



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. Carola Otth

Instituto de Microbiología Clínica

Facultad de Medicina

**ALTERACIÓN DEL CITOESQUELETO NEURONAL INDUCIDA
POR LA INFECCIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS HERPES SIMPLE
TIPO1**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

NATALIA SALVADORES BERSEZIO

VALDIVIA – CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Carola Otth, por haberme recibido en su laboratorio, haberme integrado en su grupo de investigación, y haber depositado su confianza en mi trabajo. Agradezco a la Dra. Angara Zambrano por su gran ayuda, todos sus consejos, y por el tiempo que se dio para encontrar soluciones cuando algún problema surgió.

Agradezco también a la Dra. Ilona Concha, por aceptar ser miembro de mi comisión evaluadora.

Especialmente quiero agradecer a mis papás y a mis hermanos, por apoyarme y estar a mi lado siempre entregándome su amor y preocupación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Loretto, Claudio, especialmente a Danilo, Lerchu, Marcos, Sharin y Naty, les doy las gracias por haberme acompañado y ayudado, por haberme hecho reír, haber escuchado mis largas historias y haber compartido conmigo tantos momentos. Gracias Paula por toda tu alegría, tu compañía y paciencia que me tuviste todo el tiempo.

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología, Facultad de Ciencias y Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, de la Universidad Austral de Chile, y contó con el financiamiento de Fundación Andes C-14060/5, MECESUP AUS0107, y DID-UACH S-2007-62.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
1.1. SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.4. Planteamiento del problema	17
2.5. Objetivo general	18
2.5.1. Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Material biológico	19
3.1.1. Virus Herpes Simple Tipo 1	19
3.1.2. Cultivo de células VERO	19
3.1.3. Cultivo primario de neuronas corticales	20
3.2. Reactivos químicos	20
3.3. Metodología	22
3.3.1. Propagación viral	22
3.3.2. Titulación viral	22
3.3.3. Cinética de infección	24
3.3.4. Extracción de proteínas	25
3.3.5. Separación electroforética de proteínas	25
3.3.6. Electrotransferencia a membranas	26
3.3.7. Inmunodetección	27
3.3.8. Inmunofluorescencia	28

3.4. Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Modelo Epitelial	29
4.1.1. Titulación del Virus Herpes Simple Tipo 1	30
4.1.2. Control de infección	30
4.1.3. Alteraciones del citoesqueleto celular inducidas por la infección del Virus Herpes Simple Tipo 1	32
4.1.3.1. Cambios en la dinámica microtubular	32
4.1.3.2. Alteración de los filamentos de actina	35
4.2. Modelo neuronal	39
4.2.1. Caracterización del cultivo neuronal	39
4.2.2. Control de infección	41
4.2.3. Eventos neurodegenerativos inducidos por la infección del Virus Herpes Simple Tipo 1	41
4.2.3.1. Alteración de los procesos neuríticos	41
4.2.3.2. Detección de células apoptóticas	47
4.2.3.3. Cambios en la dinámica microtubular de neuronas infectadas con Virus Herpes Simple Tipo 1	49
4.2.3.4. Alteración del citoesqueleto neuronal de actina	55
5. DISCUSIÓN	58
6. CONCLUSIONES	63
7. BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	
Morfología del virión de los Herpesvirus	4
Figura 2.	
Entrada del virus al SNC	9
Figura 3.	
Diseminación de los Herpesvirus dentro del sistema nervioso	10
Figura 4.	
Principales estructuras del citoesqueleto	12
Figura 5.	
Ensayo de formación de placas	31
Figura 6.	
Control de infección celular	31
Figura 7.	
Efecto citopático inducido por HSV-1 sobre células VERO	33
Figura 8.	
HSV-1 induce cambios en la dinámica microtubular de células VERO	34
Figura 9.	
Cambios de distribución de la tubulina modificada en células infectadas con HSV-1	36
Figura 10.	
Redistribución de la tubulina tirosinada en el citoesqueleto celular	37

Figura 11.	
Alteración de los filamentos de actina inducido por la infección con HSV-1	38
Figura 12.	
Caracterización del cultivo primario	40
Figura 13.	
Determinación del porcentaje de astrocitos	42
Figura 14.	
Control de infección neuronal	43
Figura 15.	
Daño neuronal inducido por la infección con HSV-1	45
Figura 16.	
La inhibición de la replicación viral evita las alteraciones inducidas por la infección de HSV-1	46
Figura 17.	
Apoptosis inducida por la infección con HSV-1	48
Figura 18.	
Cambios en la acetilación de la tubulina inducidos por la infección de HSV-1 en neuronas	50
Figura 19.	
Cambios en la tirosinación de la tubulina inducidos por la infección de HSV-1 en neuronas	51

Figura 20.

Cambios en la distribución de la tubulina tirosinada en cultivos neuronales infectados con HSV-1 53

Figura 21.

Cambios en la distribución de la tubulina acetilada en cultivos neuronales infectados con HSV-1 54

Figura 22.

Alteración del citoesqueleto neuronal de actina inducido por la infección de HSV-1 56

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	:	Albúmina sérica de bovino
DMEM	:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EA	:	Enfermedad de Alzheimer
ECP	:	Efecto citopático
EDTA	:	Ácido etilendiamino tetraacético
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
GFAP	:	Proteína ácida fibrilar glial
H.P.I.	:	Horas post infección
HBSS	:	Solución salina balanceada Hank
HSE	:	Encefalitis por Herpes Simple
HSV-1	:	Virus Herpes Simple Tipo 1
MEM	:	Medio Eagle Mínimo
MOI	:	Multiplicidad de infección
MTs	:	Microtúbulos
PBS	:	Tampón fosfato salino
PFU	:	Unidades formadoras de placa
SDS	:	Dodecilo sulfato de sodio
SFB	:	Suero fetal bovino
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	:	Tris hidroximetil aminometano
TRITC	:	Isotiocianato de tetrametil rodamina

1. RESUMEN.

El Virus Herpes Simple Tipo 1 (HSV-1) es ubicuo, infectando aproximadamente a un 90% de la población. HSV-1 invade y establece latencia en el sistema nervioso del huésped, constituyendo la causa más común de encefalitis aguda esporádica. La Encefalitis por Herpes Simple (HSE) está asociada a una elevada tasa de mortalidad y significativas secuelas neurológicas relacionadas con alteraciones cognitivas, de memoria y personalidad. Recientes estudios sustentan la hipótesis de que HSV-1 podría ser un factor de riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, no existe evidencia acerca de una posible inducción de procesos neurodegenerativos. En esta tesis se analizó el daño causado sobre cultivos neuronales durante la infección productiva con HSV-1, comparándolo con lo ocurrido en un modelo epitelial. Nuestros resultados obtenidos a partir de la infección sobre el modelo epitelial VERO, muestran alteraciones similares a las previamente descritas, observándose claras modificaciones del citoesqueleto. La cinética de infección realizada sobre cultivos neuronales, nos permitió advertir una alteración progresiva en la viabilidad y en los procesos neuronales. Asimismo, se logró demostrar que HSV-1 induce modificaciones en la dinámica microtubular en las distintas etapas de la infección, además de la alteración de los filamentos de actina, sugiriendo un rol modulador importante de HSV-1 en el citoesqueleto neuronal.

1.1. SUMMARY.

Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) is ubiquitous, infecting approximately 90% of the population. HSV-1 invades and it establishes latency in the host nervous system, constituting the most common cause of sporadic acute encephalitis. Herpes Simplex Encephalitis (HSE) is associated with a high mortality rate and significant neurological sequels related to cognitive, memory and personality alterations. Recent studies support the hypothesis that HSV-1 could be a risk factor for Alzheimer's disease; however, there is no evidence about the probable induction of neurodegenerative processes. In this thesis we analyzed the damage caused on neuronal cultures during productive HSV-1 infection, comparing it with that occurred in an epithelial model. Our results obtained from the epithelial VERO model infection, showed similar alterations to those previously described, revealing evident cytoskeletal modifications. The infections carried out on neuronal cultures, allowed us to notice a progressive alteration in the viability and in the neuronal processes. Also, it was possible to demonstrate that HSV-1 induces microtubular dynamic modifications in the different stages of the infection, besides the alteration of the actin filaments, suggesting an important modulatory role of HSV-1 on the neuronal cytoskeleton.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.

La familia *Herpesviridae*, se encuentra ampliamente diseminada en la naturaleza. Existen más de 100 tipos diferentes de Herpesvirus, todos los cuales comparten la misma estructura, DNA lineal de doble hebra, el cual se encuentra dentro de una cápside de simetría icosaédrica, rodeada por un tegumento proteico que separa la cara externa de la cápside, de la cara interna de una envoltura lipídica. Su diámetro varía desde los 120 a los 300 nm (**Figura 1**). Una característica que define a los Herpesvirus, es su capacidad para establecer latencia en el huésped infectado, estado en el cual el genoma viral se encuentra en forma episomal (Arthur *et al.*, 2001) y con una expresión limitada de genes específicos para el mantenimiento del estado de latencia. La infección latente es definida como la presencia del genoma viral como episoma en el núcleo, con ausencia de la producción de partículas virales infecciosas (Wagner *et al.*, 1997). Este tipo de infección constituye un mecanismo de evasión del sistema inmunológico. Bajo ciertas condiciones, distintos factores -incluyendo la exposición a radiación UV, estrés emocional, alteración del balance hormonal, depresión del sistema inmunológico, entre otros- pueden interrumpir el estado de latencia, induciendo una reactivación, con la consecuente producción de nuevas partículas virales infecciosas. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ocurre el proceso de reactivación, aún no se conocen.

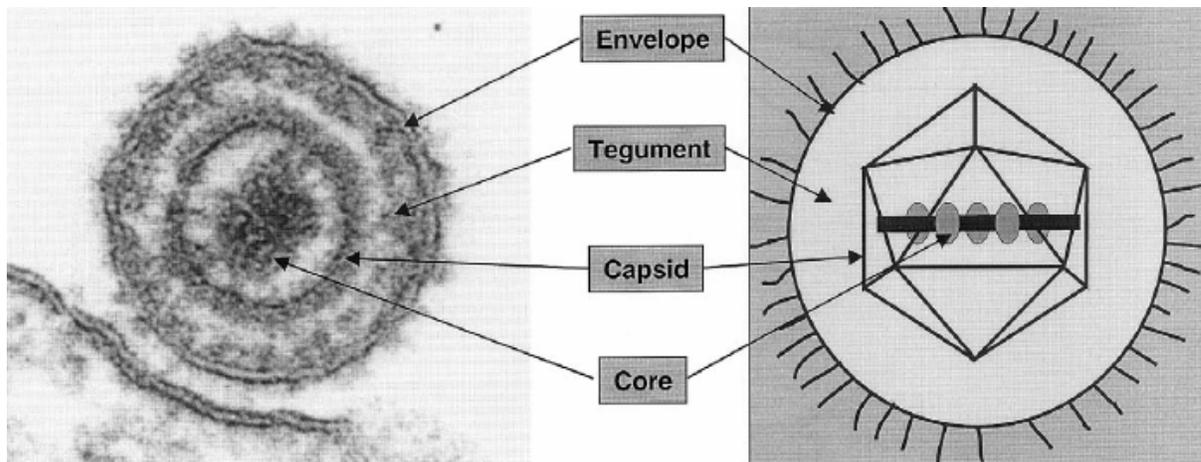


Figura 1. Morfología del virión de los Herpesvirus. Es posible diferenciar cuatro estructuras: el core, que contiene el DNA lineal de doble hebra, una cápside icosaédrica rodeada por un tegumento proteico y la envoltura lipídica que contiene -insertas- proteínas glicosiladas (Mettenleiter, 2003).

En base a sus propiedades biológicas -tales como el tipo de célula en que establecen latencia- los herpesvirus humanos han sido clasificados en distintas subfamilias. Los Virus Herpes Simple Tipo 1 (HSV-1) y Tipo 2 (HSV-2) pertenecen a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, cuyos miembros se caracterizan por presentar un mecanismo de daño lítico y por ser neurotrópicos. HSV-1 y HSV-2 son patógenos humanos comunes, infectando aproximadamente a un 90% y 22% respectivamente, de la población en Estados Unidos (Morrison, 2004). La infección primaria o primoinfección con HSV-1 ocurre -generalmente- a temprana edad, la mayoría de los niños entre 1 y 2 años ya han sido infectados. El sitio inicial de infección es la mucosa oral, epitelio corneal o heridas en la piel, en donde la replicación viral causa lesiones vesiculares. En el caso de la infección por HSV-2, éste es adquirido por transmisión sexual y resulta en la generación de lesiones ulcerosas en la zona genital. En ambos casos, el estado de latencia es establecido en neuronas sensoriales que se encuentran inervando el sitio de infección inicial (Morrison, 2004; Efstathiou *et al.*, 2005). Una vez que HSV-1 alcanza los terminales de nervios sensoriales periféricos, la nucleocápside viaja por transporte axonal retrógrado hacia los cuerpos neuronales alcanzando el núcleo, un ciclo de replicación del virus es seguido por el establecimiento de una infección latente, la cual persiste durante toda la vida del individuo. El proceso de reactivación, conlleva al transporte axonal anterógrado de nueva progenie viral hacia el sitio inicial de infección, conduciendo a una potencial manifestación recurrente de los síntomas clínicos y a la posibilidad de transmisión (Khanna *et al.*, 2004).

2.2. ETIOLOGÍA VIRAL DE LA NEURODEGENERACIÓN.

A pesar de los años de estudio y un claro conocimiento de cuáles son las regiones del cerebro involucradas, las causas de la mayoría de los desórdenes neurológicos y psiquiátricos aún no se conocen. Los síntomas y características específicas de las diferentes enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) son determinados, en su mayoría, por el tipo de célula o vía que ha sido dañada (van den Pol, 2006).

Durante el envejecimiento fisiológico, es posible observar una serie de alteraciones que conllevan a una deficiencia de la actividad cerebral, la cual es más evidente en los casos de enfermedades neurodegenerativas, en donde circuitos nerviosos responsables del mantenimiento de los procesos cerebrales cognitivos, se ven afectados (Peinado *et al.*, 2000).

Debido a la normal alteración de las funciones del sistema inmunológico -producto del envejecimiento- la vulnerabilidad del SNC a la invasión por diferentes tipos de agentes infecciosos, se ve aumentada con la edad (Mattson, 2004), ya que la capacidad de un virus de alcanzar el cerebro, depende -en gran parte- de cuan eficiente es el sistema inmunológico en eliminarlo del organismo.

Por otra parte, existen estudios que demuestran que la vulnerabilidad a una infección viral, además de estar ligada a un deterioro inmunológico inherente a la senectud, depende de una potencial sensibilidad genética a tales infecciones. Lee *et al.* (2001), utilizaron un modelo de infección experimental en distintas cepas de ratón y demostraron que la susceptibilidad de los ratones BXD-8, a la infección con Cytomegalovirus -un virus perteneciente a la familia *Herpesviridae*- capaz de invadir y producir un daño considerable en el cerebro, está asociada con una delección en el gen *Klra8*, el cual se relaciona con la regulación de las células Natural Killer.

Un gran número de virus capaces de infectar el SNC ha sido descrito, cada uno de ellos con un mecanismo de entrada, replicación, defensa contra el sistema inmune y diseminación específicos. Las alteraciones neurológicas inducidas por los diferentes tipos de virus, no sólo son causadas por una acción citolítica sobre las células del sistema nervioso, sino también por la activación de vías apoptóticas, dañando la barrera hematoencefálica, iniciando un ataque autoinmune en células específicas, expresando genes virales y reprimiendo genes celulares, entre otras (van den Pol, 2006). Gautier *et al.* (2003), demostraron que la infección de células ND7 (fusión de células de neuroblastoma murino y células nerviosas primarias de ganglio de la raíz dorsal de rata) con HSV-1, induce alteraciones fisiológicas asociadas con etapas tempranas de apoptosis, tales como: exposición de fosfatidil serina, cambios morfológicos de las mitocondrias, activación de caspasa 8, condensación de la cromatina, entre otras.

2.2.1. INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR HSV-1.

Las primeras evidencias de que HSV-1 podía ser transportado hasta el SNC, desde el sistema nervioso periférico, fueron obtenidas a partir de estudios acerca de la Encefalitis (Norgren *et al.*, 1998).

Terminales de nervios sensoriales periféricos, que se encuentran inervando el sitio inicial de infección son rápidamente invadidos y el virus es transportado a través de los axones hacia el ganglio periférico, donde establece una infección latente. Perturbaciones esporádicas de la homeostasis neuronal, resultan en la reactivación del virus, provocando la recurrente aparición de vesículas ulcerosas en el epitelio y mucosas.

En casos más aislados, el virus continúa su diseminación centrípetamente, hacia y dentro del SNC, alcanzando el cerebro y causando encefalitis (Morrison, 2004). HSV es la causa más común de encefalitis aguda no epidémica en Estados Unidos, con una frecuencia estimada de un caso por 250 000 a 500 000 habitantes, anualmente. La mortalidad asociada a la Encefalitis por Herpes Simple (HSE) es >70% en ausencia de un tratamiento antiviral efectivo, y los sobrevivientes presentan secuelas neurológicas relacionadas con alteraciones cognitivas, memoria y personalidad (Levitz *et al.*, 1998; Tyler, 2004). Aciclovir es el tratamiento de elección en caso de HSE, pero aún bajo medicación, la mortalidad continúa siendo alta (50-60%).

Sobre la base de estudios serológicos, cerca de un tercio de los casos de HSE son causados por infección primaria con HSV-1, mientras que dos tercios resultan de la reactivación viral (Whitley *et al.*, 2002; Whitley, 2006).

Existen dos vías propuestas para la entrada del virus al cerebro. En una de éstas se sugiere la entrada a través del nervio trigémino y posterior transporte hacia la meninges que recubre el lóbulo temporal. La otra hipótesis involucra el flujo intraneuronal a través del nervio olfatorio hasta el bulbo olfatorio, desde donde podría alcanzar la amígdala, ínsula, y sustancia perforada anterior (**Figura 2**). El posterior transporte transneuronal podría conducir al virus hacia estructuras del sistema límbico. Esta hipótesis es consistente con el patrón específico de distribución de lesiones observados en pacientes con HSE y la diseminación transneuronal de HSV en el sistema límbico y olfatorio, observada en modelos animales (Norgren *et al.*, 1998).

