cambios ultraestructurales:

Se caracterizó la ultraestructura de las células infectadas y de los grupos controles por MET. Se detectó la presencia de partículas virales en el citoplasma de las células de los grupos (Inf) (Figura 29). Asimismo, se detectaron cambios morfológicos nucleares característicos de la muerte por apoptosis, como la fragmentación y compactación nuclear, y la desorganización de las organelas celulares en el citosol sin ruptura de la membrana plasmática (Figura 30), en comparación con las células normales (Figura 31).

Figura 29. Sección de dos células ED infectadas con EHV-1 (MOI 10), tomadas a las 9 h pi y observadas con microscopía electrónica de transmisión. Nótese la presencia de partículas virales dentro de las células (flechas rojas).

Figura 30. Cambios ultraestructurales en una célula ED inducida a la apoptosis mediante la incubación con sorbitol 1M (grupo Apo+). Nótese la desorganización de las organelas, sin ruptura de la membrana plasmática.

Figura 31. Ultraestructura de una célula ED normal (grupo control - Cc) sin ruptura de la membrana plasmática ni alteración de la estructura intracelular.

Determinación del patrón de fragmentación de ADN celular:

a- Mediante corrida electroforética en gel de agarosa

La fragmentación del ADN internucleosómico, liberando fragmentos de 180-200 pares de bases, ocurrido durante la apoptosis, puede observarse mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa. La visualización de la fragmentación del ADN con el patrón en escalera característico de la apoptosis se detectó parcialmente en el grupo (Apo+) para ambas líneas celulares. Con respecto a los grupos (Inf) se detectó un patrón similar pero solo a las 18 h pi (Inf18), tanto en las células heterólogas como homólogas. A pesar de ello, en las fotografías la resolución no fue

la más adecuada, y no se ha podido evidenciar claramente el característico patrón en escalera.

b-A través de la técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling)

La detección de fragmentos de ADN con extremos 3' libre mediante la aplicación de la técnica de TUNEL en la línea celular MDBK, no mostró diferencias significativas entre los grupos (Inf) respecto al grupo (Cc) para los horarios estudiados. Sin embargo, el grupo (Inf 9) presentó un menor número de células TUNEL positivas que los grupos (Inf 3) e (Inf 18) (Figura 32).

Figura 32. Porcentaje de células MDBK positivas a TUNEL evaluado por inmunofluorescencia. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas actuando como control negativo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En la línea celular ED el porcentaje de células TUNEL positivas fue significativamente mayor en los grupos (Inf) a las 3 y 18 horas pi en comparación con el grupo (Cc) ($p < 0,01$). El grupo (Inf 9) mostró un porcentaje significativamente menor de células TUNEL positivas en comparación con los grupos (Inf 3) e (Inf 18) ($p < 0,01$) (Figuras 33 y 34).

Figura 33. Células ED infectadas con EHV-1 MOI 10, recolectadas a las 18 h pi y marcadas con TUNEL mediante inmunofluorescencia. El azul corresponde a la tinción nuclear con DAPI, mientras que en rojo los núcleos TUNEL positivos.

Figura 34. Porcentaje de células ED TUNEL positivas evaluado por inmunofluorescencia. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas actuando como control negativo. Se hallaron diferencias significativas entre el grupo (Cc) e (Inf) a las 3 y 18 h pi ($p < 0,01$), y entre los grupos (Inf 3) e (Inf 18) con el grupo (Inf 9).

Relación Anexina V/ ioduro de propidio

Se analizó la traslocación de fosfatidilserina hacia la cara extracelular, mediante la tinción con anexina V combinado con IP. Los resultados se analizaron por citometría de flujo. En las células MDBK no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células anexina V+/PI- entre los grupos (Inf) y el grupo (Cc). Sin embargo, el grupo (Inf 9) presentó un porcentaje de células anexina

V+/PI- significativamente menor que el grupo (Apo+) ($p < 0,01$), mientras que en el grupo (Inf18) los porcentajes fueron significativamente mayores que el resto de los grupos (Inf) ($p < 0,5$) (Figuras 35 y 36).

Figura 35. Células MDBK positivas a anexina V/FICT evaluado por citometría de flujo. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi).

Figura 36. Porcentaje de células MDBK positivas a anexina V+/PI– evaluado por citometría de flujo. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Apo+) y el grupo (Inf9) ($p < 0,01$), y entre el grupo (Inf18) con los grupos (Inf3) e (Inf9) ($p < 0,05$).

En las células ED el porcentaje de marcación anexina V+/PI– en los grupos (Inf3) e (Inf9) fue significativamente menor que el del grupo (Inf18) ($p < 0,01$) (Figuras 37 y 38).

Figura 37. Células ED positivas a anexina V/FICT evaluado por citometría de flujo. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi).

Figura 38. Porcentaje de células ED positivas anexinaV+/PI– evaluado por citometría de flujo. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Inf18) y los grupos (Inf3) e (Inf9) ($p < 0,01$).

Determinación de la participación de caspasas

a-Determinación de la activación y acción de caspasas efectoras por inmunofluorescencia:

Con el objeto de estudiar la actividad de las caspasas efectoras en los distintos grupos experimentales, se realizó la marcación de citoqueratina

18 clivada por inmunofluorescencia. El número de células positivas en la línea celular MDBK fue similar entre los grupos (Inf) y los controles (Cc) para todos los tiempos pi analizados. Sin embargo, el grupo (Inf9) presentó un menor porcentaje de células positivas, aunque estas diferencias no fueron significativas (Figura 39).

Figura 39. Porcentaje de células MDBK positivas al clivaje de la citoqueratina 18, evaluado por inmunofluorescencia. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En las células ED el porcentaje de células positivas a M30 difirió significativamente ($p < 0,01$) entre los grupos (Cc) y los (Inf) a las 9 y 18 h, obteniéndose el valor más alto en el grupo (Inf18) ($p < 0,01$) (Figuras 40 y 41).

Figura 40. Células ED infectadas con EHV-1 MOI 10, recolectadas a las 18 h pi, positivas al clivaje de la citoqueratina 18 evaluadas mediante inmo fluorescencia. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, mientras que en verde se identifican a los citoplasmas positivos al anticuerpo anti-citoqueratina 18 clivada.

Figura 41. Porcentaje de células ED positivas al clivaje de la citoqueratina 18 evaluado mediante inmunofluorescencia. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Cc) con los grupos (Inf9) e (Inf18) ($p < 0,01$).

b-Determinación de la activación de caspasas efectoras por western blot:

Se evaluó la presencia de la proteína caspasa 3 activa (17 Kda) por *western blot*. En el grupo (Apo+), se determinó la misma en células recolectadas a diferentes tiempos pos tratamiento (pt) (1, 3 y 5 h pt). Para este grupo (Apo+) a 1 h pt se observó una banda muy débil correspondiente a la proteína de 17 KDa, mientras que

a las 5 h pt la detección fue más evidente. Se observó la presencia de pro-caspasas 3 en todas las muestras de lisados de células MDBK y ED (Figura 42).

Figura 42. *Western blot* de células ED para procaspasa 3 (32 Kd) y caspasa 3 activa (17 Kd). M: marcador de peso molecular. Calle 1: células control; 2: células infectadas con EHV-1 y recolectadas a las 3 h pi; 3: ídem 2 recolectadas a las 9 h pi; 4: ídem 2 recolectadas a las 18 h pi. 5: Células ED tratadas con sorbitol 1M recolectadas 5 h pt; 6: ídem 5 recolectadas 1 h pt.

En la detección conjunta de caspasa 3 activa, PARP y actina, sólo fue detectada actina en la totalidad de las muestras. Sin embargo, también se pudo observar una débil banda de 89 Kd correspondiente a PARP en las células utilizadas como control positivo (incubadas con estaurosporina) (Imagen no mostrada por confiabilidad de divulgación de resultados del *Institut für Virologie, Freie Universität, Berlin*).

c- Determinación de actividad de caspasas por incubación con el sustrato específico:

Se determinó la actividad caspasa 3 mediante el análisis con un sustrato fluorogénico específico. La actividad evaluada en células MDBK fue significativamente menor en los grupos (Inf9) e (Inf18) con respecto al grupo (Apo+) ($p < 0,05$), aunque estas diferencias no fueron significativas con el grupo (Cc), ni entre el grupo (Inf 3) con el grupo (Apo+) (Figura 43).

Figura 43. Porcentaje de actividad de caspasa 3 en células MDBK. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas, actuando como control negativo, graficadas con su media. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Apo+) con los grupos (Inf9) e (Inf18) ($p < 0,05$).

En las células ED la actividad de caspasa 3 fue significativamente menor en todos los grupos (Inf) con respecto al grupo (Apo) ($p < 0,05$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Inf) con el grupo (Cc) (Figura 44).

Figura 44. Porcentaje de actividad de caspasa 3 en células ED. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos pos infección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas actuando como control negativo, se encuentran graficadas con su media. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Apo+) y la totalidad de los grupos (Inf) ($p < 0,05$).

d- Determinación de la vía de caspasas implicada en la infección por EHV-1, mediante la incubación con el sustrato específico para caspasa 8 y 9:

El estudio de la vía de las caspasas implicada en la infección por EHV-1 se estudió en células ED. Se detectó un aumento significativo de la actividad de caspasa 8 en el grupo (Inf9) en comparación con los grupos (Inf3), (Inf18) y (Apo+). Los valores obtenidos a las 9 h pi decrecieron notablemente hacia las 18 h pi. Con respecto a la actividad de caspasa 9, se detectó un valor significativamente menor en el grupo (Inf 9) respecto de los grupos (Inf 3) e (Inf 18) (Figura 45)

Figura 45. Porcentaje de actividad de caspasa 8, 9 y 3 en células ED. Las células (Apo+) fueron tratadas con sorbitol 1M durante 1 h para inducir apoptosis, las células de los grupos (Inf) fueron infectadas con EHV-1 MOI 10 y recolectadas a diferentes tiempos posinfección (pi), las células (Cc) no fueron tratadas actuando como control negativo, se encuentran graficadas con su media. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Inf9) con los grupos (Inf3) e (Inf18) para actividad de caspasa 8 y 9 ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El ciclo de replicación viral promedio de los alphaherpesvirus es de aproximadamente 18-20 h y al finalizar este lapso, las células infectadas estallan por lisis liberando al medio partículas virales que infectarán nuevas células. Los cultivos celulares infectados por alphaherpesvirus se caracterizan por exhibir lisis, primero focal y luego total, de la monocapa de células, un cambio que es microscópicamente visible y que junto con la formación de sincicios se denomina efecto citopático (Kaplan, 1973, Dunowska, 2014).

