

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la macropinocitosis
como mecanismo endocítico de
entrada del Virus de la Peste
Porcina Africana**

**Elena García Sánchez
Madrid, 2013**



Memoria de Investigación presentada por

Elena García Sánchez

Para optar al grado de

Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por la

Dra. Yolanda Revilla Novella

Investigador Científico Titular del

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

La presente tesis ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (UAM-CSIC).



Elena García Sánchez ha recibido financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del Programa de Formación en Investigación para Titulados Universitarios Superiores (PFIS F107/00180). El trabajo del laboratorio ha sido financiado en parte a través de proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2007-63110/BFU2010-17794), el Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7/2007-2013) y la Fundación Ramón Areces.

A mis padres

Índice

Abreviaturas	15
Resumen	21
Summary	25
Introducción	29
1.1. Interacción virus-célula: la entrada viral	31
1.2. Endocitosis	34
1.2.1. Endocitosis mediada por clatrina	34
1.2.2. Macropinocitosis	37
1.2.3. Fagocitosis	42
1.2.4. Endocitosis mediada por caveolas	43
1.2.5. Otros tipos de endocitosis	43
1.3. El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA)	44
1.3.1. Aspectos generales de la infección con el VPPA	44
1.3.2. El virión: estructura, replicación y transcripción génica	46
1.3.3. Mecanismos relevantes de interacción con la célula huésped	47
1.3.4. Mecanismos de entrada del VPPA	48
Objetivos	53
Materiales y Métodos	57
3.1. Líneas celulares	59
3.2. Virus	59
3.3. Inhibidores farmacológicos y reactivos	59
3.4. Sueros, anticuerpos y sondas	60
3.5. Plásmidos de expresión	62
3.6. Tipos de infección viral	62
3.7. Tratamiento con inhibidores farmacológicos	63
3.8. Análisis de la internalización viral	64
3.8.1. Análisis mediante citometría de flujo	64
3.8.2. Análisis mediante microscopía óptica confocal	64
3.9. Análisis de la expresión de proteínas virales	66

3.10. Análisis de la formación de factorías virales	66
3.11. Análisis de la producción viral	68
3.12. Análisis de la fosforilación de Akt y Pak1	68
3.13. Análisis de la distribución de actina, Rac1 y Rock1	69
3.14. Análisis de protrusiones de membrana	69
3.15. Análisis de marcadores de endocitosis	70
3.16. Ensayo de activación de la PI3K	71
3.17. Ensayo de activación de Rac1	71
3.18. Ensayo de <i>by-pass</i> a pH ácido	72
3.19. Citometría de flujo (FACS)	72
3.20. Inmunofluorescencia	72
3.21. Microscopía óptica confocal (CLSM)	73
3.22. Extracción de proteínas totales	73
3.23. Electroforesis y <i>Western blot</i>	73
3.24. Transfección transitoria	74
3.25. Análisis de viabilidad celular	74
3.26. Análisis densitométricos	74
Resultados	75
4.1. El VPPA induce alteraciones de la membrana plasmática durante su entrada en la célula	77
4.1.1. Formación de <i>ruffles</i> en células Vero durante la entrada del VPPA	77
4.1.2. Formación de <i>blebs</i> en células IPAM durante la entrada del VPPA	78
4.2. La entrada del VPPA requiere de los canales Na ⁺ /H ⁺	83
4.2.1. Efecto de la inhibición de los canales Na ⁺ /H ⁺ sobre la entrada del VPPA	83
4.2.2. Efecto del EIPA sobre etapas posteriores a la internalización viral	84
4.2.3. Internalización del dextrano durante la entrada del VPPA	88
4.3. El VPPA induce la reorganización del citoesqueleto de actina durante la entrada viral	89
4.3.1. Efecto de la inhibición de la dinámica del citoesqueleto de actina en la entrada del VPPA	89
4.3.2. Efecto de la inhibición de la dinámica del citoesqueleto de actina en la infección del VPPA	90
4.3.3. Reestructuración del citoesqueleto de actina durante la entrada del VPPA	92
4.3.4. Papel del sistema de microtúbulos durante la infección con el VPPA	93

4.4.	La infección del VPPA activa las rutas de señalización celular del EGFR y de la PI3K	95
4.4.1.	Papel del EGFR en la entrada del VPPA.	95
4.4.2.	Activación de la ruta de señalización de la PI3K durante la entrada e infección del VPPA	97
4.4.3.	Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la entrada e infección del VPPA	100
4.5.	El VPPA regula la GTPasa Rac1 durante su entrada en la célula	103
4.5.1.	Activación de Rac1 durante la internalización del VPPA	103
4.5.2.	Distribución de Rac1 durante la infección de VPPA	104
4.5.3.	Efecto de la inhibición de Rac1 sobre la internalización del VPPA	106
4.5.4.	Efecto de la inhibición de la actividad de Rac1 sobre la infección del VPPA	108
4.6.	La quinasa Pak1 es esencial para la entrada del VPPA	111
4.6.1.	Activación de Pak1 durante la internalización del VPPA	111
4.6.2.	Efecto de la inhibición de Pak1 sobre la internalización del VPPA	112
4.6.3.	Efecto de la inhibición de Pak1 sobre la infección del VPPA	113
Discusión		117
<hr/>		
5.1.	Macropinocitosis: mecanismo de internalización del VPPA en la célula huésped.	119
5.2.	Mecanismos alternativos de endocitosis para la entrada del VPPA	128
5.3.	Perspectivas futuras	133
Conclusiones		135
<hr/>		
Bibliografía		139
<hr/>		
Anexo 1		163
<hr/>		
Anexo 2		167
<hr/>		

Abreviaturas

Ab: *Antibody* / Anticuerpo

Ad 2: *Adenovirus type 2* / Adenovirus tipo 2

Ad 3: *Adenovirus type 3* / Adenovirus tipo 3

Ad 5: *Adenovirus type 5* / Adenovirus tipo 5

AID: *Autoinhibitory Domain* / Dominio de autoinhibición

AN: Apertura Numérica

Ba71V: Badajóz- 71 adaptado a Vero

BCA: *Bicinchoninic Acid* / *Ácido bicinconínico*

BSA: *Bovine Serum Albumin* / Albúmina de Suero Bovino

Cito D: *Cytochalasin D* / Citocalasina D

CME: *Clathrin Mediated Endocytosis* / Endocitosis mediada por clatrina

CLSM: *Confocal Laser Scanning Microscopy* / Microscopía óptica confocal

CV: *Coxsackie Virus* / Virus Coxsackie

CtBP/BARS: proteína-1 de unión C-terminal/brefeldina A-ADP sustrato ribosilado

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* / Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: *Ácido etilendiaminotetraacético*

EE: *Early Endosomes* / Endosomas tempranos

EEA-1: *Early Endosomes Autoantigen-1* / Autoantígeno-1 de endosomas tempranos (EEA1)

EGF: *Epidermal Growth Factor* / Factor de crecimiento epitelial

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor* / Receptor del factor de crecimiento epitelial

EIPA: 5-etil-isopropil-amiloride

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* / Ensayo enzimático de inmunoadsorción

E70: España 70

EV1: *Ecovirus type 1* / Ecovirus tipo 1

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting* / Citometría de Flujo

FBS: *Fetal Bovine Serum* / Suero fetal bobino

FESEM: *Field Emission Scanning Electron Microscopy* / Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo

FLUAV: *Influenza A Virus* / Virus de la gripe A

GFP: *Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente

h: hora

HCMV: *Human Cytomegalovirus* / Citomegalovirus humano

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* / Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida Humana

hpi: horas post-infección

HPV: *Human Papiloma Virus* / Virus del papiloma humano

HSV: *Herpes Simplex Virus* / Virus Herpes Simplex

IgG: *Immunoglobulin G* / Inmunoglobulina tipo G

IPAM: *Immortalized Porcine Alveolar Macrophages* / Macrófagos alveolares porcinos inmortalizados

KHSV: *Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus* / Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi

LY: LY294002

M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor* / Factor estimulador de colonias de macrófagos

MDI: Multiplicidad de Infección

min: minutos

PA: Pellet de Alta

PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* / Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBD: *Protein Binding domain* / Dominio de unión a proteínas

PBS: *Phosphate-buffered saline* / Solución salina tamponada con fosfato

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* / Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: Paraformaldehido

PIK5: *Phosphatidylinositol kinase 5* / Fosfatidilinositol quinasa 5

PI3K: *Phosphatidylinositide 3-kinase* / Fosfatidilinositol 3-quinasa

PI(4,5)P2: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* / Fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato

PI(3,4,5)P3: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* / Fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate* / 12 forbol-13 meristeato-acetato

PPA: Peste Porcina Africana

RIPA: *Radio Immunoprecipitation Assay*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

rpm: revoluciones por minuto

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* / Dodecil sulfato sódico

SeV: *Sendai Viru* / Virus Sendai

SFV: *Semliki Forest Virus* / Virus del Bosque Semliki

SV40: *Simian Virus 40* / Virus Vacuolizante de Simios

TBS: *Tris-Buffered Saline* / Solución salina tamponada con trizma base

TEM: *Transmission Electron Microscopy* / Microscopía electrónica de transmisión

ufp: unidades formadoras de placa

VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana

VSV: *Vesicular Stomatitis Virus* / Virus de la Estomatitis Vesicular

VV: *Vaccinia Virus* / Virus de la Vacuna

Resumen

La Peste Porcina Africana (PPA) es actualmente endémica en África y Cerdeña y desde el año 2007 un nuevo brote en Georgia se ha extendido por toda Rusia pudiendo tener consecuencias catastróficas para la cabaña porcina en todo el mundo, ya que no existe vacuna frente a la enfermedad. El agente causante de la PPA, el Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA), único miembro de la familia *Asfarviridae*, es uno de los virus más complejos que existen. Infecta a cerdos domésticos y otros miembros de la familia de los suidos, causando fuertes hemorragias generalizadas en el animal infectado.

El VPPA es un virus con envuelta, morfología icosaédrica y un diámetro medio de 200 nm. La partícula viral está formada por varias capas concéntricas en cuyo interior se encuentra el genoma viral constituido por una molécula de ADN de doble banda lineal que codifica para más de 150 proteínas con funciones muy heterogéneas. En el animal infectado, el virus replica principalmente en macrófagos alveolares porcinos, lo que es de gran importancia en la patogenia de la enfermedad y en el establecimiento de la respuesta inmune.

La entrada del VPPA en la célula huésped tiene lugar mediante endocitosis, siendo un proceso dependiente de energía, temperatura, pH vacuolar y colesterol. Aunque la internalización viral depende de sitios de unión saturable en la célula huésped, los receptores y factores de unión implicados todavía no se conocen. En el presente trabajo describimos que uno de los principales mecanismos endocíticos utilizados por la cepa viral Ba71V del VPPA para entrar en célula es la macropinocitosis. Mediante el análisis por microscopía electrónica de barrido (FESEM) demostramos que durante la internalización, el virus induce la formación de protrusiones de membrana compatibles con *ruffles* en células Vero o *blebs* en células IPAM. Asimismo, mostramos que durante la entrada viral existe una importante restructuración del citoesqueleto de actina, fundamental para la eficiente internalización e infección. Además, la internalización del virus induce la activación de factores celulares importantes para la macropinocitosis, como son el receptor de crecimiento epitelial (EGFR), la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la GTPasa Rac1 y la quinasa Pak1, y es dependiente de la función de los canales Na^+/H^+ , un hecho que se considera clave en este tipo de endocitosis.

En conclusión, nuestro estudio identifica a la macropinocitosis como un mecanismo endocítico prioritario explotado por el VPPA para entrar en la célula huésped caracterizando los factores celulares necesarios para orquestar la señalización celular que dirige la internalización viral.

Summary

African Swine Fever (ASF) is presently endemic in Africa and Sardinia and a new outbreak in Georgia from 2007 is wide spreading around Russia and neighbouring countries. This uncontrolled dissemination represents expansion threats worldwide, because no specific protection or vaccine against ASF is available.

ASF is caused by African Swine Fever Virus (ASFV), the sole member of *Asfarviridae* family. ASFV is a very complex, enveloped virus, with an icosahedral morphology of about 200 nm in diameter that infects several members of suids, causing sub acute and acute hemorrhagic disease. The viral particle is composed by several concentric domains and the viral genome is a lineal double DNA molecule which encodes more than 150 different proteins with heterogenic functions. ASFV replicates mainly in pig alveolar macrophages, which is an event very important in the pathogenesis and for the establishment of the immune response.

The ASFV enters host cells by an endocytic mechanism depending on energy, vacuolar pH, temperature and cholesterol. Although saturable binding sites mediate ASFV internalization, the specific receptor(s) and attachment factor(s) involved in viral entry are still unknown. In the present study we describe that one of the main endocytic mechanisms used by the isolate ASFV-Ba71V to enter cells is macropinocytosis. By field emission electron scanning microscopy (FESEM), we demonstrate that ASFV triggers cytoplasm membrane perturbation in form of ruffles in Vero cells or blebs in IPAM cells in the course of internalization. We also show that during viral entry exists an actin cytoskeleton restructuration which is important to efficient viral internalization. Moreover, ASFV activates the macropinocytosis by activation of cellular factors, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), fosfoinositide -3 kinase (PI3K), Rac1 GTPase and Pak1 kinase whose functions are closely linked to macropinocytosis an are essential for ASFV entry. Also, we describe that the viral entry depends on Na^+/H^+ channels, a specific macropinocytosis factor not involved in other endocytic routes.

In conclusion, this study identifies the macropinocytosis as a principal endocytic mechanism used by ASFV to enter cells and describes the key cellular factors required for the viral uptake and the cell signalling involved in this process.

Introducción

1.1. INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA: LA ENTRADA VIRAL

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren los sistemas biológicos de la célula para su replicación y producción de la progenie viral, que se transmite de una célula a otra en el organismo huésped. El pequeño tamaño, la simplicidad estructural y la falta de actividades metabólicas, limitan los procesos que las partículas virales pueden llevar a cabo por ellas mismas. Para contrarrestar estas deficiencias, han evolucionado explotando el comportamiento y la fisiología de sus huéspedes, lo que a nivel celular se manifiesta en la regulación de la expresión de determinados grupos de genes y de rutas de señalización celular.

El ciclo infectivo de un virus consta de varias etapas: entrada en la célula, desencapsidación viral, replicación del material genético, síntesis de proteínas, ensamblaje de nuevas partículas virales, liberación de los virus al espacio extracelular y entrada de la progenie viral en una nueva célula huésped. Obviamente, la entrada viral y el conocimiento de los diferentes métodos virales para llevarla a cabo son esenciales en el campo de la medicina y veterinaria, así como en el desarrollo de nuevas vacunas y fármacos antivirales. En cada caso, el mecanismo utilizado dependerá de las características estructurales y bioquímicas de la partícula viral, al igual que de su tamaño y complejidad, y aunque es un proceso rápido que transcurre en pocos minutos, se pueden describir diferentes fases que acontecen de forma sucesiva y perfectamente coordinada (**Figura 1**).

En primer lugar, el virión debe de reconocer y fijarse a la superficie celular, en lo cual participan tanto componentes de la partícula viral como componentes presentes en la membrana plasmática de la célula. El reconocimiento específico entre los elementos celulares y virales define el tropismo, es decir, la capacidad de un virus de infectar sólo a un tipo o a unos pocos tipos de células de un órgano o tejido de una especie concreta. Las glicoproteínas localizadas en la membrana externa de los virus con envuelta juegan un papel fundamental, como es el caso de la glicoproteína gp120 del Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida Humana (HIV) (Wilén y col., 2012) o la hemaglutinina del Virus de la gripe A (FLUAV) (Luo, 2012).

En el caso de los factores celulares implicados, se diferencian factores de unión y receptores virales. Los factores de unión se encargan de concentrar y unir las partículas virales en la superficie celular favoreciendo la infección. Normalmente, en estas interacciones intervienen moléculas de glicosaminoglicanos como el heparan sulfato en la infección del HIV-1 (Patel y col., 1993; Ugolini y col., 1999), de Rinovirus (Vlasak y col., 2005) o del Virus Herpes Simplex (HSV) (WuDunn y Spear, 1989), aunque también participan carbohidratos como el ácido siálico en el caso del FLUAV (Skehel y Wiley, 2000). Al mismo tiempo que ocurren estas interacciones, los receptores virales se encargan de promover activamente la entrada del virus mediante cambios conformacionales en la partícula viral y la activación de

rutas de señalización celular que dirigen la internalización. Cualquier molécula presente en la superficie de la célula puede actuar como receptor, aunque para cada virus, dicha molécula es una determinada. En general, los receptores suelen ser proteínas y entre ellos se encuentra la molécula de adhesión celular denominada CAR para el Virus Coxsackie (CV) y el Adenovirus 2 y 5 (Ad2 y Ad5) (Bergelson y col., 1997), así como el cofactor de membrana para la acción del complemento (CD46) en la infección por Adenovirus B (Marttila y col., 2005). La unión de la partícula viral a la membrana plasmática viene seguida de una serie de movimientos laterales en la superficie celular que facilitan la interacción del virus con otros receptores adicionales, o correceptores, ayudando a que la entrada viral sea más eficiente (Burckhardt y Greber, 2009). En los últimos años, cientos de receptores y factores de unión han sido caracterizados en los distintos sistemas virales, tales como transportadores de iones, factores de adhesión, proteínas de señalización, fosfolípidos, carbohidratos o glicolípidos (Schneider-Schaulies, 2000).

La señalización celular responsable de la internalización viral, además de producirse a través de la unión directa del virus con su receptor, se genera mediante el reclutamiento de proteínas y/o lípidos a la superficie celular. Entre las proteínas involucradas se han descrito serinas/treoninas quinasas, tirosinas quinasas, fosfatidilinositol quinasas, fosfatasa y una gran variedad de pequeñas GTPasas que incluyen la familia de proteínas Arf, Rab y Rho GTPasas (Greber, 2002; Liberali y col., 2008b). Por ejemplo, en el caso del Ad2, la interacción de las proteínas de la cápsida viral con integrinas de la membrana plasmática activa a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que a su vez, activa a las GTPasas Rac1 y Cdc42 promoviendo la polimerización de actina y la internalización viral (Li y col., 1998; Nemerow y Stewart, 1999). Otros ejemplos los encontramos en el Virus Vacuolizante de Simios (SV40), cuya infección se ve dramáticamente disminuida en presencia de inhibidores de tirosinas quinasas (Chen y Norkin, 1999; Pelkmans y col., 2002), o en la infección del Virus Ébola cuya entrada depende estrictamente de la señalización mediada por la PI3K y Rac1 (Saeed y col., 2008). Esta señalización también juega un papel fundamental en la consecución de eventos tempranos o tardíos en el ciclo replicativo de muchos otros virus (Cooray, 2004).

Una vez activada la célula, la internalización viral puede ser de dos tipos dependiendo de si los virus lo hacen a través de la membrana plasmática o a través de endosomas. La internalización a través de la membrana plasmática, en el caso de que el virus no posea envuelta externa, por lo general, conlleva la formación de poros o la alteración de la propia membrana (Hogle, 2002). Por el contrario, si el virus posee envuelta externa, las membranas viral y celular se fusionarán por la acción de proteínas presentes en la membrana del virus cuya actividad es independiente de pH (Earp y col., 2005; Harrison, 2005). El prototipo de virus que utiliza este tipo de entrada es el Virus Sendai (SeV) (Morgan y Howe, 1968) aunque al menos en algunos tipos celulares, la entrada del HIV ocurre igualmente por fusión directa (Stein y col., 1987).

La internalización a través de endosomas, o endocitosis, es la vía más común utilizada por los virus para entrar en la célula huésped al conferirles numerosas ventajas; debido a la importancia que tiene en la consecución de la infección viral, se explicará detalladamente en el siguiente apartado.

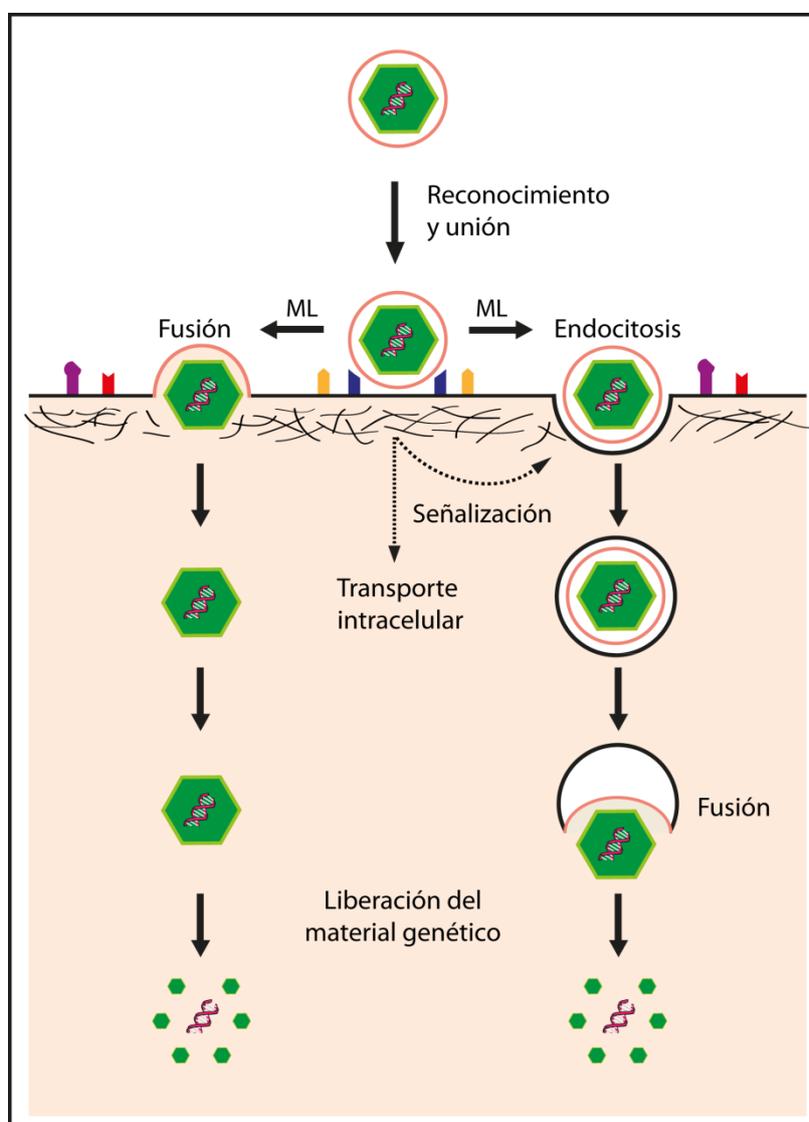


Figura 1. Etapas en el proceso de entrada de virus animales con envuelta. La entrada viral en la célula huésped es un proceso gradual en el que se diferencian las siguientes etapas: 1) reconocimiento y fijación de la partícula viral a factores de unión y receptores de la membrana plasmática celular, 2) movimientos laterales que aumentan la interacción con la superficie celular (ML), 3) activación de rutas de señalización que dirigen la internalización, 4) internalización de la partícula viral por fusión directa con la membrana plasmática o mediante endocitosis a través de endosomas y 5) liberación del material genético y comienzo de la replicación viral en sitios concretos de la célula; en el caso de la endocitosis este proceso está dirigido por la fusión de la membrana viral con la endosomal.