Estudios acerca de los mecanismos moleculares de infección neuronal de los herpesvirus, han demostrado la particular capacidad de diseminación direccional transneuronal de HSV, a través de las sinapsis (**Figura 3**). De hecho, existe evidencia de la participación de varias glicoproteínas de la envoltura viral en la propagación transsináptica del virus, tales como gD, gB

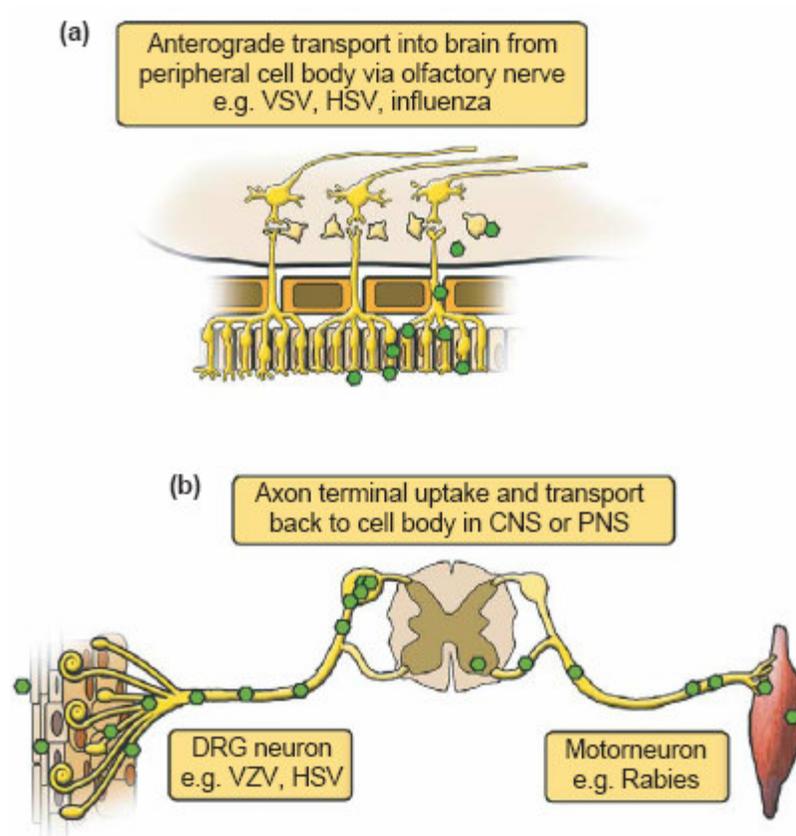


Figura 2. Entrada del virus al SNC. (a) Varios virus (VSV, HSV, etc.) alcanzan el cerebro por transporte anterógrado a través del nervio olfatorio. (b) Herpesvirus, tales como varicela-zóster (VZV) y herpes simple (HSV), infectan el cerebro vía nervio trigémino o nervios sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (van den Pol, 2006).

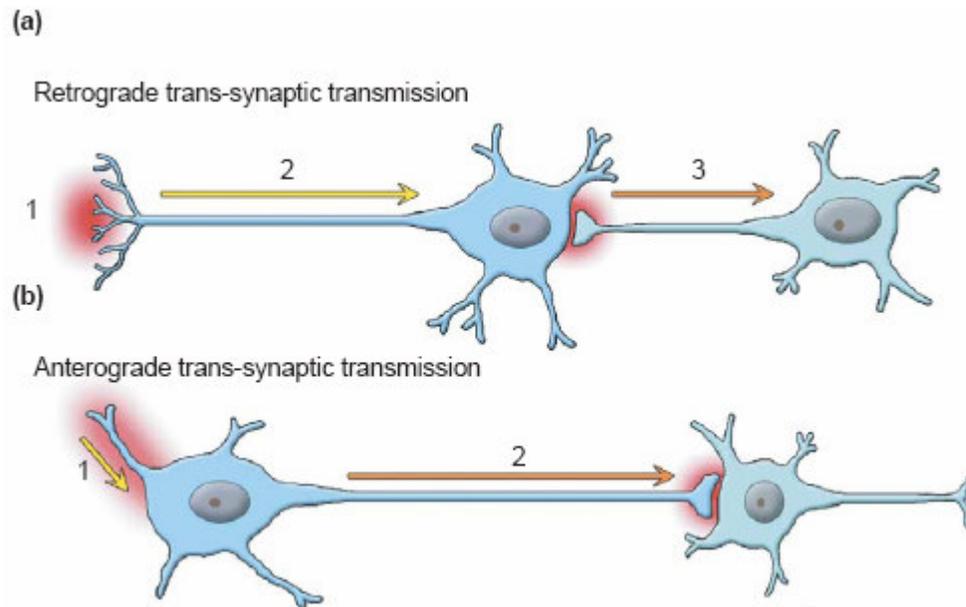


Figura 3. Diseminación de los Herpesvirus dentro del sistema nervioso (a) Las partículas virales son transportadas retrógradamente a través del axón y posteriormente son liberadas por el cuerpo celular y dendritas para ser subsecuentemente alcanzados y transportados por neuronas acopladas sinápticamente. **(b)** Transporte anterógrado desde el cuerpo celular, hacia el terminal axónico, desde donde el virus es liberado (van den Pol., 2006)

y gE. De este modo el virus puede ganar acceso a circuitos neuronales ligados sinápticamente (Mettenleiter, 2003).

2.3. CITOESQUELETO.

El citoesqueleto celular es una red tridimensional de filamentos proteicos, que mantienen la integridad de las células. Es una estructura altamente dinámica, encontrándose bajo un constante ensamblaje y desensamblaje. Los principales componentes del citoesqueleto son los filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (**Figura 4**), que en conjunto participan en un gran número de procesos biológicos esenciales, tales como transporte intracelular, movimiento celular, brinda soporte estructural a la célula, media procesos de endocitosis y exocitosis y tiene un importante rol durante la división celular (Kasas *et al.*, 2005).

Los filamentos de actina (F-actina) o microfilamentos, están formados a partir del polipéptido glomerular de 375 residuos G-actina, el cual forma polímeros helicoidales de aproximadamente 5 a 9 nm de diámetro, proceso dependiente de ATP. Estos filamentos se organizan en forma de haces paralelos y están distribuidos en todo el citoplasma, participando en procesos de desplazamiento y adhesión celular. Sin embargo, se encuentran mayormente concentrados en el cortex celular, el cual se encuentra situado bajo la membrana plasmática, desde donde controla las propiedades mecánicas de la superficie celular (Magalhães *et al.*, 2002). La dinámica y configuración del citoesqueleto de actina están regulados, en gran parte, por proteínas específicas que se unen a ésta, tales como la gelsolina, la tropomiosina, la severina, la fimbrina, la vellosina, etc. (Lodish *et al.*, 2000).

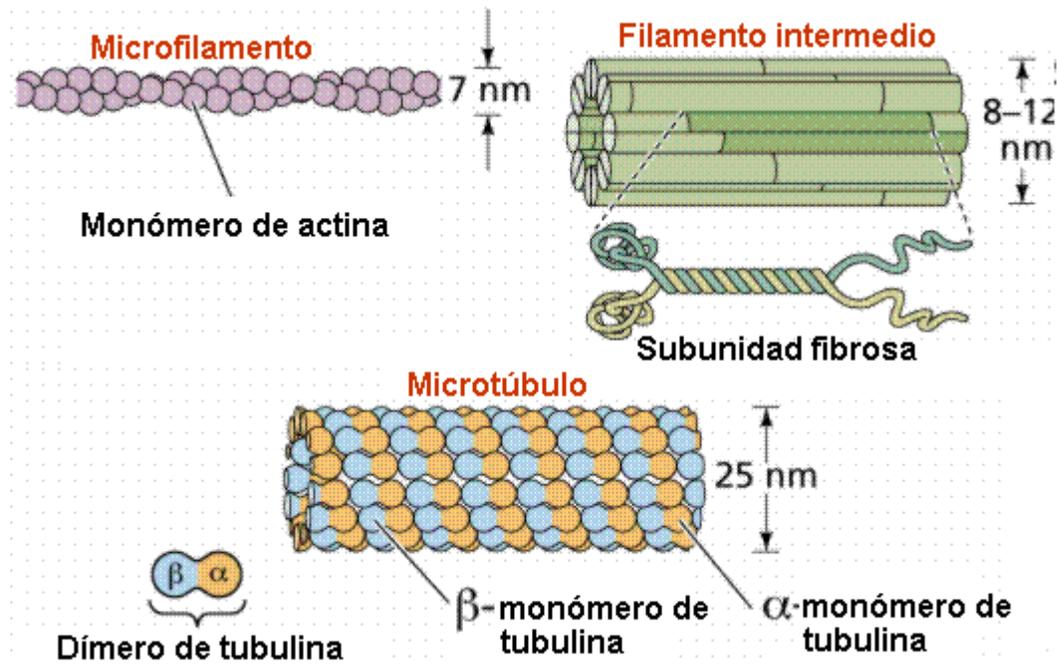


Figura 4. Principales estructuras del citoesqueleto. (Figura obtenida de: http://fai.unne.edu.ar/biologia/cel_euca/celula3.htm#E1%20citoesqueleto).

Los filamentos intermedios son fibras proteicas de aproximadamente 8-12 nm de diámetro, cuya composición proteica varía y es específica para cada tipo celular. Estas fibras, desempeñan un papel estructural en la célula y proporcionan estabilidad mecánica a éstas, debido a su elevada resistencia a la tensión. Dependiendo del tipo de polipéptido que los conforman, varía el tipo de filamento. Así, se encuentran los filamentos de desmina en las células musculares, filamentos de queratina en las células epiteliales, filamentos de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en astrocitos, neurofilamentos en tejido nervioso, etc. (Magalhães *et al.*, 2002).

Los microtúbulos (MTs) -por su parte- son cilindros largos y huecos, de aproximadamente 25 nm de diámetro, que se componen por la asociación longitudinal de trece protofilamentos, los cuales se forman a su vez, por el ensamblaje alternativo de subunidades de α y β tubulina. La γ tubulina se encuentra en el centrosoma o centro organizador de MTs (COMTs), formando anillos a los cuales se asocian los heterodímeros $\alpha\beta$ para nuclear los MTs (Joshi, 1994).

Los MTs tienen un importante rol en varios procesos biológicos tales como la migración de los cromosomas durante la mitosis, motilidad, transporte de vesículas, morfogénesis, etc.

El ensamblaje de estas estructuras altamente dinámicas depende de varios factores fisiológicos tales como la presencia de GTP, temperatura, concentración de iones Mg^{2+} , etc. Los MTs polimerizados no son estructuras estáticas sino que están en constante crecimiento y depolimerización, habilidad conocida como inestabilidad dinámica (Chang *et al.*, 2002).

Otro factor determinante en la modulación de la dinámica microtubular, son las modificaciones postraduccionales que sufre la tubulina. La α tubulina es susceptible a la acetilación, que ocurre en el grupo ϵ amino de la Lys 40 -la cual neutraliza la carga positiva de este grupo- estabilizando los microtúbulos. Por otra parte, este mismo isotipo de la tubulina puede sufrir la eliminación y readición del residuo de tirosina en su extremo carboxilo terminal.

Se ha descrito que MTs detirosinados, constituyen una población más estable (Ludueña, 1998; Chang *et al.*, 2002).

2.3.1. CITOESQUELETO NEURONAL.

El citoesqueleto es la estructura interna principal que define la forma y polaridad de las neuronas, y así como en los demás tipos celulares, organiza el citoplasma para llevar a cabo procesos metabólicos esenciales. Su composición no difiere mayormente del citoesqueleto de otros tipos de células, encontrándose principalmente microtúbulos, neurofilamentos (equivalentes a los filamentos intermedios) y filamentos de actina (Georgiev *et al.*, 2004).

Además de los procesos ya mencionados, las estructuras del citoesqueleto tienen un rol central en el proceso de ramificación y funciones neuronales más especializadas incluyendo la memoria y el procesamiento de información dentro de las neuronas. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el citoesqueleto controla la plasticidad neuronal, permanecen desconocidos. Se ha propuesto que el citoesqueleto contiene un sistema para la conducción del impulso nervioso, sugiriéndose la existencia de una interacción entre MTs y canales iónicos, la cual regularía la plasticidad sináptica mediante la capacidad de los MTs de permitir la conexión de señales eléctricas intracelulares -orientadas espacialmente- con filamentos de actina, capaces también de transmitir información eléctrica (Lin *et al.*, 1993; Azmitia, 2002; Priel *et al.*, 2006).

La estructura del citoesqueleto neuronal posee una composición y organización distinta en el axón y dendritas, lo cual contribuye a su diferenciación estructural y metabólica. Estudios han demostrado una distribución diferencial de las distintas modificaciones de la tubulina en ambas estructuras, encontrándose tubulina acetilada y tubulina detirosinada preferencialmente en axones

en comparación con las dendritas, lo cual mantendría la estabilidad de los microtúbulos axonales (Cambray-Deakin *et al.*, 1987).

Debido a la inexistencia de una maquinaria de síntesis adecuada en el axón y dendritas, es necesaria la exportación de muchas sustancias desde el cuerpo neuronal. El transporte de moléculas desde el soma al axón y viceversa se denomina transporte axonal o flujo axoplásmico. El transporte en dirección a la terminal axonal se denomina anterógrado, y en dirección al soma se denomina retrógrado.

El citoesqueleto microtubular participa activamente en este proceso, de hecho, el desensamblaje de los MTs mediante el uso de agentes despolimerizantes -en modelos neuronales- para el estudio de anomalías del citoesqueleto y neurodegeneración, ha demostrado un impedimento del transporte axonal (Steward *et al.*, 1984). Por otra parte, estudios demuestran que la exposición de colchicina (droga despolimerizante) a células del gránulo cerebelar, causa alteraciones en los MTs e induce apoptosis caracterizada por condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, liberación de citocromo c y activación de caspasa 3 (Bonfoco *et al.*, 1995; Gorman *et al.*, 1999).

Varias investigaciones argumentan la posibilidad de que alteraciones del citoesqueleto podrían participar en la patogénesis de lesiones traumáticas del cerebro (Fitzpatrick *et al.*, 1998). Desórdenes neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, evidencian una disfunción del citoesqueleto a nivel molecular y de citoarquitectura. Cambios en la morfología neuronal, pérdida de neuritas y acumulación de proteínas del citoesqueleto resultan en una serie de alteraciones tales como la pérdida de sinapsis y una disminución en la conductividad sináptica (Li *et al.*, 2007), demostrándose así la importancia de

las estructuras del citoesqueleto en la conservación de la integridad neuronal y por lo tanto en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.

2.3.2. INFECCIÓN POR HSV-1 Y CITOESQUELETO.

Como se mencionó anteriormente, son diversos los mecanismos mediante los cuales la infección de un virus induce alteraciones en las células, como resultado de la utilización de la maquinaria celular -por parte del virus- para su propio beneficio y tales alteraciones no sólo son producto de una acción citolítica de éste.

Luego de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped, la cápside debe ser transportada a través de los MTs, desde la periferia celular hasta el núcleo para su replicación, etapa particularmente crítica cuando se trata de largas distancias como en el caso de las neuronas. Dicho transporte, es un proceso activo mediado por la ATPasa dineina, la cual se desplaza sobre los MTs hacia el extremo negativo, acercándose al centrosoma (Dohner *et al.*, 2002; Marozin *et al.*, 2004). Por otra parte, el transporte anterógrado de las partículas virales, es importante para su disseminación.

Estudios realizados para determinar el rol de los MTs en el transporte del virus HSV-1, en varias líneas celulares, demostraron que éstos sufrieron cambios en su organización, observándose una fragmentación y posterior redistribución alrededor del núcleo, luego de la infección productiva del virus (Avitabile *et al.*, 1995). Yedowitz *et al.* (2005), sugieren que en etapas tardías de la infección, dicha reorganización de los MTs es dependiente de la proteína del tegumento viral, VP22. Investigaciones acerca del rol de esta proteína en la infección del HSV-1,

han demostrado que su expresión en distintas líneas celulares induce la estabilidad de los MTs, los cuales sufren una hiperacetilación (Elliott *et al.*, 1998).

En modelos neuronales también se ha descrito la participación de los MTs como mediadores del transporte axonal bidireccional de HSV-1 (Topp *et al.*, 1994). El transporte anterógrado del virus en el nervio óptico es inhibido por drogas despolimerizantes de los MTs (Bosem *et al.*, 1990); a su vez, el transporte retrógrado también es inhibido en estas condiciones, previniéndose la infección del ganglio de la raíz dorsal al inyectar colchicina en el nervio ciático (Openshaw *et al.*, 1978).

Todos los fenómenos asociados al ciclo replicativo del virus, incluyendo los que constituyen modificaciones del citoesqueleto celular, contribuyen a la alteración del normal funcionamiento de la célula infectada.

2.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Basado en la información anteriormente expuesta y sobretodo en el hecho de que, no obstante entre un 20 y un 40% de la población infectada con el Virus Herpes Simple Tipo 1 sufre la reactivación recurrente -evidenciada por la aparición de vesículas ulcerosas en la piel- la entrada y posterior reactivación localizada del virus en el SNC, podría contribuir con el desarrollo de alteraciones neurológicas a largo plazo, lo cual estaría siendo subdimencionado. Por otra parte, considerando el hecho de que año a año las expectativas de vida son mayores, lo cual genera un incremento en la población de personas ancianas con riesgo de padecer algún tipo de desorden neurodegenerativo, resulta interesante estudiar la posible inducción de procesos

neurodegenerativos por parte de un virus tan común en el hombre como lo es HSV-1, por lo que se planteó la siguiente hipótesis:

“La infección productiva del Virus Herpes Simple Tipo 1 induce alteraciones sobre el citoesqueleto neuronal”.

2.5. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar los cambios en la dinámica del citoesqueleto neuronal durante la infección productiva por HSV-1, comparándolo con lo ocurrido en un modelo epitelial.