La apoptosis es un proceso complejo que involucra una amplia variedad de cambios bioquímicos y morfológicos que llevan a la desaparición completa de la célula sin que ocurra respuesta inflamatoria. En la misma se ven involucrados un importante número de proteínas y componentes celulares. Existen diversos factores y estímulos que pueden determinar la activación de este proceso, dentro de los cuales algunos son fisiológicos y otros patológicos (Dash, 2006; Clarke y Tyler, 2009).

Ante una infección viral y más precisamente ante la penetración del virus a la célula junto con el comienzo de su replicación, muchas células, desencadenan su muerte por apoptosis como un mecanismo de protección no específico, con la finalidad de evitar la propagación y diseminación viral (Hay y Kannourakis, 2002).

La apoptosis es modulada por muchos virus como una estrategia para salvaguardar su replicación y supervivencia en las células infectadas. En estudios previos se ha demostrado que diferentes miembros de la subfamilia

Alphaherpesvirinae, tales como el BoHV-1 y el SuHV-1, interfieren en la apoptosis de las células infectadas (De Martino y col., 2003; Derruelle y col., 2010).

Durante el desarrollo de esta tesis, se estudió el efecto de la cepa argentina AR8-EHV-1 sobre la apoptosis, en dos líneas de células epiteliales en las que el virus es capaz de penetrar y replicarse. Seleccionamos esta cepa de virus debido a que es una cepa nacional que se encuentra caracterizada desde el punto genómico y patogénico (Martin Ocampo y col., 2009; Fuentealba y col., 2011; Zanuzzi y col., 2013).

Se utilizaron diferentes técnicas para detectar eventos apoptóticos tempranos y tardíos a diferentes tiempos pi, y se compararon los resultados entre células infectadas, no infectadas (controles negativos) e inducidas a la muerte por apoptosis con sorbitol (controles positivos de muerte por apoptosis). El uso del sorbitol como agente inductor de apoptosis se encuentra ampliamente citado en la bibliografía (Galván y col., 1999; Perkins y col., 2000; Geenen y col., 2005; De Martino y col., 2003; 2007). A pesar de ello los resultados hallados permiten inferir que la respuesta a este agente no es evidenciable con todos los métodos de detección de apoptosis utilizados. En este trabajo sólo se pudieron observar niveles estadísticamente significativos de apoptosis en las células usadas como control positivo (grupo Apo+) al determinar las características morfológicas nucleares típicas del proceso, y mediante citometría de flujo al reconocer la externalización de fosfatidilserina. Cuando se utilizó otro importante inductor de apoptosis, como lo es la estaurosporina (Thompson y col., 2000; Javoujey y col., 2008), para la determinación de caspasa activa y PARP por la técnica de *western blot*, los

resultados fueron coincidentes con los obtenidos con sorbitol, excepto por la obtención de una débil banda correspondiendo al peso de PARP, la que de todas maneras resultó de dificultosa repetibilidad.

Dentro de las técnicas utilizadas para la identificación de la apoptosis, se utilizó la identificación de cambios morfológicos y tintoriales a nivel del núcleo, mediante la coloración con bromuro de etidio y naranja de acridina, la observación conjunta de células de coloración verde, debido al naranja de acridina, con algunos cambios morfológicos como la compactación nuclear, permitieron identificar a aquellas células que estaban atravesando el proceso de muerte apoptótica; sin embargo, debido a la subjetividad de la técnica, sumado a la precaución que debe tenerse con el uso de los reactivos, y fundamentalmente al desarrollo de nuevas técnicas con una mayor sensibilidad y especificidad para detectar células en apoptosis temprana, es que esta técnica ha caído en desuso en los últimos años. A pesar de ello, los resultados que se han obtenido con esta técnica concuerdan con los obtenidos con otras técnicas utilizadas.

Por otra parte, el uso de la MET permitió confirmar cambios ultraestructurales característicos de la muerte por apoptosis, así como también confirmar la infección celular por EHV-1, debido a la observación de partículas virales en el citoplasma de las células infectadas. Resultados similares a los observados en esta tesis fueron encontrados con SuHV-1 en cultivos celulares infectados (Cheung y col., 2000), y en cortes de ganglios nerviosos de animales experimentalmente infectados (Alemañ y col., 2001; Marcaccini y col., 2006).

Una de las técnicas estándar para la detección de apoptosis es la observación del *ladder* o escalera de ADN, cuando el ADN celular es sometido a una corrida electroforética. La inducción a la apoptosis en algunos tipos celulares, como por ejemplo en timocitos, es claramente evidenciada debido a que presentan este patrón apoptótico en escalera, sin embargo, no es fácilmente observable en todos los tipos celulares inducidos a apoptosis. Esto en parte, podría deberse a diferencias en el modo de respuesta de las células ante el inductor de muerte, y a que el proceso no sería iniciado y llevado a cabo sincrónicamente en todas las células, aun cuando el número de éstas sea elevado; es por ello que no es conveniente utilizar a esta técnica como un *gold estándar* ni como la única técnica para la evaluación y medición de apoptosis. Estos motivos podrían explicar por qué la observación del patrón en escalera del ADN en las líneas celulares utilizadas fue muy subjetiva y resultó por momentos muy dificultosa, aun en aquellas células que habían sido inducidas a la apoptosis mediante incubación con sorbitol (grupo Apo+). Sin embargo, el estudio de la fragmentación de ADN celular, también se llevó a cabo mediante la técnica de TUNEL, mediante la cual se reconocen los extremos hidroxilos 3' libres que resultan de la actividad de endonucleasas activadas durante el proceso apoptótico, por tal motivo el uso de esta técnica resulta de mayor objetividad y precisión comparado con la visualización de la escalera de ADN. Los resultados que se obtuvieron mediante el uso de esta técnica permitieron determinar una alta cantidad de células en apoptosis para los grupos infectados y recolectados a las 3 y 18 h pi, en relación con sus respectivos controles de células sin infectar; mientras que a las 9 h pi no se detectaron diferencias entre el grupo infectado y el control. Estas diferencias fueron más notables en las células equinas.

La determinación de la traslocación del fosfolípido fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática es un evento característico de la apoptosis que ocurre tempranamente. La identificación de este acontecimiento se puede llevar a cabo mediante la marcación con anexina V, la cual conjuntamente con la tinción por ioduro de propidio permite reconocer células en apoptosis y diferenciarlas de aquellas en necrosis. Los resultados obtenidos con la marcación de anexina V/ioduro de propidio mostraron una notable diferencia en la marcación entre los grupos infectados y recolectados a las 3 y 9 h pi con aquella obtenida a las 18 h pi. Esta tendencia fue más evidente con las células homólogas en comparación con las heterólogas.

La detección de caspasas activas (principalmente ejecutoras) durante la muerte celular es un fiel indicador de apoptosis. El estudio de la caspasa 3 es uno de los primeros pasos en la determinación de la apoptosis. La forma inactiva de esta enzima, la procaspasa 3, tiene un peso de 32 Kda, y se encuentra en el citoplasma celular. Cuando se inicia el proceso de apoptosis la procaspasa es clivada a su forma activa de 17 Kda (Jordán y col., 2000). La visualización de ambas formas de caspasa 3 mediante *western blot* solamente se detectó en los grupos utilizados como control positivo de muerte por apoptosis (Apo+) cuando las células fueron reincubadas durante 5 h pt. A pesar de ello, cuando se evaluó la actividad de caspasa 3 por incubación con el sustrato fluorogénico específico, los resultados que se obtuvieron difirieron estadísticamente entre los diferentes grupos infectados analizados. Una de las hipótesis que se propone para explicar estos resultados sería una baja expresión de estas enzimas, sumado a la existencia de diferencias en la sensibilidad de ambas técnicas, lo que dificulta su detección por la técnica de

western blot, pero no el análisis de su actividad mediante incubación con el sustrato específico. Sin embargo, la falta de detección y/o de actividad de caspasas, no significa necesariamente que no haya ocurrido muerte celular apoptótica, debido a la existencia de mecanismos que actúan de manera independiente a estas enzimas catalíticas (Bröker y col., 2005). La actividad de caspasa 3 activa en células inducidas a la apoptosis con sorbitol fue alta, resultado que concuerda con lo observado por *western blot*; mientras que en todos los grupos de células infectadas la actividad de la enzima fue menor con respecto al grupo (Apo+).

Las técnicas empleadas para evaluar la apoptosis evidenciaron cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares ocurridos durante etapas tempranas y tardías de dicho proceso. Se demostró que en ambas líneas celulares infectadas y para la mayoría de las técnicas utilizadas, el mayor número de células apoptóticas se encontró a las 18 h pi (~20%). Este tiempo concuerda con la fase final del ciclo de replicación del virus, momento en el que se produce la lisis celular y la progenie viral es liberada al medio. Sin embargo, teniendo en cuenta que finalizada su replicación el virus desencadena la lisis celular, podría suponerse que la apoptosis podría actuar como un mecanismo secundario de muerte de las células infectadas aún no lisadas, con el objetivo final de liberar las nuevas partículas infectivas al medio y desencadenar de esta manera la viremia.

De igual forma se observó que el EHV-1 interfiere sobre el proceso de apoptosis en etapas medias de la infección (9 h pi) en las líneas celulares estudiadas, produciendo un retraso de dicho proceso. Resultados similares fueron observados en otros trabajos utilizando células MDBK infectadas por el BoHV (De

Martino y col., 2003) y también en células humanas infectadas por el HSV-1 (Aubert y col., 2007).

Asimismo, se observó que el efecto que el EHV-1 tiene sobre la modulación de la apoptosis es de mayor importancia sobre las células de la especie que naturalmente infecta. La línea celular homóloga ED presentó una mayor susceptibilidad a la infección y un mayor efecto de inhibición temporaria de la apoptosis, en comparación con la línea heteróloga MDBK. Posiblemente esta diferencia pueda deberse a que en las células ED el EHV-1 encuentra una mejor afinidad de los receptores con los cuales interactuar. Este comportamiento sería un factor a tener en cuenta debido a que la OIE recomienda el uso indistintamente de células MDBK, RK13 y ED para el diagnóstico de EHV-1 y EHV-4.