1.2. ENDOCITOSIS

La endocitosis comienza con la formación de una vesícula endocítica, el endosoma, a partir de la invaginación de la membrana plasmática. En la membrana endosomal se localizan varios factores implicados en su funcionalidad, y entre ellos, la enzima protón ATPasa vacuolar se encarga de bombear protones al interior del mismo produciendo una disminución gradual del pH en su interior. Esta acidificación dirige la maduración del endosoma pasando por diferentes estadios, desde endosomas tempranos (EE) con un pH entre 6,5 - 6,0, hasta endosomas tardíos y lisosomas con un pH ente 6,0 - 5,0 y 5,0 - 4,5, respectivamente (Kane, 2006; Lafourcade y col., 2008). Otros componentes que definen la funcionalidad e identidad de los endosomas son las proteínas de la familia Rab GTPasas, el autoantígeno-1 de endosomas tempranos (EEA1), el marcador de endosomas tardíos LAMP-1, los fosfatidilinositoles, así como la actividad de la PI3K (Barr y Lambright, 2010; Huotari y Helenius, 2011). Además, el programa de maduración endosomal se caracteriza por continuos cambios en los factores que conforman el endosoma en cada etapa, consecuencia de los mecanismos de fusión y fisión entre las vesículas formadas a lo largo del proceso endocítico (Huotari y Helenius, 2011).

Durante la entrada en la célula huésped, los viriones viajan internalizados en los endosomas desde donde liberan el material genético al citosol o núcleo celular para comenzar la replicación. Este proceso está dirigido por proteínas localizadas en la envuelta del virus que se activan en un ambiente de pH ácido, provocando la fusión entre la membrana viral y la endosomal. En el caso de los virus desnudos, el material genético se libera bien por lisis del endosoma, o bien por la perturbación de la membrana del mismo, siendo ambos procesos inducidos por proteínas virales (Earp y col., 2005; Kielian y Rey, 2006).

En las células eucariotas existen diferentes tipos de endocitosis dependiendo de la naturaleza del ligando, de los factores celulares implicados, de las señales necesarias para su activación y del destino final del material internalizado (Doherty y McMahon, 2009). A continuación se explican las diferencias entre las rutas endocíticas más comunes explotadas por los virus para internalizar en la célula huésped y concretamente, aquellas más importantes para el desarrollo de esta Tesis Doctoral (**Figura 2**).

1.2.1. Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina (CME) es probablemente el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de partículas de diversa naturaleza en la célula (Mousavi y col., 2004). Es un proceso rápido y eficiente que ocurre constitutivamente en todas las células de mamíferos para internalizar nutrientes, factores de crecimiento, antígenos, patógenos y receptores de la membrana plasmática (Mellman, 1996).

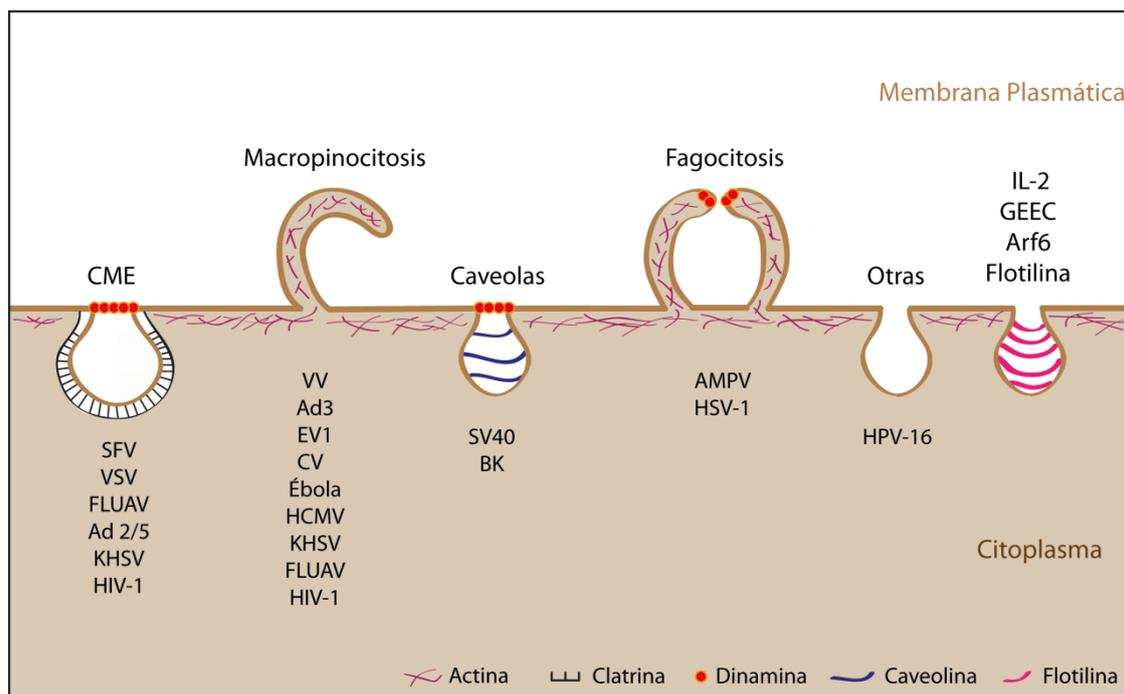


Figura 2. Tipos de endocitosis empleados por virus animales. Los virus pueden internalizar en la célula huésped mediante varios tipos de mecanismos endocíticos. Por lo general, los virus con un tamaño inferior a 150 nm internalizan por endocitosis mediada por clatrina (CME) o por caveolas, y los virus grandes, con un tamaño superior a 150-200 nm, utilizan la macropinocitosis o fagocitosis. La CME y la endocitosis por caveolas se caracterizan por la formación de vesículas endocíticas provistas de cubierta proteica, y la escisión de la vesícula a partir de la membrana plasmática depende de la actividad de la GTPasa dinamina. En el caso de la macropinocitosis y fagocitosis, la entrada viral induce protrusiones en la membrana de la célula y las vesículas por donde internaliza el virus no presentan recubrimiento proteico. Otros mecanismos de endocitosis, como los dependientes de IL-2, flotilina, GEEC o Arf6 no son utilizados comúnmente por virus, aunque nuevos procesos endocíticos están siendo descritos para la entrada de algunos virus. Es importante remarcar que en algunos casos un mismo virus puede entrar en la célula por más de un tipo de endocitosis. SFV, Virus del Bosque Semliki; VSV, Virus de la Estomatitis Vesicular; FLUAV, Virus de la gripe A; Ad2/5, Adenovirus 2 y 5; KHSV, Virus Herpes Simplex asociado al sarcoma de Kaposi; HIV-1, Virus de la Inmunodeficiencia Humana adquirida 1; VV, Virus de la Vacuna; Ad3, Adenovirus 3; EV1, Ecovirus 1; CV, Virus Coxsackie, HCMV, Citomegalovirus humano; SV40, Virus Vacuolizante de Simios; BK, Virus BK; AMPV, Mimivirus; HSV-1, Virus Herpes Simplex; HPV-16, Papilomavirus humano 16. Adaptado de Mercer y col, 2010.

Hasta hace poco tiempo, se consideraba que la CME era la ruta endocítica más común utilizada por los virus para entrar en la célula; sin embargo, cada vez más trabajos describen cómo los virus son capaces de explotar otros mecanismos endocíticos de manera eficiente (Ghigo, 2010; Marsh y Helenius, 2006; Mercer y col., 2010b).

Durante el proceso de la CME las partículas virales internalizan junto con sus receptores a través de regiones específicas de la membrana plasmática, denominadas invaginaciones con recubrimiento proteico o *coated pits*, que forman rápidamente vesículas recubiertas o *coated vesicles* (Brodsky y col., 2001). El componente principal de estas invaginaciones y vesículas es la clatrina, un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que

constituyen una unidad denominada el “trisquelion” cuya función es la de interaccionar con los receptores celulares concentrándolos en los sitios específicos de endocitosis (Pearse, 1976; Smith y Pearse, 1999). A su vez, la clatrina es reclutada a la membrana por el complejo adaptador AP-2 y con la participación de otras moléculas accesorias como AP180, Eps15, amfifisina, endofilina, además de fosfatidilinositoles, la membrana se invagina formando la vesícula endocítica (Takei y Haucke, 2001). Finalmente, esta vesícula se escinde de la membrana plasmática por acción de la GTPasa dinamina, cuya función es imprescindible para este tipo de endocitosis (Hinshaw, 2000; Mettlen y col., 2009; Sever y col., 2000). Una vez en el citoplasma, las vesículas pierden la clatrina y dan lugar a endosomas tempranos que continúan con su proceso de maduración (Marsh y Helenius, 2006). Recientemente, mediante ensayos de ARN de interferencia en células Hela infectadas con el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), se han descrito más de 90 quinasas implicadas en regular la internalización mediada por clatrina, además de algunas etapas tempranas de la infección. Estas quinasas pertenecen a tipos muy diferentes incluyendo reguladores del citoesqueleto, del ciclo celular y del tráfico de membranas (Pelkmans y col., 2005).

El tamaño de las vesículas recubiertas de clatrina oscila entre 85 y 120 nm dependiendo del tipo celular, siendo un tipo de endocitosis utilizada, generalmente, por virus de pequeño tamaño como son Ad2/5 (Meier y col., 2002; Meier y Greber, 2004), FLUAV (Chen y Zhuang, 2008) o el Virus del Bosque Semliki (SFV), como se muestra en la **Figura 3** (Helenius y col., 1980). Sin embargo, en los últimos años, algunos trabajos han descrito la participación activa del citoesqueleto de actina en la dinámica de la membrana plasmática durante la CME promoviendo la eficiente internalización de virus de mayor tamaño como es el VSV (Cureton y col., 2009; Cureton y col., 2010) e incluso bacterias (Pizarro-Cerda y col., 2010; Veiga y Cossart, 2005) y hongos (Moreno-Ruiz y col., 2009).

Las aproximaciones experimentales comúnmente utilizadas para definir si un virus utiliza la CME para entrar en la célula se basan en inhibir la ruta endocítica mediante la expresión de construcciones dominante negativas de factores involucrados, como la proteína Eps15 (Benmerah y col., 1999) y la dinamina (Damke y col., 1994), o mediante el tratamiento con inhibidores farmacológicos como la clorpromazina y el dinasore que inhiben el ensamblaje del trisquelión de clatrina y la función de la dinamina, respectivamente (Macia y col., 2006; Wang y col., 1993).

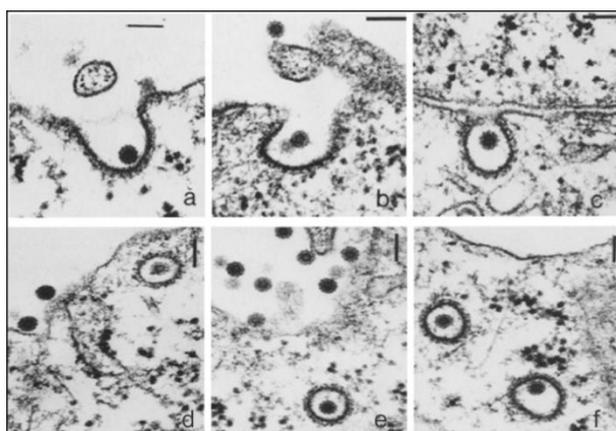


Figura 3. Endocitosis mediada por clatrina de Semliki Forest Virus. Microscopía electrónica de transmisión de la endocitosis mediada por clatrina de SFV en células BHK-21. El virus, de 70 nm de diámetro, internaliza por regiones de la membrana plasmática electrodensas (*coated pits*) (a-b) y la vesícula recubierta de clatrina (*coated vesicle*) se escinde de la membrana plasmática (c) transportando a la partícula viral al interior de la célula (d-f). Barra de escala 0,1 μm x 80.000. Adaptado de Helenius y col., 1980.

1.2.2. Macropinocitosis

La macropinocitosis se caracteriza por ser un proceso de endocitosis inducible y transitorio asociado con la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática (*ruffling*) que conduce a la internalización de fluidos o partículas en vesículas citoplasmáticas denominadas macropinosomas (Swanson y Watts, 1995). Este tipo de endocitosis se observó por primera vez en 1931 en macrófagos (Lewis, 1931), y en los últimos años, numerosos estudios han descrito cómo los virus se valen de esta ruta para entrar en la célula huésped (Mercer y Helenius, 2009; Mercer y col., 2010b).

A diferencia de otros tipos de endocitosis, la macropinocitosis no está necesariamente regulada por la unión selectiva entre ligando-receptor y el reclutamiento de moléculas efectoras a sitios específicos de la membrana plasmática para formar vesículas recubiertas por donde internaliza el ligando (Kerr y Teasdale, 2009; Mercer y Helenius, 2009; Swanson y Watts, 1995). En diversos tipos celulares se activa en respuesta a factores externos, como ésteres de forbol o factores de crecimiento (Brunk y col., 1976; Davies y Ross, 1978), y aunque en macrófagos y células tumorales es un proceso constitutivo, los tratamientos con el factor de crecimiento epitelial (EGF), con el factor estimulador de colonias de macrófagos (rM-CSF) o con el 12 forbol-13 meristeato-acetato (PMA), también la inducen de forma significativa (Bryant y col., 2007; Racoosin y Swanson, 1989; Swanson, 1989; West y col., 1989). Como consecuencia de esta estimulación, se activan receptores celulares del tipo tirosina quinasa cuya cascada de señalización provoca cambios en el citoesqueleto de actina, generando las protrusiones de membrana características. Dependiendo del tipo celular y del estímulo, las extensiones de la membrana plasmática pueden ser de tres tipos distintos: pliegues planos tipo lamelipodio (*ruffles* planos), extensiones en forma de copa circular (*ruffles* circulares) o grandes extrusiones redondeadas (*blebs*) (Mercer y Helenius, 2009). La **Figura 4** muestra la formación

de diferentes protrusiones en la membrana plasmática de la célula en respuesta a estímulos externos e infecciones virales. Una vez formadas estas protrusiones, se retraen hacia la superficie de la célula y la partícula endocitada se internaliza en macropinosomas, que se caracterizan por ser heterogéneos en tamaño y forma oscilando entre 0,5 y 10 μM (Swanson, 1989).

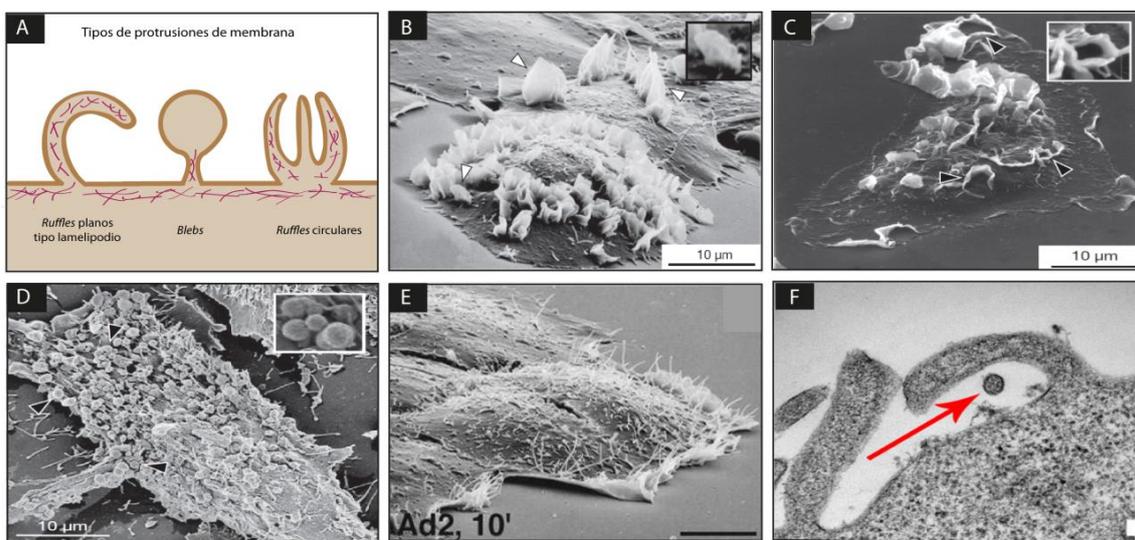


Figura 4. Tipos de protrusiones de membrana generadas durante la macropinocitosis. A) Esquema de los diferentes tipos de protrusiones de membrana que se forman durante la estimulación de la macropinocitosis: *ruffles* planos tipo lamelipodio, *blebs* o extrusiones redondeadas y *ruffles* circulares. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) o barrido (SEM) muestran un ejemplo de estas formaciones en respuesta a diferentes estímulos. B) *Ruffles* tipo lamelipodio en células A431 estimuladas con factor de crecimiento epitelial (EGF). Adaptado de Mercer y Helenius, 2009. C) *Ruffles* circulares formados en macrófagos estimulados con el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). Adaptado de Mercer y Helenius, 2009. D) *Blebs* formados tras la infección de células Hela con el Virus de la Vacuna. Adaptado de Mercer y Helenius, 2009. E) Formación de *Ruffles* planos tras 10 min de internalización de Adenovirus 2 en células A431. Barra de escala 20 μm . Adaptado de Meier y col., 2002. F) Internalización del Virus de la gripe A (flecha) mediante *ruffles* planos en células A549. Barra de escala 100 nm. Adaptado de Rossman y col., 2012.

Entre los factores celulares que controlan la macropinocitosis cabe destacar a las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42. Ambas pertenecen a la superfamilia de las proteínas Ras y son fundamentales en el control de la polimerización de los filamentos de actina en los sitios de *ruffling*, así como en la biogénesis de los macropinosomas (Bar-Sagi y Feramisco, 1986; Bar-Sagi y col., 1987; Ridley, 2006). Estas proteínas se encuentran en la célula en dos estados conformacionales diferentes, uno inactivo unido a GDP y otro activo unido a GTP, cuya interconversión tiene lugar en respuesta a factores extracelulares (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Rac1 está implicada en la macropinocitosis y formación de protrusiones de membrana en respuesta a factores de crecimiento. Esta función se describió por primera vez en fibroblastos

tratados con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), donde la formación de *ruffles* y la reorganización de los filamentos de actina se vieron completamente inhibidos tras la expresión de un mutante no funcional de la proteína (Ridley y col., 1992). En células dendríticas inmaduras, donde la macropinocitosis es constitutiva, Rac1 es fundamental para la formación de los macropinosomas y la internalización de trazadores específicos, pero en este caso, la formación de *ruffles* está controlada por otras GTPasas de la familia Ras que actúan a un nivel superior en la cascada de señalización (West y col., 2000). En contraste con este trabajo, se ha descrito que la inhibición de la expresión de Rac1 en macrófagos murinos derivados de médula ósea, provoca una importante disminución del *ruffling* de la membrana en respuesta a rM-CSF-1 (Wells y col., 2004). Además de inhibidores específicos de la actividad de Rac1 o Cdc42, compuestos como el amiloride o su análogo 5-etil-isopropil-amiloride (EIPA) son utilizados para inhibir de forma específica la macropinocitosis al prevenir la activación de estas Rho-GTPasas (Koivusalo y col., 2010).

Rac1 y Cdc42 dirigen la formación de *ruffles* a través de la participación de otros componentes celulares, y entre ellos, la serina-treonina quinasa activada p21-1 (Pak1) desempeña un papel esencial en este proceso siendo necesaria para todos los estadios de la macropinocitosis (Dharmawardhane y col., 2000; Sells y Chernoff, 1997). En su forma GTP, Rac1 y Cdc42 interactúan con el dominio de unión de Pak1 (PBD) provocando que la quinasa adquiera una conformación pre-activada y sea susceptible de sufrir otras modificaciones necesarias para su funcionalidad. Entre ellas, la auto-fosforilación en el residuo treonina 423 se ha descrito como un evento clave para su completa activación (Chong y col., 2001; Manser y col., 1994; Parrini y col., 2005; Zenke y col., 1999).

El papel de Pak1 durante la macropinocitosis ha sido extensamente demostrado en numerosos estudios. En fibroblastos Swiss 3T3 y en células Hela, se ha descrito que la sobreexpresión de Pak1 causa la formación de *ruffles*, lamelipodios y filopodios en la membrana plasmática, siendo un importante regulador de la reorganización del citoesqueleto de actina (Manser y col., 1997; Sells y col., 1997). Además, el tratamiento con PDGF bajo la señalización mediada por Rac1 promueve la localización de Pak1 en la membrana plasmática a partir de los 10 min post-estimulación, donde colocaliza con los filamentos de actina en *ruffles* y con vesículas pinocíticas, lo cual es inhibido por inhibidores específicos de macropinocitosis (Dharmawardhane y col., 1997). El control que ejerce Pak1 sobre la macropinocitosis depende de su dominio quinasa, pues la internalización de solutos aumenta de forma significativa en presencia de formas activas de Pak1 y por el contrario, disminuye cuando se inhibe el dominio catalítico de la quinasa (Dharmawardhane y col., 2000). Asimismo, Pak1 interviene en el control del cierre del macropinosoma y en la fisión de la membrana plasmática mediante la fosforilación de la proteína-1 de unión C-terminal/brefeldina A-ADP sustrato ribosilado

(CtBP/BARS) (Liberali y col., 2008a). En último lugar, es importante remarcar que, a diferencia de otros factores involucrados en la macropinocitosis, Pak1 se define como un factor específico de este tipo de endocitosis no interviniendo en otros procesos endocíticos como la CME (Dharmawardhane y col., 2000; Karjalainen y col., 2008).

Arf6 es otra GTPasa importante para la formación de las protrusiones de membrana, además de estar involucrada en la dinámica y tráfico endosomal (Donaldson y col., 2009; Radhakrishna y col., 1996; Schafer y col., 2000). Durante la formación del macropinosoma, remodela la membrana plasmática controlando la curvatura de la misma (Lundmark y col., 2008) y en células Hela y fibroblastos mantiene la formación de *ruffles* mediante el reciclamiento de Rac1 desde los compartimentos endosomales hasta la membrana celular, donde ambas proteínas colocalizan (Radhakrishna y col., 1999). Otra de sus funciones es controlar la generación y distribución del fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂ o PIP₂) en la membrana celular (Brown y col., 2001), siendo el metabolismo de los fosfatidilinositoles muy importante al regular la función de proteínas que interaccionan con los filamentos de actina (Araki y col., 2007; Sechi y Wehland, 2000). Asimismo, tanto Rac1 (Carpenter y col., 1997; Hartwig y col., 1995) como el colesterol son factores clave en regular la síntesis de estos fosfatidilinositoles ya que cuando el colesterol se elimina de células A431 estimuladas con PMA, la colocalización de Rac1 y Arf6 se ve drásticamente perturbada, impidiendo la adecuada distribución de los PIP₂ y por tanto, del *ruffling* en la membrana plasmática celular (Grimmer y col., 2002).

Uno de los enzimas principales en la señalización celular que, en muchos casos, media la entrada viral por endocitosis, es la PI3K. Esta quinasa es, además, fundamental en el control de otros procesos celulares como el crecimiento, la proliferación y la síntesis de proteínas desempeñando un papel central en el ciclo celular (Hawkins y col., 2006). Cuando la PI3K se activa, fosforila a su sustrato, el PI(4,5)P₂, produciendo fosfatidil-inositol-3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P₃) en la membrana plasmática de la célula, hecho que posibilita la fosforilación y activación subsecuente de la proteína quinasa B o Akt, siendo esta quinasa el mayor efector de la ruta de señalización (Alessi y col., 1996; Bayascas y Alessi, 2005; Sarbassov y col., 2005).

El papel que desempeña la PI3K en el *ruffling* y macropinocitosis se ha demostrado ampliamente en diversos estudios donde se refleja que dependiendo del sistema celular utilizado, la internalización del *cargo* depende en mayor o menor medida de su actividad quinasa. Por ejemplo, en macrófagos y células A431 estimulados con PMA/M-CSF y EGF, respectivamente, la PI3K está implicada en el cierre del macropinosoma concordando con la localización de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática y con un aumento en los niveles de PI(3,4,5)P₃, consecuencia de su actividad quinasa. En ambos tipos celulares, la formación de los *ruffles* no se ve afectada en presencia de agentes farmacológicos que inhiben específicamente a la PI3K, sin embargo, afectan a la internalización de trazadores específicos de macropinocitosis

(Araki y col., 2007; Araki y col., 1996). Por el contrario, en modelos de macropinocitosis constitutiva, donde fibroblastos de rata presentan permanentemente activada la PI3K, tanto el *ruffling* como la formación de macropinosomas se ven afectados tras la inhibición de la actividad quinasa (Amyere y col., 2000). Estas diferencias demuestran que las particularidades de cada ruta de señalización que, finalmente conducen al *ruffling* y/o a la formación de macropinosomas, pueden diferir dependiendo de los receptores involucrados en la respuesta así como del tipo celular. En el caso de macrófagos, además de ser fundamental para la macropinocitosis, la PI3K también lo es para la fagocitosis, regulando la formación de los fagosomas a partir de las copas fagocíticas (Araki y col., 1996). Por último, se ha descrito que la actividad de Rac1 puede estar controlada por la propia PI3K (Hawkins y col., 1995; Kotani y col., 1995; Wennstrom y col., 1994), siendo éste un ejemplo más del complejo entramado celular que orquesta la formación de *ruffles* y dirige el reclutamiento de unos u otros efectores a los macropinosomas.