2.5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer el modelo de infección productiva por HSV-1 en células epiteliales de riñón de mono verde africano -VERO- y en cultivos neuronales de corteza de ratón.
2. Determinar los cambios en la dinámica microtubular durante una cinética de infección por HSV-1 sobre células VERO y sobre cultivos neuronales.
3. Analizar las modificaciones de los filamentos de actina en ambos modelos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizaron dos modelos de trabajo. El primero se llevó a cabo en la línea epitelial de mono verde africano -VERO- debido a que el Virus Herpes Simple Tipo 1, además de ser neurotrópico, es epiteliotrópico, por lo que este modelo es ampliamente utilizado en el estudio del virus, además de sus interacciones con componentes celulares. El segundo modelo de trabajo se realizó en neuronas corticales de embriones de rata, los cuales fueron proporcionados por el vivero de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

3.1.1. VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.

Para llevar a cabo las infecciones, se utilizó la cepa F del Virus Herpes Simple tipo 1, la cual es utilizada como cepa de referencia en estudios a nivel mundial. Ésta fue donada por la Dra. María José Martínez del Programa de Virología, Universidad de Chile. El virus fue conservado a -70° C.

3.1.2. CULTIVO DE CÉLULAS VERO.

La línea epitelial VERO, se usó como modelo de experimentación, estandarizando previamente en éste, multiplicidad de infección (MOI), tiempos de infección, diluciones óptimas

de anticuerpos, etc. Además, fue utilizada sistemáticamente para la propagación y titulación del virus.

Las células fueron cultivadas y mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37° C en atmósfera al 5% de CO₂.

3.1.3. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES.

Para generar los cultivos primarios de neuronas, se sacrificó ratas preñadas, de 18 días de gestación y se procedió según lo descrito por Alvarez y col., (1999). Se realizó la disección de las cortezas de los embriones, se colocaron en solución salina balanceada Hank (HBSS) y se eliminó las meninges; se lavó el tejido 3 veces por decantación en HBSS y luego fue incubado con tripsina por 10 minutos a 37° C. Posteriormente fue lavado en Medio Eagle Mínimo suplementado con 10% SBF (MEM 10) y se procedió a la disgregación del tejido. Las células fueron sembradas en placas cubiertas con poli-lisina e incubadas durante 30 minutos en medio MEM 10, posterior a lo cual se reemplazó el medio por Neurobasal suplementado con B27 y L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37° C con 5% CO₂.

3.2. REACTIVOS QUÍMICOS.

De la marca **Sigma** se obtuvo: Anticuerpos Monoclonales Anti-Tubulina Acetilada y Anti-Tubulina Tirosinada; sonda Phalloidina, Ioduro de propidio, Protease inhibitor cocktail y NP-40.

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc.**: tripsina, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio Eagle Mínimo (MEM), Neurobasal, suplemento B27, suero bovino fetal (FBS).

Reactivo quimioluminiscente ECL Western blotting analysis system y membranas de PVDF Hybond-p se obtuvieron de **Amersham Pharmacia Biotech**.

Tween 20, Persulfato de amonio, glicerol, Tritón X100, dodecilo sulfato de sodio (SDS), azul de bromofenol, NaCl, 2-Mercaptoetanol, acrilamida y bisacrilamida fueron adquiridos de **Merck**. De **BioRad**: agarosa, Reactivo de Bradford, Temed y glicina.

Anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa, a fluoresceína y a tetrametilrodamina; policlonal anti-GFAP, monoclonal anti-glicoproteína D de HSV-1 y Kit de detección de HSV-1 se obtuvieron de **Chemicon Internacional**.

El estándar de peso molecular preteñido rango 20-120 kDa para geles de poliacrilamida-SDS se obtuvo de **BioAxis**.

EDTA se obtuvo de **Mallinckrodt Baker**. De **Winkler** se obtuvo albúmina sérica de bovino (BSA). De **Cellgro** se obtuvo L-glutamina, de **Dako**, medio de montaje; de **Calbiochem** se obtuvo Tris Base.

Los anticuerpos 2H3 y CD68 fueron donados por el Dr. Esteban Rodríguez del Instituto de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. Tau 5, fue donado por el Dr. Lester Binder del Departamento de Biología Celular y Molecular de Northwestern University Medical School, Chicago, U.S.A.

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. PROPAGACIÓN VIRAL.

La propagación del virus se realizó sistemáticamente, para ello se creció células VERO en botellas de 450 ml hasta alcanzar un 95% de confluencia. Se inoculó con 2 ml de sobrenadante infectado con HSV-1 y se incubó a 37° C durante 1 hora, moviendo la placa cada 10 minutos. Posteriormente se aspiró el inóculo y se adicionó medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Se incubó a 37° C con 5% CO₂ hasta observar ECP (efecto citopático) en un 95% de las células, aproximadamente 24 horas. Para lisar las células se congeló y descongeló 3 veces consecutivas, se recolectó el lisado en un tubo falcon estéril y se centrifugó a 2000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado, alicuotado y conservado a -20° C.

3.3.2. TITULACIÓN VIRAL.

Para titular el virus, se preparó diluciones en base 10 de la alícuota de sobrenadante infectado con virus. Para ello, se adicionó 100 µl de sobrenadante a 900 µl de DMEM 0.5 % SFB (dilución 10⁻¹), luego se tomó 100 µl de esta dilución y se adicionó a un nuevo tubo con 900 µl de DMEM 0.5 % SFB (dilución 10⁻²), lo mismo se repitió, hasta obtener una dilución de 10⁻⁷. Posteriormente, se inoculó con 500 µl de cada dilución, células VERO crecidas en confluencia sobre placas de 6 pocillos (1x10⁶ células por pocillo), previa aspiración del medio, dejando uno de los pocillos como control, adicionando a éste sólo medio. Se descartó las diluciones 10⁻¹ y 10⁻². Se incubó la placa durante 1 hora a 37° C, con agitación cada 10 minutos. Pasado el tiempo

de incubación, se aspiró el inóculo y se adicionó a cada pocillo, 1 ml de una mezcla de agarosa 1,2% en agua y medio DMEM 2X 0.5 % SFB, en una proporción de 1:1. Nuevamente se incubó la placa, a 37° C en ambiente al 5 % de CO₂, durante 72 horas. Transcurrida la incubación, se eliminó la agarosa por inversión y se cubrió cada pocillo con cristal violeta, luego de 30 minutos se eliminó el colorante, se lavó los pocillos con agua destilada y se contó el número de placas de lisis formadas, en el pocillo inoculado con la alícuota más diluida en el que haya ocurrido la formación de placas.

Posteriormente, se procedió al cálculo de la concentración viral, en unidades formadoras de placa (pfu) por ml según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (pfu/ml)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Placas de Lisis}}{\text{V. Inóculo (ml) x Dilución}}$$

V. Inóculo (ml) x Dilución

Luego se determinó el volumen necesario para infectar placas del tamaño requerido, con una multiplicidad de infección (MOI) específica. Por ejemplo, para infectar placas de 50 mm (3x10⁶ células), con un MOI de 10 (10 pfu por célula):

$$\begin{array}{l} 10 \text{ pfu} \rightarrow 1 \text{ célula} \\ x \rightarrow 3 \times 10^6 \text{ células} \quad / \quad x = 3 \times 10^7 \text{ pfu} \end{array}$$

Si por ejemplo, la concentración obtenida anteriormente hubiese sido 3.8x10⁷ pfu/ml:

$$\begin{array}{l}
 3.8 \times 10^7 \text{ pfu} \rightarrow 1 \text{ ml} \\
 3 \times 10^7 \text{ pfu} \rightarrow x \quad / \quad x = 0.789 \text{ ml}
 \end{array}$$

Por lo tanto, para infectar placas de 50 mm (3×10^6 células), con un MOI de 10, se requeriría de 789 μ l de la alícuota titulada anteriormente.

3.3.3. CINÉTICA DE INFECCIÓN.

Para el análisis de las alteraciones inducidas por HSV-1 -en ambos modelos de trabajo- se procedió a la realización de cinéticas de infección, es decir, se sometieron los cultivos a diferentes tiempos de infección.

Las células utilizadas para extracción de proteínas fueron crecidas en placas de 50 mm (3×10^6 células), en confluencia, a diferencia de las utilizadas para análisis por inmunofluorescencia, las cuales fueron crecidas sobre cubreobjetos circulares de 13 mm de diámetro en placas de distinto tamaño, dependiendo del número de cubreobjetos requeridos, y a un 50 % de confluencia.

El virus se adicionó sobre el medio y se incubó por una hora a 37° C, en ambiente al 5 % de CO₂, con agitación cada 10 minutos, permitiendo así la adsorción homogénea del virus. Posteriormente, se cambió el medio por DMEM suplementado con 5% de SFB en el caso de células VERO o Neurobasal suplementado con B27 y L-glutamina, en el caso de los cultivos primarios y se incubó durante los distintos tiempos de infección, previamente establecidos. El volumen de inoculación dependió del MOI con el cual se infectó.

Para detener la infección de los cultivos destinados a extracción proteica, se aspiró el medio y se lavó cuidadosamente con PBS 1X (15 mM NaH₂PO₄ [pH 7,4], 150 mM NaCl), inmediatamente se procedió a la extracción. En el caso de los cultivos destinados a análisis por inmunofluorescencia, la infección se detuvo eliminando el medio, luego se lavó con PBS 1X, y se fijó con paraformaldehído (PFA) 4%, cubriendo toda la placa, durante 15 minutos; luego, se eliminó el PFA y se cubrió la placa con PBS 1X. Los cultivos fijados se mantuvieron a 4° C hasta su análisis.

3.3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Luego de ser lavados, los cultivos celulares destinados a extracción proteica fueron lisados con 100 µl de solución de lisis por placa de 50 mm (Tris/HCl 50 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato 0.5%, SDS 0.1%, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas: 100 µg/ml PMSF, 0.08 mM Aprotinin, 2.00 mM Leupeptin, 4.00 mM Bestatin, 1.50 mM Pestatín y 1.40 mM E-64). Los lisados fueron posteriormente centrifugados a 14800 g por 15 minutos a 4° C; se recolectó el sobrenadante y se cuantificó proteínas por el método de Bradford.

3.3.5. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS.

Los extractos proteicos obtenidos, fueron sometidos a separación electroforética en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), en geles de poliacrilamida al 12%. Los geles espaciador y separador fueron preparados a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 30:08. El gel espaciador se preparó con 125 mM de Tris [pH 6,8], persulfato de amonio 0,01%, SDS 0.1%,

TEMED 0,04% y a una concentración final de poliacrilamida de 3.8%. El separador se preparó adicionando 375 mM de Tris [pH 8,8], SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%, a una concentración final de poliacrilamida de 12%. Las muestras fueron preparadas con un volumen equivalente a 20 µg de proteína, a las cuales se les adicionó solución de muestra consistente en Tris 0.313 M [pH 6,8], SDS 5%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0.025% y 2-mercaptoetanol 0,7 M; posteriormente se calentaron a baño maría por 5 minutos y se cargaron en el gel. Además de las muestras, se cargó paralelamente en el gel un estándar de peso molecular, para poder determinar posteriormente el peso de las muestras. La electroforesis se realizó a 32 mA por una hora, en solución Tris 0.1 M, glicina 0.768 M y SDS 0.1%, en el sistema Mini Protean^R III de BIO RAD.

3.3.6. ELECTROTRANSFERENCIA A MEMBRANAS.

Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde el gel a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales fueron previamente activadas con metanol. La transferencia se llevó a cabo en el sistema de Cleaver Scientific Ltd.. Se usó como tampón de transferencia 25 mM Tris [pH 8,3], 190 mM glicina, 0,1% SDS y 20% metanol. Entre el ánodo y el cátodo se dispusieron secuencialmente y embebidos en tampón de transferencia: esponja, papel de filtro (Whatman n° 1), gel a transferir, membrana de PVDF activada, papel filtro y otra esponja. La transferencia se efectuó a 400 mA durante 2 horas ó 35 mA durante 15 horas, posterior a lo cual las membranas se secaron y almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

3.3.7. INMUNODETECCIÓN.

Para la detección específica de proteínas en las membranas de PVDF, éstas fueron incubadas durante una hora con solución de bloqueo (PBS 1X; 0,3% Tween-20; 1% BSA y 5% leche descremada) a temperatura ambiente y agitación constante. Luego, las membranas se incubaron con 5 ml de solución de anticuerpo específico, en una dilución de 1:1000 para anti-tubulina acetilada y anti-tubulina tirosinada y 1:10000 para anti-actina, durante 15 horas en agitación, a temperatura ambiente. Los anticuerpos fueron diluidos con solución de bloqueo. Posteriormente las membranas fueron lavadas 4 veces durante 5 minutos con PBS-Tween-20 (PBS 1X, 0,3% Tween-20) e incubadas de 2 a 4 horas con una solución de anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa -diluida 1:10000- en agitación, a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron nuevamente lavadas 4 veces durante 5 minutos con PBS-Tween-20 e incubadas durante un minuto con una solución obtenida mezclando partes iguales de los reactivos 1 y 2 del sistema de detección quimioluminiscente ECL. Luego de eliminar el exceso de reactivo, las membranas se pusieron en contacto con un film, en el cual quedó impresa la luminiscencia liberada en la reacción y que fue revelada con el reactivo D_{72} , finalmente se fijó con el reactivo U_3 . Todos los pasos realizados posteriores al último lavado de las membranas, fueron llevados a cabo en oscuridad. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas, utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0, los datos fueron normalizados con la densitometría de las bandas correspondientes a actina y graficados como porcentaje del control. Se realizó el análisis estadístico t-student ($P < 0.05$, $n=3$)

3.3.8. INMUNOFLUORESCENCIA.

Los análisis por inmunofluorescencia se realizaron en células fijadas sobre covers; para ello, las células fueron primero bloqueadas con solución de bloqueo-0.3 % tritón X100 durante 30 minutos, luego se procedió a la incubación con los primeros anticuerpos a una dilución de 1:100 para anti-tubulina acetilada, anti-tubulina tirosinada, anti-gD, faloidina, tau 5, GFAP y 1:50 para 2H3 y CD68, durante toda la noche, en cámara húmeda a 4° C. Se lavó los covers 4 veces por 3 minutos con PBS 1X y se incubó con los segundos anticuerpos, ratón-FITC, ratón-TRITC y conejo-FITC en una dilución de 1:100, durante 4 horas, en cámara húmeda a 4° C. Para la detección del Virus Herpes Simple Tipo 1 se utilizó el kit de Chemicon Internacional. Luego de lavar nuevamente -en las mismas condiciones del primer lavado- se montó los covers en portaobjetos, sobre 10 µl de medio de montaje y se procedió al análisis en microscopio confocal y en microscopio de fluorescencia, ambos marca Zeiss. Las imágenes fueron procesadas utilizando los programas Olympus Micro Fluoview, Image J. y Adobe Photoshop 7.0.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados, son representativos de al menos tres experimentos separados. A los resultados se les realizó el análisis estadístico *t-student* y los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media. El valor de p se indica en cada caso, $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS.

El Herpes Simple Tipo 1, es un virus común en el hombre, por lo cual sus propiedades biológicas e interacciones con componentes celulares han sido ampliamente estudiadas en distintas líneas celulares. Se ha demostrado que este virus es capaz de inducir distintos tipos de alteraciones, incluyendo modificaciones del citoesqueleto y la activación de procesos apoptóticos.

Debido a la capacidad de HSV-1 de infectar y establecer latencia en células del sistema nervioso, es de interés el estudio del daño inducido por este patógeno en neuronas.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo, se utilizaron dos modelos de estudio. El primero se llevó a cabo en cultivos de células VERO, las cuales han sido ampliamente utilizadas en el estudio de HSV-1. El segundo modelo, correspondió a cultivos primarios neuronales de corteza de rata.

4.1. MODELO EPITELIAL.

El modelo epitelial de mono verde africano -VERO- se utilizó preliminarmente con el objeto de acercarnos a lo ya descrito en la literatura. Además, se usó como modelo epiteliotrópico de referencia, para posteriormente llevar a cabo de modo similar, el modelo neurotrópico.

Asimismo, el cultivo de células VERO fue utilizado sistemáticamente para la propagación y titulación del virus.

4.1.1. TITULACIÓN DEL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.

La titulación o cálculo de la concentración del virus, en número de unidades formadoras de placa por ml (pfu/ml), se realizó mediante el método de formación de placas de lisis, según lo descrito en Materiales y Métodos. Este procedimiento se llevó a cabo para efectuar las infecciones con una multiplicidad de infección (MOI) determinada, que en la mayoría de los experimentos fue de 10, es decir, la infección de 10 partículas virales por cada célula. La **figura 5** muestra el resultado de un ensayo, en donde se pueden observar las placas de lisis formadas. Se observa que a medida en que disminuye la concentración del inóculo, disminuye también el número de placas de lisis formadas, las cuales fueron contadas en el pocillo N° 4, el cual fue infectado con la alícuota más diluida de virus que presentó la formación de placas. Posteriormente se procedió al cálculo del pfu/ml, tal como se describe en Materiales y Métodos.

4.1.2. CONTROL DE INFECCIÓN.

Para cerciorar la correcta infección de los cultivos celulares, se realizó infecciones de distintos tiempos, los cuales están indicados en la **figura 6**, en donde se muestra el resultado de una inmunofluorescencia realizada con anticuerpos específicos contra proteínas de HSV-1. Se observa que a las 4 hrs. de infección, el virus ya se encuentra en el citoplasma y núcleo de las células, haciéndose más intensa la inmunodetección en el núcleo, a medida que aumentan las horas de infección.

Figura 5. Ensayo de formación de placas.

Alícuotas de distinta concentración viral fueron inoculadas sobre células VERO. El pocillo 1 se infectó con la alícuota más concentrada y el pocillo 5 con la más diluida. C corresponde al control (células libres de infección).