Estos datos respaldan la hipótesis de la existencia de un posible mecanismo de interferencia de la apoptosis por parte del EHV-1 durante las primeras etapas de su ciclo de replicación. Coincidentemente con ello, las experiencias con SuHV-1 sobre cultivos de células mostraron que el porcentaje de actividad de caspasa 3 a las 18 h pi era de alrededor del 10%, y alcanzaba un 50% hacia las 24 h pi, momento en el cual el virus había completado su primer ciclo de replicación (Geenen y col., 2005). Esto permitiría inferir que la apoptosis podría actuar como un mecanismo secundario de muerte celular hacia la finalización del ciclo de replicación viral, favoreciendo de esta manera la diseminación por células fagocíticas.

Al estudiar la vía de activación de caspasas involucrada durante la infección por EHV-1, se observó que tanto en las células infectadas como en las inducidas a la apoptosis, los valores obtenidos de actividad de caspasa 8 fueron mayores que los

de actividad de caspasa 9; un resultado esperable teniendo en cuenta que tanto el virus como el sorbitol son agentes que actúan de manera externa, por lo que desencadenarían la vía extrínseca de activación de caspasas. En las células inducidas a la muerte con sorbitol, se encontró un aumento de la actividad de caspasa 8 y 3, el incremento de la primera estaría asociado con la activación de caspasas ejecutoras, como la caspasa 3. Sin embargo, esta asociación no se observó en las células infectadas, lo que podría estar relacionado con una posible interferencia viral con el mecanismo de activación de las caspasas ejecutoras, como se ha demostrado para otros herpesvirus, mediante la expresión de proteínas específicas. Algunas de las proteínas virales en las que se estudiaron mecanismos similares son la glicoproteína G (gpG) (Jin y col., 2003), la proteína Us3 (Ladelfa y col., 2011) y la proteína UL14 del BoHV-1 (De Martino y col., 2007); y las proteínas ICP4 (Leopardi y Roizman, 1996), la quinasa US3 (Deruelle y col., 2010) y el transcripto LAT (Geenen, y col., 2005) para el SuHV-1. Sin embargo, aún no están definidas cuales de las proteínas virales estarían involucradas en la modulación de la apoptosis durante la infección por EHV-1, aunque últimamente se ha relacionado a la proteína gB y al transcripto Us3 en la viremia asociada con células blancas (Spiesschaert y col., 2015); el Us3 estaría involucrado con el mecanismo antiapoptótico ejercido por el virus.

Cymerys y col. (2012) demostraron que la expresión de caspasas no difirió entre cultivos primarios de neuronas de ratón infectadas por el EHV-1, con respecto a cultivos no infectados, y que el virus fue capaz de sobrevivir en los cultivos durante ocho semanas. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito completamente

la existencia de algún mecanismo capaz de interactuar con la apoptosis, ni de proteínas que bloquen el proceso en células infectadas.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral concuerdan con observaciones previamente publicadas con la cepa japonesa HH1 de EHV-1 en células heterólogas (MDBK) (Scrochi y col., 2013), y con los resultados obtenidos con otros alfa herpesvirus (De Martino y col., 2003; Deruelle y col., 2010, Cymerys y col., 2012). La cepa japonesa HH1 de EHV-1 tiene un origen similar a la cepa argentina AR8 utilizada a lo largo del desarrollo de esta tesis, y ambas difieren de las cepas de origen británico en la región intergénica ORF 62 y ORF 63, sin embargo, dicha variación no estaría relacionada con la patogenia viral (Martin Ocampo y col., 2009).

La mayor susceptibilidad de las células ED a la infección por EHV-1 y a la respuesta moduladora de la apoptosis, dependería, al menos en parte, de la afinidad del virus por los receptores celulares, debido a que pertenecen a la especie que el virus infecta en la naturaleza. Conclusiones similares obtuvieron Turowska y col., (2010) al comparar el efecto de dos cepas de EHV-1 de diferente virulencia sobre el citoesqueleto de células ED y de riñón de mono verde africano (Vero), y observar efectos diferentes de cada cepa de virus sobre cada tipo de células, apoyando así el uso de líneas celulares específicas de especie. Estos factores deberían considerarse al trabajar con diferentes líneas celulares indistintamente.

Por otro lado, Cymerys y col., (2012) utilizaron cultivo primario de neuronas murinas y demostraron que la virulencia de las cepas de EHV-1 determina la extensión del proceso antiapoptótico. Asimismo, se ha demostrado que el SuHV-1

podría estar implicado en múltiples interacciones con proteínas del citoesqueleto (específicamente actina) con la finalidad de aumentar la eficiencia de su replicación en células de testículo de cerdo (Deruelle y col., 2010). Un mecanismo similar de interacción del virus con proteínas del citoesqueleto se comenzó a estudiar para el EHV-1, donde la conformación de proteínas del mismo en células infectadas sufría importantes cambios al cabo del primer ciclo de replicación, lo que podría deberse a modificaciones intracelulares a beneficio del transporte de viriones (Turowska y col., 2010).

Por todo lo antes mencionado, es mucho el avance que se ha tenido en los últimos años respecto a la patogenia del EHV-1, pero aún no se había logrado establecer fehacientemente su interacción con la apoptosis, ni se conoce cual proteína/s estaría implicada en dicho proceso.

CAPÍTULO 2:

EXPERIENCIAS IN VIVO

OBJETIVO

- **Estudiar en pulmones de animales infectados el efecto de la infección por EHV-1 sobre la apoptosis.**

Además de comprobarse en experiencias *in vitro* la interferencia de muchos alphaherpesvirus sobre la apoptosis, en algunos de ellos se ha demostrado además un efecto similar *in vivo*. De esta manera, cuando se analizó la apoptosis en cortes de tejido nervioso de animales infectados con SuHV-1, no se encontraron cambios significativos en las células (Alemañ y col., 2001), este efecto podría estar relacionado con el mecanismo de latencia característico de estos virus (Marcaccini y col., 2006).

En la infección por EHV-1 en equinos, las lesiones macroscópicas más importantes en pulmones consisten en hiperemia, necrosis y ulceración del epitelio de las vías respiratorias; a nivel microscópico se observa rinitis, bronquiolitis, alveolitis y edema intersticial con infiltrado mononuclear en la región perivascular, fluido serofibrinoso en los alvéolos y cuerpos de inclusión intranucleares (Allen y col., 2004). Cuando se trabaja con el modelo experimental las lesiones microscópicas en el pulmón de ratones BALB/c son similares a las descritas para el caballo, observándose focos de alveolitis y bronquitis con la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en las células del epitelio bronquiolar, presencia de focos

necróticos y células inflamatorias, principalmente mononucleares (Walker y col., 1999).

Con respecto a la modulación de la apoptosis por el EHV-1 *in vivo*, hasta el momento se desconocen publicaciones que hagan referencia a este efecto.

El objetivo de este capítulo fue estudiar en pulmones de ratones BALB/c infectados el efecto del EHV-1 sobre la apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones libres de patógenos específicos, machos BALB/c de 6 semanas de edad, que fueron alojados en un cuarto especialmente adaptado, con Ta controlada de 22°C, ciclos de luz y oscuridad de 12 h, y ciclos de ventilación de 45 min por cada hora. El agua y el alimento se administraron *ad libitum*.

Los procedimientos experimentales con animales realizados en el presente trabajo estuvieron de acuerdo con las normativas internacionales y fueron aprobados y supervisados por el Comité Institucional de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (Expediente 0600-004104/08-001. Res. 129/09).

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 12 animales, los cuales fueron agrupados de la siguiente manera:

	Inoculación experimental con EHV-1 (AR-8)	Inoculación con MEM (Controles negativos de infección)
Cantidad animales	8 animales	4 animales

Inoculación experimental

Los animales experimentalmente infectados fueron inoculados por vía intranasal con $10^{5.5}$ DICC₅₀ en 50 µl de inóculo, (~ 250.000 partículas virales). Los animales controles negativos de infección fueron inoculados con 50 µl de MEM estéril.

Observación de signos clínicos, necropsia y toma de muestra

Los animales fueron observados diariamente para la determinación de signos clínicos característicos de la infección, y finalmente sacrificados según el siguiente esquema:

- grupo **24 hs pi**, con 2 animales infectados con EHV-1 y 1 animal control,
- grupo **48 hs pi**, con 2 animales infectados con EHV-1 y 1 animal control,
- grupo **72 hs pi**, con 2 animales infectados con EHV-1 y 1 animal control,
- grupo **96 hs pi**, con 2 animales infectados con EHV-1 y 1 animal control.

Los animales fueron anestesiados con isoflurano en una cámara de aire, siguiendo el protocolo de estudios previos (Eöry y col., 2013), y posteriormente sacrificados por sangrado a blanco. Durante la necropsia se extrajeron los pulmones para su posterior análisis.

Se tomaron muestras de pulmón de los ratones de todos los grupos, las que fueron fijadas en formol tamponado al 10% durante 12 h y almacenadas en etanol 70°. Posteriormente fueron deshidratadas por medio de tres pasajes en etanol 96° (1 h cada uno), dos en etanol 100° (1 h cada uno) y dos en xilol (30 min cada uno). Se eliminó el xilol mediante el pasaje triple por parafina líquida a 60°C (1 h cada pasaje) y se formaron los tacos de parafina sólida.

Estudio histopatológico mediante tinción con Hematoxilina-Eosina

Se realizó el estudio histológico de los pulmones de cada grupo experimental a partir de material coloreado con Hematoxilina – Eosina (HE). Para ello se realizaron cortes finos de 3 µm del material incluido en parafina utilizando un micrótopo de deslizamiento. Los cortes obtenidos se montaron en portaobjetos de vidrio y luego se desparafinaron mediante pasajes en alcoholes de graduación decreciente y se rehidrataron con agua destilada. Para su coloración, los preparados fueron inmersos en Hematoxilina de Gill (Hematoxilina “activada”, Biopur. Cat. 121) durante 3 min y luego en agua corriente para el viraje del colorante. Posteriormente fueron sumergidos en eosina amarilla en solución acuosa (Eosina Amarilla, Biopur.

Cat. 745380100) durante 1 min. Por último se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá para su visualización con microscopio óptico (Anexo H2).