La escisión de los macropinosomas desde la membrana plasmática, además de estar controlada por Pak1, Arf6 y PI3K, parece estar dirigida por la actividad contráctil de las miosinas que se localizan en los *ruffles* de tipo circular (Araki y col., 2003; Buss y col., 1998) y una vez liberados al citoplasma, comienzan su maduración siendo un proceso rápido y dependiente de pH. Los macropinosomas comparten muchas características con otras vesículas del sistema endosomal; entre ellos, la GTPasa Rab 5, fundamental para la formación de los EE, se ha descrito también como un factor importante para su biogénesis (Lanzetti y col., 2004). Asimismo, la función de su efector, la Rabanquirina 5, se relaciona con la formación de nuevos macropinosomas y colocaliza con marcadores de EE como es el EEA-1 (Schnatwinkel y col., 2004). En los últimos años, se ha señalado a las nexinas como importantes candidatos reguladores del mecanismo de la maduración de los macropinosomas (Kerr y col., 2006) durante el tráfico endosomal.

Como se ha comentado anteriormente, la macropinocitosis es un proceso constitutivo en macrófagos y células dendríticas, y desde un punto de vista funcional, está involucrada en la internalización y presentación antigénica, contribuyendo a la respuesta inmune y facilitando el mantenimiento de la homeostasis celular de una forma rápida y eficaz (Kerr y Teasdale, 2009). Sin embargo, muchos patógenos explotan este tipo de endocitosis para entrar en la célula huésped, lo que les permite evitar su destrucción por el sistema endosomal o su detección por parte del sistema inmune. Por lo general, los virus que utilizan la macropinocitosis presentan un tamaño mayor de 150 nm y entre ellos, distinguimos los que la utilizan de manera directa para llevar a cabo una infección productiva, o los que la emplean indirectamente para favorecer la internalización de las partículas virales que, sin embargo, entran por otro tipo de mecanismo endocítico. Entre los primeros se encuentra el Virus de la Vacuna (VV) (Mercer y Helenius,

2008; Schmidt y col., 2011), el Adenovirus tipo 3 (Ad3) (Amstutz y col., 2008), el CV-B (Coyne y col., 2007) o el HSV-1 (Valiya Veetil y col., 2010). Ejemplos de virus que utilizan la macropinocitosis para asistir la internalización viral son el Ad2/5 (Meier y col., 2002) y el Virus de la Rubeola (Kee y col., 2004).

Debido a que los factores celulares que regulan la macropinocitosis desempeñan, además, otras funciones en la célula, se requiere la combinación de varias estrategias experimentales para determinar si un virus utiliza esta ruta para entrar en la célula huésped. Por ello, el conjunto de requisitos mínimos que deben de cumplirse para definir que un virus entra por macropinocitosis son los siguientes: 1) la infección debe inducir reordenamientos de membrana en forma de *ruffles* o *blebs*, 2) la entrada viral debe estimular la internalización de fluidos o marcadores específicos como el dextrano, 3) la entrada e infección deben ser sensibles a la inhibición de la actividad de Rac1 o Cdc42, de las quinasas PI3K y Pak1, así como a la inhibición de la polimerización de los filamentos de actina y 4) la endocitosis e infección tienen que ser completamente inhibidas por el amiloride o EIPA. La implicación de otros factores celulares mencionados anteriormente dependerá del tipo de célula y aislado viral empleado en cada estudio. (Mercer y Helenius, 2009).

1.2.3. Fagocitosis

La fagocitosis se define como la ingestión de partículas con un tamaño superior a 0,5 μM realizada por células especializadas como son macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, eliminando la mayor parte de bacterias, hongos y protozoos del organismo (Aderem y Underhill, 1999; Underhill y Ozinsky, 2002). La fagocitosis también requiere de una importante activación de la membrana plasmática formando las copas fagocíticas por donde internaliza el ligando. Una de las características más importantes es que es un proceso dirigido estrictamente por el reconocimiento específico entre el ligando y receptor (Taylor y col., 2005). Entre los factores implicados en la internalización se encuentran proteínas de unión a actina como Arp2/3, Rho GTPasas (Rac1, Cdc42 o RhoA), fosfolípidos y tirosinas quinasas como PI3K (Doherty y McMahan, 2009). En contraste con la macropinocitosis, durante la fagocitosis, la dinamina es un factor crítico para la escisión del fagosoma y liberación del mismo al citoplasma celular donde comenzará su maduración vesicular (Gold y col., 1999).

La fagocitosis es utilizada por bacterias, hongos y parásitos para infectar a fagocitos profesionales; sin embargo, recientemente se ha demostrado que también puede ser utilizada por virus de gran tamaño como el caso del Mimivirus *Acanthamoeba* Polifaga (Ghigo y col., 2008) o incluso por otros no tan grandes como HSV-1 (Clement y col., 2006).

1.2.4. Endocitosis mediada por caveolas

La endocitosis mediada por caveolas es otra vía endocítica que se encarga de endocitar ligandos extracelulares como ácido fólico o albúmina y toxinas bacterianas. El componente estructural principal son las caveolinas, proteínas integrales de membrana asociadas a microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos (Parton y Simons, 2007). Tras la estimulación con el ligando, estas regiones de la membrana forman pequeñas vesículas endocíticas con un diámetro entre 50-80 nm por donde internaliza el *cargo*, denominadas caveosomas, recubiertas de caveolina. En este tipo de endocitosis participan factores como la dinamina, la actina y algunas quinasas que dirigen la formación de la vesícula endocítica caracterizada por no presentar el marcador endosomal EEA-1 y cuyo pH es neutro (Pelkmans y Helenius, 2002).

Los virus que utilizan esta vía para entrar en la célula huésped se caracterizan por tener un tamaño pequeño debido a las restricciones impuestas por el diámetro de la vesícula, así como ser independientes del pH vacuolar, tales como el SV40 (Pelkmans y col., 2001; Pelkmans y col., 2002).

1.2.5. Otros tipos de endocitosis

El resto de rutas endocíticas descritas se conocen como vías independientes de clatrina y caveolina entre las que se encuentran la ruta dependiente de Arf6, de flotilina, de IL2 y la ruta GEEC. En algunos aspectos, presentan características comunes entre sí dirigiendo la internalización de *cargos* específicos en cada caso (Doherty y McMahon, 2009) y por lo general, no son mecanismos endocíticos utilizados activamente para la entrada de virus en la célula.

Actualmente, se están describiendo nuevos procesos endocíticos explotados por virus para internalizar en la célula huésped, aunque los factores celulares específicos que intervienen en el proceso y dirigen la endocitosis todavía no están bien definidos.

Por tanto, como puede observarse, los virus son capaces de utilizar una o varias de las rutas de endocitosis existentes controlando una compleja red de factores celulares en su propio beneficio, tal y como se revisa en Mercer y col, 2010 (Mercer y col., 2010b). Como resumen de este apartado, en la **Tabla 1** se muestran los factores celulares implicados en los tipos de endocitosis más comunes utilizados por los virus mencionados en este trabajo.

	<i>CME</i>	<i>Macropinocitosis</i>	<i>Fagocitosis</i>	<i>Caveolas</i>
Vesículas recubiertas	Sí; Clatrina	No	No	Sí; Caveolina
Factores escisión	Dinamina-2	Desconocido	Dinamina-2	Dinamina-2
Citoesqueleto	Actina* y microtúbulos*	Actina, microtúbulos* y miosinas*	Actina, microtúbulos y miosinas	Actina
Factores reguladores	AP2	Canales Na ⁺ /H ⁺	Tirosinas quinasas	Tirosinas quinasas
	Eps-15	Tirosinas quinasas	PI3K, PKC	Fosfatasas
	PI(3,4)P	Pak1, PI3K, Rac1	Ras, RhoA	PKC
	PI(4,5)P ₂	CtBP1	Colesterol	RhoA
		Colesterol		Colesterol

Tabla 1. Factores celulares implicados en diferentes tipos de endocitosis. En la tabla se muestran los factores celulares más importantes que intervienen en la endocitosis mediada por clatrina (CME), mediada por caveolas, en la macropinocitosis y en la fagocitosis. Se marca con un * si el factor celular interviene o no en el proceso endocítico dependiendo del modelo de estudio.

1.3. EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA)

1.3.1. Aspectos generales de la infección con el VPPA

El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) es uno de los virus más complejos que existe. Es el único miembro de la familia *Asfarviridae* (Dixon y col., 2004; Dixon, 2012) y debido a que las garrapatas del género *Ornithodoros* pueden ser infectadas actuando como vectores biológicos y reservorios virales, es el único virus ADN clasificado en el género arbovirus, es decir, capaz de replicar en artrópodos (Burrage, 2013; Costard y col., 2013).

El VPPA infecta a cerdos domésticos (Viñuela, 1985) y otros miembros de la familia de los suidos, tales como cerdos salvajes y jabalíes, en los que generalmente la enfermedad es subclínica (Montgomery, 1921). En cerdos domésticos, la Peste Porcina Africana (PPA) se caracteriza por la coagulación intravascular diseminada con hemorragias generalizadas que conducen a la muerte del animal en un periodo entre 6 y 13 días (Villeda y col., 1993) aunque las formas clínicas de la enfermedad varían con la virulencia de las cepas virales, distinguiéndose la forma hiperaguda, aguda, subaguda, crónica y subclínica (Blome y col., 2013).

En el animal infectado, el VPPA replica principalmente en macrófagos y monocitos, lo cual es de gran importancia en la patogenia de la enfermedad y en el establecimiento de la respuesta inmune; no obstante, también se han detectado partículas virales en otros tipos celulares como fibroblastos y células endoteliales en estadios tardíos de la enfermedad (Gomez-Villamandos y col., 2013; Viñuela, 1985). En cultivos *in vitro* el virus puede replicar en varias líneas celulares establecidas tras procesos de adaptación (de Leon y col., 2013; Enjuanes y col., 1976; Garcia-Barreno y col., 1986; Granja y col., 2006a).

Actualmente, la PPA es endémica en África y en Cerdeña; sin embargo, existe un fuerte riesgo de diseminación a varios países de la Unión Europea pues en el año 2007 se notificó un nuevo brote en Georgia (Rowlands y col., 2008) que se ha extendido descontroladamente a través de toda Rusia, lo cual podría tener consecuencias catastróficas para la cabaña porcina europea si se produce el contagio, al no existir vacuna frente a la enfermedad.

Durante años, numerosos estudios han analizado los posibles mecanismos de protección frente a la infección (Escribano y col., 2013; King y col., 2011; Revilla y col., 1992; Takamatsu y col., 2013; Wardley y col., 1985), no habiendo todavía hoy en día, ningún resultado completamente concluyente. Los primeros intentos de vacunación emplearon extractos celulares infectados e irradiados o virus inactivados que en ningún caso protegieron de la infección, sugiriendo que los anticuerpos generados frente al virus no son protectores. En este sentido, el papel de la respuesta inmune humoral en la protección frente al VPPA ha sido ampliamente estudiada (Escribano y col., 2013). Así, se ha descrito que sueros de cerdos inmunizados con las proteínas virales p72, p54 y p30 neutralizan la infección *in vitro* pero no son capaces de proteger frente a cepas virulentas en experimentos *in vivo* (Gomez-Puertas y col., 1998; Gomez-Puertas y col., 1996). Uno de estos estudios también apunta a que la inmunización con una mezcla de proteínas virales recombinantes disminuye parcialmente la patogénesis y mortandad, aunque estos resultados no se han reproducido en trabajos similares (Neilan y col., 2004). Incluso el empleo de vacunas ADN que expresan las proteínas p54 y p30 ha demostrado que a pesar de inducir una importante respuesta humoral, no sólo no protegen de la infección, sino que exacerban la viremia (Argilaguet y col., 2011). Por tanto, de estos estudios se deduce que la PPA se caracteriza por la ausencia de anticuerpos neutralizantes, impidiendo el desarrollo de una vacuna que induzca una respuesta inmune humoral protectora mediante la inmunización con virus inactivado y/o proteínas virales recombinantes. De hecho, nuevos trabajos apuntan a la importancia de la inmunidad celular inducida tras la inmunización con vacunas ADN como mecanismo de protección frente a cepas virulentas, sin que ello, no obstante, haya dado lugar más que a una protección parcial frente a la infección (Argilaguet y col., 2012).

1.3.2. El virión: estructura, replicación y transcripción génica

El VPPA presenta morfología icosaédrica y un diámetro promedio de unos 200 nm. La partícula viral está formada por varias capas concéntricas que de dentro a fuera se clasifican como: el núcleo o core, donde se localiza el material genético, el dominio intermedio, constituido por una fina capa de proteínas, la envuelta lipídica interna, la cápsida viral y la envuelta o membrana externa adquirida a partir de la membrana plasmática celular durante el proceso de gemación de las partículas virales (**Figura 5**) (Andres y col., 1997; Breese y DeBoer, 1966; Carrascosa y col., 1984).

Mediante técnicas de microscopía electrónica y el análisis bidimensional de los viriones extracelulares, se han identificado hasta 54 proteínas con pesos moleculares entre 10.000 y 150.000 Dalton (Carrascosa y col., 1986; Esteves y col., 1986; Salas y Andres, 2013). Entre ellas destaca la proteína p12, localizada en la membrana externa (Carrascosa y col., 1993) e identificada como el factor de unión viral a la célula (Carrascosa y col., 1991), la proteína CD2, que media la hemadsorción de las células infectadas (Dixon, 2012; Rodriguez y col., 1993) y la p72 que es la proteína mayoritaria de la cápsida viral constituyendo un tercio de la masa total del virión (Carrascosa y col., 1986; Garcia-Escudero y col., 1998; Sanz y col., 1985). Además, las proteínas p54 y p32 (ó p30) parecen ser importantes por sus propiedades antigénicas, tal y como se ha explicado anteriormente (Gomez-Puertas y col., 1996; Rodriguez y col., 2004). El genoma viral se localiza en el núcleo del virión, junto con proteínas y con la maquinaria necesaria para la síntesis temprana de los ARNm virales. Cabe señalar, que a diferencia de otros muchos virus, el virión del VPPA no presenta ninguna glicoproteína estructural aunque si se han descrito ciertos glicolípidos (del Val y col., 1986).

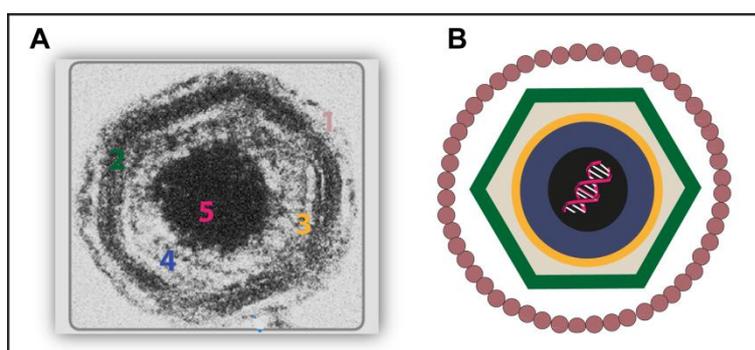


Figura 5. Estructura del virión extracelular del Virus de la Peste Porcina Africana. A) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la partícula viral extracelular del VPPA y B) representación esquemática de la misma. De fuera hacia dentro se diferencian varias capas: 1) membrana lipídica externa, 2) cápsida viral, 3) membrana interna, 4) dominio intermedio y 5) núcleo con el material genético. Adaptado de Carrasco y Almendral, 2006 (Carrasco y Almendral, 2006).

El genoma del VPPA es una molécula de ADN de doble hebra lineal con un tamaño que varía entre 170 y 190 Kpb dependiendo de la cepa viral, y que codifica para más de 150 proteínas con funciones muy heterogéneas tales como proteínas estructurales, enzimas, proteínas de replicación y transcripción viral, así como proteínas involucradas en la interacción virus-huésped (Dixon y col., 2013; Yañez y col., 1995). El ciclo de replicación del virus es principalmente citoplasmático aunque también se ha descrito una fase de replicación nuclear a tiempos tempranos de la infección (6 horas post-infección; hpi) (Ballester y col., 2011; Garcia-Beato y col., 1992; Rojo y col., 1999). Los sitios concretos del citoplasma donde tiene lugar la fase tardía de replicación viral, alrededor de las 12 hpi, así como la morfogénesis de los viriones, se denomina factoría viral. El transporte y mantenimiento de las partículas virales inmaduras en las factorías virales depende de la interacción entre la proteína viral p54 y la cadena ligera de la dineína, desplazándose por el citoplasma a través del sistema de microtúbulos (Alonso y col., 2001). Este componente del citoesqueleto también media el transporte de los viriones maduros hacia la membrana plasmática por donde salen al exterior mediante gemación (de Matos y Carvalho, 1993); y aunque la membrana celular parece que es necesaria para la salida, no lo es para la infectividad del virus (Andres y col., 2001).

Aproximadamente el 20% del genoma viral codifica proteínas que participan en la regulación de la transcripción, lo que confiere al virus una importante autonomía. La transcripción génica ocurre bajo una estricta regulación temporal distinguiendo cuatro tipos de transcritos: inmediatamente tempranos, tempranos, intermedios y tardíos. Estos ARNm se diferencian, principalmente, en que su expresión depende o no de la replicación viral, transcribiéndose los tempranos e inmediatamente tempranos antes de que el ADN viral replique, y haciéndolo los intermedios y tardíos después de la replicación. Se cree que los factores codificados por los genes tempranos son necesarios para la expresión de los genes intermedios, y el producto de éstos para la expresión de los tardíos (Almazan y col., 1992; Rodriguez y Salas, 2013; Rodriguez y col., 1996).

1.3.3. Mecanismos relevantes de interacción con la célula huésped

Entre las proteínas codificadas por el genoma viral destacan aquellas implicadas en la interacción con la célula infectada y en particular, las involucradas en evadir la respuesta inmune del huésped. Ejemplos de estas proteínas son la proteína A179L, homólogo a la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (Revilla y col., 1997); A224L, homólogo a la familia de inhibidores de apoptosis IAPs (Nogal y col., 2001) y EP153R, homólogo a las lectinas tipo C (Hurtado y col., 2004).

Entre estos productos virales cabe destacar a la proteína A238L. Este factor viral es homólogo a la familia de proteínas IκB (Revilla y col., 1998) y ha demostrado ser un elemento

fundamental en la inhibición de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria durante la infección viral. El mecanismo de acción de A238L ha sido ampliamente estudiado en nuestro laboratorio y tras la publicación de varios estudios, revisados recientemente (Sánchez y col., 2013), se ha propuesto un modelo de regulación transcripcional muy preciso y poco frecuente en otros sistemas virales. Estos trabajos han demostrado que durante la infección, la proteína A238L viaja al núcleo celular donde interacciona con el coactivador transcripcional p300 impidiendo la fosforilación, mediada por la PKC- θ , en el residuo Serina 384 del coactivador. La fosforilación de este residuo es fundamental para la correcta trans-activación de p300 al localizarse en su dominio regulador CH1/KIX y como consecuencia del bloqueo mediado por A238L, la activación de los factores de transcripción NFAT, NF κ B y c-Jun por parte de p300 se ve fuertemente bloqueada durante la infección. Esto conduce a que la expresión de genes pro-inflamatorios regulados por dichos factores de transcripción como son la ciclooxigenasa-2, el factor de necrosis tumoral α y la enzima óxido nítrico sintasa inducible, críticos para el desarrollo de la respuesta inmune, está fuertemente inhibida durante la infección del VPPA (Granja y col., 2006a; Granja y col., 2004; Granja y col., 2008; Granja y col., 2006b; Granja y col., 2009).

Además del control que ejerce el virus sobre la transcripción celular como mecanismo de evasión viral, nuestro grupo recientemente ha descrito que el VPPA controla la maquinaria de traducción celular para asegurarse la síntesis de sus propias proteínas durante la infección. Esta manipulación la lleva cabo regulando tanto la activación de los factores del complejo de iniciación de la traducción (eIFs), como la localización de los mismos en la célula infectada, de tal forma que a tiempos tardíos de la infección los eIFs, mitocondrias y ribosomas se distribuyen en las factorías virales donde tiene lugar la replicación y la morfogénesis viral (Castello y col., 2009). Además, la regulación de los eIFs debe ser un factor importante a controlar durante la infección, pues últimos resultados apuntan a que el virus también modula su expresión a nivel transcripcional aunque el mecanismo molecular no se conoce todavía (Sánchez y col., 2013).

1.3.4. Mecanismos de entrada del VPPA

El VPPA, al igual que otros muchos virus, entra en la célula huésped mediante endocitosis. Este proceso se observó por primera vez en estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en los que se muestra cómo las partículas virales internalizan en vesículas citoplasmáticas a partir de la membrana celular, así como en experimentos donde la infección está inhibida en presencia de drogas lisosomotrópicas que aumentan el pH vacuolar (Alcamí y col., 1989a; Valdeira y Geraldés, 1985).

Aunque hoy en día la identidad de los receptores celulares que median la entrada viral no se conoce, en la década de los 90 Alcamí y col. describieron que en macrófagos porcinos y células Vero la entrada del VPPA está mediada por receptores saturables presentes en la membrana plasmática de la célula y que estos son los responsables de la unión, internalización, síntesis ADN, y producción viral (Alcamí y col., 1989b; Alcamí y col., 1990). No obstante, posteriormente, se describió que la existencia de estos receptores es necesaria, pero no suficiente, para la eficiente producción viral ya que no son los únicos factores que garantizan la permisividad de la célula a desarrollar una infección productiva (Carrascosa y col., 1999). Estos trabajos también demostraron que el virus puede unirse a la membrana celular mediante una unión no saturable, permitiendo en algunos casos como en macrófagos de conejo, la internalización viral e incluso la síntesis de proteínas tempranas aunque la infección es abortiva en dichas células (Alcamí y col., 1989b; Alcamí y col., 1990).

La presencia de receptores celulares que median la unión, internalización y producción viral, apunta a que deben de existir factores virales que interaccionen con ellos en la superficie celular. En el caso del VPPA, se ha descrito que la proteína viral p12 es el factor responsable de esta unión (Carrascosa y col., 1991), bloqueándose la infección *in vitro* cuando las células se incuban con la proteína recombinante (Angulo y col., 1993). Sin embargo, aunque la inoculación de animales con la proteína p12 o virus inactivo genera anticuerpos específicos contra la proteína viral, estos antisueros no son capaces ni de inhibir la unión del virus a la célula, ni de neutralizar la infectividad, lo que sugiere que este factor no es el único responsable de mediar la adsorción viral (Angulo y col., 1993). A este respecto, como se ha explicado anteriormente, existen evidencias de la posible implicación de las proteínas virales p30, p72 y p54 en las etapas tempranas del ciclo infectivo, obtenidas a partir de experimentos de bloqueo y neutralización de la infección *in vitro* con anticuerpos frente a las proteínas recombinantes (Gomez-Puertas y col., 1998; Gomez-Puertas y col., 1996).