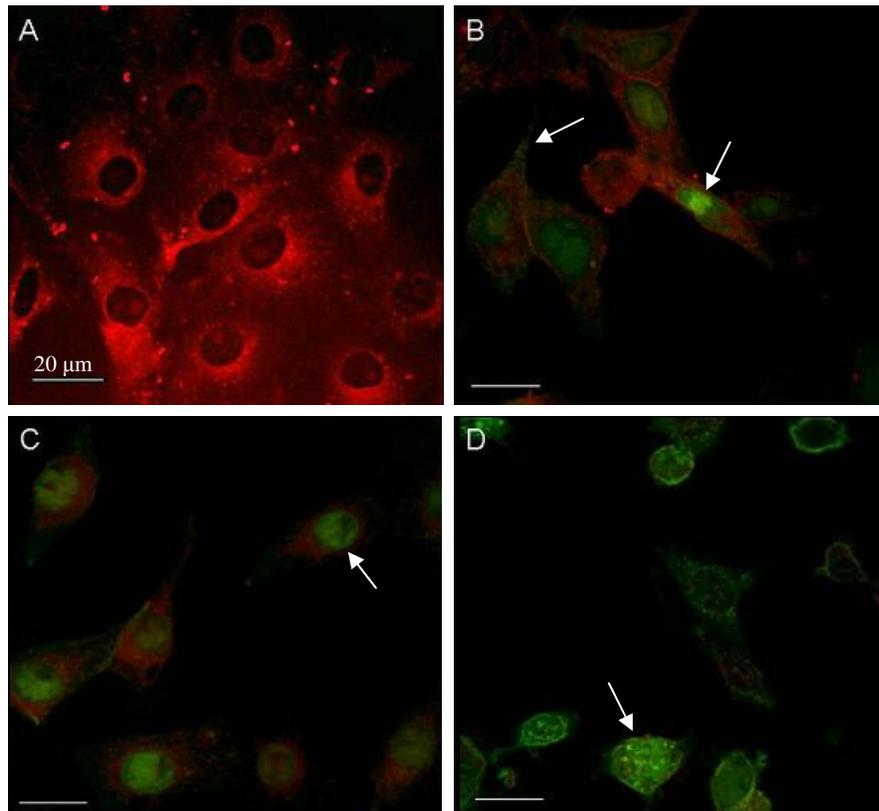
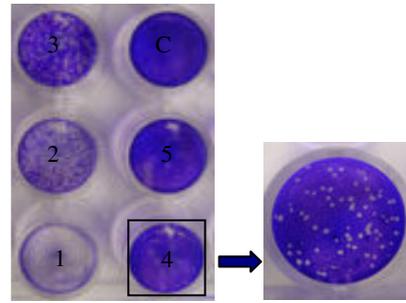


Figura 6. Control de infección celular.

Inmunofluorescencia realizada con el Kit de detección específico para HSV-1 de Chemicon Internacional, el cual contiene anticuerpos anti-gC y anti-ICP35 de HSV-1 (fluorescencia verde). En **A** se observa el control (células libres de infección). Los tiempos de infección fueron: 4 h (**B**), 8 h (**C**) y 18 h (**D**). Las células se aprecian de color rojo debido a la presencia de azul de ébano en el reactivo.

4.1.3. ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO CELULAR INDUCIDAS POR LA INFECCIÓN DEL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.

Establecido el modelo de infección productiva, se procedió a la realización de una cinética de infección sobre los cultivos celulares y posterior análisis de las modificaciones inducidas en el citoesqueleto, mediante inmunofluorescencia y ensayos de *western blot* de extractos proteicos totales, de células sometidas a los distintos tiempos de infección. Los protocolos se llevaron a cabo según se describe en Materiales y Métodos.

En la **figura 7** se muestra el efecto citopático inducido por HSV-1 sobre células VERO. Se observa un claro cambio en la morfología de la célula, la cual se torna notablemente más redondeada y de un mayor volumen.

4.1.3.1. CAMBIOS EN LA DINÁMICA MICROTUBULAR.

Para el estudio de las modificaciones ocurridas en el citoesqueleto microtubular provocadas por la infección con el virus, se realizó inmunodetecciones con anticuerpos específicos contra dos tipos de tubulina modificada postraduccionalmente: tubulina acetilada y tubulina tirosinada, las cuales están involucradas en la estabilización y aumento de la dinámica de los microtúbulos, respectivamente. La **figura 8A**, muestra el resultado de los análisis *de western blot* de las distintas modificaciones de tubulina. Los gráficos (**B** y **C**), indican una disminución de la tubulina acetilada en las primeras horas de infección, siendo estadísticamente significativa a las 8 h, y un posterior aumento de esta modificación, máximo a las 24 horas de infección. En cuanto a la tirosinación de la tubulina, un significativo aumento se observa a las primeras 4 horas de

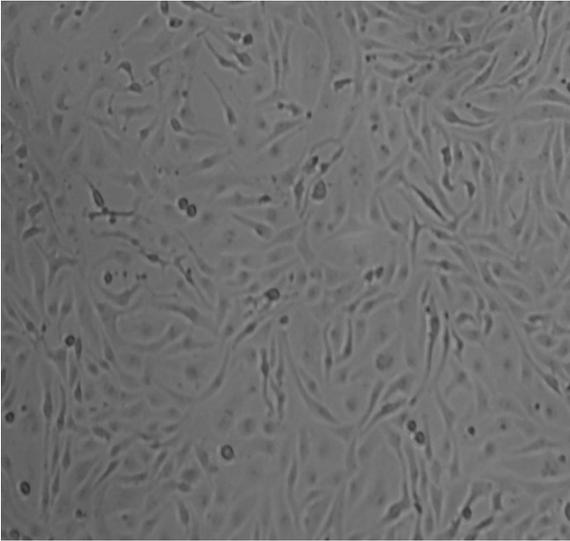
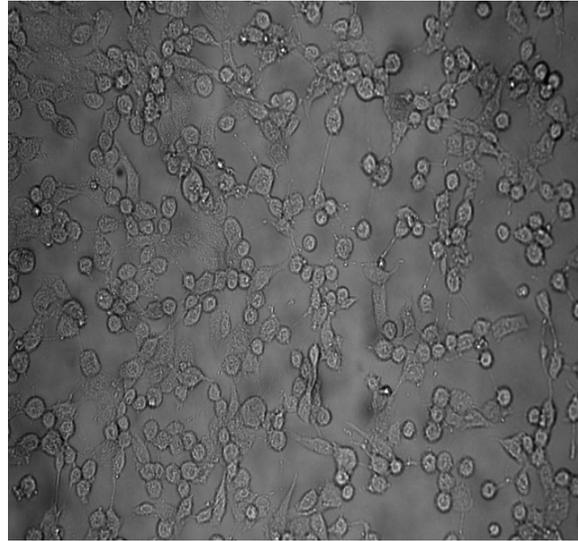
CONTROL**24 H.P.I.**

Figura 7. Efecto citopático inducido por HSV-1 sobre células VERO. Micrografía tomada a través de microscopio invertido, que permite observar el cambio morfológico sufrido por células VERO infectadas durante 24 horas por HSV-1, con un MOI de 10.

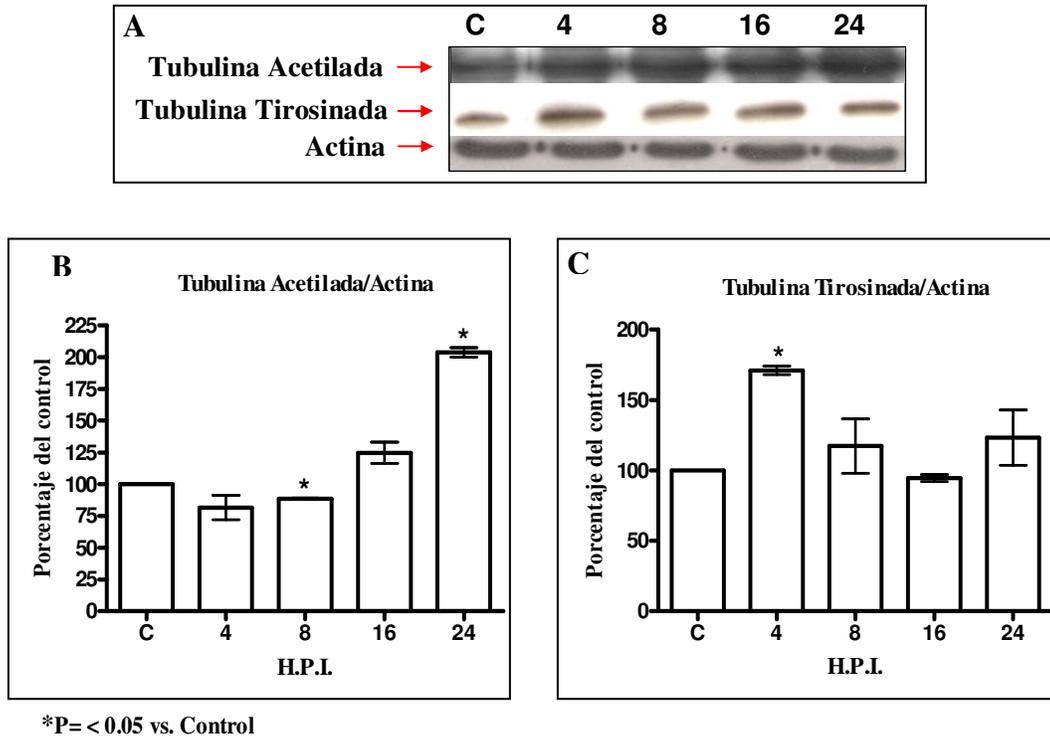


Figura 8. HSV-1 induce cambios en la dinámica microtubular de células VERO. (A) Immunodetección de tubulina acetilada, tubulina tirosinada y actina realizada a extractos proteicos totales de células VERO infectadas durante distintos tiempos, (MOI: 10). **(B y C)** Gráficos representando el análisis densitométrico de los datos de A, normalizados con actina.

infección, con una posterior disminución en las etapas siguientes. El análisis por inmunofluorescencia (**Figura 9**), nos permite visualizar los cambios en la distribución de las distintas modificaciones de tubulina en la célula, en donde podemos notar la disminución de acetilación a las 8 horas post infección (**C**) y una posterior inmunodetección -mayoritariamente- en la zona perinuclear (**D** y **E**). La tubulina tirosinada se observa distribuida en toda la célula hasta las 8 horas de infección, en etapas más tardías, ésta se encuentra preferentemente cercana al núcleo.

Estos resultados sugieren un aumento de la dinámica microtubular en las primeras etapas de la infección (primeras 8 horas), lo cual podría tener relación con la reorganización del citoesqueleto microtubular inducido por HSV-1 durante las primeras horas de infección. Estudios anteriores han demostrado que la transfección de la proteína VP22 de HSV-1 en células VERO, induce una reorganización y posterior estabilización de los microtúbulos, los cuales presentan una elevada acetilación (Elliott *et al.*, 1998). En la **figura 10**, una mayor magnificación nos permite observar una reorganización en la distribución de la tubulina tirosinada a las 8 horas de infección (**B**) en forma de fibras entrecruzadas, en comparación con el control (**A**), en donde se observa formando ases, desde el centrosoma hacia la membrana plasmática.

4.1.3.2. ALTERACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA.

Para determinar si la infección de HSV-1 induce algún tipo de alteración visible sobre el citoesqueleto de actina, células VERO sometidas a una cinética de infección con el virus, fueron fijadas e incubadas con faloidina, sonda que se une a actina fibrilar. Los resultados se exponen en la **figura 11**, en donde los microfilamentos se observan claramente y distribuidos en todo el

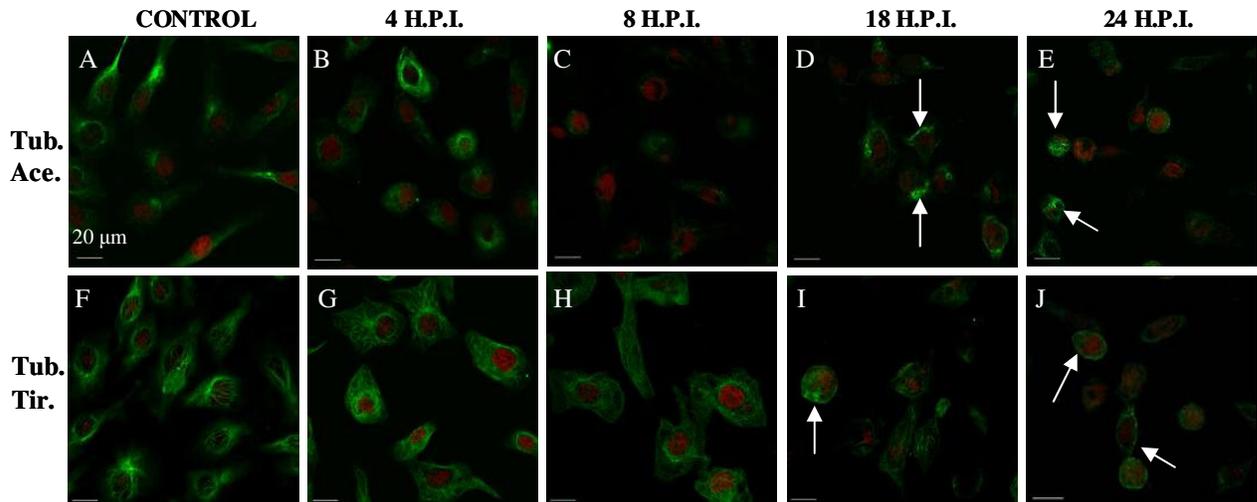


Figura 9. Cambios de distribución de la tubulina modificada en células infectadas con HSV-1. Inmunofluorescencia realizada a células VERO infectadas y fijadas a distintos tiempos, usando anticuerpos anti-tubulina acetilada y anti-tubulina tirosinada; núcleos teñidos con Ioduro de propidio.

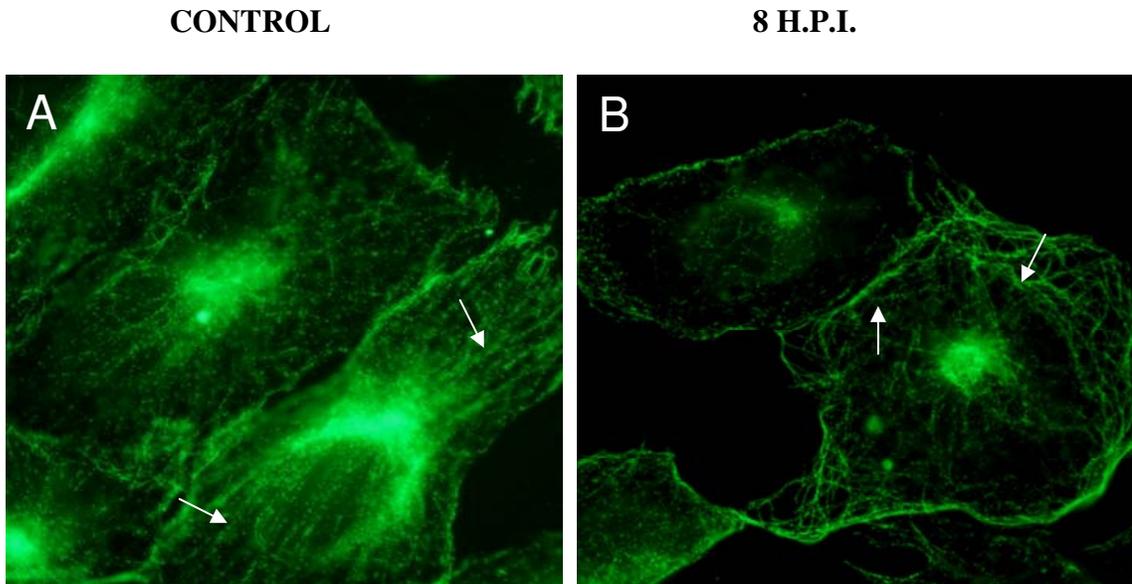


Figura 10. Redistribución de la tubulina tirosinada en el citoesqueleto celular. Inmunofluorescencia realizada a células VERO infectadas (**B**) o no (**A**) con HSV-1 (MOI 10), usando el anticuerpo anti-tubulina tirosinada. (Magnificación 100X).

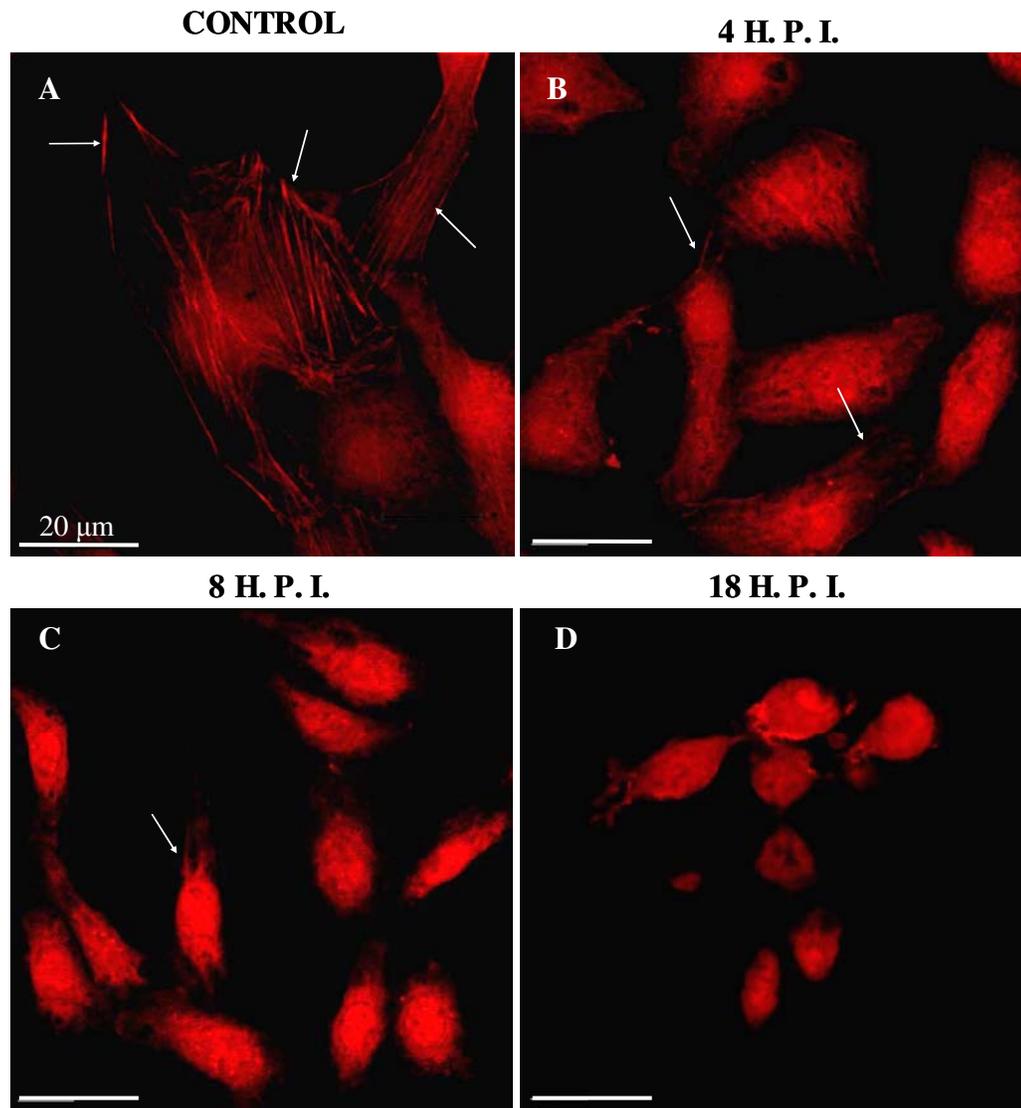


Figura 11. Alteración de los filamentos de actina inducido por la infección con HSV-1. Células VERO sometidas a una cinética de infección con HSV-1 (MOI 10), fueron fijadas y posteriormente incubadas con la sonda faloidina, la cual permite la visualización de los filamentos de actina (flechas).

citoplasma de la célula en el control (**A**), lo cual se ve drásticamente afectado desde las 4 horas de infección (**B**), en donde aún se observan algunos microfilamentos, pero de una longitud considerablemente menor. Desde las 18 horas de infección en adelante, los microfilamentos se ven afectados en su totalidad (**D**).