Detección de antígenos virales por inmunohistoquímica

A partir el material incluido en parafina se realizaron cortes que se montaron en vidrios positivados (Biotraza microscope slides positive charged. Cat. HDAS001A) para evitar el desprendimiento del material. Los preparados fueron desparafinados mediante dos inmersiones en xilol durante 10 min y dos lavados en alcohol 100° durante 5 min. Se sumergieron 30 min en metanol con 0,3% v/v de H₂O₂ para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego se rehidrataron por inmersión en alcoholes de graduación creciente, se lavaron con PBS (pH 7,4), y se incubaron con BSA durante 30 min a Ta para bloquear la unión inespecífica del Ac. Posteriormente se realizó la incubación con el Ac primario (suero policlonal anti EHV-1 producido en conejo, en una dilución 1/1500 en PBS) durante 2 h a Ta en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se incubaron con el Ac secundario anti-conejo (EnVision detection system p HRP, Dako Cytomation) durante 30 min, se lavaron nuevamente y se revelaron con el agregado de 3,3' diaminobenzidina (DAB). Se utilizó una contracoloración con Hematoxilina según Gill durante 20 s y por último el material fue deshidratado y montado con bálsamo de Canadá para su observación (Anexo H).

DETERMINACIÓN DE CÉLULAS EN APOPTOSIS EN PULMONES

Sobre las muestras de tejido de pulmón se evaluó el número total de células apoptóticas, a través de:

- la técnica de TUNEL por inmunofluorescencia,
- la detección de caspasa 3 activa por inmunohistoquímica

Técnica de TUNEL por inmunofluorescencia

Los cortes de tejido de cada grupo fueron montados sobre vidrios positivados y fueron desparafinados según el protocolo descrito, posteriormente se lavaron en PBS (pH 7,4) + 0,05% *tween*, y se incubaron 1 h a 37 ° C con el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche, Mannheim, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con PBS + 0,05% *tween*. Los núcleos fueron teñidos con 5µg / ml de DAPI (6-diamidino-2-fenilindol - Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EE.UU.) durante 15 min a Ta, luego fueron lavados tres veces con PBS + 0,05% *tween* durante 5 min cada uno y montados utilizando el medio acuoso FluoroSave TM (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) (Anexo H). Por último, los cortes se observaron con un microscopio confocal (FV1000, Olympus Co., Japón) con el software FV10-ASW 4,0 (Olympus, Japón). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X, AN 0,95. Se utilizaron filtros Texas Red (rojo) (559 nm de excitación de longitud de onda del láser, filtro BA575-675) para la emisión del fluoróforo y DAPI (azul) (405 nm de excitación de longitud de onda del láser, filtro BA430-455). Para cada experimento se cuantificaron

las células marcadas utilizando un analizador de imágenes (cellSens Dimensión v1.6. Olympus Co., Japón). Se observaron células apoptóticas positivas en rojo que se contaron usando la función basada en histograma automático del software.

Detección de caspasa 3 activa por inmunohistoquímica

Los cortes de tejido de cada grupo fueron montados sobre vidrios positivados y fueron desparafinados y rehidratados según el protocolo descrito. Se realizó la incubación con el Ac primario anticaspasa 3 activa (policlonal producido en conejo, Sigma Aldrich, EE.UU en una dilución 1/800 en BSA al 0,1%) durante 1 h a Ta en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se incubaron con el Ac secundario anti-conejo (EnVision detection system p HRP, Dako Cytomation) durante 30 min, se lavaron nuevamente y se revelaron con el agregado de 3,3'diaminobenzidina (DAB). Se utilizó una contracoloración con Hematoxilina según Gill durante 20 s y por último el material fue deshidratado y montado con bálsamo de Canadá para su observación (Anexo H).

Análisis estadístico

Para las experiencias *in vivo* se procesaron 3 muestras por cada grupo (horario) y se evaluaron 3 repeticiones para cada tratamiento (infección) desde las 24 a las 96 h pi. La variable a analizar para ambos modelos fue el recuento de células apoptóticas.

Los resultados se muestran como media $\pm$ 1 desviación estándar (DS). Para el análisis de datos se utilizó la prueba de ANOVA de una vía. Los valores de $p < 0,05$ fueron tomados como diferencias significativas.

RESULTADOS

Observación de signos clínicos y anatomopatológicos

Los animales infectados experimentalmente comenzaron a presentar depresión general, pelo hirsuto y disnea a partir de las 12 h pi. Se registró una leve disminución del peso corporal al cabo de las 96 h pi.

	0 h	24 h pi	48 h pi	72 h pi	96 h pi
Inf 24 h	20,5	20			
Inf 24 h	22	22			
Control 24 h	21	21			
Inf 48 h	22,5	22	21,5		
Inf 48 h	21	20,5	20,5		
Control 48 h	22	22	22		
Inf 72 h	22	22	21,5	21,5	
Inf 72 h	20,5	20,5	20	20,5	
Control 72 h	21	21	21	21	
Inf 96 h	22	21	21	21,5	22
Inf 96 h	21	21	20,5	20,5	21
Control 96 h	22	22	21,7	22	22

Tabla 3. Pesos en gramos de ratones BALB/c infectados con EHV-1 a las 24, 48, 72 y 96 h pi. Los animales controles fueron inoculados con MEM.

Durante la necropsia no se detectaron lesiones macroscópicas.

Estudio histopatológico mediante la tinción con Hematoxilina-Eosina

En los pulmones de todos los grupos infectados con EHV-1 se observaron cambios histopatológicos característicos de la infección con este virus. El grado de

severidad de las lesiones fue variable dependiendo del tiempo transcurrido, de esta manera, a las 24 h pi se observaron focos de infección localizados principalmente en el epitelio de los bronquiolos distales y de los bronquiolos respiratorios, con una leve reacción inflamatoria, constituida principalmente por leucocitos mononucleares y escasos neutrófilos. En algunos sectores de los epitelios se observaron escasos sincicios, zonas de erosión y cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos. A las 48 h pi, se observaron cambios histológicos similares a los descritos para las 24 h pi con un infiltrado inflamatorio de predominio linfocítico alrededor de las vías respiratorias bronquiales y vasos sanguíneos. A las 72 y 96 h pi los cambios detectados fueron similares a los encontrados a las 24 y 48 h, pero con menor cantidad de focos infecciosos y una leve respuesta inflamatoria.

Por otra parte, en los pulmones de todos los animales control (inoculados con MEM) se observaron epitelios bronquiales y bronquiolares histológicamente normales, con escasos restos celulares en la luz, y no se encontraron signos de infección viral ni de inflamación.

Detección de EHV-1 por inmunohistoquímica

En todos los grupos infectados se detectaron células epiteliales positivas al virus y otras sin marcación pero con indicios morfológicos de infección. La marcación se encontró principalmente en los epitelios bronquiales y bronquiolares como también en algunas células de las paredes alveolares (Figura 46). Muchas de las células marcadas en los epitelios formaban parte de los sincicios detectados por H-E. Se observaron restos celulares con marcación específica en la luz de las vías

respiratorias (Figura 47). La cuantificación determinó que la mayor detección de Ag virales fue a las 48 h pi.

En los pulmones de los animales del grupo control no se observó marcación positiva.

Figura 46. Marcación positiva para EHV-1 por inmunohistoquímica de pulmón de un ratón BALB/c infectado y sacrificado a las 48 h pi. La marcación positiva se encuentra en células del epitelio bronquiolar (20X y 40X).

Figura 47. Marcación positiva para EHV-1 por inmunohistoquímica de pulmón de un ratón BALB/c infectado sacrificado a las 48 h pi (40X). Las células marcadas se encuentran desprendidas en la luz del bronquiolo.

DETERMINACIÓN DE CÉLULAS EN APOPTOSIS EN PULMONES

Técnica de TUNEL por inmunofluorescencia

En todos los pulmones de los animales infectados se detectó marcación positiva para Tunel en el epitelio bronquial y bronquiolar, en las paredes alveolares y en el estroma pulmonar (Figura 48). Por otro lado, en los animales control se detectaron escasas células Tunel positivas indistintamente en el parénquima como en el estroma pulmonar.

Sin embargo, no se pudieron establecer diferencias significativas entre la cantidad de células marcadas para los diferentes horarios analizados en los animales inoculados experimentalmente, ni diferencias entre los pulmones infectados y los controles (Figura 49).

Figura 48. Marcación de células en apoptosis con TUNEL mediante inmunofluorescencia en corte de un pulmón de ratón BALB/c infectado y sacrificado a las 48 h pi. El azul corresponde a la tinción nuclear con DAPI, mientras que en rojo los núcleos TUNEL positivos.

Figura 49. Marcación de células en apoptosis en cortes de pulmones de ratones BALB/c infectados con EHV-1 (Inf) o con medio de cultivo (Cc) a diferentes horarios pos infección. La apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL por inmunofluorescencia. No se detectaron diferencias significativas entre los animales (Inf) con los (Cc), ni entre los grupos (Inf) entre sí.

Detección de caspasa 3 activa por inmunohistoquímica

En los pulmones de los animales infectados se detectó marcación positiva para caspasa 3 en el epitelio bronquiolar, en restos celulares presentes en su luz, así como en paredes alveolares y en el estroma. En los pulmones de los animales del grupo control se detectó una escasa cantidad de células positivas a caspasa 3 activa, tanto en el parénquima como en el estroma.

La cantidad de células marcadas fue insuficiente para lograr establecer diferencias significativas entre los diferentes horarios analizados de los animales

inoculados experimentalmente, y entre estos grupos y los animales del grupo control (Figura 50).

Figura 50. Marcación de células en apoptosis en cortes de pulmones de ratones BALB/c infectados con EHV-1 (Inf) o con medio de cultivo estéril (Cc) y sacrificados a diferentes horarios pos infección. La apoptosis se evaluó mediante la marcación de caspasa 3 activa por inmunohistoquímica. No se detectaron diferencias significativas entre los animales (Inf) con los (Cc), ni entre los (Inf) entre sí.

DISCUSIÓN

Luego de estudiar la interferencia de EHV-1 con la apoptosis *in vitro*, se comenzó con el análisis *in vivo* utilizando pulmones de animales experimentalmente infectados con el virus. Estos estudios buscan una primera aproximación sobre la interacción que existe entre el virus en el individuo huésped.