La caracterización de los receptores celulares importantes para la entrada del VPPA en macrófagos alveolares porcinos, célula diana en el animal infectado, también ha sido objeto de estudio. En este sentido, uno de los trabajos publicados defiende que la infección no tiene lugar a través de los receptores Fc, y por lo tanto, que la entrada viral dependiente de anticuerpos no favorece la infección (Alcamí y Viñuela, 1991) como ocurre en otros sistemas virales, aunque esto está en discusión en base a los últimos resultados obtenidos en un reciente estudio (Argilaguet y col., 2011). Otro ensayo apunta al receptor CD163 como un posible factor importante para la entrada viral en macrófagos, pues poblaciones positivas para dicho receptor son más susceptibles a la infección y ésta se inhibe de forma dosis-dependiente cuando las células se incuban con un anticuerpo específico frente a CD163 (Sánchez-Torres y col., 2003).

La internalización del VPPA se caracteriza por ser un proceso dependiente de temperatura y energía. En células Vero incubadas durante 3 h con el virus, se ha demostrado que el porcentaje de partículas virales capaces de unirse a la membrana plasmática a 37°C es el doble que a 4°C y que la internalización se ve completamente bloqueada en presencia de inhibidores metabólicos o 4°C de temperatura (Alcamí y col., 1989a; Valdeira y col., 1998). Igualmente, durante la endocitosis, el colesterol juega un papel importante en el proceso de fusión entre la membrana viral y endosomal siendo crítico para el avance de la infección (Bernardes y col., 1998).

Estudios de TEM han demostrado que la internalización del virus tiene lugar a través de dos tipos de invaginaciones de la membrana plasmática; unas presentan un recubrimiento proteico mostrándose como zonas electrodensas al microscopio electrónico similares a *coated pits*, sin embargo, otras invaginaciones están desprovistas de este recubrimiento proteico electrodensito. Tras la internalización viral y una vez que se produce la escisión del endosoma a partir de la membrana, las partículas virales viajan por el citoplasma dentro de vesículas endocíticas, que hasta el momento, no se han caracterizado como vesículas recubiertas (*coated vesicles*) de clatrina o caveolina (Alcamí y col., 1989a; Valdeira y Geraldés, 1985). En la **Figura 6** se muestra cómo tiene lugar la internalización del VPPA.

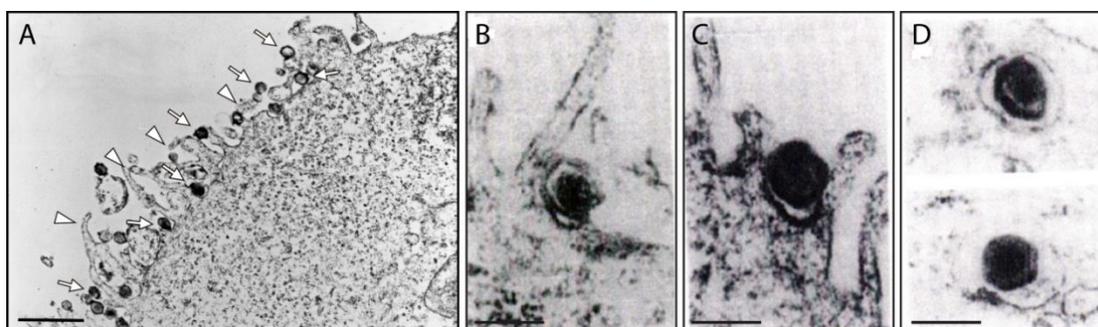


Figura 6. Internalización del Virus de la Peste Porcina Africana en células Vero. A) Adsorción de los viriones a la membrana plasmática. Durante la adsorción, el VPPA (flechas) se localiza adyacente a protrusiones de membrana (puntas de flecha) compatibles con *ruffles* planos de tipo lamelipodio. Barra de escala 1 μ m. Adaptado de Sánchez y col., 2012. B-D) Internalización del VPPA. El virus se localiza en invaginaciones de membrana electrodensas al microscopio electrónico e internaliza rápidamente en vesículas citoplasmáticas. Barra de escala 200 nm. Adaptado de Alcamí y col., 1989a. Imágenes adquiridas mediante TEM.

La desencapsidación viral y liberación de los cores al citoplasma desde los endosomas comienza a partir de los 60 minutos post-infección (mpi) siendo un proceso dependiente de la acidificación vacuolar pues está inhibido en presencia de drogas lisosomotrópicas afectando, por lo tanto, al inicio de la transcripción temprana y el progreso de la infección (Valdeira y

Geraldes, 1985). Recientemente, se ha demostrado que los endosomas tardíos son claves para la liberación de la cápsida viral estando controlado por la actividad de la GTPasa Rab7 localizada en la membrana endosomal (Cuesta-Geijo y col., 2012). Igualmente, tanto las proteasas como los fosfatidilinositoles juegan un papel fundamental en esta etapa del ciclo viral (Alcamí y col., 1989a; Cuesta-Geijo y col., 2012; Geraldes y Valdeira, 1985; Valdeira y col., 1998; Valdeira y Geraldes, 1985). Estudios de TEM han demostrado que la fusión de la membrana celular con la membrana viral se puede inducir de forma artificial por una disminución del pH en el medio, en cuyo caso, hay replicación viral. Sin embargo, si la internalización a pH ácido tiene lugar en presencia de drogas lisosomotrópicas no hay producción viral, sugiriendo que, en esta situación, los viriones son degradados en el citoplasma y que sólo puede haber infección productiva si el virus internaliza por endocitosis (Cuesta-Geijo y col., 2012; Valdeira y col., 1998; Valdeira y Geraldes, 1985).

En los últimos años ha emergido un gran interés por profundizar en el conocimiento del tipo de ruta endocítica específica utilizada por el VPPA para internalizar en la célula huésped, ya que existe cierta controversia sobre la naturaleza del mecanismo utilizado. Aunque la endocitosis dependiente de clatrina ha sido recientemente descrita por otro laboratorio como mecanismo de entrada (Hernaez y Alonso, 2010), se requiere de procedimientos experimentales que definan con mayor precisión la entrada viral, lo cual constituye uno de los motivos fundamentales de la presente Tesis Doctoral. El esclarecimiento de este proceso puede ser crítico en la elaboración tanto de reactivos para el diagnóstico precoz de la infección, como en el desarrollo de vacunas, especialmente si se determina la naturaleza del receptor(es) y los factores virales implicados.

Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido determinar si la macropinocitosis es el mecanismo endocítico empleado por el VPPA para entrar en la célula huésped. Las causas que nos llevaron a centrarnos en el estudio de este tipo de endocitosis durante la infección fueron: 1) los virus con un tamaño superior a 150-200 nm, como es el caso del VPPA, internalizan, por lo general, por mecanismos diferentes a CME o caveolas; 2) la macropinocitosis es uno de los mecanismos endocíticos más importantes en macrófagos, célula diana del VPPA en el animal infectado.

El planteamiento experimental se realizó por un lado, analizando si durante la entrada del VPPA se inducen y activan procesos o factores específicos de la macropinocitosis, y por otro, si la inhibición dichos factores afecta a la internalización viral.

Los objetivos concretos que nos planteamos fueron:

- 1- Analizar si la entrada del virus produce la formación de protrusiones de membrana típicas del proceso de macropinocitosis en la célula infectada.
- 2- Analizar si la entrada del VPPA depende de la función de los canales Na^+/H^+ y el virus internaliza junto con marcadores típicos de macropinocitosis.
- 3- Estudiar si la entrada viral provoca la restructuración del citoesqueleto de actina, fundamental para la formación de protrusiones de membrana.
- 4- Determinar si los factores celulares que dirigen la señalización durante la macropinocitosis se activan durante la entrada del VPPA y si la inhibición de esta actividad tiene efecto sobre la internalización virus. En concreto, nos centramos en el análisis de las rutas de señalización controladas por EGFR, PI3K, Rac1 y Pak1.

Materialles y Métodos

3.1. LÍNEAS CELULARES

Las células Vero (CCL 81) y Cos-7 (CLR 1650) (ambas de riñón de mono verde africano) se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC) y se cultivaron en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959), suplementado con 5% de suero fetal (FBS). Las células IPAM, pertenecientes a una línea celular de macrófagos alveolares de cerdo (CRL-2843) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%. Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C de temperatura y bajo atmósfera controlada con un 97% de humedad relativa y 7% de CO₂. El medio de cultivo fue suplementado con 2 mM L-glutamina, 0,05 mg/ml de gentamicina y 0,4 mM de aminoácidos no esenciales.

3.2. VIRUS

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas del VPPA: el aislado virulento España 70 (E70) y el adaptado a crecer en células Vero, Ba71V (Enjuanes y col., 1976).

Las preparaciones virales fueron obtenidas a partir de la infección en botellas de células Vero en el caso de Ba71V, y de células Cos-7 en el caso de E70, con una multiplicidad de infección (MDI) de 0,2 ufp/célula. Tras 72 horas de infección, las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se clarificó durante 16 horas a 7000 rpm y 4°C. Finalmente, las partículas virales producidas se resuspendieron en medio completo suplementado con 2% de suero fetal, se sonicaron y almacenaron a -80°C. La preparación viral resultante de este procedimiento se denomina Pellet de Alta (PA) y para la completa purificación del aislado viral Ba71V, el PA fue sometido a la purificación mediante gradiente de Percoll tal y como se describe previamente (Carrascosa y col., 1985). El aislado viral E70 fue titulado mediante ensayos de plaqueo en Cos-7 (Granja y col., 2006b; Hurtado y col., 2010), mientras que el aislado Ba71V fue titulado en células Vero (Enjuanes y col., 1976).

3.3. INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS Y REACTIVOS

Los inhibidores farmacológicos utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes:

5- etil-isopropil-amiloride (EIPA), inhibidor de los canales Na⁺/H⁺ (Sigma); Citalcalasina D (Cito D), inhibidor de la polimerización de filamentos de actina (Sigma); Genisteína, inhibidor de proteínas tirosina quinasa (Sigma); IPA-3, inhibidor de la proteína quinasa Pak1 (Sigma); Nocodazol, inhibidor de la dinámica de microtúbulos (Sigma); Blebistatina (±), inhibidor de la miosina II no muscular (Calbiochem); 324674, inhibidor del EGFR

(Calbiochem); NSC23766, inhibidor de la GTPasa Rac1 (Calbiochem); LY294002, inhibidor de la PI3K (Echelon). Todos ellos fueron preparados en agua o DMSO siguiendo las indicaciones del fabricante y se utilizaron a las concentraciones indicadas en cada caso.

Los reactivos y soluciones utilizadas fueron las siguientes: solución salina tamponada con fosfato (PBS); albúmina de suero bovino (BSA); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampón HEPES pH 7,4; tampón fosfato (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 0,1M pH 6); tampón ácido (Acetato sódico 0,1 M; NaCl 0,05 M; pH 5,5); solución de marcaje para citometría de flujo (BSA al 5%; 0,01% acida sódica en PBS); tampón RIPA (*Radio Immunoprecipitation Assay*) modificado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 1% de Nonidet NP-40; Deoxicolato sódico al 0.25%; NaCl 150 mM; EDTA 1mM); tampón TBS (Tris.HCl 500 mM pH 7.4 y NaCl 1500 mM); inhibidores de fosfatasas (*PhosphoStop*, Roche) e inhibidores de proteasas (*Complete mini-EDTA free*, Roche); tampón de lisis para Rac1-GTP (HEPES 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; 1% de Nonidet NP-40; MgCl_2 10 mM; EDTA 1 mM, 2% de glicerol).

3.4. SUEROS, ANTICUERPOS Y SONDAS

Los anticuerpos empleados para el estudio fueron los que se detallan a continuación:

Antígeno	Anticuerpo	Tipo	Dilución	Técnica utilizada	Fuente
Akt I	Akt	pAb	1:500	Western blot	Cell Signaling Technology; 9272
Akt fosforilada (treonina 308)	Fosfo-Akt (Thr308) C31E5E	mAb	1:500	Western blot	Cell Signaling Technology; 2965
Akt fosforilada (serina 473)	Fosfo-Akt (Ser473)	pAb	1:500	Western blot	Cell Signaling Technology; 9271
Subunidad p85 de PI3K	PI3Kp85	pAb	1:200	Inmunoprecipitación	Millipore; 06-195
Pak1	Pak1	mAb	1:500	Western blot	Santa Cruz Biotechnology ; sc-166887
Pak1 fosforilada (treonina 423)	Fosfo-Pak1 (Thr423)	pAb	1:500	Western blot	Santa Cruz Biotechnology ; sc-12925
Rock1	Rock1 C-19	pAb	1:50	Inmunofluorescencia	Santa Cruz Biotechnology ; sc-6055
β-actina	β -actina	pAb	1:1000	Western blot	Santa Cruz Biotechnology ; sc-1616
Proteína verde fluorescente	GFP	mAb	1:100	Western blot	Roche; 11814460
Rac1	Rac1 23A8	mAb	1:500	Western blot	Millipore; 05-389

Antígeno	Anticuerpo	Tipo	Dilución	Técnica utilizada	Fuente
Receptor del EGF	EGFR	pAb	1:100	FACS	Cell Signaling Technology; 4267
EGFR fosforilado (Tirosina 1068)	Fosfo-EGFR	pAb	1:500	FACS	Cell Signaling Technology; 3777
Proteína p32 del VPPA	p32	mAb	1:1000	Western blot	(Prados y col., 1993)
Proteína p72 del VPPA	p72 17LD3	mAb	1:100	FACS	Ingenasa (Sanz y col., 1985)
Proteína p72 del VPPA	p72 17LD3	mAb	1:250	Inmunofluorescencia	Ingenasa (Sanz y col., 1985)
IgG de ratón	Alexa Fluor-488	pAb	1:500	FACS e Inmunofluorescencia	Invitrogén(A-21202)
IgG de ratón	Alexa Fluor-555	pAb	1:500	Inmunofluorescencia	Invitrogén (A-31570)
IgG de cabra	Alexa Fluor-555	pAb	1:500	Inmunofluorescencia	Invitrogén (A-21431)
IgG de conejo	Rabbit peroxidasa	N/D	1:10000	Western blot	Amersham Biosciences
IgG de ratón	Mouse peroxidasa	N/D	1:4000	Western blot	Amersham Biosciences
IgG de cabra	Goat peroxidasa	N/D	1:20000	Western blot	Sigma-Aldrich

mAb, Anticuerpo monoclonal; pAb, Anticuerpo policlonal; N/D, no determinado.

Las sondas utilizadas en este estudio fueron las que se detallan a continuación:

Marcador de	Sondas	Dilución	Técnica utilizada	Fuente
Filamentos de Actina	Faloidina Alexa Fluor-488	1:100	Inmunofluorescencia	Invitrogén
Filamentos de Actina	Faloidina TRITC	1:500	Inmunofluorescencia	Sigma
Ácidos nucleicos	Topro3	1:500	Inmunofluorescencia	Invitrogén
Endocitosis	Dextrano Texas Red 3 KDa	0,5 mg/ml	Inmunofluorescencia	Invitrogén
Endocitosis	Dextrano Alexa Fluor-647	0,05 mg/ml	FACS	Invitrogén

3.5. PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN

Los plásmidos de expresión utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes:

- **pEGFP-C2**: vector de expresión que codifica para la proteína GFP (Invitrogén).
- **pEGFP-actina**: vector de expresión que codifica para la proteína β -actina fusionada a GFP. Cedido amablemente por el Dr. Jason Mercer (ETH Zurich, Institute of Biochemistry, Zurich, Switzerland).
- **pEGFP-Rac1**: vector de expresión que codifica para la proteína GTPasa Rac1 fusionada a GFP. Cedido amablemente por el Dr. Jason Mercer (ETH Zurich, Institute of Biochemistry, Zurich, Switzerland).
- **pGFP-Rac1-N17**: plásmido que expresa la GTPasa Rac1 fusionada a GFP. La proteína Rac1 presenta una mutación en la posición 17 cambiando el aminoácido treonina por aspártico. Este cambio impide la unión de Rac1 a GTP y compite con Rac1-WT por unirse a los GEFs funcionando como dominante negativo. El plásmido fue cedido amablemente por el Dr. Ricardo Madrid (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España).
- **pEGFP-Pak1-WT**: vector de expresión que presenta la proteína quinasa Pak1-WT fusionada a GFP. Fue amablemente proporcionado por el Dr. Jonathan Chernoff (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA).
- **pEGFP-Pak1-AID**: vector de expresión que presenta el dominio de autoinhibición (AID) de la quinasa Pak1 fusionado a GFP. El dominio AID se une a las proteínas Pak1-WT e inhibe su función actuando como dominante negativo. El plásmido fue amablemente proporcionado por el Dr. Jonathan Chernoff (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA).
- **pEGFP-Pak1-T423E**: plásmido de expresión que presenta la quinasa Pak1 en su forma constitutivamente activa fusionada a GFP. El plásmido fue amablemente proporcionado por el Dr. Jonathan Chernoff (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA).

3.6. TIPOS DE INFECCIÓN VIRAL

La infección viral se realizó de dos maneras diferentes según el tipo de experimento:

- **Infección sincrónica**: la adsorción viral tiene lugar durante 90 min a 4°C en medio completo tamponado con HEPES 25 mM pH 7,4, periodo en el que los virus se adhieren a la membrana plasmática. Seguidamente, la monocapa celular se lava dos veces con PBS frío y las células se incuban a 37°C permitiendo la infección hasta los tiempos indicados. Antes de realizar la infección las células se incuban a 4°C durante 15 min.

- **Infección asincrónica:** la adsorción viral tiene lugar durante 90 ó 60 min a 37°C (según se indique en cada experimento), las células se lavan una vez y se incuban a 37°C para que la infección viral progrese hasta los tiempos indicados.

Las células Vero fueron infectadas con el aislado viral Ba71V y las células IPAM con E70 o Ba71V según se indique. Todas las infecciones se realizaron en medio sin FBS y la MDI utilizada varió en los diferentes experimentos desde 1 a 100 ufp/célula.

3.7. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS

El tratamiento con inhibidores farmacológicos se realizó de dos maneras distintas:

- **Pre-tratamiento:** las células se incubaron con los inhibidores farmacológicos durante 60 min a 37°C antes de la adición del virus y el inhibidor se mantuvo durante la adsorción e infección viral. Este es el procedimiento estándar que se realiza a lo largo de todo el estudio si no se indica específicamente lo contrario (**Figura 7A**).

- **Post-tratamiento:** las células se incubaron con los inhibidores farmacológicos después de 60 min de adsorción viral a 37°C y se mantuvieron a lo largo de la infección (**Figura 7B**). Esta aproximación se realizó para el estudio de los niveles de expresión de proteínas virales por *Western blot*, tal y como se indica en el apartado 3.9.

En todos los casos, como control positivo, la infección se realizó en presencia de DMSO a una concentración equivalente a la máxima concentración utilizada con cada inhibidor.

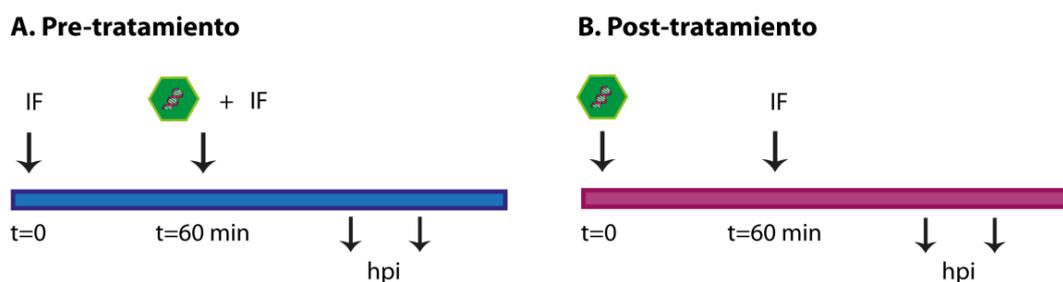


Figura 7. Esquema de los tipos de tratamiento realizados con inhibidores farmacológicos. A) Las células se incuban con el inhibidor farmacológico 60 min antes de la adición del virus o B) 60 min después de la adsorción viral a 37°C. En ambos casos el inhibidor está presente a lo largo de todo el periodo de infección hasta los tiempos indicados. IF, Inhibidor farmacológico

3.8. ANÁLISIS DE LA INTERNALIZACIÓN VIRAL

Las células fueron pre-tratadas con DMSO o inhibidores farmacológicos, infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula y tras la adsorción de los virus a la membrana, se incubaron durante 60 min a 37°C para permitir la infección viral. Posteriormente, la monocapa celular se lavó con PBS y la internalización viral se analizó mediante citometría de flujo o microscopía óptica confocal como se describe a continuación.

3.8.1. Análisis mediante citometría de flujo (FACS)

Después de la infección, las células se trataron con tripsina-EDTA durante 10 min a 37°C para eliminar los virus que permanecen adheridos a la membrana plasmática y se lavaron una vez con PBS al 1% de FBS. Tras la fijación y permeabilización celular, las partículas virales internalizadas se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3 seguido del anticuerpo secundario Alexa Fluor-488, como se detalla en el apartado 3.19. La **Figura 8** muestra diferentes condiciones experimentales realizadas con el fin de determinar cuál era la mejor condición para cuantificar la internalización viral mediante este método. En primer lugar, realizamos la infección a diferentes MDIs y concentraciones del anticuerpo anti-p72, y como muestra la **Figura 8A** y **8B**, la detección del número de células infectadas es directamente proporcional a la MDI utilizada así como a la concentración del anticuerpo. Basándonos en estos datos, decidimos utilizar una MDI de 10 ufp/célula y una dilución 1:100 del anticuerpo para los experimentos de internalización viral. La efectividad del tratamiento con tripsina-EDTA para eliminar los virus adheridos a la membrana plasmática que no han internalizado se muestra en la **Figura 8C**, donde el porcentaje de células p72 positivas disminuye alrededor de un 70% cuando las células son tripsinizadas tras un periodo de adsorción viral de 90 min a 4°C. Los datos obtenidos a partir del análisis por FACS se representan como el porcentaje medio de células p72 positivas (porcentaje de internalización) en presencia del inhibidor farmacológico respecto a las células DMSO control; en todos los casos el análisis se realizó al menos tres veces por duplicado.

3.8.2. Análisis mediante microscopía óptica confocal (CLSM)

Las células infectadas se fijaron y la inmunofluorescencia se realizó tal y como se describe en el apartado 3.20. Para detectar las partículas virales internalizadas, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3 a una dilución 1:250 seguido del anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 y en este caso, las muestras también se incubaron con faloidina-TRITC y Topro3 para visualizar los filamentos de actina y el núcleo, respectivamente. Tras la inmunofluorescencia, el análisis se realizó mediante CLSM (apartado 3.21.) tomando entre 13 y 18 planos seriados en el eje horizontal (plano x-y). Un ejemplo de la visualización de

las partículas virales a los 60 mpi tras la proyección vertical de los diferentes planos celulares tomados se muestra en la **Figura 9**. La cuantificación de la internalización viral se realizó de forma automática mediante un algoritmo específico creado por el departamento de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO a través del programa Image J, en el que el número de partículas virales en cada uno de los planos tomados se contabilizó mediante el *Threshold Intermode*. Los resultados se representan a partir de la suma de la información obtenida en cada plano como el porcentaje de internalización viral por célula en relación a la muestra DMSO control. Para cada condición se analizó 100 células en tres experimentos independientes. En la **Figura 10** se muestra un ejemplo de las partículas virales contabilizadas por el programa informático en los diferentes planos celulares.