4.2. MODELO NEURONAL.

Los cultivos primarios fueron generados a partir de neuronas corticales de embriones de rata de 18 días de gestación y se procedió según lo descrito por Alvarez *et al.*, (1999). Los experimentos fueron llevados a cabo luego de cuatro días de diferenciación neuronal.

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO NEURONAL.

Realizados los cultivos primarios, se procedió a su caracterización por medio de inmunofluorescencia, usando distintos marcadores, tanto neuronales como de astrocitos. En la **figura 12A** -utilizando el anticuerpo Tau 5- el cual se une a todas las isoformas de la proteína Tau, siendo -por lo tanto- marcador neuronal específico, es posible visualizar las prolongaciones nerviosas y las conexiones neuronales formadas en los cultivos. En **B**, el anticuerpo utilizado fue 2H3 -el cual detecta neurofilamentos- permitiendo la observación definida del axón y dendritas. CD68, marcador de macrófagos, permite la inmunodetección de la microglía (**C**). El porcentaje de astrocitos en los cultivos, fue calculado contando el número de éstos y el número total de núcleos -teñidos con yoduro de propidio- en varias micrografías de inmunofluorescencias realizadas utilizando el anticuerpo GFAP, el cual se une a la proteína ácida de los filamentos

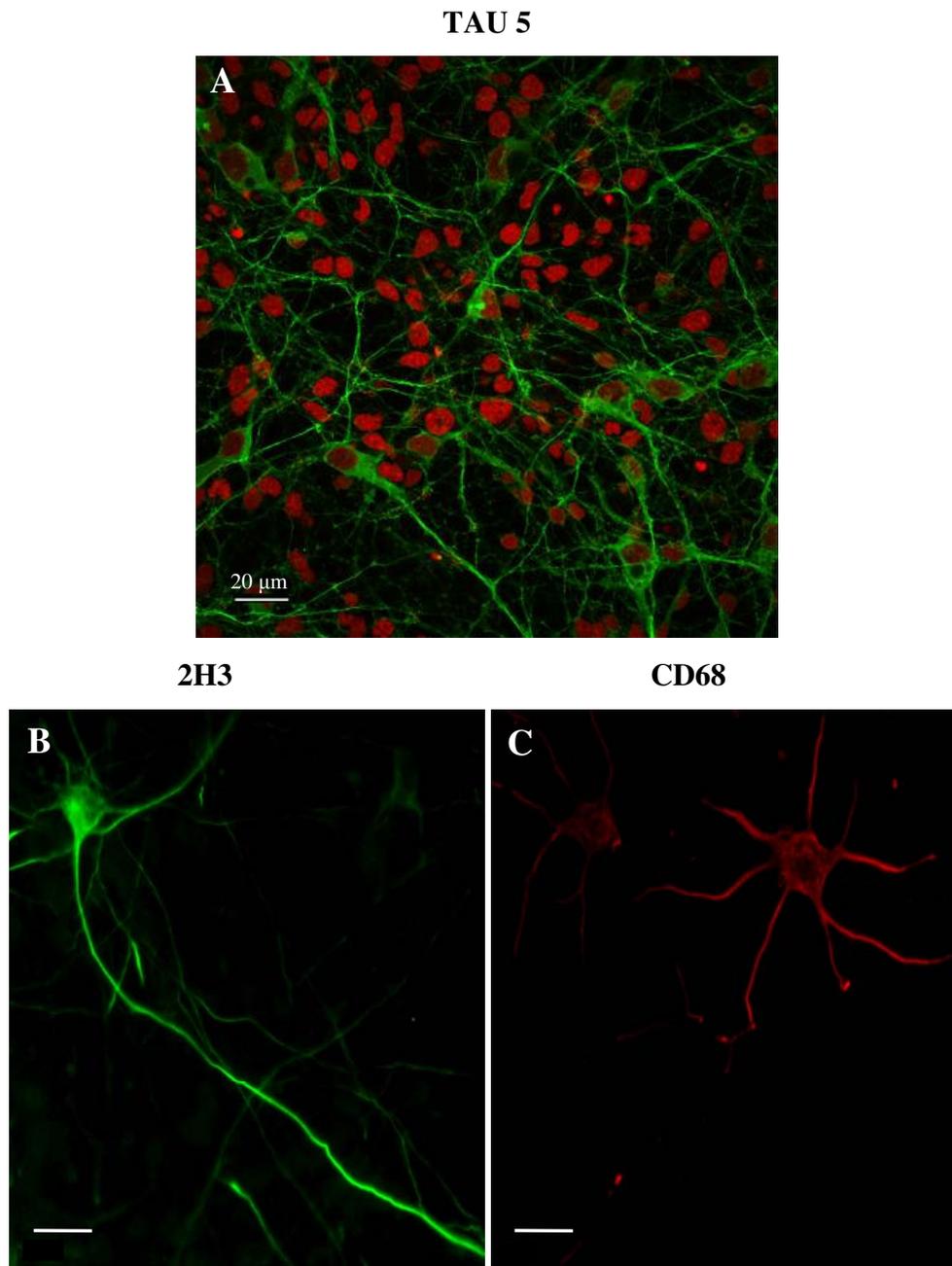


Figura 12. Caracterización del cultivo primario. La figura muestra el resultado de una inmunofluorescencia -realizada a las células del cultivo primario neuronal- fijadas luego de 4 días de diferenciación, utilizando los anticuerpos Tau 5 (**A**), 2H3 (**B**) y CD68 (**C**). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio.

gliales de los astrocitos (**Figura 13A**). El porcentaje de astrocitos, resultó ser de aproximadamente un 5% (**B**).

4.2.2. CONTROL DE INFECCIÓN.

Al igual que en el modelo de trabajo anterior, se llevó a cabo un control de infección -esta vez- utilizando el anticuerpo anti-glicoproteína D de HSV-1. Los diferentes tiempos de infección se señalan en la **figura 14**. El virus comienza a ser inmunodetectado luego de una hora de adsorción (fluorescencia verde), haciéndose más profusa la señal a medida que aumentan las horas de infección.

4.2.3. EVENTOS NEURODEGENERATIVOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.

4.2.3.1. ALTERACIÓN DE LOS PROCESOS NEURÍTICOS.

Para el estudio del daño general provocado por HSV-1 sobre los cultivos neuronales corticales, se efectuó una cinética de infección sobre éstos y un posterior análisis por inmunofluorescencia, mediante el cual se logró observar que la infección con el virus induce claros signos de neurodegeneración, incluyendo la disminución de las prolongaciones nerviosas, la formación de procesos tortuosos y la retracción de los procesos neuríticos.

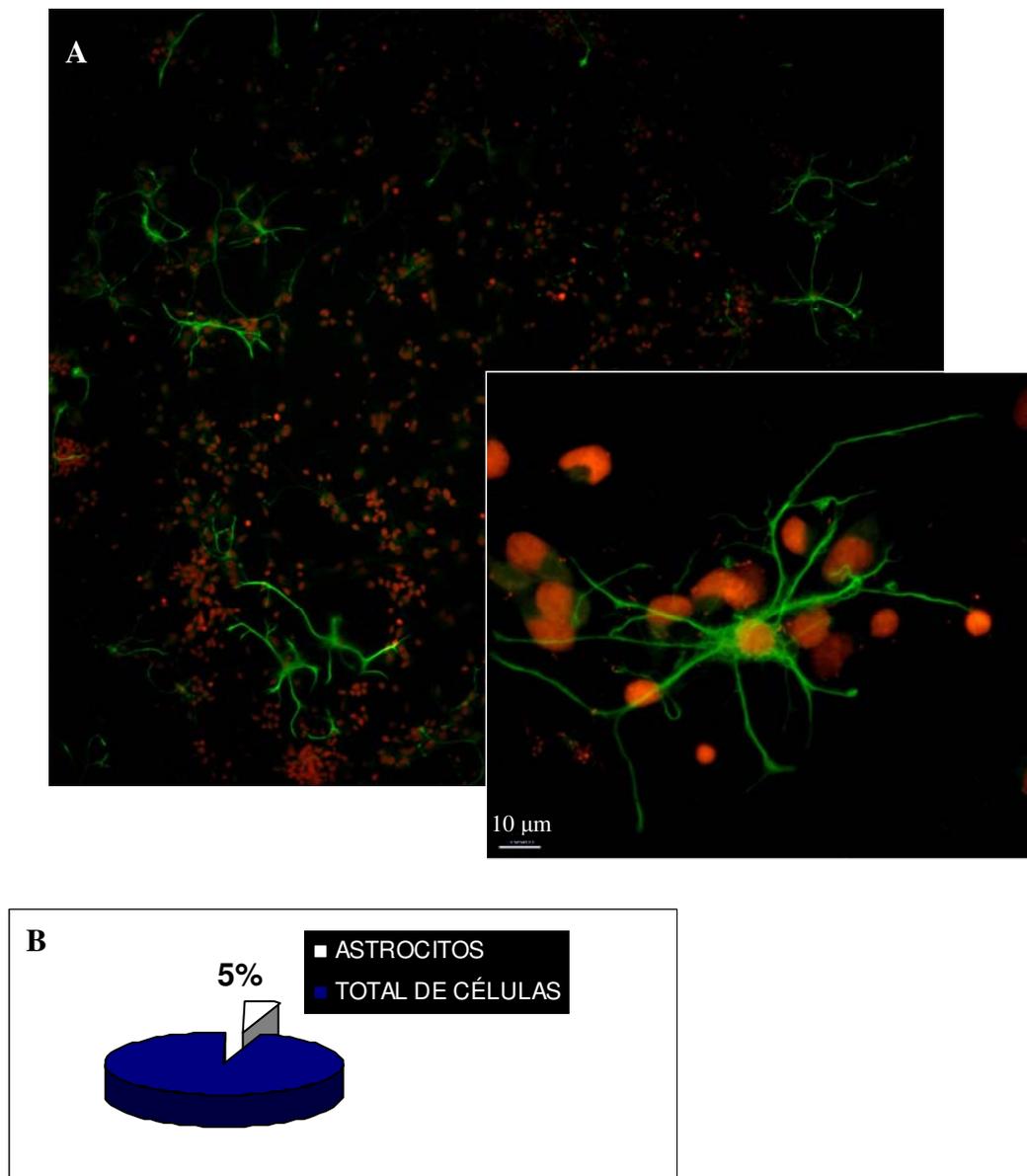


Figura 13. Determinación del porcentaje de astrocitos. Inmunofluorescencia realizada al cultivo primario neuronal, con el anticuerpo GFAP, el cual se une a la proteína ácida de los filamentos gliales de astrocitos; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (A). Gráfico representando el porcentaje de astrocitos en el cultivo primario neuronal (B).

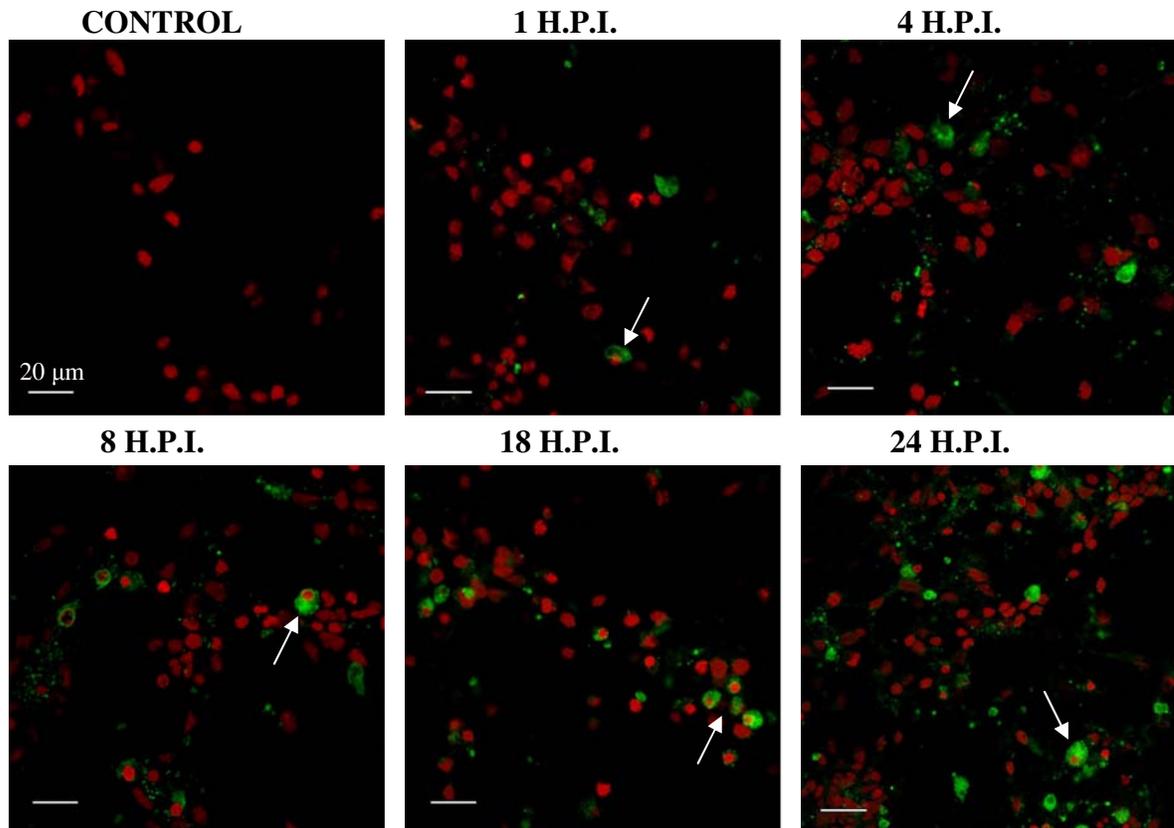


Figura 14. Control de infección neuronal. Inmunofluorescencia realizada a cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1 (MOI 10), usando el anticuerpo anti-glicoproteína D de HSV-1. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio.

La **figura 15** resume los resultados obtenidos. En el panel **A** es posible observar que -en comparación con el control- existe una clara alteración de los procesos neuronales en las células infectadas, visualizándose la retracción de éstos y evidenciándose una pérdida de las conexiones entre las neuritas. Por medio de microscopio invertido, fue posible registrar el efecto citopático inducido por HSV-1 en una neurona; las flechas en el panel **B** indican las alteraciones morfológicas ocurridas, en donde el soma se observa redondeado, y el axón, además de presentar una menor longitud, exhibe una morfología tortuosa.

La longitud de los axones, en los distintos tiempos de infección, fue medida en el programa *Olympus fluoview*, y graficada como porcentaje de la longitud de los axones de neuronas en el control, cuyo promedio se consideró como un 100%; por otra parte, pudimos advertir una disminución en el número de neuronas, proporcional al tiempo de infección, por lo que se realizó un conteo de los núcleos a las distintas horas de la cinética, lo cual fue graficado como porcentaje del control (**C**). El gráfico indica que ambos parámetros disminuyen considerablemente, encontrando aproximadamente un 36% de neuronas y un promedio aproximado del 20% de la longitud -con respecto al control- a las 18 hrs. de infección.

Para determinar si las alteraciones observadas fueron inducidas, efectivamente por la infección productiva de HSV-1, la replicación viral fue inhibida mediante el uso de Aciclovir, análogo sintético de guanósina que actúa inhibiendo a la DNA polimerasa viral (**figura 16**). En el panel **A**, es posible apreciar los focos de infección formados en el cultivo infectado con HSV-1, en los cuales las células presentan una alteración morfológica que no se observa en los cultivos tratados previamente con Aciclovir.