El EHV-1 ingresa por vía nasal y rápidamente comienza su replicación en células epiteliales de la nasofaringe, tráquea y bronquios, desde donde accede a la circulación sistémica. Teniendo en cuenta la patogenia del virus se propuso buscar la existencia de algún mecanismo de interferencia o modulación de la apoptosis en el primer órgano blanco del virus.

Los estudios que relacionan a los herpesvirus con la apoptosis en tejidos animales se han realizado principalmente con SuHV-1 en cerdos experimentalmente infectados, y en ellos se analizaron cambios por inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, Tunel y microscopía electrónica de transmisión en muestras de ganglio trigémino tomadas a las 24, 48 y 72 h pi y (Alemañ y col., 2001; Marcaccini y col., 2006). Los autores demostraron que en su mayor parte las neuronas infectadas no presentaban cambios apoptóticos para los momentos estudiados, asociando este hecho con el estado de latencia que presenta el virus en las células nerviosas. Además, demostraron que las células positivas para SuHV-1 y para Tunel se encontraban en las mismas áreas, pero la apoptosis se manifestaba principalmente en células inflamatorias y no en células nerviosas infectadas. Asimismo, la marcación para el Ag viral se reducía al transcurrir los días desde la infección, probablemente debido a

la degradación del Ag por proteasas celulares (Alemañ y col., 2001). Por otro lado, encontraron que durante largos estadios de infección se podía identificar la activación de caspasa 3 en neuronas ganglionares, suponiendo que la inhibición de la apoptosis ejercida por SuHV-1 sería un proceso temporario y no permanente (Marcaccini y col., 2006).

En lo que respecta a la infección por EHV-1 en ratones BALB/c infectados, se demostró la presencia del Ag viral en los pulmones a partir de las 24 h pi, con un aumento de su expresión entre las 48 y 72 h pi, para luego disminuir gradualmente, producto de la remoción viral ejercida principalmente por los macrófagos, hasta llegar a una marcación casi nula a los 7 días pi. Simultáneamente se evidenciaron cambios histológicos correspondientes a una respuesta antiviral por parte del hospedador, evidenciada por la presencia de sincicios, zonas de erosión y cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos en los epitelios bronquiales, con pequeños focos inflamatorios, las células inflamatorias observadas fueron principalmente mononucleares y escasos neutrófilos (Zanuzzi y col., 2013). Todos estos cambios motivaron la elección de los tiempos (24, 48, 72 y 96 h pi) para llevar a cabo la primer aproximación en el estudio del efecto del EHV-1 con la apoptosis, en muestras de pulmones de animales infectados experimentalmente.

Durante el presente estudio se evaluó el número total de células apoptóticas, discriminando los tipos celulares involucrados por características morfológicas. La determinación de células apoptóticas en tejidos se realizó de manera similar a la utilizada por otros autores (Alemañ y col., 2001; Marcaccini y col., 2006) mediante el uso de la técnica de Tunel e inmunohistoquímica para detectar caspasa 3 activa. La

ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos infectados entre sí y, entre éstos con grupos controles podría deberse a un conjunto de factores relacionados, al menos en parte con, la eliminación definitiva del virus del tejido pulmonar, ésto sumado a que el pulmón no es un órgano donde el virus establezca latencia, dificultó la identificación y el análisis de cambios en este órgano.

Las células de los pulmones, al igual que la mayoría de las células de un individuo, se encuentran en diferentes estadios del ciclo celular y, particularmente las células epiteliales, tienen un recambio relativamente rápido, por lo que el análisis de células en apoptosis simultáneamente con la infección viral con las técnicas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis resultó complejo. En los estudios realizados por Alemañ y col. (2001) y Marcaccini y col. (2006) en animales infectados con SuHV-1 se encontraron diferencias en ganglio trigémico, lugar donde el virus establece latencia, sin embargo los autores no estudiaron aspectos similares en otros órganos, entre ellos el pulmón, primer órgano blanco; por lo que no se pudieron comparar los resultados con los observados en nuestras experiencias.

Por otro lado, en el organismo a diferencia de lo que ocurre en un cultivo de células, la apoptosis tiene un progreso dinámico, las células que están transitando por este proceso rápidamente deben ser fagocitadas y eliminadas, lo que también podría explicar nuestra baja observación de células apoptóticas, comparativamente a lo registrado en los estudios *in vitro*.

La ausencia de un control positivo para apoptosis, debido a la ausencia de un inductor natural o comercial que pueda utilizarse *in vivo*, impidió realizar comparaciones entre este grupo y los pulmones de los animales infectados.

A pesar de todo lo anteriormente mencionado, el proceso de modulación de la apoptosis por el EHV-1 podría ejercerse de manera temporal teniendo como principal finalidad asegurar la replicación del virus, paso previo y de suma importancia para iniciar la fase de viremia y diseminación por otros órganos blancos. Estos resultados concordarían con los obtenidos para los estudios *in vitro*, aunque la dinámica de la infección en un organismo vivo es diferente a aquella realizada sobre un cultivo celular.

Estos primeros ensayos *in vivo* con EHV-1 sobre pulmones son una primera aproximación a la modulación que ejerce el virus en las células del epitelio respiratorio, lugar donde comienza su patogénesis.

CONCLUSIONES GENERALES

- La línea celular ED es más sensible a la infección por el virus en comparación con las células MDBK.
- La cepa AR8-EHV-1 impacta negativamente sobre la apoptosis hacia la mitad del ciclo de replicación viral, en células MDBK y ED.
- Las células ED resultaron más sensibles al efecto modulador de la apoptosis ejercido por el virus comparativamente al observado en las células MDBK.
- De acuerdo a los resultados expuestos, el mecanismo por el cual el EHV-1 interactúa con la apoptosis podría involucrar a la vía extrínseca dependiente de caspasas, manifiesta por la participación de la caspasa 8.
- El incremento del porcentaje de apoptosis encontrado hacia el final del ciclo de replicación podría ser utilizado como un mecanismo viral para favorecer la liberación de nuevas partículas virales al medio.
- El EVH-1 podría utilizar a la apoptosis como un mecanismo secundario que favorezca su diseminación a través de células fagocíticas.
- La eliminación del virus de los pulmones por la fagocitosis de las células infectadas, afectaría la visualización de posibles mecanismos que estarían implicados en la modulación de la apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alemañ N, Quiroga MI, López Peña AM, Vazquez S, Guerrero F, Nieto J M. Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. J Virol. 2001; 75(1):469–479.
2. Allen GP, Bryans JT. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus 1 infections. Prog Vet. Microbiol Immunol. 1986; 2: 78-144.
3. Allen AL, Myers SL, Searcy GP, Fretz PB. Hematology of equine fetuses with comparisons to their dams. Vet Clin Pathol. 1998; 27: 93-100.
4. Allen GP, Kidd JH, Slater JD, Smith KC. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. Proc. 8th Int. Conf. Eq. Inf. Dis. Ed U Wernery, JF Wade JA, Mumford, Kaaden OR, R&W Publications (Newmarket). 1999; 129-146.
5. Allen GP, Slater JD, Smith KC. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. En Infectious diseases of Livestock, J.A.W.a.T. Coetzer, R.C., ed. (Cape Town, Oxford Press). 2004; pp. 829-859.
6. Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998; 281(5381): 1305-1308
7. Aubert M, and Blaho JA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. J Virol. 1999; 73: 2803-2813.
8. Aubert M, Pomeranz LE, Blaho JA. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. Apoptosis. 2007; 12: 19-35.

9. Awan AR, Baxi, M, Field HJ. EHV-1-induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. *Res Vet Sci.* 1995; 59: 139-145.
10. Awan AR, Chong Y, Field HJ. "The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J Gen Virol.* 1990; 71: 1131-1140.
11. Awan AR, Gibson JS, Field HJ. A murine model for studying EHV-1- induced abortion. *Res Vet Sciences.* 1991: 51, 94-99.
12. Baxi MK, Efsthathiou S, Lawrence G Whalley JM, Slater JD, Field HJ. The detection of latency associated transcript of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J Gen Virol.* 1995; 76: 3113-18.
13. Benetti L, Munger J, Roizman B. The herpes virus simplex Us3 protein kinase blocks caspase dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol.* 2003; 77(11):6567-6573
14. Benetti L, Roizman B. Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 2004,101: 9411-9416.
15. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang G, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JL. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas and TNFR1 induced apoptosis. *Biochemistry.* 1997, 94:1172-1176
16. Berrueta L, Salmen S, Montes H. REspuesta inmunitaria frente a virus. *Rev Méd Ext Portuguesa.* 2007; 1(2):73-90

17. Bottone MG, Santin G, Aredia F, Bernocchi G, Pellicciari C, Scovassi AI. Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells*. 2013; 2: 294–305.
18. Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell death independent of caspase: a review. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(9): 3155-3162.
19. Carpenter D, Hsiang C, Brown DJ, Jin L, Osorio N, BenMohamed L, Jones C, Wechsler SL. Stable cell lines expressing high levels of the herpesvirus simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis. *Virology*. 2007; 369:12-18
20. Carter J, Saunders VA. Herpesviruses (and other DNAs virus). *Virology Principles And Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Liverpool, UK. 2007; 121-35.
21. Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol*. 2000; 145(11): 2371-85.
22. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol*. 1997; 71: 3437–43.
23. Cheung A K, Chen Z, Sun Z, McCullough D. Pseudorabies virus induces apoptosis in tissue culture cells. *Arch Virol*. 2000; 145: 2193–2200.
24. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37: 299–310.
25. Clarke P y Tyler KL. Apoptosis in animal models of virus induced disease. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(2):144-155.

26. Cooper GM y Hausman RE. Muerte y renovación celular. En: La célula. 5ta edición. Madrid, España. Ed. Marbán, 2009, p. 694-705.
27. Crabb BS, Studdert MJ. Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J Gen Virol.* 1990; 71(9): 2033-41.
28. Crawford ED, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 2011; 80: 1055–1087.
29. Cymerys J, Slonska A, Godlewski M M, Golke A, Tucholska A A, Chmielewska A, Banbura M W. Apoptotic and necrotic changes in cultured murine neurons infected with equid herpesvirus 1. *Acta virol.* 2012; 56: 39–48.
30. Dash P. Apoptosis. University of London. 2006 .[Online: www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash]
31. Davison A, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009; 154(1): 171-177.
32. De Diego AI. (Ed). Guía para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (aves y mamíferos) Ed. del autor. Bs As, Argentina. 1974; p. 587.
33. Delhon G A, Marcelo J, González M J, Murcia P R. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J Gen Virol.* 2002; 83: 2257–2267.
34. Del Piero F, Wilkin S. Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Vet Pathol.* 2001; 38(4): 474-475.