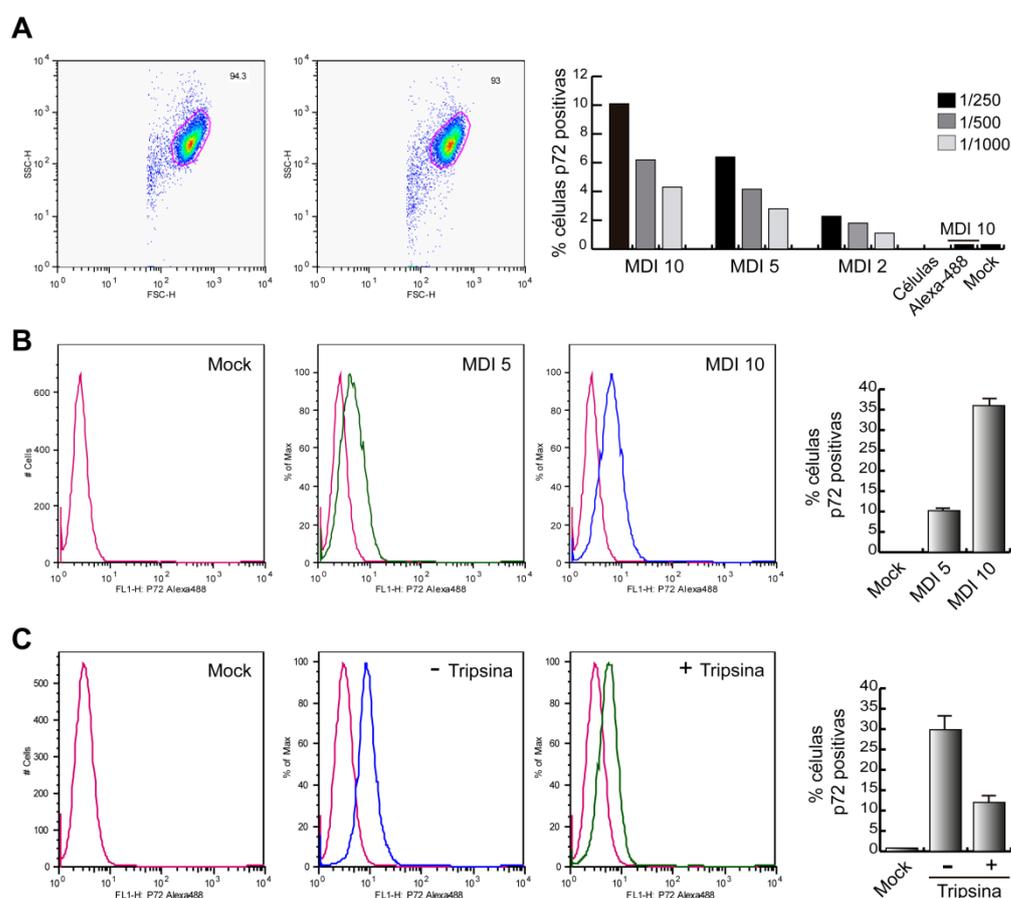


Figura 8. Optimización del análisis de la internalización viral mediante FACS. **A)** Optimización de la concentración del anticuerpo anti-p72 17LD3. Las células Vero se infectaron sincrónicamente durante 60 min con diferentes MDIs, se incubaron con concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3 y se analizaron mediante FACS. **B)** Optimización de la MDI. La infección sincrónica se realizó con una MDI de 5 y 10 ufp/célula durante 60 min y la dilución utilizada de anti-p72 17LD3 fue de 1:100 (n=2; media \pm D.E.). **C)** Análisis del tratamiento con tripsina. Las células fueron incubadas con el VPPA a una MDI de 10 ufp/célula durante 90 min a 4°C. Tras el periodo de adsorción, las células se tripsinizaron o se levantaron con una espátula y las partículas virales adheridas a la membrana plasmática se detectaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 a la dilución 1:100. Los resultados se representaron como el porcentaje de células p72 positivas respecto las células control (mock o no tripsinizadas).

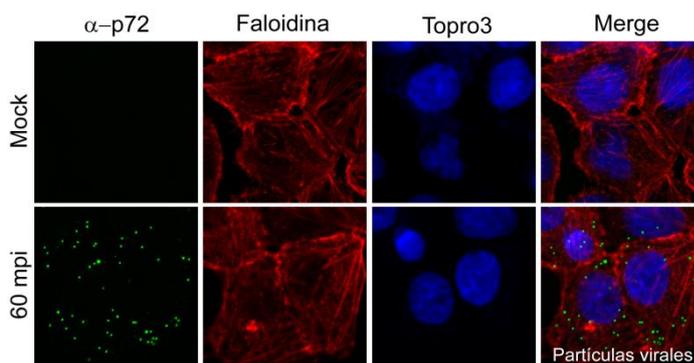


Figura 9. Visualización de las partículas virales internalizadas mediante CLSM. Las células Vero se infectaron sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula durante 60 min. Posteriormente, tanto las células no infectadas (mock) como las infectadas (60 mpi), se procesaron para inmunofluorescencia y las partículas virales se detectaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3. Los filamentos de actina y el núcleo celular se visualizaron incubando a las células con las sondas faloidina TRITC y Topro3, respectivamente. La adquisición de las imágenes se realizó mediante CLSM tomando varios planos seriados de la célula y representándolos como la máxima proyección en el plano horizontal (plano x-y).

3.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

El tratamiento con DMSO o con inhibidores farmacológicos se realizó 60 min antes de la adsorción del virus (Pre-tratamiento), o 60 min después de la adsorción viral (Post-tratamiento) y las células se infectaron asincrónicamente con una MDI de 1 ufp/célula. Tras la adsorción, en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico, la infección tuvo lugar durante 16 horas. Finalmente, los extractos celulares fueron procesados y analizados por *Western blot* como se describe posteriormente en los apartados 3.22 y 3.23. Los niveles de expresión de las proteínas virales se examinaron con los anticuerpos anti-p72, anti-p32 y anti-VPPAt, según se indique. El análisis se realizó tres veces de forma independiente.

3.10. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE FACTORÍAS VIRALES

Las células cultivadas en cubre-objetos y tratadas con DMSO o con inhibidores farmacológicos fueron infectadas asincrónicamente con una MDI de 5 ufp/célula y tras la adsorción viral, la infección tuvo lugar durante 16 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y fijaron para continuar la inmunofluorescencia y el análisis mediante CLSM, tal y cómo se describe en el apartado 3.20 y 3.21, respectivamente. La **Figura 11** muestra la formación de una factoría viral tras la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3, seguido del secundario Alexa Fluor-488. Los filamentos de actina y el núcleo celular así como el ADN viral, se visualizaron incubando las muestras con faloidina-TRITC y Topro3, respectivamente. Tras el análisis de 100 células por condición, se representó el porcentaje de las factorías virales desarrolladas en tres experimentos independientes.

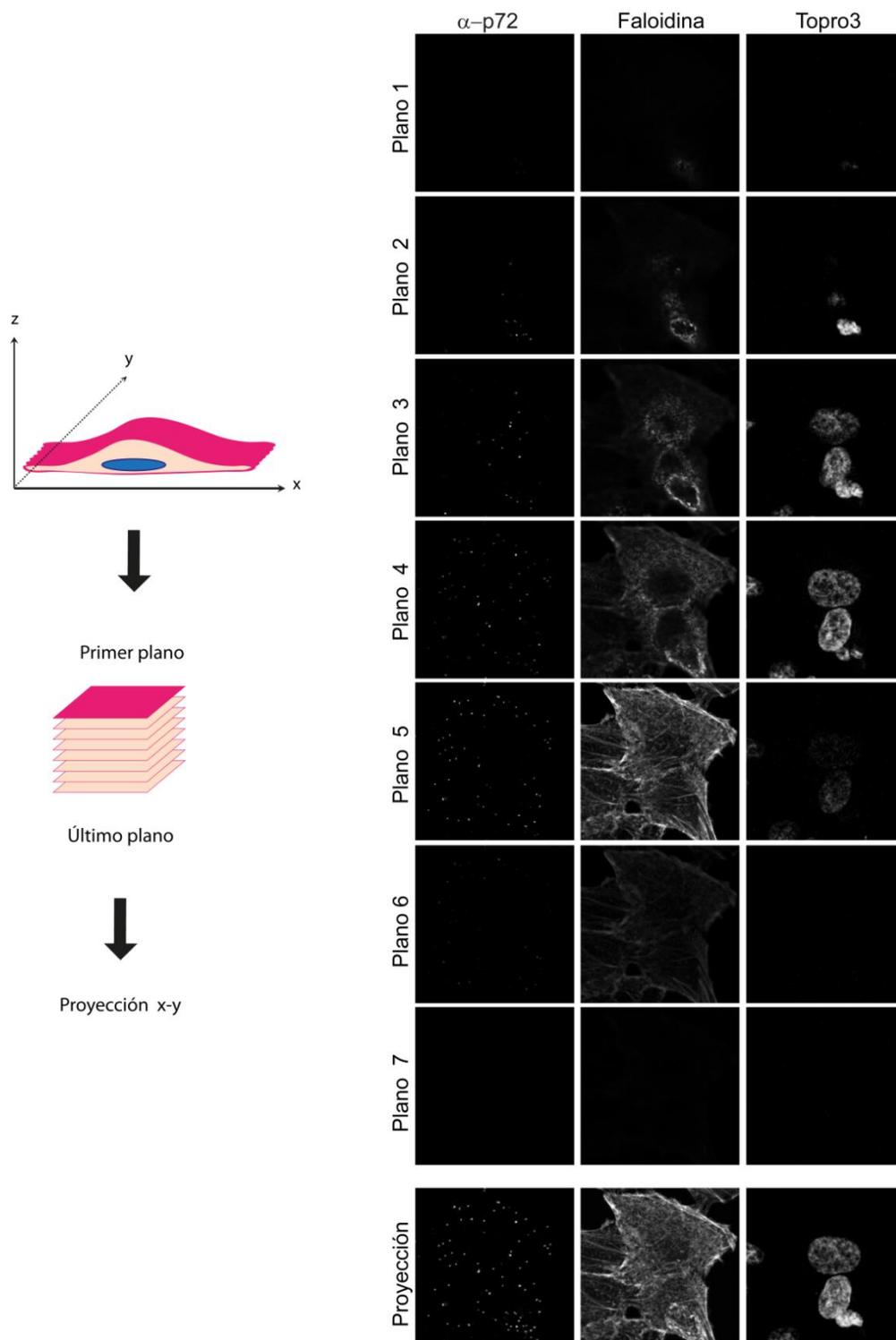


Figura 10. Análisis de la internalización de las partículas virales en planos seriados celulares. Las células Vero se infectaron sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula durante 60 min y tanto las células mock como las infectadas se procesaron mediante inmunofluorescencia. Las partículas virales se detectaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3 y los filamentos de actina y el núcleo celular se visualizaron con las sondas faloidina TRITC y Topro3, respectivamente. Las imágenes se adquirieron mediante CLSM tomando varios planos seriados de la célula y el conteo automático del número de partículas virales en cada uno de los planos se realizó en el programa Image J con el *Threshold Intermodos*. En la figura se muestran 7 planos celulares de los 18 adquiridos en este campo.

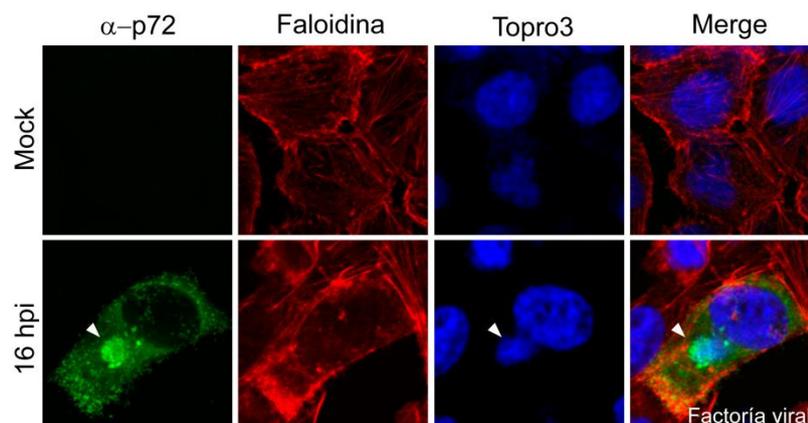


Figura 11. Análisis del desarrollo de factorías virales durante la infección del VPPA. Las células Vero fueron infectadas asincrónicamente con una MDI de 5 ufp/célula y tras 16 hpi se procesaron para inmunofluorescencia. Las factorías virales (punta de flecha) se visualizaron incubando a las células con el anticuerpo anti-p72 17LD3, y los filamentos de actina así como el ADN celular y viral, se marcaron con faloidina-TRITC y Topro3, respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas mediante CLSM.

3.11. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN VIRAL

Las células se trataron con DMSO o con inhibidores farmacológicos y se infectaron asincrónicamente con una MDI de 1 ufp/célula. Tras 48 h de infección, se recogió en sobrenadante y el número de partículas virales productivas se analizó mediante ensayos de plaqueo en células Vero, como se describió previamente (Enjuanes y col., 1976). El título viral se calculó como la cantidad de unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/ml); en todos los casos se realizó el experimento por triplicado de forma independiente.

3.12. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE AKT, PAK1 y EGFR

Para analizar la fosforilación de la quinasa Akt durante la infección viral, las células se cultivaron sin FBS durante 24 h, se infectaron con una MDI de 5 ó 10 ufp/célula y tras la adsorción a 37°C ó 4°C durante 60 ó 90 min, se recogieron los extractos celulares a diferentes tiempos de infección. La fosforilación de Pak1 y del EGFR fue analizada en extractos de células Vero infectadas sincrónicamente con una MDI de 5 y 10 ufp/célula, respectivamente, a los tiempos indicados.

Para el análisis de la fosforilación de Akt y Pak1, los extractos totales de células infectadas se procesaron como se indica en el apartado 3.22 y la fosforilación de las proteínas se analizó mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos primarios anti-fosfo Akt (Treonina 308), anti fosfo Akt (Serina 473) y anti-fosfo Pak1 (Treonina 423). Los niveles totales de Akt y Pak1 se analizaron con anticuerpos específicos, así como los niveles de β -actina como control

de carga. En el caso de la fosforilación del EGFR, las células se procesaron para el análisis mediante FACS, como se especifica en el apartado 3.19, y la fosforilación se detectó con el anticuerpo fosfo-EGFR (Tirosina 1068). Los niveles de EGFR se detectaron con un anticuerpo específico frente al receptor.

3.13. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE ACTINA, RAC1 Y ROCK1

La distribución de actina, tanto la endógena como la transfectada con el plásmido pEGFP-actina, se analizó en células infectadas asincrónicamente sin periodo de adsorción y con una MDI de 50 ufp/célula. En el caso de Rac1, su distribución se analizó tras la transfección transitoria de pEGFP-Rac1 e infección sincrónica con una MDI de 10 ufp/célula, y la localización de Rock1 se examinó en células infectadas sincrónicamente con una MDI de 50 ufp/célula. En todos los casos, tras el periodo de infección, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron a los tiempos indicados para continuar con la inmunofluorescencia. En el caso de la distribución de actina endógena, la inmunofluorescencia se realizó incubando las células con la sonda faloidina Alexa Fluor-488 y para visualizar la proteína Rock1 las células se incubaron con el anticuerpo anti-Rock1 seguido de Alexa Fluor-555. Las partículas virales se visualizaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 seguido de los secundarios Alexa Fluor-488 o Alexa Fluor-555 y el núcleo celular con Topro3. Todas las preparaciones se analizaron mediante CLSM como se describe en el punto 3.21.

3.14. ANÁLISIS DE PROTRUSIONES DE MEMBRANA

3.14.1. Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

Las células fueron cultivadas en cubre-objetos sin FBS durante 24 h antes de ser infectadas sincrónicamente con una MDI de 50 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados, las células se fijaron durante 3 h a 4°C en 2,5% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se lavaron tres veces con el mismo tampón en agitación y se trataron con tetróxido de osmio al 2% en agua ($\text{OsO}_4/\text{H}_2\text{O}$) durante 60 min a temperatura ambiente. Tras tres lavados consecutivos en agua destilada, las células fueron deshidratadas a temperatura ambiente durante 10 min en concentraciones crecientes de acetona o etanol como sigue: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%. Para una completa deshidratación, las muestras se sometieron al proceso de punto crítico durante 2 h y fueron cubiertas con grafito y oro para aumentar su conductividad. Finalmente, fueron analizadas a diferentes aumentos y con un voltaje de 5kV en un microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo, modelo JSM-6335-F (JEOL) (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Universidad Complutense de Madrid).

3.14.2. Microscopía óptica de Contraste de Fases

Para estudiar a tiempo real en célula viva las perturbaciones de membrana producidas tras la infección, las células se cultivaron durante 24 h en ausencia de FBS y la adsorción viral tuvo lugar durante 90 min a 4°C con una MDI de 100 ufp/célula. Tras la adsorción, las células se lavaron dos veces con PBS frío y la infección se monitorizó durante 30 min con una cámara digital Orca R2 (Hamamatsu) acoplada a un microscopio de campo ancho (LeicaDMI6000B, Leica Microsystems) a 37°C y atmósfera controlada con 7% de CO₂. Las imágenes se capturaron cada 1/485 segundos con el software LAS AF versión 2.6.0. (Leica Microsystems) a una resolución de 1344 x 1024 píxeles, con un objetivo 20x, 0,40 AN y un aumento de 1,6x. Las imágenes fueron analizadas y montadas con el programa Image J.

3.14.3. Microscopía óptica mediante Normasky.

La visualización de protrusiones de membrana en células IPAM se llevó a cabo tras la infección sincrónica a una MDI de 50 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con una cámara ccd monocroma (Hamamatsu) acoplada a un microscopio invertido (Axiovert, Zeiss) con un objetivo 63x, 1,4 AN. Finalmente, las imágenes se importaron y procesaron con el programa Image J.

3.15. ANÁLISIS DE MARCADORES DE ENDOCITOSIS

Para analizar la endocitosis de dextrano mediante citometría de flujo, las células fueron cultivadas en medio sin FBS durante 24 h y posteriormente se incubaron con DMSO o EIPA. Después del tratamiento, fueron infectadas sincrónicamente a una MDI de 10 ufp/célula o estimuladas con PMA (200 nM) durante 30 min a 37°C, en ambos casos. A los 15 min de infección o estimulación, las células se incubaron con 0,05 mg/ml dextrano-647 y tras 15 min a 37°C, se lavaron tres veces con PBS frío y una vez con tampón ácido (Acetato sódico 0,1 M, Cloruro sódico 0,05 M, pH 5,5) durante 10 min para eliminar los restos de dextrano adheridos a la membrana plasmática celular. Finalmente, las células se levantaron de la placa, se lavaron con PBS frío, se centrifugaron durante 3 min a 2000 rpm y 4°C, diluyeron en medio de marcaje (BSA al 5% y 0,01% acida sódica en PBS) y 2×10^4 células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Science). La internalización de dextrano se representó como la media de fluorescencia de tres experimentos independientes, y la barra de error representa la desviación estándar entre los mismos. Como control de que el tampón ácido eliminó el dextrano adherido a la membrana, se analizó la internalización del trazador en células no tratadas con dicho tampón.

La colocalización de dextrano con las partículas virales internalizadas se analizó mediante CLSM. En este caso, las células se cultivaron sin FBS 4 horas y se infectaron asincrónicamente durante 45 min con una MDI de 2 ufp/célula. A los 30 min de infección las células se incubaron con dextrano Texas-Red a una concentración de 0,5 mg/ml durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS frío para detener la internalización y una vez con tampón ácido durante 10 min para eliminar el dextrano adherido a la membrana. La inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo primario policlonal anti-p72 seguido del secundario Alexa Fluor-488 para marcar las partículas virales. El análisis de la colocalización del virus con el dextrano se realizó mediante CLSM como se indica en el punto 3.21.

3.16. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA PI3K

Las células fueron tratadas con DMSO o LY294002 durante 60 min a 37°C después de ser cultivadas en ausencia de FBS durante 24 horas y se infectaron asincrónicamente con una MDI de 10 ufp/ célula y un periodo de adsorción de 60 min. A los tiempos post-infección indicados, la subunidad p85 de la PI3K fue inmunoprecipitada de los lisados celulares y la actividad de la quinasa se midió como la producción de PI(3,4,5)P₃ mediante un ensayo enzimático de inmunoadsorción (ELISA) siguiendo las instrucciones del distribuidor (Kit#1001s Echelon). La actividad de la PI3K se representa como la cantidad de PI(3,4,5)P₃ generado a partir de PI(4,5)P₂. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes realizados cada uno por duplicado.

3.17. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE RAC1

Las células se infectaron sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula después de 24 h de cultivo en ausencia de suero. Tras la adsorción, se lavaron con PBS frío y se incubaron a 37°C hasta los tiempos post-infección indicados. La activación de Rac1 en las diferentes muestras se midió mediante dos métodos. La primera medida se realizó con un kit de activación G-ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Kit#BK128 Cytoskeleton, Inc), en el que los niveles de activación de Rac1 son inversamente proporcionales a la absorbancia obtenida a 490 nm. El segundo ensayo realizado se fundamenta en un *pull down* de Rac1 mediante la incubación de los extractos celulares con el dominio PBD (*Protein Binding Domain*) de la proteína Pak1. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron en hielo durante 10 min con el buffer de lisis complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (HEPES 25mM pH 7,5, NaCl 150mM, 1% de NP-40, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM, 2% de glicerol). Tras la incubación, se separó una fracción del lisado celular como extracto total y el resto se incubó con 40 µl de solución PBD en la noria durante 1 h a 4°C. Finalmente, las muestras se

centrifugaron 10 min a 14000 rpm, el pellet se lavó 3 veces con el buffer de lisis y se preparó para ser analizado mediante *Western blot*. La cantidad de Rac1-GTP unida al dominio PBD se analizó con un anticuerpo primario anti-Rac1. En ambos tipos de experimentos el análisis se realizó por triplicado de forma independiente.

3.18. ENSAYOS DE BY-PASS A pH ÁCIDO

Las células se trataron con el inhibidor farmacológico EIPA durante 60 min a 37°C en medio sin suero fetal. La adsorción viral tuvo lugar durante 90 min a 37°C a pH neutro (7,4) o pH ácido (5,0) con una MDI de 1ufp/célula, y tras lavar la monocapa con PBS, las células se incubaron a 37°C en medio a pH neutro en presencia o ausencia del inhibidor. Finalmente, tras 16 h de infección, los extractos celulares se recogieron y prepararon para el análisis mediante *Western blot* utilizando el anticuerpo primario anti-VPPAt.

3.19. CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

Tras la infección viral, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min en PBS al 1% de FBS y se fijaron con PFA al 2% en PBS durante 30 min a 4°C. Seguidamente, se permeabilizaron con saponina al 2% en solución de marcaje (BSA al 5% y 0,01% acida sódica en PBS) durante 15 min a temperatura ambiente. Tras un lavado, las células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 30 min a 4°C, se lavaron una vez en solución de marcaje, y se incubaron el mismo tiempo en oscuridad con el anticuerpo secundario. Finalmente, tras dos lavados consecutivos, 2×10^4 células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Science).

3.20. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células fueron crecidas sobre cubre-objetos y a los tiempos post-infección indicados se fijaron con PFA al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS frío. A continuación, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS y bloquearon con BSA al 1% durante 30 min. Seguidamente, las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA al 1% a temperatura ambiente durante 60 min y tras tres lavados en agitación se incubaron con el anticuerpo secundario en oscuridad en las mismas condiciones. Finalmente, las células fueron lavadas sucesivamente con BSA al 1% en PBS, agua destilada y etanol, y la preparación fue montada sobre un porta-objetos utilizando medio de montaje Prolong Gold (Invitrogén). Tras el secado del medio de montaje, el análisis de las muestras se realizó mediante CLSM.

3.21. MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL (CLSM)

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM510 META) acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) con un objetivo 63x, 1,4 AN. En los experimentos en los que se analizó el número de partículas virales internalizadas así como la distribución de actina y Rock1 se tomaron varios planos por imagen y se representaron como la máxima proyección en el plano vertical (plano x-z) y/o la máxima proyección en el plano horizontal (plano x-y). Para el análisis de la formación de las factorías virales y de la colocalización del virus con el dextrano se tomó un plano medio, que en el caso de los experimentos de colocalización fue de un grosor de 0,3 micras. La distribución de Rac1 se analizó tomando varios planos seriados o sólo un plano celular. Los parámetros de adquisición del confocal se ajustaron tomando la muestra mock como control negativo. Las imágenes obtenidas mediante el microscopio fueron digitalizadas y procesadas utilizando el programa Image J. En todos los casos se muestra una imagen representativa de al menos dos experimentos independientes.