Como control adicional, cultivos primarios neuronales fueron infectados con alícuotas de HSV-1 inactivado mediante temperatura y radiación UV. En el panel **B** podemos visualizar

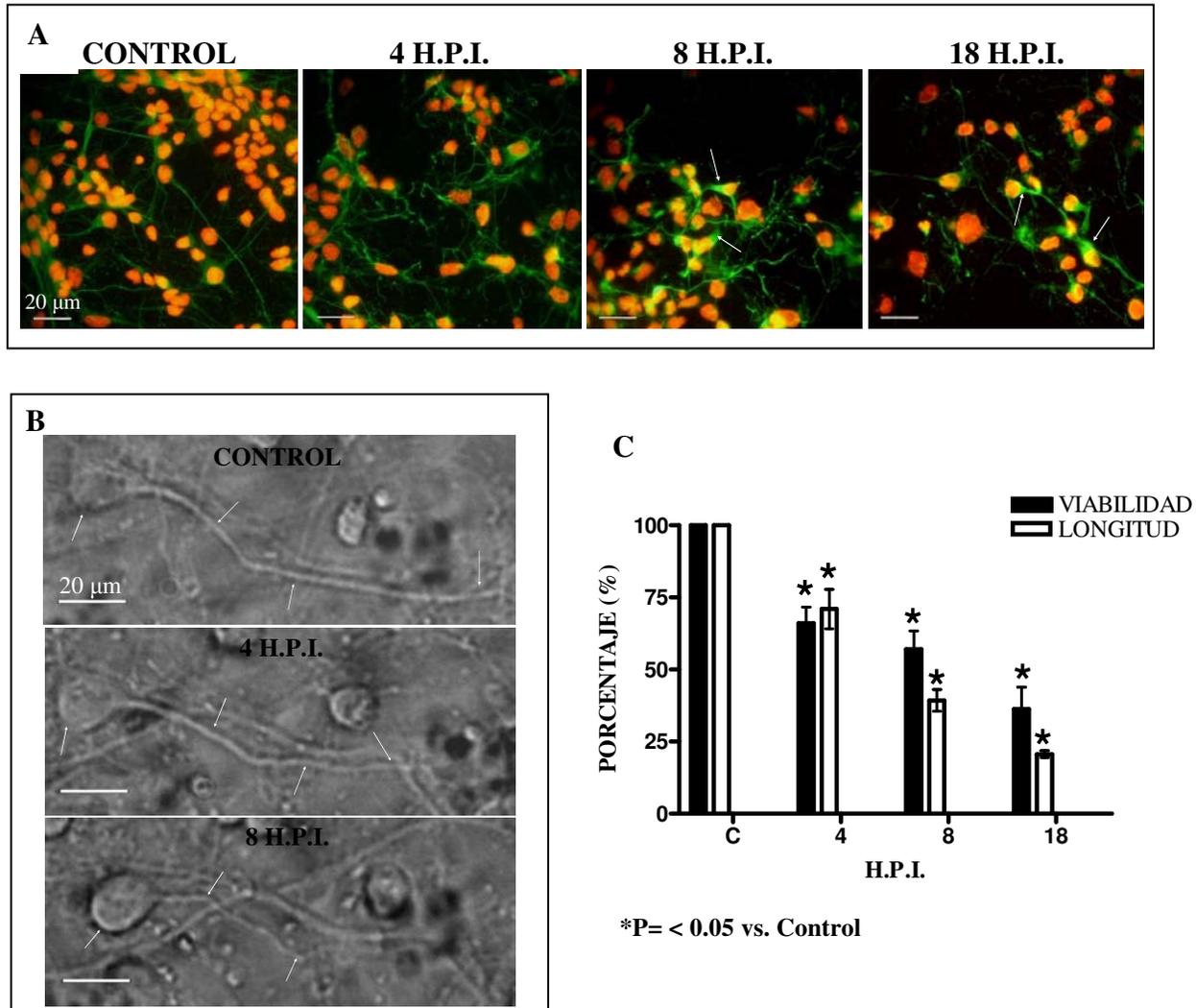


Figura 15. Daño neuronal inducido por la infección con HSV-1. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-tubulina acetilada, de cultivos neuronales sometidos a diferentes tiempos de infección con HSV-1 (MOI 10); los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio; las flechas indican una mayor inmunodetección en la zona perinuclear (A). Registro mediante microscopio invertido, de una neurona infectada por HSV-1; las flechas indican el efecto citopático inducido por el virus (B). Gráfico representando la longitud axonal y el número de neuronas a distintas horas post infección, con respecto al control (C).

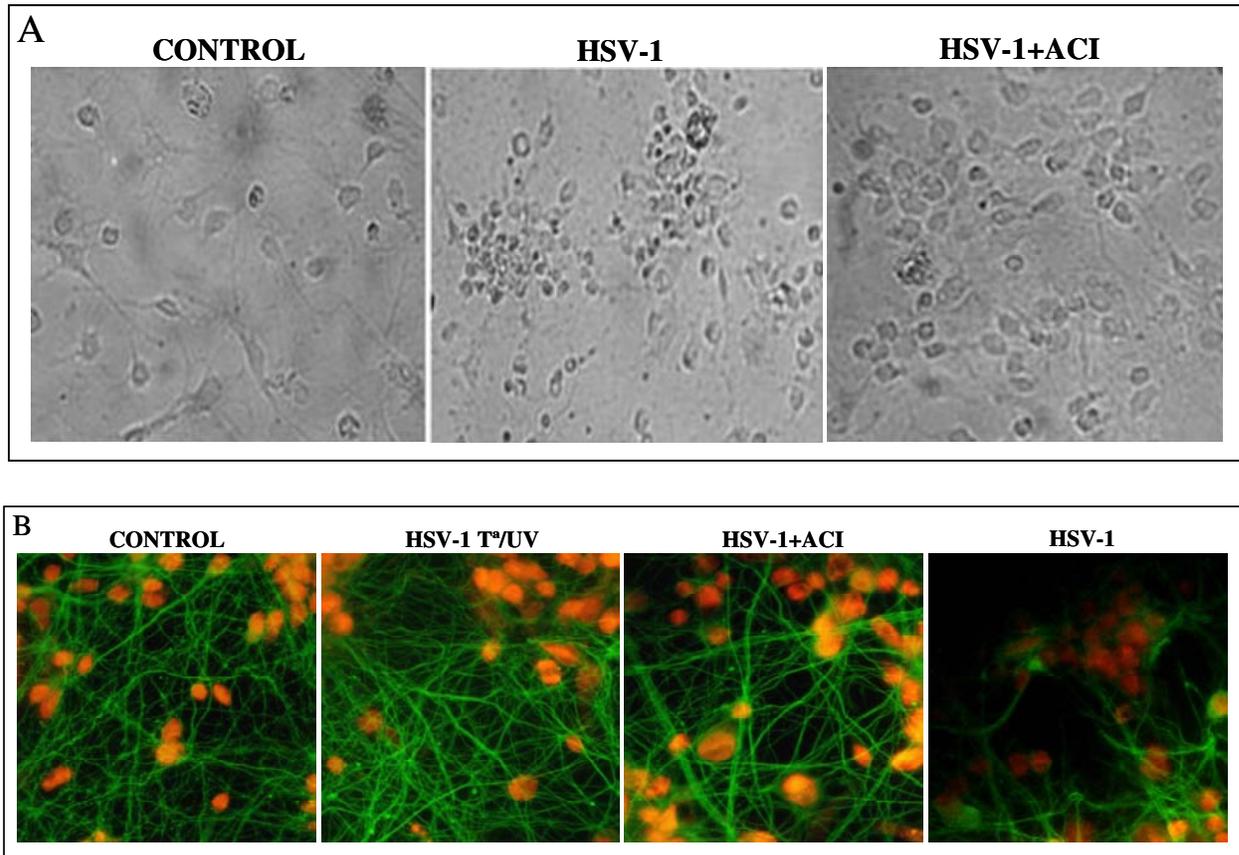


Figura 16. La inhibición de la replicación viral evita las alteraciones inducidas por la infección de HSV-1. Cultivos primarios neuronales tratados (HSV-1+ACI) o no -previamente- con aciclovir (50 μ M), fueron infectados durante 18 hrs. con HSV-1 MOI 10 (A). Inmunofluorescencia realizada utilizando anticuerpo anti α -tubulina, sobre cultivos primarios neuronales infectados con HSV-1, inactivado mediante exposición durante 30 min. a radiación UV, 30 min. a 56° C o tratados previamente con aciclovir (50 μ M) (B).

que los cultivos tratados con HSV-1 inactivo, al igual que los cultivos tratados previamente con aciclovir, no sufrieron alteraciones visibles en los procesos neuronales, observándose éstos íntegros -al igual que en el control- a diferencia de lo observado en las células infectadas.

4.2.3.2. DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.

Un ensayo adicional para determinar la disminución en la viabilidad de las neuronas corticales, inducida por la infección con HSV-1, fue la detección de células con la cromatina compactada. Se ha demostrado que la infección del Virus Herpes Simple induce apoptosis en células humanas (Aubert *et al.*, 2000; Perkins, 2002; Goodkin *et al.*, 2004); más aun, debido al hallazgo de células apoptóticas en cerebros de pacientes que sufrieron encefalitis por Herpes Simple, se ha sugerido que la apoptosis inducida por el virus en el SNC, podría tener relación con la patogénesis molecular de la enfermedad (Athmanathan *et al.*, 2001).

Un método común para la determinación de apoptosis, es el uso de sondas fluorescentes, en nuestro caso se utilizó el colorante *Hoechst 33342*, el cual permite visualizar la morfología nuclear y los cambios en la compactación de la cromatina, proceso inducido por la activación de apoptosis. El resultado de este ensayo se expone en la **figura 17**, en donde las flechas indican los núcleos que muestran la cromatina condensada, los cuales fueron indicativos de apoptosis. Se observa que el porcentaje de células apoptóticas aumenta a medida en que aumentan las horas de infección.

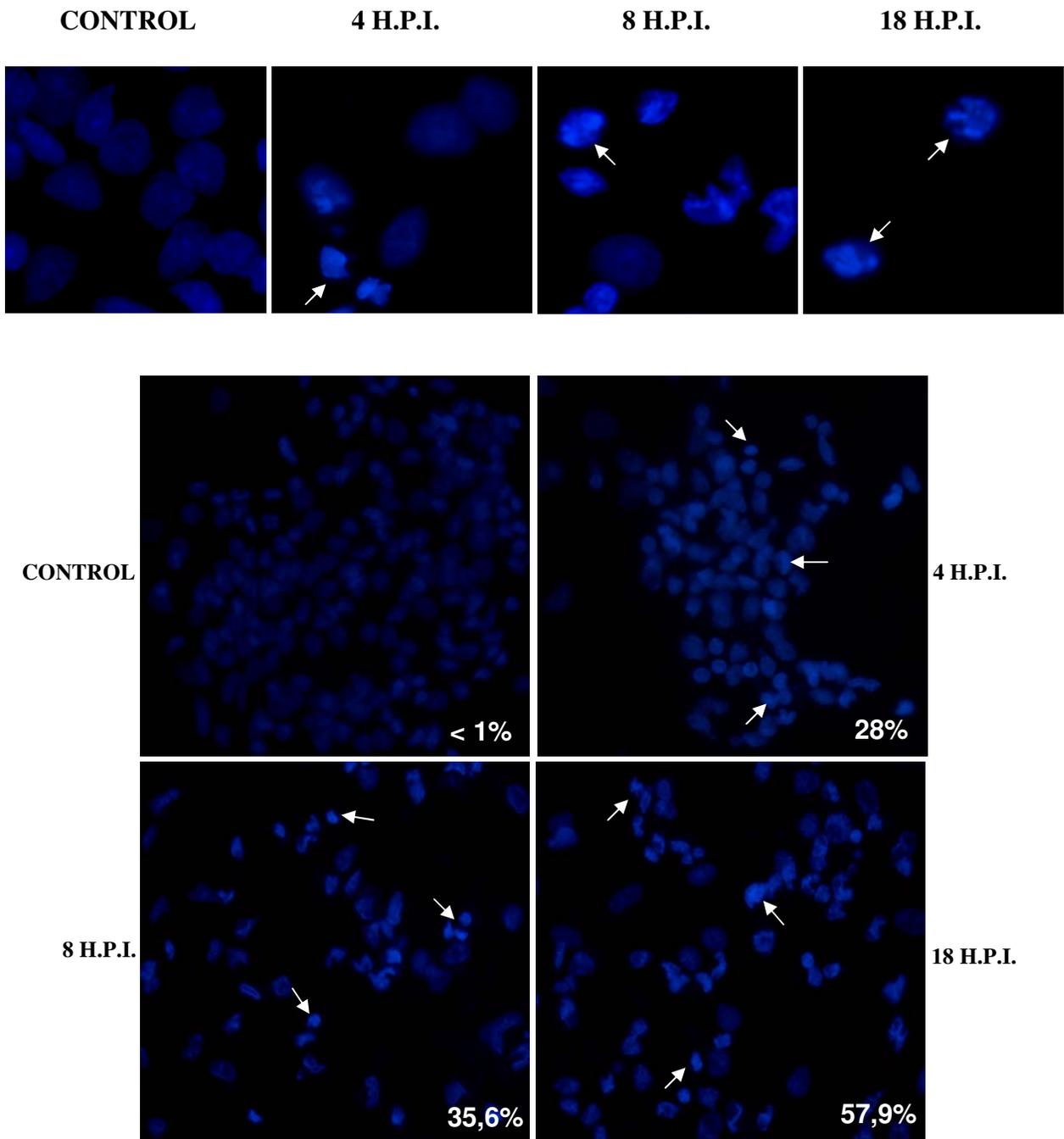


Figura 17. Apoptosis inducida por la infección con HSV-1. Cultivos primarios neuronales sometidos a infección fueron fijados y luego incubados durante 2 minutos con la sonda *Hoechst* 33342, a una dilución de 1:1000. Las flechas indican los núcleos que presentan la cromatina condensada. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas en los distintos tratamientos.

4.2.3.3. CAMBIOS EN LA DINÁMICA MICROTUBULAR DE NEURONAS INFECTADAS CON HSV-1.

Los microtúbulos son estructuras que presentan inestabilidad dinámica dentro de la célula, sufriendo alternativamente etapas de crecimiento y despolimerización. En modelos distintos al neuronal, se ha demostrado que la infección con Virus Herpes Simple Tipo 1 induce modificaciones en esta dinámica. Para determinar si la infección del virus induce modificaciones similares en neuronales corticales, cultivos primarios fueron sometidos a una cinética de infección y posterior análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra tubulina acetilada (microtúbulos estables) y tubulina tirosinada (microtúbulos dinámicos). En la **figura 18** se presenta el resultado de un ensayo de inmunodetección, de extractos proteicos totales provenientes de cultivos primarios sometidos a una cinética de infección, durante los tiempos que allí se indican. El gráfico -panel **A**- indica que en las primeras horas de infección existe una disminución de la tubulina acetilada, que continúa hasta las 8 horas de infección; posteriormente, la estabilidad de los microtúbulos comienza a aumentar, lo cual está denotado por el aumento de este marcador. El mismo experimento se realizó con una multiplicidad de infección menor -panel **B**- en donde podemos observar que los resultados son similares.

La disminución de la dinámica microtubular, también se vio manifestada por la progresiva disminución de la tubulina tirosinada a medida en que se aumentaron las horas de infección, y que fue estadísticamente significativa a las 18 horas post infección (**figura 19**, panel **A**).

Para darle un enfoque más real a la problemática planteada y acercarnos más a las condiciones fisiológicas de infección, se llevaron a cabo ensayos similares, pero con una multiplicidad de infección menor. Cultivos neuronales fueron sometidos a infección durante 18

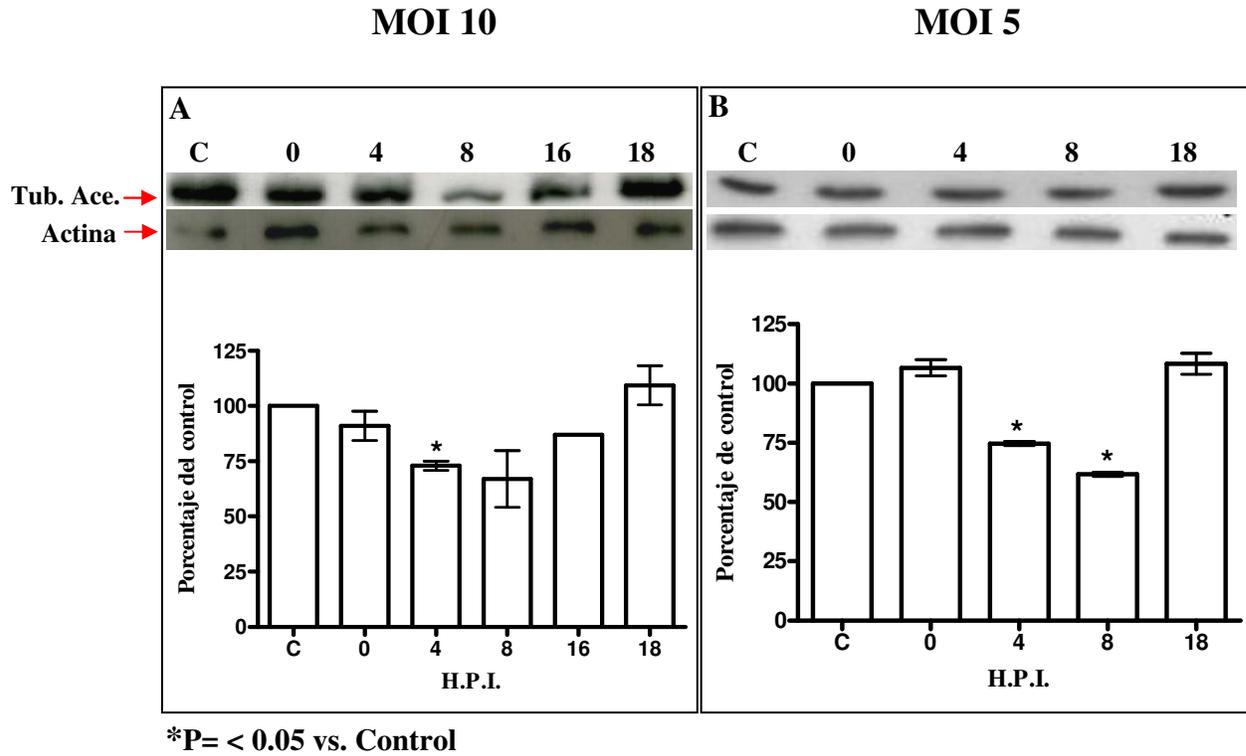
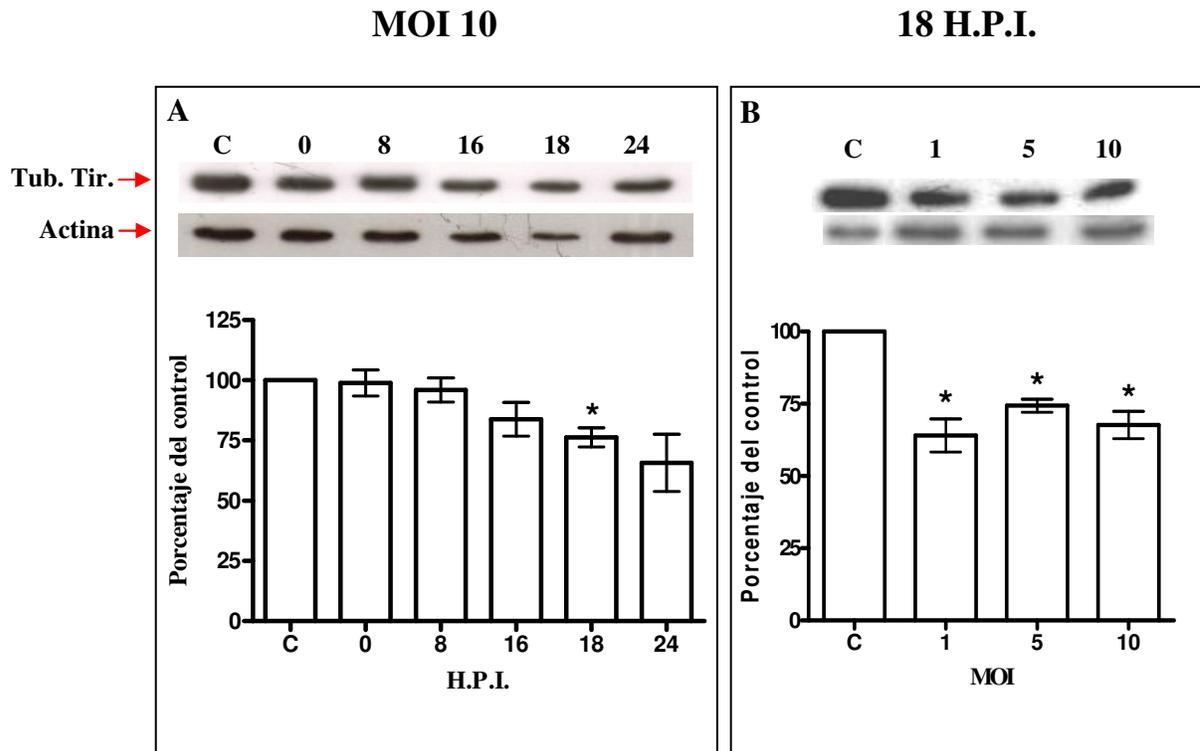


Figura 18. Cambios en la acetilación de la tubulina inducidos por la infección de HSV-1 en neuronas. Inmunodetección de tubulina acetilada, de extractos proteicos totales de cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1, utilizando un MOI de 10 (A) o un MOI de 5 (B).