35. De Martino L, Marfe G, Di Stefano C, Pagnini U, Florio S, Crispino L, Iovane G, Macaluso M, Giordano A. Interference of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in sorbitol-Induced apoptosis. *J Cell Biochem.* 2003; 89: 373-380.
36. De Martino L, Marfe G, Irno Consalvo M, Di Stefano C, Pagnini U, Sinibaldi-Salimei P. Antiapoptotic activity of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) UL14 protein. *Vet Microbiol.* 2007; 123: 210–216
37. Deruelle MJ, De Corte N, Englebienne J, Nauwynck HJ, Favoreel HW. Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. *J Gen Virol.* 2010; 91: 1127-1132.
38. Devireddy L R, Jones CJ. Activation of Caspases and p53 by Bovine Herpesvirus 1 Infection Results in Programmed Cell Death and Efficient Virus Release. *J Virol.* 1999; 73(5): 3778–3788.
39. Díez J, Fortuño MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive cardiopathy. *Rev Esp Cardiol.* 1999; 52(3):18-24
40. Dubin M, Stoppani AOM. Muerte celular programada y apoptosis, función de las mitocondrias. *Medicina (Buenos Aires).* 2000; 60: 375-386.
41. Dunowska M. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment. *New Zealand Veterinary Journal.* 2014; 62:4, 171-178.
42. Dunowska M. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *New Zealand Veterinary Journal.* 2014; 62:4, 179-188.

43. Etcheverrigaray ME, Oliva GA, Gonzalez ET, Nosetto EO, Martin AA. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Revista Militar Veterinaria*. 1982; 30: 138-9.
44. Edington N, Smyt HB, Griffiths L. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *J Comp Pathol*. 1991; 104: 379-387
45. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495–516.
46. Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eigh Oxford, United Kingdom [Online] <http://www.ictvdb.org/ictv/ICTV8thReport%20Master%20species%20list.htm>. 2005.
47. Flint S, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Structure, genome organization, and infectious cycles. En: *Principles of virology*, 2nd edition ASM Press, Washington DC, USA. 2004; 811-812.
48. Fuentealba NA, Zanuzzi CN, Scrochi MR, Sguazza GH, Bravi ME, Cid de la Paz V, Corva SG, Portiansky EL, Gimeno EJ, Barbeito CG, Galosi CM. Protective effects of intranasal immunization with recombinant glycoprotein D in pregnant BALB/c mice challenged with different strains of Equine Herpesvirus 1. *J Comp Path*. 2014; 151(14): 384-393.
49. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006; 25: 4798–4811.
50. Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gomez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. Equine Herpesvirus-1 (EHV-1): Characterisation of a viral strain isolated from

equine plasma in Argentina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizz. 1989; 8 (1): 117-122.

51. Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosoetto EO, Etcheverrigaray ME, Tohya Y, Mikami T. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. Braz J Med Biol Res. 1998;31(6):771-774.

52. Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva SG, Etcheverrigaray ME, Gimeno EJ. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. Vet Microbiol. 2004; 103: 101-112.

53. Galosi CM, Cid de la Paz V, Fernandez LC, Martinez JP, Craig MI, Barrandeguy M, Etcheverrigaray ME. Isolation of equine herpesvirus 2 from the lung of an aborted foetus. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17: 500-502.

54. Galosi CM, Martin Ocampo GP, Martínez JP, Ayala MA, Corva SG, Fuentealba NA, Gimeno EJ. An Argentine Equine Herpesvirus strain with special restriction patterns protect mice challenged with a pathogenic strain. J. Vet. Med. 2006; 53: 412-417.

55. Galvan V, Brandimarti R, Roizman B. Herpes Simplex Virus 1 Blocks Caspase-3-Independent and Caspase-Dependent. J Virol. 1999; 73: 3219-3226.

56. Garber D, Beverley SM, Cohen DM. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. Virology. 1993;197(1): 459-62.

57. Geenen K, Favoreel HW, Nauwynck HJ. Higher resistance of porcine trigeminal ganglion neurons towards pseudorabies virus induced cell death compared with other porcine cell type *in vitro*. J Gen Virol. 2005; 86:1251-1260.

58. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* 2001; 75: 3675-84.
59. Geiser V, Rose S, Jones C. Bovine herpesvirus type 1 induces cell death by a cell-type-dependent fashion. *Microb Pathog.* 2008; 44: 459–466.
60. Gibson JS, Slater JD, Awan AR, Field HJ. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen- free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol.* 1992; 123: 351-66
61. Goehring LS, Wagner B, Bigbie R, Hussey SB, Rao S, Morley PS, Lunn DP. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine.* 2010; 28(32): 5203-5211.
62. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW. Antiapoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency associated transcript. *Nature.* 2006; 442(6):82-85
63. Hanon E, Keil G, vanDrunen S, van den Hurk L, Griebel P, Vanderplasschen A, Rijsewijk FAM, Babiuk L, Pastoret PP. Bovine Herpesvirus 1 induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology.* 1999; 257: 191-197
64. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol.* 2002; 83: 1547-1564.
65. Heldens JG, Kersten AJ, Weststrate MW, Van Den Hoven R. Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpes 1 and 4 combination vaccine. *Vet. Q.* 2001; 23: 210-17.
66. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407: 770–776.

67. Hood C, Cunningham A L, Slobedman B, Boadle R A, Abendroth A. Varicella-Zoster Virus-Infected Human Sensory Neurons are resistant to apoptosis, yet Human Foreskin Fibroblasts are susceptible: evidence for a cell-type-Specific apoptotic response. *J Virol*. 2003; 12852–12864.
68. Huang T, Lehmann MJ, Said A, Ma G, Osterrieder N. Major histocompatibility complex class I downregulation induced by Equine Herpesvirus type 1 pUL56 is through dynamin-dependent endocytosis. *J Virol*. 2014; 88: 12802-12815.
69. Javouhey E, Gibert B, Arrigo AP, Diaz JJ, Diaz-Latoud C. Protection against heat and staurosporine mediated apoptosis by the HSV-1 US11 protein. *Virology*. 2008; 376: 31-41.
70. Jerome KR, Chen Z, Lang R, Torres MR, Hofmeister J, Smith S, Fox R, Froelich CJ, Corey L. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol*. 2001a;167: 3928-3935.
71. Jerome KR, Fox R, Chen Z, Sarkar P, Corey L. Inhibition of apoptosis by primary isolates of herpes simplex virus. *Arch Virol*. 2001b; 146: 2219-2225.
72. Jin L, Perng GC, Brick DJ, Naito J, Nesburn AB, Jones C, Wechsler SL. Methods for detecting the HSV-1 LAT anti-apoptosis activity in virus infected tissue culture cells. *J Virol Methods*. 2004; 118: 9–13.
73. Jin L, Peng W, Perng GC, Brick DJ, Nesburn AB, Jones C, Wechsler SL. Identification of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that both inhibit apoptosis and enhance the spontaneous reactivation phenotype. *J Virol*. 2003; 77: 6556-6561.
74. Jordán J. Apoptosis, muerte celular programada. *Ámbito farmacéutico*. 2003; Vol. 22 Núm: 6

75. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239–257.
76. Kieff E y Shenk T. Modulation of apoptosis by Herpesvirus. *Seminars in virology*. 1998; 8:471-480
77. Koyama AH y Adachi A. Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1997;78: 2909-2912.
78. Koyama AH, Arakawa T, Adachi A. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes Infect*. 2000; 2: 599–606.
79. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E S, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green D R, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.
80. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GJ, Mumford JA. Distribution of equid herpesvirus-1 in respiratory tract-associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J*. 1994; 26: 470-473.
81. Ladelfa MF, Kotsias F, Del Médico Zajac MP, Van den Broeke C, Favoreel H, Romera SA, Calamante G. Effect of the Us3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Vet Microbiol*. 2011; 153: 361-366
82. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Haleys L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. A unified model of mammalian Bcl-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell*. 2011; 44(4): 517-531.
83. Lawen A. Apoptosis an introduction. *Bioessays*. 2003; 25 (9): 888-896.

84. Leopardi R, Roizman B. Functional interaction and colocalization of the herpes simplex virus 1 major regulatory protein ICP4 with EAP, a nucleolar-ribosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 4572-4576.
85. Longo M, Fiorito F, Marfè G, Montagnaro S, Pisanelli G, De Martino LG, Iovane G, Pagnini U. Analysis of apoptosis induced by Caprine Herpesvirus 1 *in vitro*. *Virus Res*. 2009; 145: 227–235.
86. Marcaccini A, Alemañ N, Quiroga MI, López M, Guerrero F, Nieto JM. Temporary inhibition of neuronal apoptosis in Aujeszky's disease virus infected swine. *Vet Microbiol*. 2006; 113: 237-242.
87. Martín Ocampos GP, Fuentealba NA, Sguazza GH, Jones LR, Cigliano MM, Barbeito CG, Galosi CM. Genomic and phylogenetic analysis of Argentinian *Equid Herpesvirus 1*. *Virus Gene*. 2009; 38(1): 113-17.
88. Martinez JP, Fernandez LC, Martin Ocampos GP, Cid de la Paz V, Fuentealba NA, Barrandeguy M, Galosi CM. Detection of equine herpesvirus 1 genome 1B in Argentina. *Rev. Sci.Tech. Off. nt. Epizz*. 2006; 25 (3): 1075-79.
89. Matsumura T, O'Callaghan DJ, Kondo T, Kamad AM. Lack of virulence of the murine fibroblast adapted strain, Kentucky A (K yA) of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in young horses. *Vet Microbiol*. 1996; 48: 353-65.
90. Matsumura T, Kondo T, Sugita S, Damiani AM, O'Callaghan DJ, Imagawa H. An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horses. *Virology*. 1998; 242: 68-79.
91. Matumoto M, Ishizaki R, Shimizu T. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infections among horses in various countries. *Arch Ges Virus Forsch*. 1965; 50: 606-23

92. McCartan CG, Russell MM, Wood JL, Mumford JA. Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet Rec.* 1995; 136: 7-12.
93. McConkey DJ. 20s ways to apoptosis. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(9): 528-529.
94. McGeoch DJ, Barnett BC, Maclean CA. Emerging functions of alpha herpes genes. *Semin Virol.* 1993; 4: 125–34.
95. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 2006; 117: 90-104.
96. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase function in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
97. Miller LK y White E. Apoptosis in virus infection. *Seminars in virology.* 1998; 8:443-444.
98. Miles DH, Thakur A, Cole N, Willcox MDP. The induction and suppression of the apoptotic response of HSV-1 in human corneal epithelial cells. *Inv Opht & Vis Sci.* 2007; 48(2): 789-796
99. Molinková D, Skladal P, Celer V. In vitro neutralization of equid herpesvirus 1 mediated by recombinant antibodies. *J Immunol Methods.* 2008; 333(1-2): 186-191.
100. Mukherjee S, Chiu R, Leung SM, Shields D. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic Cph. Den.* 2007; 8: 369–378.
101. Mumford JA, Rosedale PD. Virus and its relationship to the "poor performance" syndrome. *Equine Vet J.* 1980; 12: 3-9.

102. Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J, Cook RF. Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm. *J Reprod Fertil Suppl.* 1985; 35: 509-18.
103. Mumford JA, Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, Smith KC, Ostlund EN. Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with equid herpesvirus-1. En: Plowright W and Nakajima H. *Equine Infectious Diseases VII.* Newmarket, Suffolk, R & W Publications. 1994, 261–275.
104. Munger J, Chee A, Roizman B. The US3 Protein Kinase Blocks Apoptosis Induced by the d120 Mutant of Herpes Simplex Virus 1 at a Premitochondrial Stage. *J Virol.* 2001; 5491–5497
105. Munger J y Roizman B. The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *PNAS.* 2001; 98(18): 10410-10415
106. Murray MJ, Del Piero F, Jeffrey SC, Davis MS, Furr MO, Dubovi EJ, Mayo JA. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection a thoroughbred breeding farm. *J Vet Intern Med.* 1998; 12: 36-41
107. Nguyen ML y Blaho JA. Cellular players in the Herpes simplex virus dependent apoptosis balancing act. *Viruses.* 2009; 1: 965-978
108. Noretto EO, Monina MI, Baschar H, Gallo GG, Galosi CM, Idiart JR, Gimeno EJ. Síndrome Neurológico asociado a Herpes Virus Equino-1(HVE-1). *Med. Vet. Barcelona.* 1985; 2(11): 583-588.
109. Oberle C, Huai J, Reinheckel T, Tacke M, Rassner M, Ekert PG, Buellesbach J, Borner C. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a

Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 1167–1178

110. Ou HD, Löhr F, Vogel V, Mäntele W, Dötsch V. *The Embo Journal.* 2007; 26: 3463-3473

111. Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto L, Florio S, Iovane G. Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 103: 283–293

112. Park JH, Zhuang J, Li J, Huang PM. P53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett.* 2016. doi: 10.1002/1873-3468.12061.

113. Patel JR, Heldens J. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4): epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet J.* 2005; 170:14-23

114. Perkins D, Pereira EFR, Gober M, Yarowsky PJ, Aurelian L. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J Virol.* 2002; 76(3) 1435-1449.

115. Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone Henderson G, Yukht A, Slanina SM, Hofman FM, Ghiasi H, Nesburn AB. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 2000; 287: 1500-1503.

116. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69: 462- 500.

117. Poon APW, Benetti L, Roizman B. Us3 and Us3,5 protein kinases of Herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *J Virol.* 2006; 80(8):3752-3764
118. Postigo A y Ferrer PE. Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes and infection.* 2009; 11: 1071-1078
119. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 405–413.
120. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 897–907.
121. Rimstad E y Evensen O. The identification of equid herpesvirud 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J. Vet. Diag. Inv.* 1993; 5: 174-83.
122. Rimstad E y Hyllseth B. Equine Herpesviruses 1 and 4: amplification and differentiation by Polymerase Chain Reaction. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35: 303-6.
123. Roizman B, Batterson W. Herpesviruses and their replication. Raven Press, New York, USA. 1985, p. 497-526.
124. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 1992; 123: 425-49.
125. Roizman B, Knipe DM. Herpes Simplex Virus and their replication. En: D.M. Knipe and P.M. Howley *Fields Virology*, 4ta Edición. Lippincot Williams & Wilkings, Philadelphia. 2001, 2: p. 2399-2460.
126. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffre-Cuculletto M, Venuti A, Grelli S, Bramanti P, Mastino A. Involvement of gD/HVEM interaction in NF-

kB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76: 1522-1532.

127. Shen W y Jones C. Open reading frame 2, encoded by the latency related gene of Bovine herpesvirus 1, has antiapoptotic activity in transiently transfected neuroblastoma cells. *J Virol.* 2008; 82(21): 10940-10945

128. Shukla D, Del Canto MC, Rowe CL, Spear PG. Striking similarity of murine nectin-1 alpha to human nectin-1 alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *J Virol.* 2000; 70(5): 11773-11781.

129. Slater JD, Gibson JS, Barnett KC, Field HJ. Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet Rec.* 1992; 131: 237-239

130. Slater JD, Borchers K, Thackery AM, Field H. The trigeminal ganglion is a location for quine herpesvirus-1 (EHV-1) in latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol.* 1994; 75: 2007-2016.

131. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant mares with equid herpesvirus 1. *Equine Vet J.* 1992; 24: 256-259.

132. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Gower SM, Hannant D, Tearle JP. An immunohistological study of the uterus mares following experimental infection by equid herpesvirus 1. *Equine Vet J.* 1993; 25: 36-40.

133. Smith KC, Mumford JA, Lakhani K. A comparison of equid herpesvirus 1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *J Comp Pathol.* 1996; 114: 231-47.

134. Smith DJ, Iqbal J, Purewal A, Hamblin AS, Edington N. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+ CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophine. *J Gen Virol.* 1998; 24: 2997-3004.
135. Soboll Hussay G, Ashton LV, Quintana AM, Lunn DP, Goehring LS, Annis K, Landolt G. Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with Equine herpesvirus 1. *Vet Microbiol.* 2014; 170: 28-38.
136. Spear P, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 2003; 77(19): 10179-85.
137. Spiesschaert B, Goldenbogen B, Taferner S, Schade M; Mahmoud M, Klipp E, Osterrieder N, Azab W. Role of gB and Us3 in Equine Herpesvirus transfer between peripheral blood mononuclear cells and endothelial cells: a dynamic in vitro model. *J Virol.* 2015; 89(23): 11899-11908
138. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 9(3): 231-241
139. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Bin NS, Livesay GJ, Mumford JA. Replication of equid herpesvirus 1 (EHV-1) in the testes and epididymes of ponies and venereal shedding of infectious virus. *J Comp Pathol.* 1996; 115: 385-97
140. Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology.* 1992; 189(1): 304-316.
141. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene product. *J Virol.* 1997; 71(3): 1739-1746.
142. Turowska A, Pajak B, Godlewski MM, Dzieciatkowski T, Chmielewska A, Tucholska A, Bandura M. Opposite effects of two different strains of equine herpesvirus 1 infection on cytoskeleton composition in equine dermal ED and African

green monkey kidney Vero cells line: application of scanning cytometry and confocal microscopy based image analysis in quantitative study. *Arch Virol.* 2010; 155: 733-743.

143. Van den Broeke C, Radu M, Nauwynck HJ, Chernoff J, Favoreel HW. Role of group A p21 activated kinases in the anti-apoptotic activity of the pseudorabies virus virus Us3. *Virus Res.* 2011; 155: 376-380

144. van der Meulen K, Caij B, Pensaert M, Nauwynck H. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol.* 2006; 113(3-4): 265-73.

145. van Woensel PA, Goovaerts D, Markx D, Visser N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. *J Virol Methods* 1995; 54: 39-49.

146. Tait SWG y Green DR. Caspase independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene.* 2008; 27: 6452-6461.

147. Thompson RL, Sawtell NM. HSV latency-associated transcript and neuronal apoptosis. *Science.* 2000; 289, 1651.

148. Vijayakumaran R, Tan KH, Miranda PJ, Haupt S, Haupt Y. Regulation of mutant p53 protein expression. *Front Oncol.* 2015; 5: 284.

149. Vissani MA, Becerra ML, Olguín Perglione C, Tordoya MS, Miño S, Barrandeguy M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet Microbiol.* 2009; 139(3-4): 361-364.

150. Walker C, Love DN, Whalley JM. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse an the mouse model: a review. *Vet Microbiol.* 1999a; 68: 3-13.

151. Walker C, Perotti VM, Love DN, Whalley JM. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. *J Comp Pathol*. 1999b; 120: 15-27.
152. Walter J, Seeh C, Fey K, Bleul U, Osterrieder N. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Virologica Scandinavica*. 2013; 55:19.
153. Watson D. Replication of the viruses: morphological aspects. En: Kaplan AS. *The herpesviruses*, New York, USA, Academic Press. 1973; 133-159.
154. Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N. Latent herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J Gen Virol*. 1992; 73: 261-68.
155. Westerfield C, Dimock WW. The pathology of equine virus abortion. *J Am Vet Med Assoc*. 1946; 109: 101-111.
156. Whitwell KE, Blunden AS. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV1) infection. *Equine Vet J*. 1992; 24: 13-19.
157. Wilson WD. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1997; 13: 53-72.
158. Xu X, Zhang K, Huang Y, Ding L, Chen G, Zhang H, Tong D. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virol J*. 2012; 9:202
159. Ye G, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B. The herpes simplex virus 1 U (L) 34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membranes. *J Virol*. 2000; 74(3): 1355-1363.

160. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 657–663.
161. Ziegler U y Groscurth P. Morfological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 124-128.
162. Zhou G, Avitabile E, Campadelli-Fiume G, Roizman B. The domains of glycoprotein D required to block apoptosis induced by herpes simplex virus 1 are largely distinct from those involved in cell-cell fusion and binding to nectin1. *J Virol.* 2003; 77: 3759-3767.