3.22. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para obtener extractos de proteínas totales a los tiempos post-infección indicados, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en tampón RIPA modificado, conteniendo: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Nonidet NP-40 al 1%; Deoxicolato sódico al 0,25%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas. Las células se mantuvieron en el tampón de lisis 30 min a 4 °C y los extractos se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm y 4°C para eliminar el DNA celular. Finalmente, la concentración de proteínas en el sobrenadante, se determinó utilizando el método espectrofotométrico del ácido bicinchonínico (*BCA*) *Protein Assay Kit* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.23. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Partiendo de extractos celulares completos se analizaron entre 15- 50 µg de proteína total de cada muestra a estudiar, a los que se añadió tampón de carga Laemmli e incubaron a 95°C durante 5 min. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. El porcentaje de acrilamida varió en función de las proteínas a analizar. Las proteínas fueron transferidas a membranas de *Immobilon-P* (Millipore) y tras lavar la membrana en etanol 100% y dejar secar durante 30 min a temperatura ambiente, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo (tampón TBS con leche en polvo desnatada al

1% o BSA al 5%). A continuación, tras un lavado de 5 min con tampón TBS, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa seguido de tres lavados con tampón TBS. La dilución utilizada para cada anticuerpo se indica en el apartado 3.4. Para identificar las bandas de proteína específicas se utilizó el método de quimioluminiscencia *ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham Pharmacia), siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.24. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Las células se transfectaron de forma transitoria con 1µg del plásmido de expresión específico por cada 10^6 de células mediante el sistema de *LipofectAMINE PLUS Reagent* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se incubaron a 37°C durante 4 h en medio sin FBS y sin antibióticos, se lavaron una vez y se incubaron a 37°C en medio con 2% de FBS. Después de 16 ó 24 h las células se infectaron a la MDI indicada y los extractos celulares se analizaron mediante *Western blot* o en el caso de los experimentos de inmunofluorescencia las células se analizaron mediante CLSM.

3.25. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR

Tras el tratamiento con los inhibidores farmacológicos a las concentraciones y tiempos indicados, las células se tripsinizaron durante 5 min a 37°C, se lavaron con PBS al 2% de suero fetal y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en solución azul *Trypan* en PBS (Invitrogén). En cada caso, las células se contaron por duplicado en un hemocitómetro y el porcentaje de células muertas se representó como número de células azules respecto al número total de células.

3.26. ANÁLISIS DENSITOMETRICOS

Tras los ensayos de *Western blot*, las bandas obtenidas por quimioluminiscencia fueron digitalizadas y cuantificadas mediante el software Image J. Los datos se normalizaron después de sustraer los valores de fondo, y se calcularon como el ratio frente al valor obtenido más alto o más bajo. Todas las cuantificaciones representan la media de tres experimentos independientes.

Resultados

4.1. EL VPPA INDUCE ALTERACIONES DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DURANTE SU ENTRADA EN LA CÉLULA

Como se ha descrito en Introducción, la macropinocitosis se diferencia de otros procesos endocíticos por una importante restructuración en el citoesqueleto de actina, generándose protrusiones de membrana a través de las cuales el *cargo* específico entra en la célula (Swanson y Watts, 1995). El tamaño y la forma de estas protrusiones varía dependiendo del estímulo y del tipo celular; por ejemplo, la estimulación de macrófagos con factores de crecimiento o PMA, la expresión constitutiva de proteínas Ras en fibroblastos, o la infección de células A549 con FLUAV induce la formación de estructuras en forma de *ruffles* (Amyere y col., 2000; Araki y col., 1996; Rossman y col., 2012), mientras que la infección de células Hela con VV promueve la formación de *blebs* durante la internalización del virus (Mercer y Helenius, 2009).

En el caso del VPPA, tal y como se ha mostrado anteriormente en estudios de TEM, durante la adsorción del virus a la membrana plasmática los viriones se localizan adyacentes a protrusiones de membrana (Alcamí y col., 1989a; Valdeira y Geraldés, 1985), lo que abre la posibilidad de que la macropinocitosis sea el mecanismo, o uno de los mecanismos, utilizado(s) por el virus para entrar en la célula huésped. Para evaluar esta posibilidad y como punto de partida de este estudio, nos propusimos analizar la morfología y naturaleza de estas estructuras tras la infección mediante otros métodos analíticos de microscopía distintos a los empleados hasta el momento.

4.1.1. Formación de *ruffles* en células Vero durante la entrada del VPPA

En primer lugar, analizamos el perfil de la membrana plasmática durante la infección de células Vero con el aislado viral Ba71V. Las células se cultivaron durante 24 h en ausencia de FBS para disminuir la activación basal celular, se infectaron de forma sincrónica durante 10, 60 y 90 min, y el perfil de la membrana plasmática se analizó mediante FESEM como se describe en Materiales y Métodos. La **Figura 12A** muestra cómo la infección provoca una importante alteración en la estructura de la membrana plasmática celular ya que en comparación con las células mock que muestran un perfil liso y con filopodios, la membrana de las células infectadas tiene un aspecto rugoso generalizado y presenta protrusiones de aproximadamente 1 μM compatibles con *ruffles* planos tipo lamelipodio. Las diferentes imágenes adquiridas durante la internalización viral sugieren que la formación de estas estructuras es un evento transitorio durante la infección, formándose en mayor medida a partir de los 10 min y disminuyendo paulatinamente hasta los 90 mpi, donde no se visualizan. Esta temporalidad en la activación de la membrana celular está en consonancia con otros estudios que describen que a los 60 mpi

alrededor del 65% de los virus han internalizado (Alcamí y col., 1989a) y por lo tanto, es de esperar que a tiempos posteriores el nivel de activación de la membrana plasmática vuelva a su estado basal. Además de las perturbaciones en forma de *ruffles*, en las células infectadas también se visualizan otras estructuras con morfología redondeada y un tamaño entre 0,3 - 1 μM . En base a sus dimensiones, estas estructuras podrían ser consideradas *blebs* aunque no parece probable, pues hasta el momento, ningún estudio ha demostrado que un único estímulo induzca la formación de protrusiones de membrana diferentes en un mismo tipo celular. Esto nos lleva a pensar que tal vez su formación esté dirigida por algún contaminante presente en la preparación viral, ya que a diferencia de los *ruffles* que desaparecen a partir de los 90 mpi coincidiendo con la completa internalización del virus, las protrusiones circulares se mantienen después de este tiempo de infección. Por otro parte, aunque las partículas virales no fueron marcadas con ningún anticuerpo específico para su reconocimiento, se observan pequeñas esferas adyacentes a los *ruffles* con un diámetro aproximadamente de 200 nm, coincidente con el tamaño del virus (**Figura 12B**).

Finalmente, monitorizamos la infección en células Vero durante los primeros 30 min mediante microscopía óptica de contraste de fases (ver **Video 1** para células mock y **Video 2** para células infectadas en el CD adjunto que acompaña a la Tesis). La **Figura 12C** muestra el montaje de parte de la secuencia de imágenes obtenidas donde se observa que la internalización viral provoca una alteración morfológica generalizada en la membrana celular, en comparación con las células mock cuya membrana plasmática presenta un perfil uniforme.

4.1.2. Formación de *blebs* en células IPAM durante la entrada del VPPA

Como se ha comentado con anterioridad, la morfología de las perturbaciones de membrana en cada tipo celular depende del estímulo que las induce, e incluso, en el caso de algunos virus como VV, la morfología de estas perturbaciones en un mismo tipo de célula varía según el aislado viral (Mercer y col., 2010a).

Para estudiar si durante la infección con el VPPA la formación y el patrón de protrusiones de membrana dependen del tipo celular y aislado viral, analizamos el perfil de la membrana plasmática en la línea celular de macrófagos porcinos IPAM, tras la infección tanto con la cepa viral E70, como con la cepa Ba71V. El análisis mediante FESEM muestra que la infección sincrónica con la cepa E70 provoca visibles cambios morfológicos en toda la membrana plasmática tan pronto como a los 10 mpi, indicando que, al igual que en las células Vero, existe un cambio generalizado en presencia del virus (**Figura 13**). Si bien la morfología de estas protrusiones no corresponde exactamente a *ruffles*, los datos revelan la incipiente aparición de

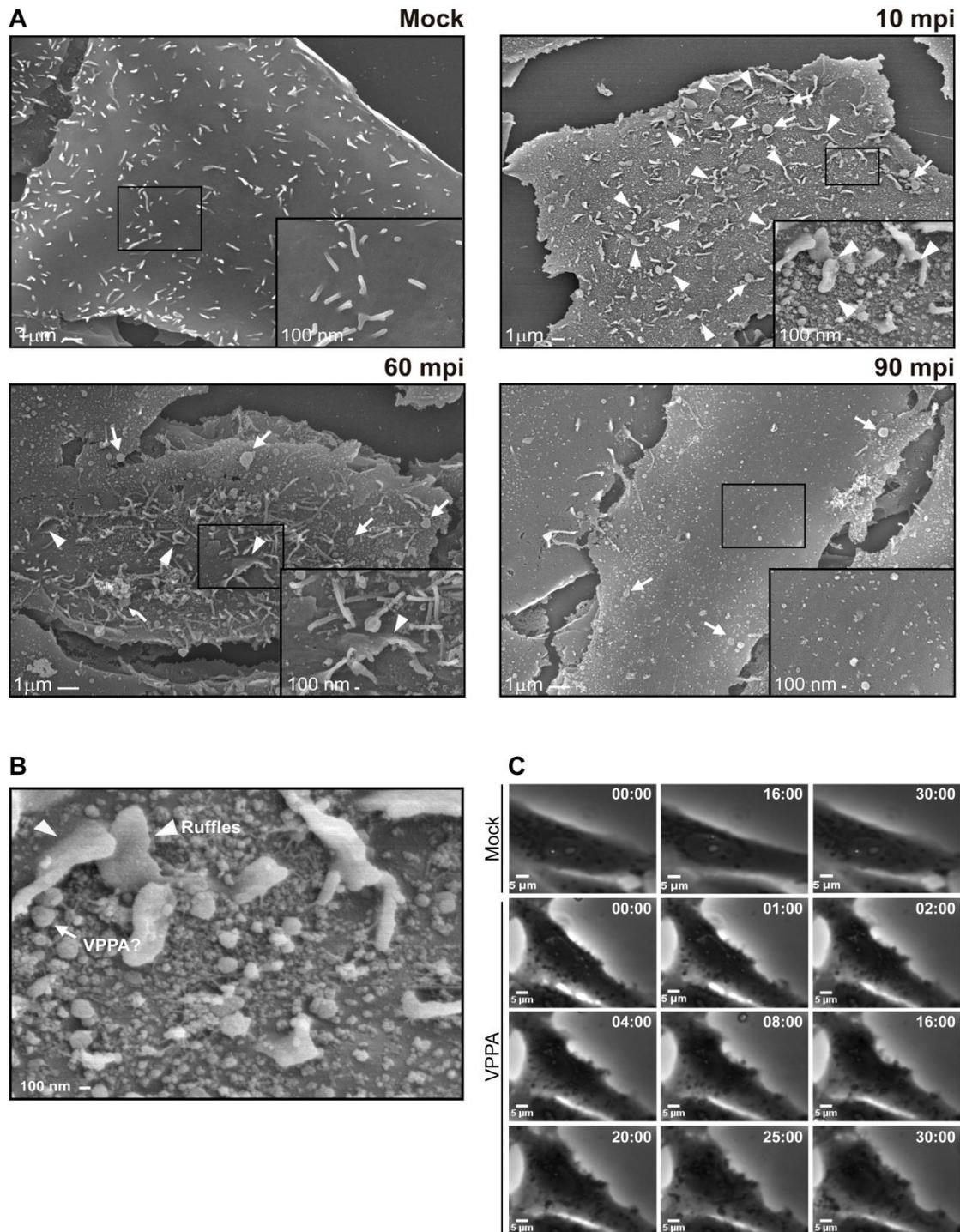


Figura 12. Inducción de perturbaciones de membrana en células Vero durante la internalización del VPPA. A) Las células fueron infectadas sincrónicamente a una MDI de 50 ufp/célula y procesadas para el análisis mediante FESEM a los tiempos post-infección indicados. Las imágenes en lado inferior derecho de las fotografías muestran en detalle una región de la superficie celular analizada. Las puntas de flecha indican perturbaciones de la membrana compatibles con *ruffles* y las flechas estructuras con morfología redondeada. **B)** Detalle de la superficie de la membrana plasmática de una célula infectada sincrónicamente durante 10 min y analizada mediante FESEM. La flecha apunta a estructuras esféricas con un tamaño de 200 nm (posibles partículas virales) adyacentes a *ruffles* (punta de flecha). **C)** Las células se infectaron sincrónicamente con una MDI de 100 ufp/célula y la infección se monitorizó durante 30 min mediante microscopía óptica de contraste de fases. La graduación numérica de cada una de las imágenes corresponde a un lapso de tiempo expresado en min:seg. Los videos correspondientes se adjuntan en el CD que acompaña a la Tesis.

estructuras que, en algunos casos, parecen adoptar una morfología esférica formada por subunidades menores. Para intentar esclarecer esta observación, las células infectadas fueron analizadas, en paralelo, mediante Normasky a los 30, 45 y 60 mpi, y como muestra la **Figura 14A**, mediante este análisis pudimos diferenciar claramente que durante la internalización de E70 en células IPAM se forman protrusiones de membrana con forma redondeada y un tamaño en torno a $0,5 \mu\text{M}$, las cuales se ajustan a la definición de *blebs*.

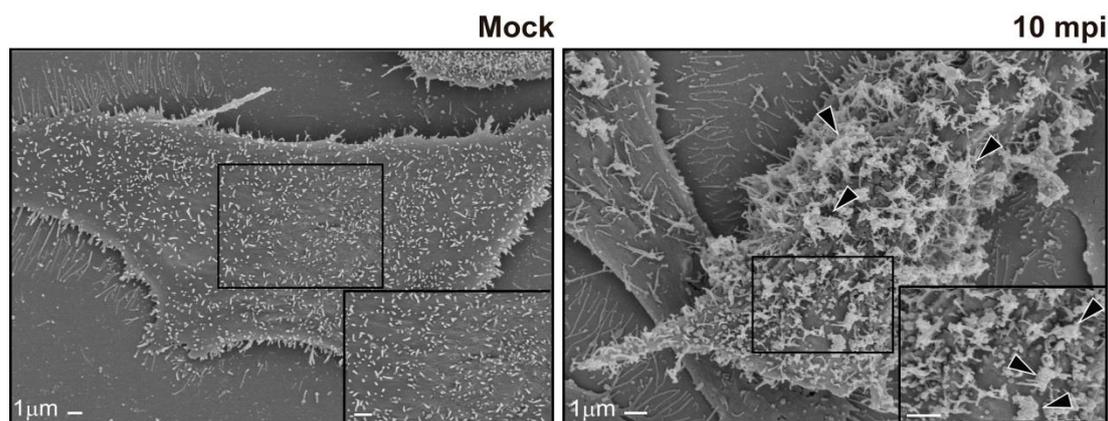


Figura 13. Alteración de la membrana plasmática en células IPAM infectadas con el VPPA. Las células fueron infectadas sincrónicamente con el aislado viral E70 a una MDI de 50 ufp/célula durante 10 min y se procesaron para el análisis mediante FESEM. Las puntas de flecha indican estructuras generadas en la membrana plasmática de las células infectadas y las imágenes localizadas en lado inferior derecho muestran en detalle una región analizada de la superficie celular. Barras de escala: $1 \mu\text{M}$.

A continuación, nos propusimos estudiar si este tipo de perturbaciones de membrana se forman igualmente cuando las células IPAM son infectadas con una cepa viral diferente. Para ello, en primer lugar, analizamos si la internalización del aislado Ba71V era sensible al tratamiento con blebistatina, un inhibidor farmacológico que inhibe específicamente a la miosina II (Kovacs y col., 2004; Limouze y col., 2004) y la entrada de virus como VV y KHSV al impedir la formación de *blebs* (*blebbing*) (Mercer y Helenius, 2008; Valiya Veetil y col., 2010). Como muestra la **Figura 14B**, cuando las células se tratan con blebistatina a concentraciones no tóxicas (**Tabla Anexo 1**) durante 60 min antes de la adición del virus (Pre), la expresión de la proteína viral temprana p32 y la tardía p72 se ve fuertemente inhibida, indicando, que la miosina II es un factor importante para la infección viral. Sin embargo, para descartar que el inhibidor estuviera afectando a procesos posteriores a la entrada como la transcripción o traducción de proteínas virales, realizamos un segundo tratamiento. En este caso, la entrada viral se permitió durante 60 min en ausencia de blebistatina y tras la internalización, pero antes del inicio de la transcripción de los genes tempranos (Rodríguez y Salas, 2013), las células se incubaron con la droga (Post). Los resultados muestran que cuando el inhibidor se

añade 60 min después de la entrada viral hay una importante recuperación de los niveles de expresión de las proteínas virales en comparación con la fuerte inhibición obtenida cuando las células se tratan con la droga antes de la adición del virus, indicando que el *blebbing* desempeña un papel importante para la internalización de Ba71V en células IPAM.

Por último y para reforzar los datos obtenidos tras la infección con Ba71V, caracterizamos los *blebs* formados tras la infección analizando la localización de la proteína Rock1, pues es un marcador específico de este tipo de protrusiones (Hannemann y col., 2008). Las imágenes de inmunofluorescencia adquiridas mediante CLSM muestran que dichas estructuras están enriquecidas en Rock1 y además, si bien no podemos hablar de colocalización puesto que las imágenes representan la proyección de distintos planos celulares, Rock1 presenta la misma distribución que las partículas virales durante el proceso de internalización (**Figura 14C**).

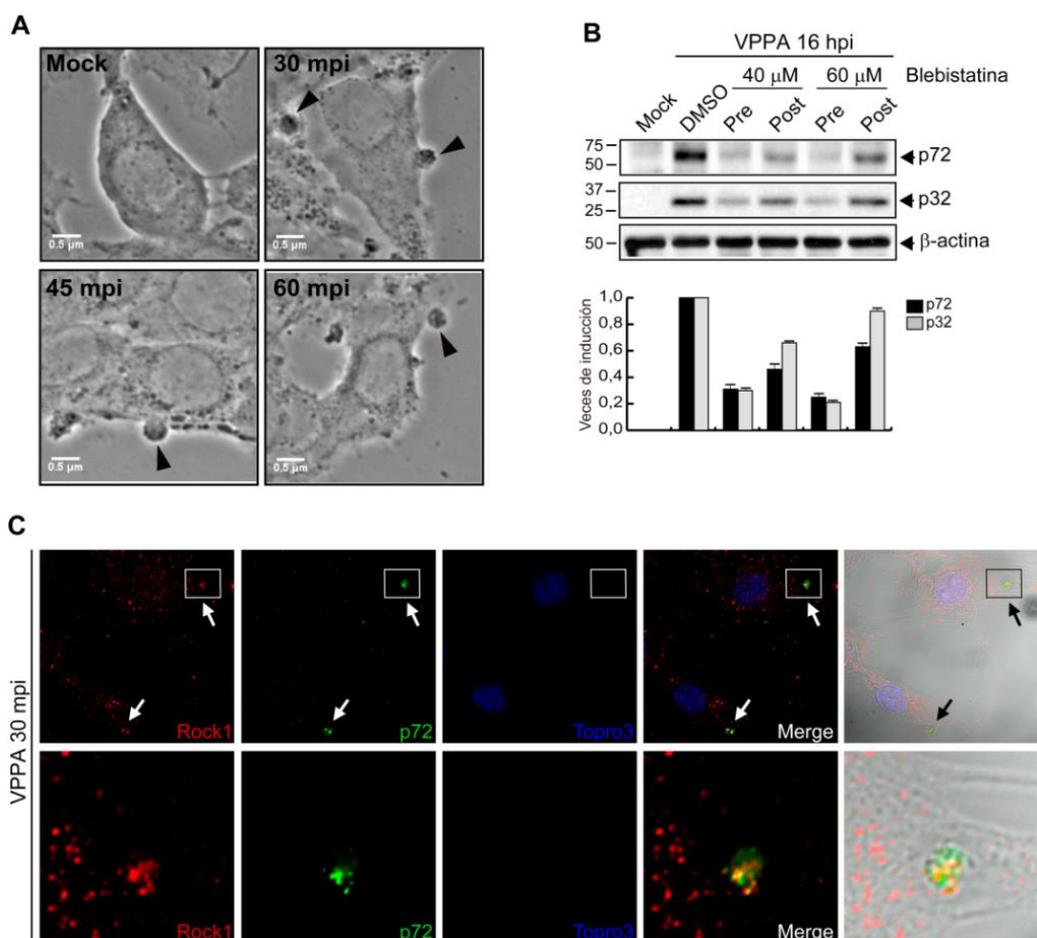


Figura 14. Implicación de los blebs durante la infección de células IPAM con el VPPA. A) Las células fueron infectadas sincrónicamente con el aislado viral E70 a una MDI de 50 ufp/célula y la formación de *blebs* se analizó a diferentes tiempos post-infección mediante Normasky. B) Análisis del efecto de la blebistatina en la entrada viral. El tratamiento con DMSO o blebistatina se realizó 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adsorción viral a 37°C. La infección con Ba71V con 1 ufp/célula se permitió durante 16 h y los extractos celulares se analizaron mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-VPPAT; los niveles de β -actina se analizaron como control de carga. La gráfica representa las veces de inducción mediante el análisis densitométrico (n=2, media \pm D.E.). C) Caracterización de *blebs* mediante inmunofluorescencia. Las células infectadas sincrónicamente con Ba71V a una MDI de 50 ufp/célula durante 30 min, se incubaron con anti-Rock1, anti-p72 17LD3 y Topro3 para marcar los *blebs*, las partículas virales y el núcleo celular, respectivamente. Tras la inmunofluorescencia, las imágenes fueron adquiridas mediante CLSM y representadas como la máxima proyección en z de los diferentes planos tomados en el eje x-y. Las células también fueron visualizadas mediante Normasky. Los paneles inferiores muestran el detalle de un *bleb* (flechas). D.E., desviación estándar.

En conclusión, estos resultados muestran que durante la entrada, el VPPA promueve la activación generalizada de la membrana plasmática celular formando protrusiones de membrana en forma de *ruffles* o *blebs* importantes durante los primeros estadios de la infección. Además, estos procesos característicos de la entrada por macropinocitosis son explotados *in vitro* tanto por diferentes aislados virales para infectar a un mismo tipo celular, como por un mismo aislado viral para infectar dos tipos celulares diferentes, lo que sugiere, que la macropinocitosis podría ser un mecanismo general de entrada durante la infección del VPPA, hipótesis que precisa de estudios posteriores los cuales constituyen el foco del presente trabajo.

4.2. LA ENTRADA DEL VPPA REQUIERE DE LOS CANALES Na^+/H^+

Las perturbaciones de membrana producidas tras la infección con el VPPA mostradas en el capítulo anterior, sugieren que el virus podría entrar en la célula mediante un proceso dependiente de macropinocitosis. Para confirmar esta idea, analizamos si durante la entrada del virus se cumplen dos de las características específicas de este mecanismo endocítico. Tal y como se ha comentado en Introducción, la entrada por macropinocitosis tiene que ser susceptible a la inhibición de los canales Na^+/H^+ y además, inducir la internalización de marcadores de fase fluida como el dextrano. Normalmente, ambos factores son utilizados como prueba diagnóstica para definir si un virus utiliza la macropinocitosis para internalizar en la célula, puesto que no intervienen en otros procesos endocíticos ajenos a ella.