*P= < 0.05 vs. Control

Figura 19. Cambios en la tirosinación de la tubulina inducidos por la infección de HSV-1 en neuronas. Immunodetección de tubulina tirosinada, de extractos proteicos totales de cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1, utilizando un MOI de 10 (A). Immunodetección de tubulina tirosinada, de extractos proteicos totales de cultivos infectados con un MOI de 1, 5 y 10, durante 18 horas con HSV-1 (B).

horas, utilizando un MOI de 1, 5 y 10; en el panel **B**, el gráfico indica que en los tres casos ocurre una disminución similar, pudiendo concluir que aun con una multiplicidad de infección considerablemente menor, el virus es capaz de inducir las alteraciones observadas al infectar con un MOI de 10, que es el cual se utiliza normalmente en los estudios de infección con HSV-1.

El siguiente análisis, se realizó con el objeto de determinar las modificaciones en la distribución de los marcadores de tubulina, inducidas por la infección del virus. En la **figura 20**, se expone el resultado de una inmunofluorescencia que nos permite visualizar los cambios de distribución de la tubulina tirosinada. La población de MTs dinámicos se observa distribuida de forma homogénea en el control y en las neuronas infectadas durante 4 horas, visualizándose una mayor inmunorreacción en el soma, a las 8 horas de infección. Luego de este tiempo, se observa una disminución en general de la señal, la cual es más notoria desde las 18 horas de infección.

En cuanto a la tubulina acetilada (**figura 21**) se observa que -en el control- la proteína se encuentra distribuida uniformemente en las prolongaciones neuronales, y a medida en que aumentan las horas de infección, la señal se hace menos intensa en las neuritas, concentrándose mayormente en la zona perinuclear, entre las 16 y 18 horas de infección.

Estos resultados sugieren un aumento de la dinámica microtubular en la zona perinuclear en las primeras 8 horas de infección. Posterior a este tiempo, comienza una disminución de esta dinámica y un aumento en la estabilidad de los MTs, mayormente en el soma de las neuronas que aún sobreviven en el cultivo.

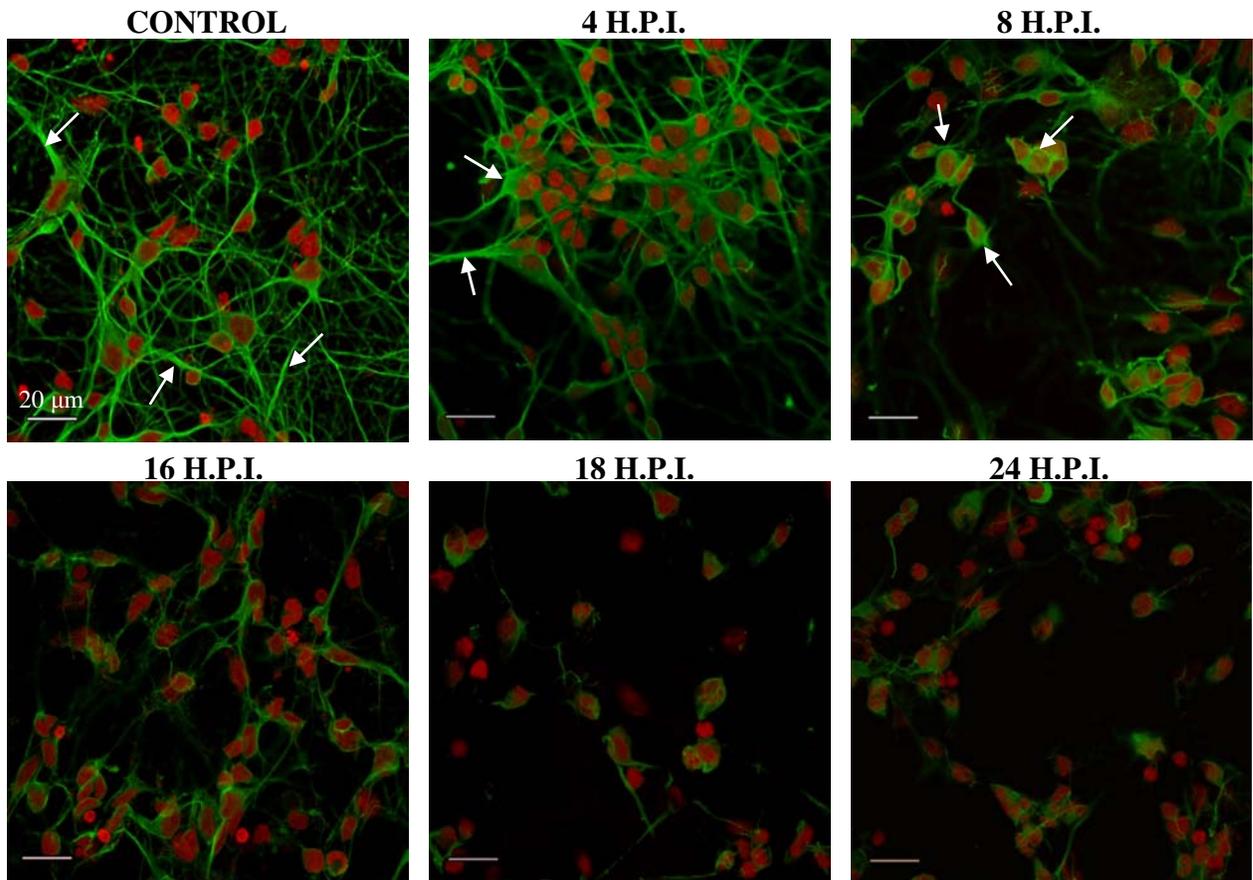


Figura 20. Cambios en la distribución de la tubulina tiosinada en cultivos neuronales infectados con HSV-1. Inmunofluorescencia realizada a cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1, utilizando el anticuerpo anti-tubulina tiosinada. Las flechas indican zonas de mayor inmunodetección.

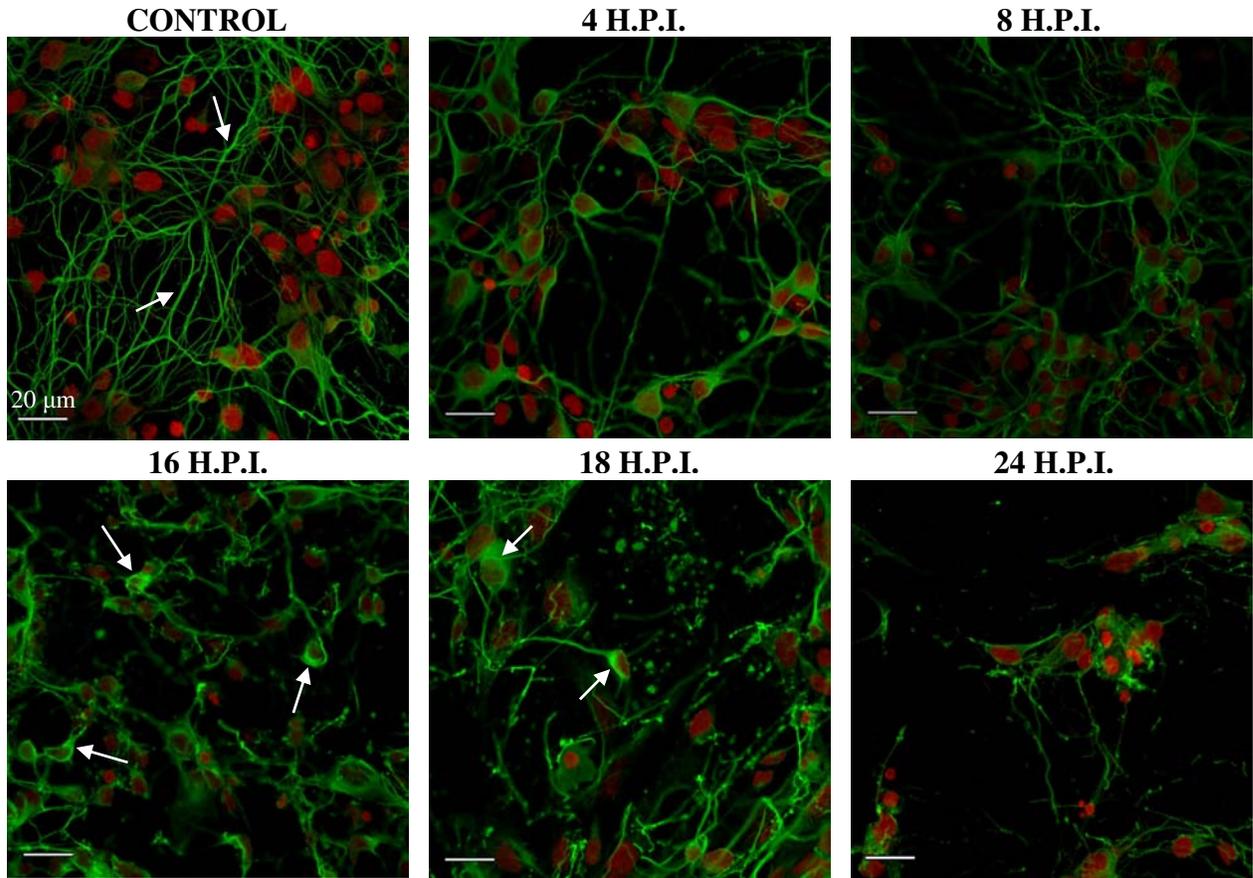


Figura 21. Cambios en la distribución de la tubulina acetilada en cultivos neuronales infectados con HSV-1. Inmunofluorescencia realizada a cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1, utilizando el anticuerpo anti-tubulina acetilada. Las flechas indican zonas de mayor inmunodetección.

4.2.3.4. ALTERACIÓN DEL CITOESQUELETO NEURONAL DE ACTINA.

El análisis de las alteraciones del citoesqueleto de actina inducidas por la infección de HSV-1 se llevó a cabo, al igual que en el modelo de trabajo anterior, mediante el uso de la sonda faloidina, la cual detecta la actina fibrilar. En la **figura 22** se expone el resultado de la inmunofluorescencia, en donde es posible observar claramente los filamentos de actina que forman parte de las prolongaciones neuronales, los cuales además se muestran interconectados unos con otros en el control. Dichas conexiones se ven alteradas debido al acortamiento de los microfilamentos luego de la exposición de los cultivos neuronales a 4 horas de infección. A las 8 horas post infección, el número de filamentos ha disminuido notablemente y se observan difusos. Posterior a este tiempo, existe una completa alteración del citoesqueleto de actina.

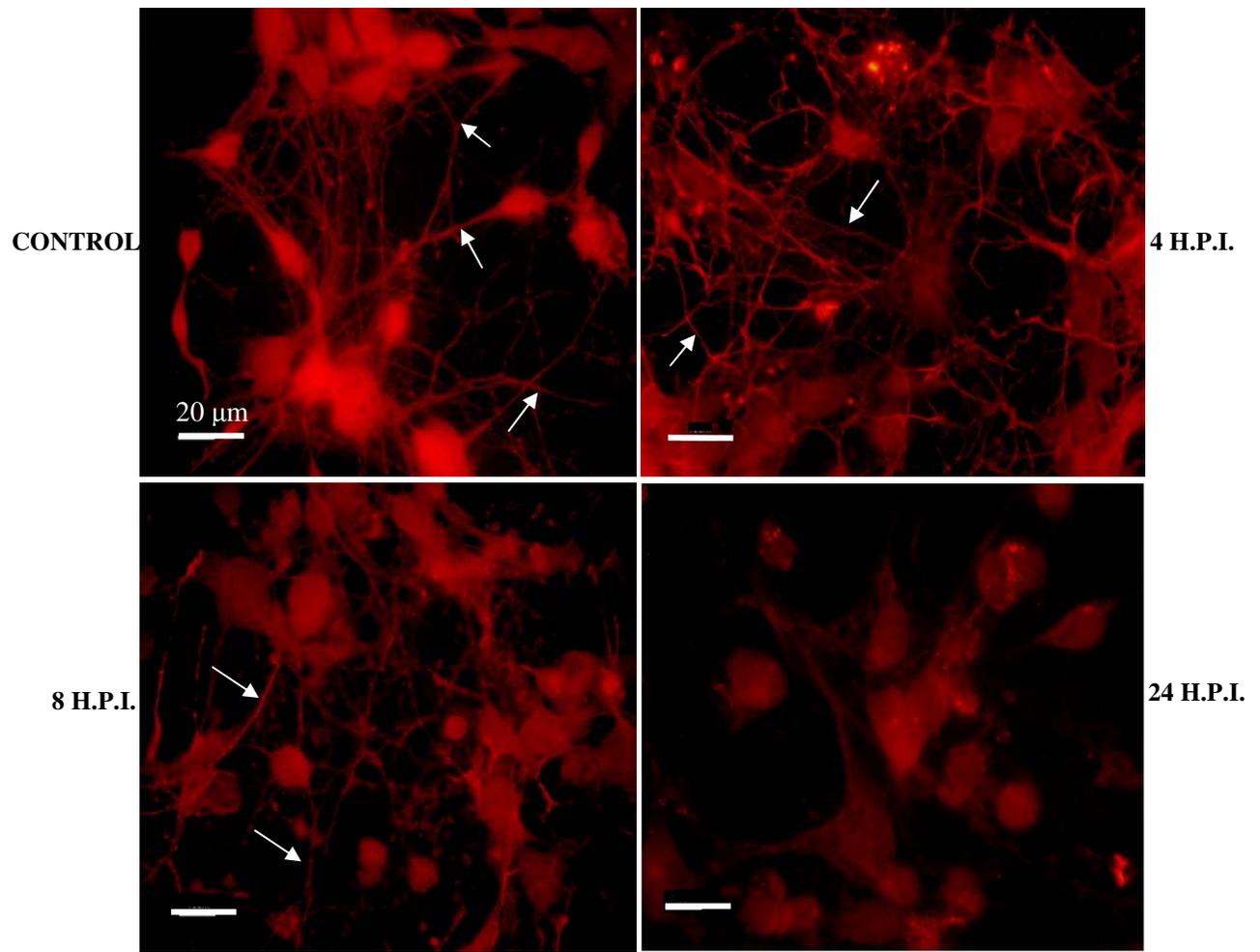


Figura 22. Alteración del citoesqueleto neuronal de actina inducido por la infección de **HSV-1**. Inmunofluorescencia realizada a cultivos primarios neuronales sometidos a una cinética de infección con HSV-1 utilizando la sonda faloidina, la cual detecta la actina fibrilar (flechas).

TABLA RESUMEN

	VERO	NEURONAS
Efecto Citopático	<ul style="list-style-type: none"> • redondeamiento celular • aumento de volumen • pérdida de adherencia 	<ul style="list-style-type: none"> • redondeamiento del soma • disminución de longitud del axón • morfología tortuosa
Acetilación de Tubulina	<p>4-8 h: disminución</p> <p>16-24 h: aumento</p>	<p>4-8 h: disminución</p> <p>18 h: aumento</p>
Tirosinación de Tubulina	<p>4 h: aumento</p> <p>16 h: disminución</p>	<p>16-24 h: disminución progresiva</p>
Filamentos de Actina	<p>4-8 h: alteración drástica, acortamiento y disminución de filamentos.</p> <p>18 h: no se observan filamentos.</p>	<p>4 h: acortamiento</p> <p>8 h: disminución</p> <p>24 h: no se observan filamentos.</p>

5. DISCUSIÓN.

El Virus Herpes Simple tipo 1 se encuentra ampliamente diseminado en la naturaleza y es un patógeno muy común en el hombre, encontrándose en un 90% de la población adulta. Entre un 20 y un 40% de los individuos seropositivos sufren la reactivación recurrente del virus, la cual se manifiesta comúnmente por la aparición de vesículas ulcerosas en la piel y mucosas, en la zona de la cara (Khanna *et al.*, 2004).

HSV-1 es capaz de invadir y establecer latencia en el sistema nervioso del huésped, pudiendo -en algunos casos- producir encefalitis, patología que presenta una elevada mortalidad y secuelas neurológicas que afectan al paciente de por vida (Levitz, 1998; Tyler, 2004).