ANEXOS

A- Líneas celulares utilizadas

- 1- **RK13:** Líneas celulares continuas desarrolladas a partir de células de riñón de conejo. Presentan un tiempo de duplicación de 26-30 h.
- 2- **MDBK:** Líneas celulares continuas desarrolladas a partir de células de riñón de feto bovino.
- 3- **VERO:** Líneas celulares continuas desarrolladas a partir de células de epitelio renal de mono.
- 4- **ED:** Líneas celulares continuas desarrolladas a partir de dermis equina.

B- Soluciones para el crecimiento y mantenimiento de células

B-1 Solución de antibióticos: Penicilina, Estreptomicina

B-2 Antimicóticos: Nistatina

B-3 Solución para la remoción de células: tripsina (0,25 % w/v) – EDTA (0,2 % w/v) (Sigma – Aldrich, USA)

C- Solución de PBS

Cloruro de sodio (NaCl) 7,5 gr, cloruro de potasio (KCl) 0,15 gr, fosfato disódico ($2\text{H}_2\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 1,42 gr, fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) 0,19 gr, agua bidestilada 1000 ml.

D- Reactivos para electroforesis

D-1 En geles de agarosa

- 1- **TBE 5X:** 45 mM Tris, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, pH 8. La dilución de uso es 1/10.
- 2- **Buffer de carga:** 10mM Tris-HCl - pH 7,6; 0,03% de azul de bromofenol y 60% de glicerol.

D-2 En geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- 1- **Acril-Bis:** 30g de acrilamida más 0,8 g de bis-acrilamida en 100ml de agua.

- 2- **Buffer Tris HCl 1,5M pH 8,8:** 18,5 g de tris-base (Invitrogen) en aproximadamente 50ml de agua, ajustar el pH a 8,8 con HCl y llevar a 100ml con agua.
- 3- **Buffer Tris HCl 0,5M pH 6,8:** 6 g de tris-base (Invitrogen) en 50ml de agua, HCl para ajustar el pH a 6,8 y llevar a 100 ml con agua.
- 4- **10% SDS:** 10g de SDS (WAKO) en 100 ml de agua.
- 5- **10% APS:** 10 mg de persulfato de amonio (Gibco) en 1 ml con agua.
- 6- **Temed:** solución comercial de N,N,N,N'-Tetrametiletilendiamina (AppliChem).
- 7- **Buffer de reservorio:** 0,302 g/l de tris-base (Invitrogen), 1,44 g/l de glicina y 0,1% de SDS.
- 8- **Buffer de carga:** Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (250 μ l), SDS 10% (400 μ l), glicerol (400 μ l), Azul de Bromofenol 0,1% p/v (20 μ l), agua (850 μ l), 2-mercaptoetanol (100 μ l) para preparar en buffer en condiciones reductoras, sino se reemplaza por agua.
- 9- **0,1% BB:** 10 mg de azul de Bromofenol (SIGMA) en 10 ml de agua.

E- Soluciones para extracción de proteínas celulares

- 1- **Solución de congelado:** 25 ml PBS, 25 μ l de 1 mM $MgCl_2$, 1 pastilla de EDTA libre de proteasas.
- 2- **Solución "Ripa 1":** 500 μ l tris 1M pH 7,4, 100 μ l tritón X-100, 25 mg Nadesoxicolato, 300 μ l NaCl 5M. Ajustar a 10 ml con agua.
- 3- **Solución "Ripa 2":** ídem solución Ripa 1, 200 μ l EDTA 0,5 M.

F- Reactivos para western blot

- 1- **Buffer de carga con reductor:** Tris-HCl 0.5M pH 6.8 250 μ l, SDS 10% 400 μ l, 2-mercaptoetanol 100 μ l, Glicerol 400 μ l, Agua 850 μ l, azul de bromofenol 20 μ l.
- 2- **Buffer de Transferencia:** tris-base 5,82 g, glicina 2,93 g, 10% SDS 3,75 ml y metanol 200 ml. Ajustar a 1L con agua.
- 3- **Solución de Bloqueo:** PBS 100 ml, tween-20 0,1 ml y leche en polvo 5 g.

4- **Solución de Lavado:** PBS 100 ml, tween-20 0,1 ml.

5- **Solución de Revelado:** PBS 100 ml, DAB 30 mg y H₂O₂ 15 µl.

G- Reactivos para determinación de actividad de caspasa por espectrofluorometría

1- **Buffer de lisis:** 50 mM Hepes pH 7.4, 0,1 chaps-triton X-100, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA.

2- **Buffer ensayo:** 50 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol.

H- PROTOCOLOS

H-1 Técnica de inmunofluorescencia

I. Obtener cortes de 5 µm de espesor y acondicionarlos sobre portaobjetos positivados.

II. Mantener en estufa durante las 24 horas previas al procedimiento.

III. Desparafinar: 2 pasajes por xilol, de 10 min cada uno (controlar que el xilol no esté hidratado, con burbujas o turbio).

IV. Hidratar: 2 pasajes por alcohol 100° de 3 a 5 min cada uno. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 min cada uno. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 min. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 min.

V. Realizar 2 lavados con PBS pH 7,4 de 5 min cada uno (los tiempos de lavado pueden extenderse). Para el caso de células fijadas en cubreobjetos el protocolo comienza aquí.

VI. Quitar el exceso de PBS.

VII. Escurrir.

VIII. Cubrir con el anticuerpo primario (Citoqueratina 18) o reactivo (Tunel) (excepto los controles). Asegurar la posición horizontal de los portaobjetos. Incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C o durante 1 h a 37°C.

IX. Realizar 3 lavados con PBS con *tween* al 0,05 durante 5 min cada uno.

X. Secar.

XI. Incubar con el anticuerpo secundario durante 1h (Citoqueratina 18).

XII. Realizar 2 lavados con PBS con *tween* al 0,05 de 5 min cada uno.

XIII. Secar cuidadosamente.

XIV. Incubar con DAPI durante 15 min a Ta.

XV. Realizar 2 lavados con PBS con *tween* al 0,05 de 5 min cada uno.

XVI. Lavar con agua destilada.

XVII. Montaje con medio acuoso Fluoromont.

H-2 Técnica de tinción con hematoxilina y eosina

I. Desparafinado: 2 pasajes por xilol de 5 a 10 min cada uno. Escurrir bien.

II. Hidratación:

- a. 1 pasaje por alcohol 100° de 5 a 10 seg.
- b. 1 pasaje por alcohol 96° de 5 a 10 seg.
- c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 a 10 seg.
- d. 1 pasaje por agua destilada.

III. Coloración con hematoxilina de Gill: 3 a 5 min.

IV. Viraje en agua corriente: realizar 2 o 3 cambios de agua corriente.

V. Enjuague en agua destilada.

VI. Coloración con eosina: 1 min.

VII. Deshidratación:

- a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 a 10 seg.
- b. 2 pasajes por alcohol 100° de 5 a 10 seg.
- c. 2 pasajes por xilol de 5 a 10 seg.

VIII. Montaje: con bálsamo sintético o de Canadá.

H-3 Técnica de inmunohistoquímica

Método EnVision

I. Obtener cortes de 2-3 μm de espesor y acondicionarlos sobre portaobjetos positivados.

II. Mantener en estufa durante las 24 h previas al procedimiento.

III. Desparafinar: 2 pasajes por xilol de 10 min cada uno (observar que el xilol no esté hidratado, con burbujas o turbio).

IV. Hidratar: 2 pasajes por alcohol 100° de 3 a 5 min cada uno.

V. Sumergir los cortes en solución de peróxido de hidrógeno al 0,03% en metanol absoluto durante 30 min a temperatura ambiente (para el bloqueo de peroxidasas endógenas).

VI. Continuar la hidratación:

- a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 min cada uno
- b. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 min.
- c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 min.

VII. Realizar 2 lavados con PBS pH 7,4 de 5 min cada uno

VIII. Quitar el exceso de PBS.

IX. Realizar la recuperación antigénica (ver procedimiento al final).

X. Retirar los portaobjetos del buffer, dejar escurrir la solución y secar cuidadosamente el exceso de líquido del corte. Evitar la desecación de los cortes.

XI. Incubar con BSA 1% durante 30 min para bloquear uniones inespecíficas.

XII. Escurrir.

XIII. Cubrir con el anticuerpo primario (excepto los controles). Asegurar la posición horizontal de los portaobjetos. Incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C o durante 1 h a 37°C.

XIV. Realizar 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno, cada anticuerpo por separado.

XV. Secar.

XVI. Incubar con el anticuerpo puente (inmunoglobulinas biotiniladas en PBS) durante 10 min.

XVII. Realizar 2 lavados con PBS de 5 min cada uno.

XVIII. Secar cuidadosamente.

XIX. Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa durante 30 min.

XX. Realizar 2 lavados con PBS de 5 min cada uno.

XXI. Revelado: incubar con solución comercial de 3-3'diaminobenzidina (DAB) durante 5-10 min a temperatura ambiente, o hasta observar coloración parda en el corte.

XXII. Interrumpir el revelado sumergiendo los cortes en agua corriente. Sumergir luego en agua destilada.

XXIII. Realizar la coloración de contraste sumergiendo en hematoxilina de Gill durante 15-30 seg (ajustar el tiempo en función de los resultados).

XXIV. Lavar con agua corriente hasta lograr el viraje del colorante.

XXV. Lavar con agua destilada.

XXVI. Deshidratar:

- a. Realizar un pasaje rápido por alcohol 80°.
- b. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 96°.
- c. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 100°. Escurrir.

XXVII. Realizar dos pasajes en xilol de 1-2 min cada uno.

XXVIII. Montar con bálsamo sintético o de canada.

Recuperación antigénica mediante el uso del horno de microondas.

1. Colocar los cortes en Koplín de plástico sin tapar, sumergidos en buffer de citrato 10 mM, pH 6,0. Colocar siempre el mismo número de jarras cerca del centro del plato giratorio, con un número fijo de preparados (4 ó 5); agregar portaobjetos vacíos si es necesario.
2. Irradiar a 800 W dos veces durante 3 min.
3. Reponer el *buffer* de citrato evaporado y repetir la operación con los mismos parámetros.
4. Dejar enfriar 20 min en el buffer.
5. Realizar 2 lavados con PBS durante 5 min cada uno.
6. Continuar con la técnica de IHQ de elección.

Solución de *buffer* de citrato pH 6,0 mM

Ácido cítrico monohidrato ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....2,1 g

Agua destilada.....1000 ml

Ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 2 N.