4.2.1. Efecto de la inhibición de los canales Na^+/H^+ sobre la entrada del VPPA

Para analizar el papel que desempeñan los canales Na^+/H^+ durante la entrada e infección del VPPA, empleamos el inhibidor farmacológico 5- etil-isopropil amiloride (EIPA) a lo largo del proceso de infección. Este compuesto, junto su análogo amiloride, inhibe de manera específica la macropinocitosis no interviniendo en otros tipos de endocitosis como la CME (Masereel y col., 2003; West y col., 1989), y aunque el mecanismo de acción concreto no es del todo conocido, se ha descrito que el tratamiento con ambos compuestos provoca la disminución del pH de la membrana celular, impidiendo la señalización necesaria para la formación de *ruffles* o *blebs* mediada por Rac1 y Cdc42 (Koivusalo y col., 2010).

En primer lugar, y para descartar que la inhibición de la infección pueda ser consecuencia de la toxicidad del compuesto sobre las células, se realizaron ensayos de viabilidad celular en presencia del EIPA a diferentes concentraciones y tiempos de incubación; los datos obtenidos están representados en la **Tabla Anexo 1**. Una vez elegidas las concentraciones no tóxicas, analizamos el efecto que el inhibidor tiene sobre la entrada del virus. Para ello, las células Vero se trataron con DMSO o EIPA a diferentes concentraciones y se infectaron sincrónicamente con el aislado viral Ba71V durante 60 min. La internalización viral se analizó mediante FACS tras marcar a las partículas virales con el anticuerpo monoclonal 17LD3 frente a la proteína mayoritaria de la cápsida (p72). Como se muestra en la **Figura 15A**, el tratamiento con EIPA produjo una fuerte disminución dosis dependiente en la internalización del virus en comparación con las células control. Para reforzar estos resultados, analizamos en paralelo la internalización viral en presencia del inhibidor farmacológico mediante CLSM. El tratamiento y la infección se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente (a una concentración de 60 μM de EIPA) y a los 60 mpi las células se fijaron e incubaron simultáneamente con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina- TRITC y Topro3 para visualizar las partículas virales, los filamentos de

actina y el núcleo, respectivamente. Tal y como se observa en la **Figura 15B**, el contaje automatizado de las partículas virales internalizadas a partir de las imágenes adquiridas por CLSM, confirma que la entrada viral es menor en las células tratadas con EIPA. La **Figura 15C** representa la proyección en el eje horizontal de los diferentes planos tomados de uno de los campos analizados. Si bien estos datos están en línea con los obtenidos mediante el análisis por FACS, el porcentaje de inhibición en presencia de EIPA fue ligeramente inferior cuando se analizó mediante CLSM. Estas diferencias podrían explicarse por la presencia de partículas virales no internalizadas pero adheridas a la membrana plasmática de las células tratadas con EIPA, y para visualizar de forma más clara esta posibilidad, las imágenes se representaron como la máxima proyección en el plano vertical. Como se observa en la **Figura 15D**, existe una diferente distribución de las partículas virales entre las células tratadas con DMSO y las células tratadas con el inhibidor, estando, en este último caso, situadas principalmente en el borde de la membrana celular y colocalizando con la actina cortical, lo que sugiere una menor internalización. Esta distribución periférica en presencia de EIPA también se puede advertir en la **Figura 15C**.

4.2.2. Efecto del EIPA sobre etapas posteriores a la internalización viral

Una vez demostrado que la entrada viral depende de la función de los canales Na^+/H^+ , analizamos el desarrollo de la infección en células tratadas con EIPA para confirmar que la inhibición observada durante las primeras etapas de la infección se ve reflejada en el progreso de la misma. Para ello, analizamos los niveles de expresión de proteínas virales, la formación de factorías y la producción viral. En primer lugar, las células Vero se trataron con EIPA a una concentración de 20 μM y tras 16 h de infección, los extractos totales de células infectadas se recogieron y analizaron mediante *Western blot* con un anticuerpo policlonal frente la proteína p72 y un anticuerpo frente a las proteínas virales inducidas (anti-VPPAt). Como muestra la **Figura 16A**, en presencia de EIPA ni la proteína temprana p32 (Prados y col., 1993), ni las proteínas tardías p12, p17 y p72 (Salas y col., 1986; Santaren y Vinuela, 1986) se detectan a tiempos tardíos post-infección. De igual forma, cuando la infección se analizó mediante CLSM no se hallaron factorías virales (**Figura 16B**) y la producción viral en presencia del inhibidor fue de hasta 3 unidades logarítmicas menor (**Figura 16C**).

Además, y para descartar que tanto la inhibición de la expresión de proteínas virales, como de la producción viral ejercida por el EIPA fuera debida a un efecto sobre etapas post-internalización, analizamos la infección en presencia del inhibidor mediante dos abordajes experimentales diferentes; el primero de ellos incluye un experimento de *by-pass* a pH ácido, que se fundamenta en la inducción de la entrada viral mediante la fusión de la membrana del

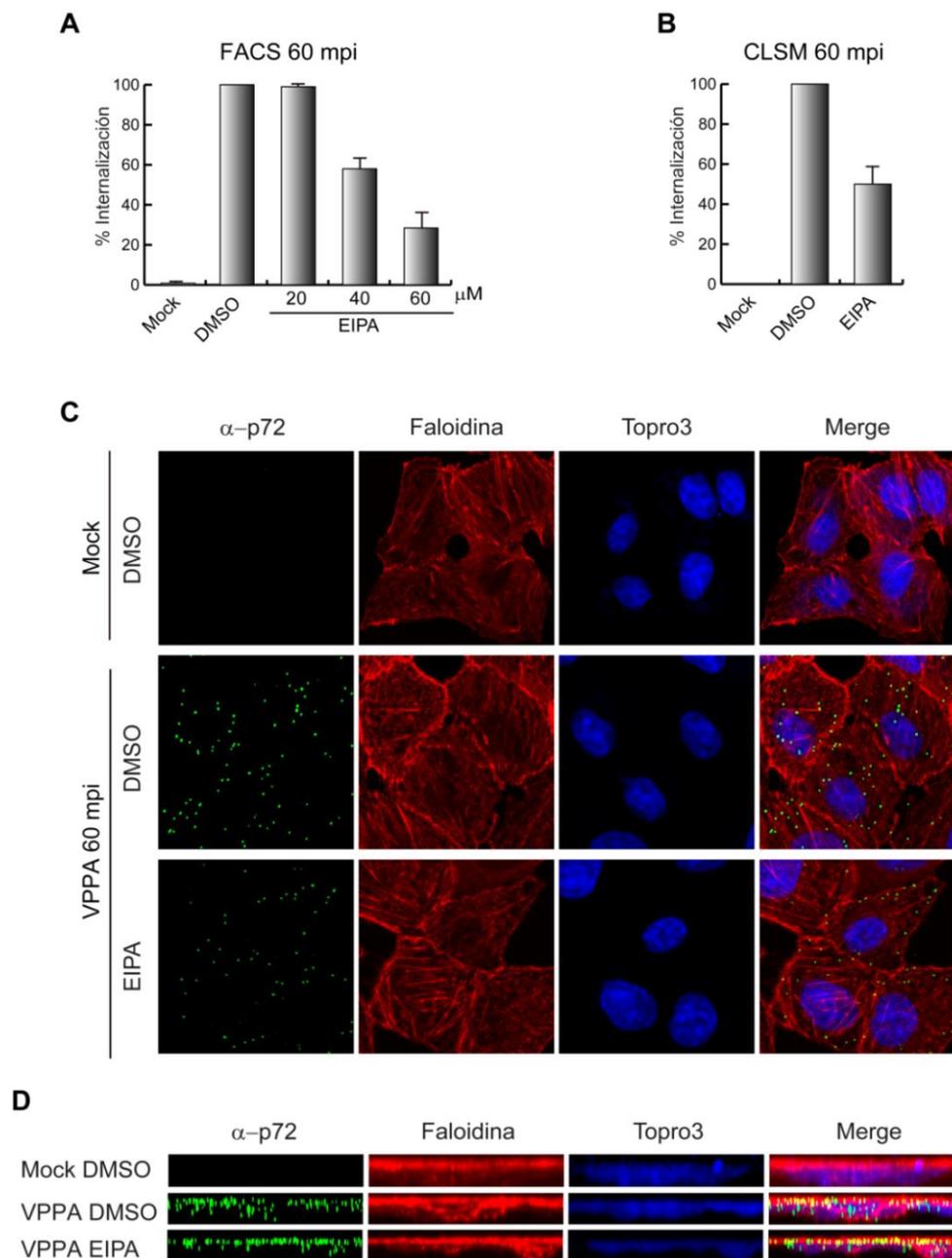


Figura 15. El tratamiento con EIPA inhibe la internalización del VPPA en células Vero. A-B) Las células fueron tratadas con DMSO o EIPA e infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula durante 60 min. **A)** Las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y las células se analizaron mediante FACS. La gráfica representa el porcentaje medio de internalización viral respecto a las células DMSO control (n=7, realizado por duplicado; media \pm D.E.). **B)** Tras la infección en presencia de 60 μ M de EIPA, la inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina-TRITC y Topro3 para visualizar las partículas virales, los filamentos de actina y el núcleo, respectivamente. Mediante CLSM se tomaron imágenes de planos seriados de la célula (eje x-y) y el número de partículas virales internalizadas se cuantificó en cada uno de ellos, tras el conteo de 100 células por condición, mediante el programa Image J. El porcentaje de internalización viral se expresa respecto a las células tratadas con DMSO (n=3; media \pm D.E.). **C)** Representación de la máxima proyección en z de los planos tomados en el eje x-y de uno de los campos analizados mediante CLSM. **D)** Representación de la máxima proyección ortogonal de los planos x-z de uno de los campos analizados mediante CLSM. D.E., desviación estándar.

virus con la membrana plasmática en un ambiente de pH ácido, tal y como se ha descrito anteriormente (Valdeira y Geraldés, 1985), en presencia del inhibidor farmacológico. Brevemente, si a pH 5 la síntesis se ve inhibida por el EIPA de igual manera que a pH fisiológico, el inhibidor no está actuando en la internalización viral sino en pasos posteriores. Por el contrario, si a pH 5 hay síntesis de proteínas virales, el inhibidor estaría actuando durante la internalización (Mercer y Helenius, 2008). Los resultados obtenidos, que se observan en la **Figura 16D**, muestran que cuando la internalización del VPPA tiene lugar en presencia de EIPA a pH ácido hay una significativa recuperación de la síntesis de p72, en contraste con la total inhibición que ejerce la droga cuando la internalización ocurre a pH fisiológico, indicando que el EIPA está actuando principalmente en el proceso de internalización.

En segundo lugar, confirmamos estos resultados en células tratadas con EIPA 60 min antes o 60 min después de la adsorción viral. La completa recuperación de la expresión de la proteína viral p72 cuando el inhibidor se añade 60 min después de la internalización, indica de manera concluyente que el EIPA está actuando durante los primeros 60 min de la infección sin afectar a otras etapas posteriores (**Figura 16E**), y por lo tanto, que los canales Na^+/H^+ , críticos en la consecución de la macropinocitosis, son fundamentales para la internalización del virus, reforzando los resultados obtenidos en los experimentos de FACS y CLSM.

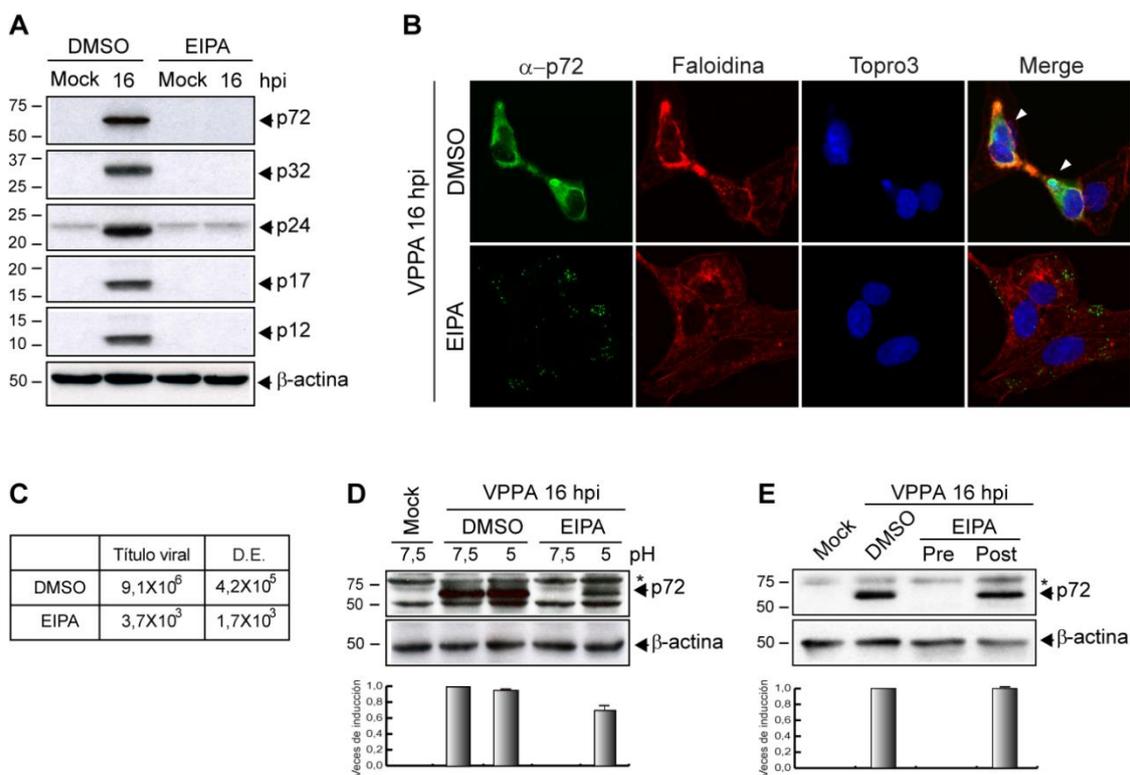


Figura 16. El tratamiento con EIPA no tiene efecto sobre etapas post-internalización en la infección del VPPA en células Vero. **A)** Análisis de la expresión de proteínas virales. Las células tratadas con DMSO o con 20 μM de EIPA se infectaron asincrónicamente con una MDI de 1 ufp/célula durante 16 h y los extractos totales se analizaron mediante *Western blot* con los anticuerpos policlonales anti-p72 y anti-VPPAt. **B)** Análisis del desarrollo de factorías virales. Tras el tratamiento con 20 μM de EIPA, las células se infectaron con una MDI de 5 ufp/célula durante 16 h y se incubaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina- TRITC y Topro3 para visualizar las factorías virales, los filamentos de actina y el ADN, respectivamente. Las imágenes de uno de los planos x-y fueron adquiridas mediante CLSM donde las puntas de flecha indican las factorías virales. **C)** Análisis de la producción viral. Los sobrenadantes de células tratadas con DMSO o con 20 μM de EIPA e infectadas con 1 ufp/célula se recogieron tras 48 h de infección y el número de virus infectivos se tituló mediante experimentos de plaqueo ($n = 3$, media \pm D.E). **D)** Ensayo de *by-pass* a pH ácido. Tras el tratamiento con DMSO o con 20 μM de EIPA durante 60 min, las células se infectaron con 1 ufp/célula en presencia de pH neutro (7,5) o pH ácido (5) y la adsorción viral tuvo lugar durante 90 min a 37°C. Posteriormente, las células se incubaron con medio a pH neutro durante 16 h y los extractos totales de células infectadas se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. **E)** El tratamiento con 20 μM de EIPA se realizó 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adición del virus y la expresión de la proteína viral p72 se analizó mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt a las 16 hpi (MDI de 1 ufp/célula). Las gráficas en D y E muestran las veces de inducción tras la densitometría de las bandas ($n=3$; media \pm D.E). La expresión de β -actina se analizó como control de carga. D.E. desviación estándar. *Proteínas celulares inespecíficas detectadas con los anticuerpos utilizados.

Puesto que todos estos experimentos se realizaron a partir de una preparación viral no purificada completamente, a la que llamamos PA (ver Materiales y Métodos), nos preguntamos si el tipo entrada empleada por el virus *in vitro* podría depender de la preparación viral utilizada. Por ello, realizamos el tratamiento de las células Vero con EIPA antes o después de la adsorción viral e infectamos a células con la preparación viral no purificada (Ba71V PA) y con una preparación viral purificada mediante gradiente de Percoll (Ba71V Percoll). Como muestra la **Figura 17**, tanto en un caso como en el otro, existe una completa reversión de la inhibición en los niveles de expresión de las proteínas virales cuando el EIPA se añade después de la internalización, indicando que los canales Na^+/H^+ son fundamentales para la entrada del VPPA independientemente del grado de pureza de la preparación viral utilizada y apunta a que, en ambos casos, la internalización depende de la macropinocitosis. Por este motivo, a lo largo de la presente Tesis Doctoral se utilizará en todos los experimentos la preparación viral Ba71V PA.

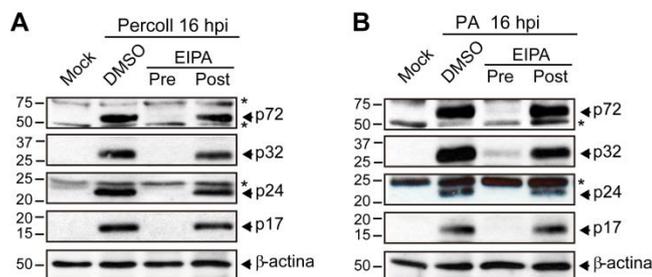


Figura 17. Los canales Na^+/H^+ son importantes en la entrada del VPPA independientemente del grado de purificación de la preparación viral. **A-B)** Las células Vero fueron tratadas con DMSO o con 20 μM EIPA durante 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adición de **A)** Ba71V Percoll o **B)** Ba71V PA a una MDI de 1 ufp/célula. Tras 16 h de infección, los extractos celulares se analizaron por *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt para analizar la expresión de proteínas virales. La expresión de β -actina se analizó como control de carga. Se muestra la imagen representativa de tres experimentos independientes. *Proteínas celulares inespecíficas detectadas con el anticuerpo utilizados.

4.2.3. Internalización del dextrano durante la entrada del VPPA

El dextrano, al igual que otros marcadores, es un trazador endosomal utilizado comúnmente en los estudios de endocitosis o entrada viral y se caracteriza porque su internalización transitoria se induce como consecuencia de la activación de la macropinocitosis (Jones, 2007; Kerr y Teasdale, 2009). Para estudiar si el VPPA estimula su internalización durante la entrada viral, las células Vero se trataron con EIPA durante 60 min y se infectaron durante 30 min o se estimularon con PMA como control positivo. Quince minutos antes de parar la infección, las células se incubaron con dextrano y posteriormente se analizó la endocitosis del trazador mediante FACS. Como indica la **Figura 18A**, la infección con el virus estimula la internalización del marcador endosomal y esta internalización se ve inhibida en presencia de EIPA, confirmando el papel específico del inhibidor. Además, demostramos que el VPPA internaliza en la célula activamente mediante macropinocitosis en experimentos de inmunofluorescencia donde se muestra la colocación entre las partículas virales y el dextrano durante la entrada viral (**Figura 18B**), indicando que el virus debe de utilizar las mismas vesículas endocíticas que el trazador durante los primeros estadios de tráfico endosomal.

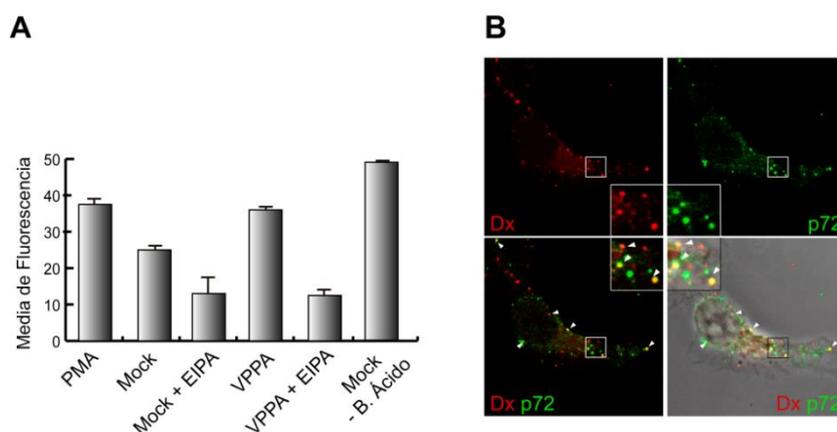


Figura 18. El VPPA activa la macropinocitosis y colocaliza con el dextrano durante su internalización en células Vero. **A)** Las células, tanto las infectadas (VPPA) como las mock, fueron tratadas con DMSO o con 60 μ M de EIPA durante 60 min, y posteriormente se realizó la infección de forma sincrónica con una MDI de 10 ufp/célula. En paralelo a la infección y como control positivo, las células se estimularon con 200 nM de PMA. Tras 15 min de infección o estimulación, las células se incubaron con dextrano-647 y a los 30 min la internalización de dextrano se analizó mediante FACS tras tratar a las células con buffer ácido ($n = 2$, media \pm D.E.). Como control de la efectividad del buffer, la internalización de trazador se midió en ausencia del tratamiento. **B)** Después de 30 min de infección asincrónica con una MDI de 2 ufp/célula, las células se incubaron con dextrano Texas-red durante otros 15 min y la inmunofluorescencia se realizó detectando a las partículas virales con el anticuerpo policlonal anti-p72. Las imágenes se adquirieron mediante CLSM y Normasky. Las puntas de flecha indican la colocación del dextrano con el virus.

En resumen, tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la macropinocitosis parece ser necesaria para la entrada del VPPA en las células Vero y que el virus internaliza activamente por dicho mecanismo endocítico.

4.3. EL VPPA INDUCE LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA DURANTE LA ENTRADA VIRAL

Como se ha explicado a lo largo de la Introducción, la reorganización de los filamentos de actina es fundamental para dirigir la formación de las perturbaciones de membrana en algunos procesos endocíticos como la macropinocitosis. El grado de dependencia a este componente del citoesqueleto varía en función del tipo de vía endocítica utilizada por el virus, y la internalización y/o endocitosis pueden verse afectadas en presencia de inhibidores farmacológicos específicos tal y como se ha descrito para VV (Mercer y col., 2010a), Ad2 (Li y col., 1998; Meier y col., 2002), Ébola (Nanbo y col., 2010), Citomegalovirus (HCMV) (Haspot y col., 2012), VSV (Cureton y col., 2009) y HSV (Clement y col., 2006; Greene y Gao, 2009), entre otros.

Basándonos en los resultados obtenidos en el Capítulo 1, donde se describe cómo el VPPA induce la formación de protrusiones de membrana durante la infección, nos propusimos analizar si la entrada viral depende de este componente del citoesqueleto. En general, los inhibidores farmacológicos Citocalasina D (Cito D) (Miranda y col., 1974a; Miranda y col., 1974b), Latrunculina A (Coue y col., 1987) y Jasplakinolide (Holzinger y Meindl, 1997), son usados comúnmente para estudios de entrada e internalización viral, diferenciándose entre ellos en el modo en el que impiden la polimerización de nuevos filamentos de actina.

4.3.1. Efecto de la inhibición de la dinámica del citoesqueleto de actina en la entrada del VPPA

Para analizar si la entrada del virus depende de la dinámica de los filamentos de actina, estudiamos la internalización viral en presencia del inhibidor farmacológico Cito D. Este compuesto se une al extremo positivo del filamento F e impide la adición de monómeros de actina G inhibiéndose la polimerización (Sampath y Pollard, 1991). Las células Vero se trataron con Cito D a una concentración no tóxica de 8 μM (**Tabla Anexo 1**) y la internalización del VPPA se analizó a 60 mpi mediante FACS, marcando las partículas virales con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3. Como se muestra en la **Figura 19A**, la internalización viral fue en torno a un 50 % menor en presencia del inhibidor farmacológico. Además, estos resultados fueron coincidentes con los datos obtenidos tras el contaje automatizado de las partículas virales internalizadas en células infectadas en presencia del inhibidor farmacológico, a partir de las imágenes adquiridas mediante CLSM (**Figura 19B**).