Teniendo en cuenta que sólo un 20-40% de los individuos seropositivos sufren la recurrencia de vesículas ulcerosas, a pesar de que un 90% de la población es portadora del virus en el sistema nervioso periférico, es válido pensar que los factores que influyen en la reactivación recurrente del virus, podrían intervenir de la misma forma en la reactivación localizada del virus en el SNC, contribuyendo así con el desarrollo de alteraciones neurológicas a largo plazo. Por ello, en este trabajo se planteó la hipótesis de que “La infección productiva del Virus Herpes Simple Tipo 1 sobre cultivos neuronales induce alteraciones neurodegenerativas sobre el citoesqueleto”.

Los resultados obtenidos de este trabajo, demuestran que HSV-1 no sólo es capaz de llevar a cabo una infección productiva sobre cultivos primarios neuronales -lo cual se expone en la **figura 14**- sino que además, análogo a lo ocurrido al infectar células epiteliales, las neuronas sufren alteraciones significativas en el citoesqueleto.

La utilización de los marcadores tubulina acetilada y tubulina tirosinada, dan cuenta del grado de estabilidad y dinámica del citoesqueleto, respectivamente. Investigaciones realizadas, han demostrado que la infección por HSV-1 induce una reorganización y posterior estabilización del citoesqueleto microtubular en varias líneas celulares (Avitabile *et al.*, 1995; Elliott and O'hare, 1998). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos de nuestro modelo epitelial VERO, en donde pudimos corroborar la inducción de una redistribución de la tubulina tirosinada (**figura 10**) y posterior estabilización de los microtúbulos, lo cual se denota por el aumento de la acetilación en horas más tardías de la infección (**figura 8**).

Por otra parte, estudios en distintas líneas celulares han demostrado que los Herpesvirus interactúan con el citoesqueleto de actina durante todo el curso de su ciclo reproductivo (Favoreel *et al.*, 2007), lo cual podría explicar las alteraciones observadas en la actina-F, desde las primeras horas de infección (**figura 11**).

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, y poder estudiar posibles eventos neurodegenerativos inducidos por la infección de HSV-1 "*in vitro*", se realizaron cinéticas de infección sobre cultivos primarios de neuronas corticales, los cuales presentaron una pureza de alrededor de un 95% en células neuronales, siendo muy bajo el porcentaje de células gliales en dichos cultivos (**figura 13**).

Mediante inmunofluorescencia y observación directa por microscopio invertido, pudimos observar una disminución de las prolongaciones nerviosas y una pérdida de la conexión entre éstas debida a la retracción de los procesos neuríticos en los cultivos infectados (**figura 15**). El daño axonal y la pérdida de sinapsis son claros signos de neurodegeneración y esta desarticulación de las redes neuronales es parte del proceso que conlleva a la pérdida de funciones cerebrales.

Los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto neuronal, participan activamente en procesos de transporte de moléculas, comunicación intercelular, transmisión de señales, etc. Dicho transporte está mediado principalmente por dos familias de motores proteicos que se desplazan sobre los microtúbulos en forma dependiente de ATP, las kinesinas, que median el transporte anterógrado -y las dineínas- las cuales participan en el transporte retrógrado, desde el extremo positivo hacia el extremo negativo, cercano al núcleo.

Los microtúbulos presentes en las neuritas sufren constantemente de modificaciones post-traduccionales. Estudios recientes han demostrado que dichas modificaciones actúan como importantes marcadores de diferentes poblaciones de microtúbulos, y que además participan en el control del tráfico intracelular mediado por los motores proteicos anteriormente mencionados. Reed *et al.* (2006), demostraron que neuritas ricas en microtúbulos acetilados, promueven selectivamente el transporte de la proteína JIP-1, mediado por kinesina-1. Por el contrario, al disminuir mediante manipulación genética dicha modificación de la tubulina, la unión y motilidad de kinesina-1 a través de los MTs se vio afectada.

No obstante estudios han demostrado que el elevado nivel de tubulina destirosinada no es responsable directo del incremento de la estabilización de los MTs, esta modificación de la tubulina se encuentra en poblaciones estables de MTs y por lo tanto puede servir como marcador de estabilidad. Los elevados niveles de tubulina destirosinada y tubulina acetilada, observados en MTs estables, se han visto pronunciados mayormente en células sufriendo eventos tales como la formación de microtubos (Gundersen *et al.*, 1989) o el crecimiento de las neuritas (Baas and Black, 1990), lo cual sugiere que las modificaciones post-traduccionales relacionadas con la estabilización de los MTs podrían ser elementos importantes en los procesos morfogénicos en general.

El aumento de la dinámica microtubular en el soma, manifestado por la disminución de la tubulina acetilada (**figura 18**) y redistribución de la tubulina tirosinada hacia esta zona (**figura 20**), en las primeras 8 horas de infección, podría tener relación con una reorganización de los MTs inducida por la infección del virus, similar a lo ocurrido en el modelo epitelial. Sin embargo -en etapas más avanzadas de la infección- la dinámica de los MTs comienza a disminuir y la estabilidad, denotada por el aumento de la tubulina acetilada y disminución de la tubulina tirosinada, comienza desde las 16 horas de infección (**figuras 18 y 19**).

Entre las 8 y 18 horas post infección, la tasa de replicación del DNA viral se encuentra significativamente aumentada, por lo cual es predecible que el ensamblaje y egreso del virus esté en un nivel elevado. La población de MTs estables, observada en algunas prolongaciones y mayormente en el soma de las neuronas que aún sobreviven en el cultivo desde las 16 hrs. post infección (**figura 21**), probablemente tenga relación con el transporte del gran número de partículas virales que conforman la nueva progenie viral que debe ser liberada, la cual requeriría de MTs más estables para un transporte óptimo.

La utilización de la maquinaria del citoesqueleto por parte del virus y sobre todo la inducción de las modificaciones de tubulina mencionadas, sugieren un daño en la función neuronal relativo a la disminución o pérdida del transporte intraneuronal de sustancias a través de los MTs, lo cual -se ha demostrado- tiene un importante rol en el desarrollo de enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer (Stokin *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

Por otra parte, recientes estudios indican que, además del tráfico vesicular, los MTs participan en importantes funciones neuronales relacionadas con procesos cognitivos tales como la memoria; Priel *et al.* (2006) demostraron que los MTs son capaces de procesar información eléctrica, actuando como transistores biomoleculares capaces de amplificar tales señales, por lo

cual es válido sugerir que modificaciones de la dinámica microtubular podrían alterar el procesamiento de información eléctrica durante la conductividad sináptica.

Similar a lo ocurrido sobre el citoesqueleto microtubular, la infección del virus induce claras alteraciones sobre el citoesqueleto neuronal de actina (**figura 22**), el cual constituye un importante componente estructural de las sinapsis. F-actina se encuentra altamente concentrada en las terminales presinápticas así como en estructuras postsinápticas, tales como las espinas dendríticas. Estudios realizados en cultivos neuronales hipocampales demostraron la dependencia de la dinámica del citoesqueleto de actina durante la formación de sinapsis en cultivos jóvenes, el cual tiene además un importante rol fisiológico en la transmisión y plasticidad sináptica (Zhang *et al.*, 2001; Dillon *et al.*, 2005). El daño observado sobre estas estructuras constituye parte de la evidencia que demuestra que la utilización del citoesqueleto neuronal, durante el ciclo reproductivo de HSV-1, conlleva a la pérdida de la integridad de sus componentes, lo cual podría contribuir al inicio de procesos neurodegenerativos.

La información presentada anteriormente sugiere fuertemente que la infección del virus Herpes Simple Tipo 1 en el SNC, podría alterar ciertos procesos neuronales e inducir una progresiva pérdida de la integridad de funciones cognitivas, lo cual se manifestaría a largo plazo, y afectaría a individuos predispuestos genéticamente a la reactivación recurrente del virus.

Dada la elevada seroprevalencia para HSV-1 en la población general y considerando el cambio demográfico que está ocurriendo, que conlleva -año a año- al envejecimiento de la población y por lo tanto al aumento de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas las asociadas con infecciones virales, los hallazgos presentados en este trabajo, que aportan evidencia respecto de la conexión entre HSV-1 y la inducción de eventos neurodegenerativos del citoesqueleto, permiten tener mayor claridad sobre la posibilidad de que este virus constituya un

factor de riesgo para este tipo de patologías, además de permitir el establecimiento de nuevos planteamientos de diagnóstico y estrategias terapéuticas, considerando que HSV-1 es un patógeno que en la actualidad tiene prevención.

6. CONCLUSIONES.

El Virus Herpes Simple Tipo 1 es capaz de llevar a cabo la infección productiva de cultivos primarios neuronales, al igual que en el modelo epitelial VERO, disminuyendo la viabilidad celular en ambos modelos.

La infección de HSV-1 induce claras alteraciones morfológicas en los dos modelos estudiados, observándose una disminución y retracción progresiva de los procesos neuronales a medida en que la infección avanza.

El citoesqueleto neuronal sufre modificaciones en la dinámica de sus componentes (microtúbulos y filamentos de actina), inducidas por la infección de HSV-1, similar a lo ocurrido en el modelo epitelial.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Alvarez, A., Toro, R., Cáceres, A. & Maccioni, R. B. (1999). Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**:421-426.

Arthur, J., Scarpini, C., Connor, V., Lachmann, R., Tolkovsky, A. and Efstathiou, S. (2001). Herpes Simplex Virus Type 1 Promoter Activity during Latency Establishment, Maintenance, and Reactivation in Primary Dorsal Root Neurons. *In Vitro J Virol* **75**:3885-3895.

Athmanathan, S. and Vydehi, B.V. (2001). Neuronal apoptosis in herpes simplex virus-1 encephalitis (HSE). *Medical Microbiology* **19**:127-131.

Aubert, M. and Blaho, J. (2001). Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. *Microb Infect* **3**:859-866.

Avitabile, E., Di Gaeta, S., Torrisi, M., Ward, P., Roizman, B. and Campadelli-Fiume, G. (1995). Redistribution of Microtubules and Golgi Apparatus in Herpes Simplex Virus-Infected Cells and Their Role in Viral Exocytosis. *J Virol* **69**:7472-7482.

Azmitia, E. C. (2002). Cajal's hypotheses on neurobiones and neurotropic factor match properties of microtubules and S-100 beta. *Prog Brain Res* **136**: 87-100.

Baas, P. and Black, M. (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J Cell Biol* **111**:495-509.

Bonfoco, E., Ceccatelli, S., Manzo, L. and Nicotera, P. (1995). Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* **218**:189-200.

Bosem, M., Harris, R., Atherton, S. (1990). Optic nerve involvement in viral spread in herpes simplex virus type 1 retinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**:1683-1689.

Bullido, M., Martínez-García, A., Artiga, M., Aldudo, J., Sastre, I., Gil, P., Coria, F., Muñoz, D., Hachinski, V., Frank, A., Valdivieso, F. (2007). A *TAP2* genotype associated with Alzheimer's disease in *APOE4* carriers. *Neurobiol Aging* **28**:519-523.

Cambray-Deakin, M. and Burgoyne, R. (1987). Posttranslational Modifications of α -Tubulin: Acetylated and Detyrosinated Forms in Axons of Rat Cerebellum. *J Cell Biol* **104**:1569-1574.

Chang, W., Webster, D., Salam, A., Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J. and Bulinski, J. (2002). Alteration of the C-terminal Amino Acid of Tubulin Specifically Inhibits Myogenic Differentiation. *J Biol Chem* **277**:30690-30698.

Dillon, C. and Goda, Y. (2005). THE ACTIN CYTOSKELETON: Integrating Form and Function at the Synapse. *Annu Rev Neurosci* **28**:25-55.

Dobson, C. and Itzhaki, R. (1999). Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **20**:457-465.

Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. and Sodeik, B. (2002). Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *Mol Biol Cell* **13**:2795-2809.

Donoso, A. (2003). La enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* **41**(2):13-22.

Efstathiou, S., Preston, C.M. (2005). Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res* **111**:108-119.

Elliott, G. and O'hare, P. (1998). Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein VP22 Induces the Stabilization and Hyperacetylation of Microtubules. *J Virol* **72**:6448-6455.

Favoreel, H., Enquist, L. and Feierbach, B. (2007). Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* **15**(9):426-433.

Fitzpatrick, M., Dewar, D., Teasdale, G. and Graham, D. (1998). The neuronal cytoskeleton in acute brain injury. *Br J Neurosurg* **12**(4):313-317.

Gautier, I., Coppey, J. and Durieux, C. (2003). Early apoptosis-related changes triggered by HSV-1 in individual neuronlike cells. *Exp Cell Res* **289**:174-183.

Georgiev, D., Papaioanou, S. and Glazebrook, J. (2004). Neuronic system inside neurons: molecular biology and biophysics of neuronal microtubules. *Biomed Rev* **15**:67-75.

Goodkin, M., Morton, E. and Váhalo, J. (2004). HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION AND APOPTOSIS. *Inter Rev Immunol* **23**:141-172.

Gorman, A. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. and Ceccatelli, S. (1999). Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* **11**:1067-1072.

Gundersen, G., Khawaja, S. and Bulinski, J. (1989). Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol* **109**:2275-2288.

Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**:74-81.

Joshi, H. (1994). Microtubule organizing centers and γ -tubulin. *Curr Opin Cell Biol* **6**:55-62.

Itzhaki, R. and Wozniak, M. (2006). Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog Lipid Res* **45**(1):73-90.

Itzhaki, R., Lin W-R, Shang, D., Wilcock, G., Faragher, B., Jamieson, G. (1997). Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**:241-244.

Itzhaki, R., Wozniak, M., Appelt, D., Balin, B. (2004). Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**(5):619-627.

Kammerman, EM., Neumann, DM., Ball, MJ., Lukiw, W., Hill, JM. (2006). Senile plaques in Alzheimer's diseased brains: Possible association of b-amyloid with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) L-particles. *Med Hypotheses* **66**:294-299.

Khanna, K., Lepisto, A., Decman, V., Hendricks, R. (2004). Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* **16**:463-469.

Kasas, S., Wang, X., Hirling, H., Marsault, R., Huni, B., Yersin, A., Regazzi, R., Grenningloh, G., Riederer, B., Forrò, L., Dietler, G. and Catsicas, S. (2005). Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **62**(2):124-132.

Laskowitz, D., Horsburgh, K. and Roses, A. (1998). Apolipoprotein E and the CNS response to Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**:465-471.

Lee, S. L., Girard, S., Macina, D., Busà, M., Zafer, A., Belouchi, A., Gros, P. and Vidal, S. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat Genet* **28**:42-45.

Levitz, R. and Conn, H. (1998). Herpes simplex encephalitis: A review. *Heart and Lung* **27**:209-212.

Li, B., Chohan, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol* **113**:501-511.

Lin, E. and Cantiello, H. F. (1993). A novel method to study the electrodynamic behavior of actin filaments. Evidence for cable-like properties of actin. *Biophys J* **65**:1371-1378.

Liquin, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**:601-635.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). The Dynamics of Actin Assembly. *Molecular Cell Biology (4th Ed.)*.

Luduena, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* **178**:207-275.

Magalhães, F., Costa, I., Faria, L. (2002). Filamentos de Actina, Miosina e filamentos intermediários. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. **2**(2).

Marozin, S., Prank, U. and Sodeik, B. (2004). Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell–cell contact sites. *J Gen Virol* **85**:775-786.

Mattson, M. P. (2004). Infectious agents and age-related neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* **3**:105-120.

Mendoza, L., Vieira de Moraes, R., Massaiti, O., Aquino, B., Moraes, L. (2006). Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect* **54**(6):589-596.

Mettenleiter, T. (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* **92**:197-206.

Morrison, L. (2004). The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol* **12**(8):353-356.

Norgren, R. and Lehman, M. (1998). Herpes Simplex Virus as a Transneuronal Tracer. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **22**:695-708.

Openshaw, H., Stampalia, L., Asher, L. (1978). Retrograde axoplasmic transport of herpes simplex virus. *Trans Am Neurol Assoc* **103**:238-239.

Peinado, M., del Moral, M., Esteban, F., Martínez-Lara, E., Siles, E., Jiménez, A., Hernández-Cobo, R., Blanco, S., Rodrigo, J., Pedrosa, J. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* **31**(11):1054-1065.

Perkins, D. (2002). Targeting apoptosis in neurological disease using the herpes simplex virus. *J. Cell Mol Med* **6**(3):341-356.

Priel, A., Ramos, A., Tuszynski, J. and Cantiello, H. (2006). A Bio-Polymer Transistor: Electrical Amplification by Microtubules. *Biophys J* **90**:4639-4643.

Reed, N., Cai, D., Blasius, L., Jih, G., Meyhofer, E., Gaertig, J. and Verhey, K. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Curr Biol* **16**:2166-2172.

Smith, K., Brown, D., Zheng, V., Pautler, H., Robia, G. (2007). In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroImage* **35**:1401-1408.

Steward, O., Goldschmidt, R.B. and Sutula, T. (1984). Neurotoxicity of colchicine and other tubulin-binding agents: a selective vulnerability of certain neurons to the disruption of microtubules. *Life Sci* **35**:43-51.

Stokin, G. and Goldstein, L. (2006). Axonal Transport and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Biochemistry* **75**:607-627.

Thach, D., Kimura, T. and Griffin, D. (2000). Differences between C57BL/6 and BALB/cBy Mice in Mortality and Virus Replication after Intranasal Infection with Neuroadapted Sindbis Virus. *J Virol* **74**:6156-6161.

Tyler KL. (2004). Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* **11**(2):57-64.

Topp, K., Meade, L. and LaVail, J. (1994). Microtubule Polarity in the Peripheral Processes of Trigeminal Ganglion Cells: Relevance for the Retrograde Transport of Herpes Simplex Virus. *J Neurosci* **14**(1):318-325.

van den Pol. (2006). Viral infections in the developing and mature brain. *Trends neurosci* **29**:398-406.

Wagner, E. K. and Bloom, D.C. (1997). Experimental investigation of herpes simplex latency. *Clin Microbiol Rev* **10**:419-443.

Whitley, R. (2006). Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. *Antivir Res* **71**:141-148.

Whitley, R. and Gnann, J. (2002). Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens.

Lancet **359**:507-514.

Yedowitz, J., Kotsakis, A., Schlegel, E. and Váhalo, J. (2005). Nuclear Localizations of the Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Proteins VP13/14, vhs, and VP16 Precede VP22-

Dependent Microtubule Reorganization and VP22 Nuclear Import. *J Virol* **79**(8):4730-4743.

Zhang, W., Benson, DL. (2001). Stages of synapse development defined by dependence on F-

actin. *J Neurosci* **15**:5169-5181.