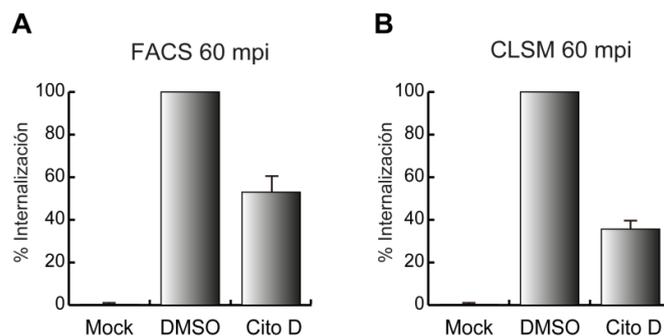


Figura 19. La dinámica de los filamentos de actina es fundamental para la internalización del VPPA en células Vero. A-B) Tras el tratamiento con DMSO u 8 μ M de Cito D, las células fueron infectadas sincrónicamente con 10 ufp/célula durante 60 min. Las partículas virales se detectaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y el porcentaje de internalización viral se analizó **A)** mediante FACS (n=3, cada uno realizado por duplicado; media \pm D.E.), o **B)** mediante la cuantificación automática del número de partículas virales en cada uno de los planos celulares seriados (eje x-y) adquiridos mediante CLSM. En este caso, la inmunofluorescencia también se realizó con faloidina-TRITC y Topro3 para determinar el límite celular. La gráfica muestra el porcentaje medio de internalización viral respecto a la muestra DMSO control resultado del contaje de 100 células por condición (n=3; media \pm D.E.). D.E., desviación estándar; Cito D, Citocalasina D.

4.3.2. Efecto de la inhibición de la dinámica del citoesqueleto de actina en la infección del VPPA

El análisis de la expresión de las proteínas virales se realizó mediante *Western blot* en células Vero tratadas con Cito D a una concentración no tóxica de 4 μ M (**Tabla Anexo 1**) e infectadas durante 16 h. Como muestra la **Figura 20A**, los niveles de expresión de todas las proteínas virales analizadas fueron significativamente menores cuando la infección tuvo lugar en presencia del inhibidor farmacológico, siendo en principio, la consecuencia directa de la menor internalización mostrada en el apartado anterior cuando la dinámica del citoesqueleto se ve comprometida.

Es importante señalar que la inhibición en la síntesis de la proteína p32 no fue tan pronunciada cuando las células se trataron con Cito D después de permitir la internalización viral, reafirmando que el citoesqueleto de actina desempeña un papel importante durante los primeros 60 min de infección (**Figura 20B**). No obstante, y aunque en menor medida, la expresión de la proteína también se ve afectada cuando la droga se añade tras 60 mpi, sugiriendo que la dinámica del citoesqueleto de actina además de ser importante para la entrada viral, también podría serlo en pasos posteriores de la infección.

En línea con estos resultados, tanto el número de factorías virales analizadas a las 16 hpi (**Figura 20C**) como la producción viral tras 48 hpi (**Figura 20D**), fue considerablemente menor en presencia Cito D, indicando que el citoesqueleto de actina es un factor fundamental en la consecución de la infección del VPPA en diferentes etapas de la misma.

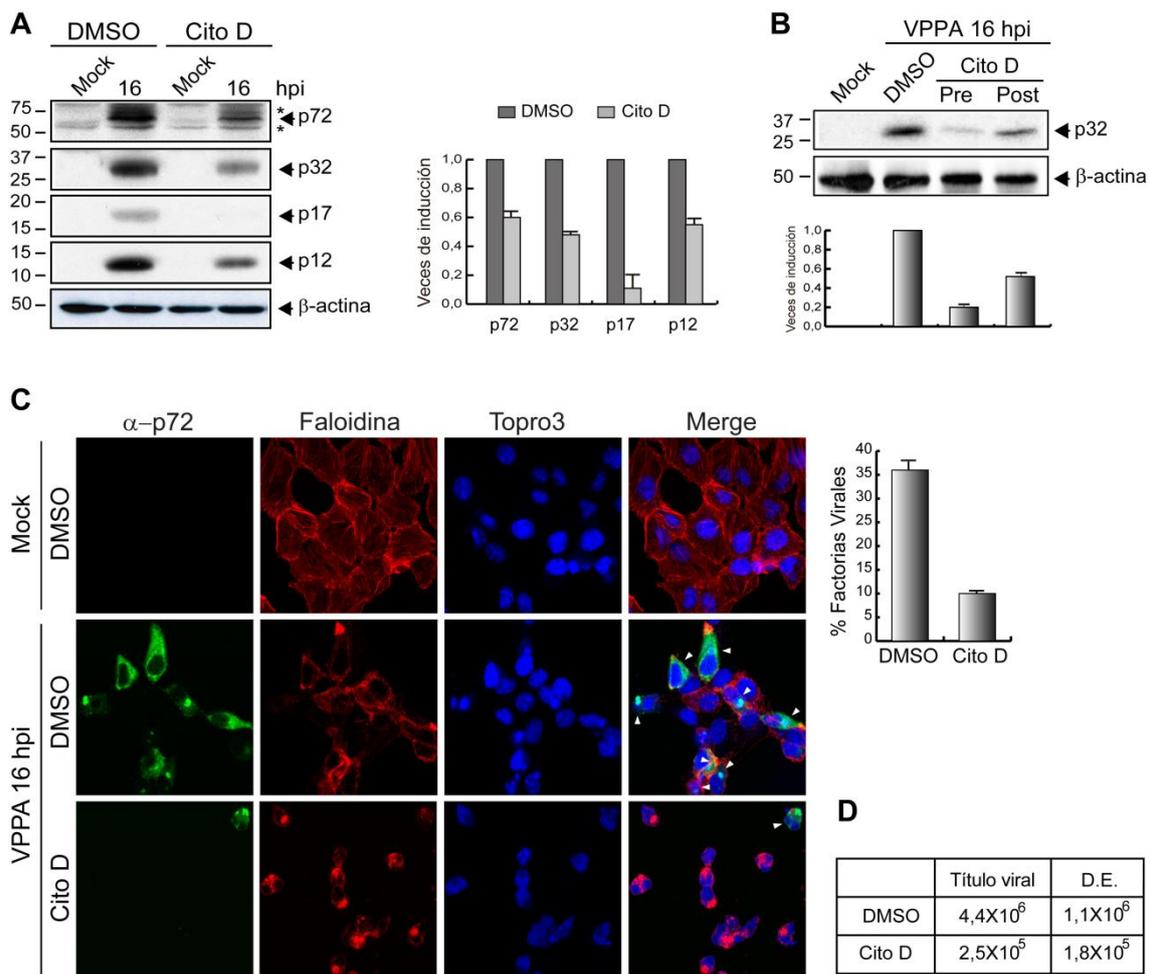


Figura 20. La dinámica del citoesqueleto de actina es importante para la infección del VPPA en células Vero. **A)** Análisis de la expresión de proteínas. Las células tratadas con DMSO o con $4 \mu\text{M}$ de Cito D se infectaron asincrónicamente con una MDI de 1 ufp/célula durante 16 h y los extractos totales se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. El análisis densitométrico se muestra en la gráfica de la derecha donde la expresión de cada proteína viral se representa respecto a la obtenida en las células DMSO control ($n=3$; media \pm D.E.). **B)** El tratamiento con $4 \mu\text{M}$ de Cito D se realizó 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adición del virus con una MDI de 1 ufp/célula, y los extractos celulares se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt a 16 hpi. La gráfica representa el análisis densitométrico ($n=2$; media \pm D.E.). **C)** Análisis de factorías virales. Tras el tratamiento con $4 \mu\text{M}$ de Cito D las células se infectaron de forma asincrónica con una MDI de 5 ufp/célula durante 16 h y se incubaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina-TRITC y Topro3 para marcar las factorías virales, los filamentos de actina y el ADN, respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas mediante CLSM; las puntas de flecha indican las factorías virales. El porcentaje de las factorías virales contabilizadas en 100 células por condición se representa en la gráfica de la derecha ($n=3$, media \pm D.E.). **D)** Análisis de la producción viral. Los sobrenadantes de células incubadas con DMSO o $4 \mu\text{M}$ Cito D e infectadas asincrónicamente con 1 ufp/célula se recogieron tras 48 h de infección y el número de virus infectivos se tituló mediante experimentos de plaqueo ($n=3$, media \pm D.E.). Los niveles de β -actina se analizaron como control de carga. D.E., desviación estándar. Cito D, Citocalasina D. *Proteínas celulares inespecíficas detectadas con los anticuerpos utilizados.

4.3.3. Reestructuración del citoesqueleto de actina durante la entrada del VPPA

Tras confirmar la importancia que tiene la dinámica del citoesqueleto de actina en la internalización del virus, nos propusimos analizar si la infección provoca cambios en la distribución de los filamentos de actina para así dirigir la formación de las protrusiones de membrana observadas y descritas en el Capítulo 1 del presente estudio.

A los tiempos post-infección indicados se analizó la distribución del citoesqueleto de actina mediante CLSM marcando los filamentos con la sonda faloidina. En la **Figura 21A** se observa cómo la distribución filamentosa típica de este componente del citoesqueleto se pierde cuando las células son infectadas, advirtiéndose un cambio en el patrón estructural. Para reforzar estos datos, las células se transfectaron con el plásmido de expresión pEGFP-actina y las células infectadas se analizaron, al igual que antes, a los 10 y 30 mpi. Como muestra la **Figura 21B**, durante la infección, la actina-GFP se distribuye en forma de agregados a diferencia de su distribución en las células control donde se encuentra en estructuras filamentosas. En ambos casos, encontramos partículas virales coincidentes con estos agregados del citoesqueleto, y puesto que se ha descrito que los *blebs* y *ruffles* están enriquecidos en actina, Rac1 y cortactina (Charras y col., 2006; Mercer y Helenius, 2008), es probable que estos acúmulos correspondan a zonas activas de la membrana donde el virus induce las perturbaciones típicas del proceso de macropinocitosis.

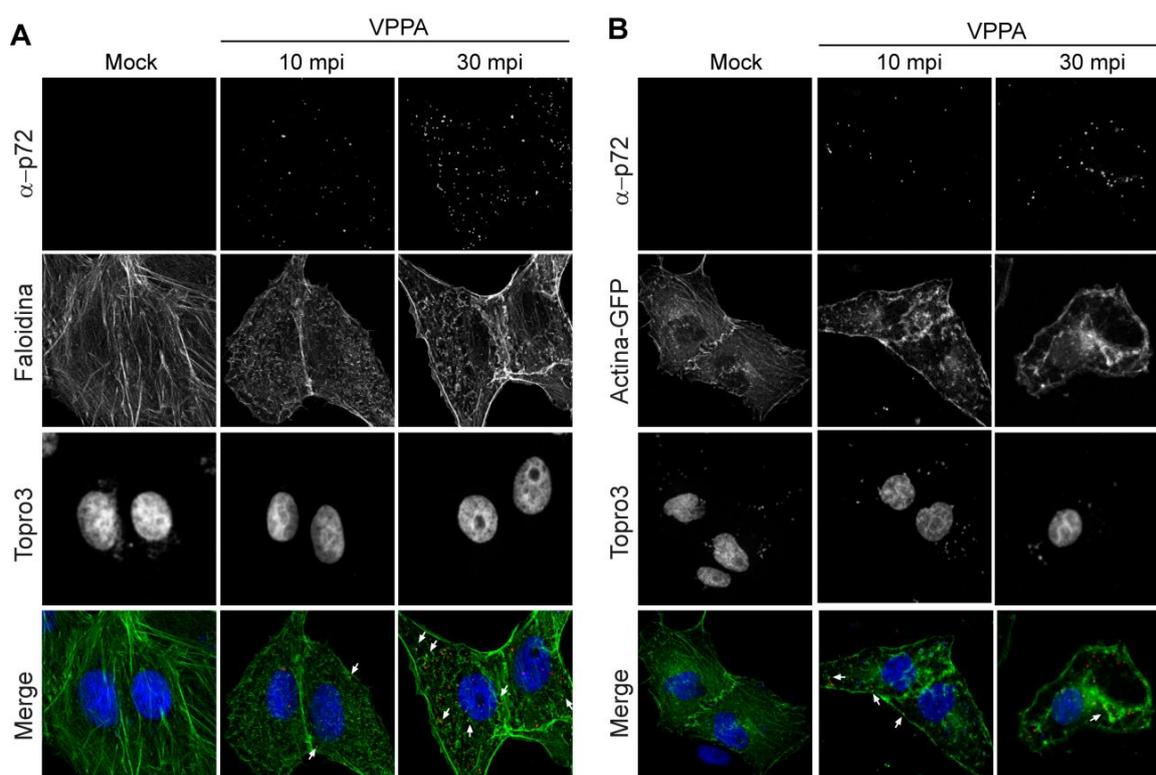


Figura 21. La entrada del VPPA induce la restructuración del citoesqueleto de actina en células Vero. A) Las células fueron infectadas con una MDI de 50 ufp/célula o B) transfectadas con el plásmido EGFP-actina durante 16 h e infectadas a la misma MDI. En ambos casos, las células se fijaron a los tiempos post-infección indicados desde la adición del virus y la inmunofluorescencia se realizó con faloidina-488 (A), anti-p72 y Topro3 (A y B) para visualizar los filamentos de actina, las partículas virales y el núcleo, respectivamente. Las imágenes representan la máxima proyección en z de los diferentes planos tomados en el eje horizontal mediante CLSM.

4.3.4. Papel del sistema de microtúbulos durante la infección con el VPPA

Otro componente del citoesqueleto que juega un papel importante en los procesos de entrada viral es el sistema de microtúbulos, aunque la función que desempeña en la entrada por macropinocitosis no está del todo clara (Mercer y col., 2010b). Respecto a la infección con el VPPA se ha descrito que el nocodazol, un inhibidor específico del sistema de microtúbulos (Vasquez y col., 1997), no afecta a la replicación viral (Jouvenet y col., 2004). Sin embargo, otro trabajo defiende que el tratamiento con el inhibidor produce una disminución en la expresión de las proteínas virales tardías p72 y p12, pero no en la expresión de proteínas tempranas como p32 (Heath y col., 2001). Basándonos en estos datos previos, todo apunta a que el sistema de microtúbulos no parece tener un papel relevante en la entrada del VPPA, y para confirmarlo, analizamos la expresión de las proteínas virales a 16 hpi en células tratadas con diferentes concentraciones de nocodazol no tóxicas para la célula (**Tabla Anexo 1**). Como muestra la **Figura 22**, la perturbación del sistema de microtúbulos no tiene efecto en los niveles de expresión de la proteína viral temprana p32, indicando que no es importante para etapas tempranas de la infección, pero si lo tiene en la expresión de las proteínas tardías p72 y p12, coincidiendo con los trabajos previamente publicados.

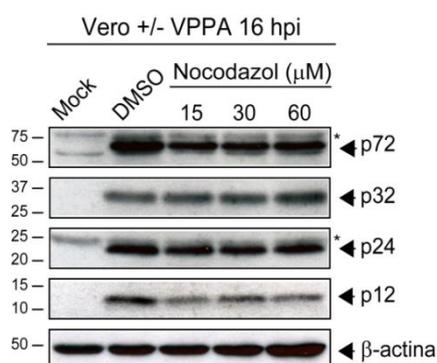


Figura 22. El sistema de microtúbulos no participa en la entrada del VPPA en células Vero. El tratamiento con Nocodazol a diferentes concentraciones se realizó durante 60 min antes de la infección asincrónica con una MDI de 1ufp/célula. Tras 16 h de infección, los extractos celulares fueron analizados mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. La expresión de β-actina se analizó como control de carga. D.E., desviación estándar. *Proteínas celulares inespecíficas detectadas con el anticuerpo utilizado.

4.4. LA INFECCIÓN DEL VPPA ACTIVA LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DEL EGFR Y DE LA PI3K

Como se ha descrito en Introducción, el inicio de la entrada por macropinocitosis depende, generalmente, de la estimulación externa asociada a factores de crecimiento que dirigen la activación de receptores tirosina quinasas (RTKs). Estos receptores activan rutas de señalización que controlan la dinámica del citoesqueleto de actina induciendo cambios en la morfología de la membrana plasmática para finalmente, formar las perturbaciones de membrana características. Debido al papel que desempeñan estas proteínas quinasas en la macropinocitosis, nos propusimos analizar si el receptor del factor de crecimiento (EGFR) y la ruta de señalización de la PI3K juegan algún papel en la infección del VPPA, pues se sabe que ambos factores están implicados en la internalización e infección de otros virus (Cooray, 2004; Mercer y Helenius, 2008; Mercer y col., 2010a; Saeed y col., 2008; Wang y col., 2003).

4.4.1. Papel del EGFR en la entrada del VPPA

La señalización mediada por el EGFR tras la unión de su ligando, el factor de crecimiento epitelial (EGF) fue uno de los primeros estímulos que se describieron como inductores de macropinocitosis en células de carcinoma A431 (Haigler y col., 1979). Entre los sistemas virales dependientes de esta señalización se ha descrito a HCMV y VV. En el primer caso, parece que el EGFR es esencial en la inmunopatología del HCMV promoviendo la entrada viral en monocitos y la motilidad celular (Chan y col., 2009). Asimismo, la infección de células Hela con diferentes aislados de VV estimula fuertemente la activación del EGFR durante la primera hora de infección, siendo este proceso imprescindible para la internalización viral (Mercer y col., 2010a).

Para evaluar si la entrada del VPPA depende de la señalización dirigida por el EGFR, analizamos, en primer lugar, la internalización viral en células Vero tratadas con diferentes concentraciones no tóxicas de un inhibidor específico del receptor (324674) (**Tabla Anexo 1**). Como muestra la **Figura 23A**, el porcentaje de internalización a los 60 min de infección fue considerablemente menor en presencia del inhibidor farmacológico, en comparación con las células tratadas con DMSO. En línea con estos resultados, en la misma figura se muestra que la internalización viral depende de la actividad de proteínas tirosina quinasas pues su inhibición con genisteína (Akiyama y col., 1987) reduce la entrada viral de manera dosis dependiente, apuntando a la importancia de este tipo de quinasas para la señalización que dirige la entrada del virus.

Puesto que se ha descrito que la activación del EGFR durante la macropinocitosis es un proceso rápido dependiente de fosforilación (Haigler y col., 1979; Mercer y col., 2010a), analizamos si durante los primeros estadios de la infección el virus activa a dicho receptor. Para ello, las células Vero fueron cultivadas durante 3 h en ausencia de FBS, se infectaron de forma sincrónica y a los 10 mpi se analizó la fosforilación del receptor mediante FACS con un fosfoanticuerpo específico frente al residuo Tirosina 1068. Como muestra la **Figura 23B**, el VPPA fosforila al EGFR durante su internalización en la célula huésped, pudiendo ser esta temprana activación uno de los factores que dirige la señalización necesaria para la entrada del virus. Asimismo, como control positivo de la fosforilación del receptor las células se estimularon con 20% de FBS, y como control de la infección viral las partículas virales se detectaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3.

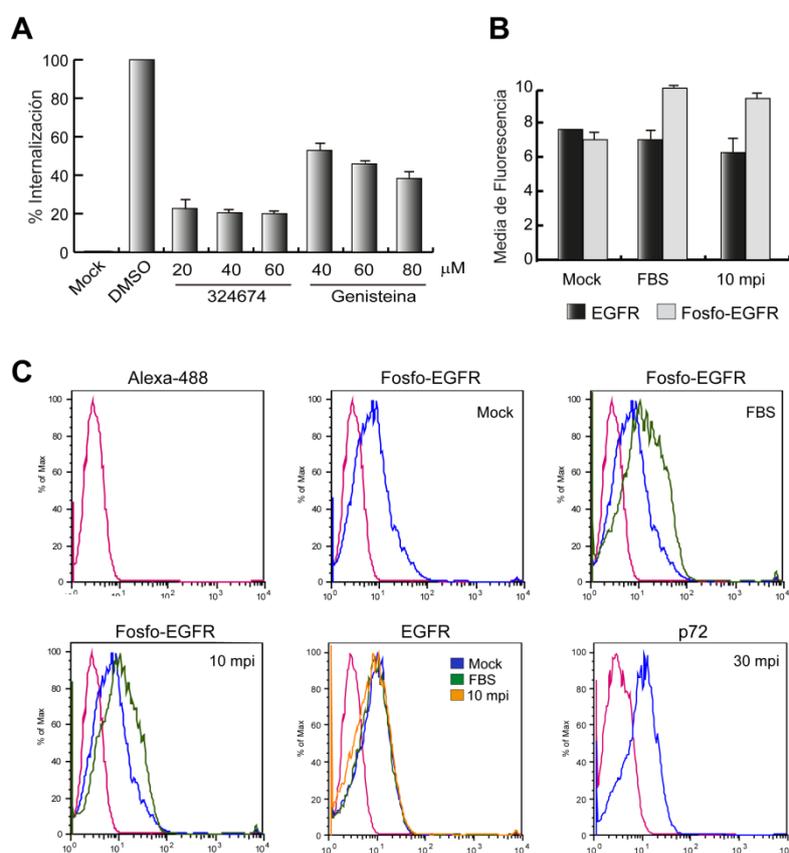


Figura 23. La activación del EGFR es importante durante la internalización del VPPA en células Vero. A) La internalización viral se analizó en células tratadas con el inhibidor del EGFR (324674) o Genisteína e infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula. Las partículas virales se detectaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 mediante FACS. La gráfica representa el porcentaje medio de internalización viral respecto a las células DMSO control (n=3, realizados por duplicado; media ± D.E.). **B-C)** Las células se cultivaron en ausencia de FBS durante 3 h y la fosforilación del EGFR se analizó mediante FACS con un anti-EGFR Tirosina 1068 tras la infección sincrónica con 10 ufp/célula o la estimulación con 20% de FBS durante 10 min. Los niveles de EGFR se analizaron como control de expresión y como control de la infección las partículas virales se detectaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3. La gráfica representa la intensidad media de fluorescencia (B) y abajo se muestran los histogramas correspondientes de un experimento (n=2; media ± D.E.). D.E., desviación estándar.

4.4.2. Activación de la ruta de señalización de la PI3K durante la entrada e infección del VPPA

La ruta de señalización dirigida por la PI3K regula numerosos procesos celulares implicados en la replicación, el crecimiento celular, la proliferación y la síntesis de proteínas. Además, desempeña un papel importante durante la macropinocitosis mediante la participación de sus efectores en la modulación del citoesqueleto de actina, controlando la formación de protrusiones de membrana y/o macropinosomas (Araki y col., 2007; Araki y col., 1996; Hawkins y col., 2006). Asimismo, es un factor fundamental en el tráfico y biogénesis de los endosomas, regulando las etapas post-internalización durante el proceso de endocitosis (Lindmo y Stenmark, 2006).

Durante años, numerosos trabajos han demostrado cómo los virus han desarrollado la capacidad para modular esta ruta de señalización celular la cual articula, en parte, el ciclo infectivo mediante el control de diferentes etapas (Buchkovich y col., 2008; Cooray, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que la actividad de la PI3K es fundamental para virus como VV (Mercer y Helenius, 2008), Ébola (Saeed y col., 2008), FLUAV (Rossman y col., 2012) o el Virus del papiloma Humano (HPV) (Schelhaas y col., 2012), pues su inhibición impide la entrada y/o infección viral.

Para investigar la importancia de esta ruta de señalización durante la consecución de los eventos tempranos de la infección del VPPA, analizamos la activación de la PI3K mediante dos aproximaciones experimentales diferentes. En primer lugar, las células Vero fueron tratadas con DMSO o con el inhibidor farmacológico LY294002 (LY), que inhibe de forma específica la actividad de la PI3K (Walker y col., 2000), e infectadas asincrónicamente con un periodo de adsorción de 60 min. Posteriormente, a diferentes tiempos post-infección, la PI3K fue inmunoprecipitada de los extractos celulares infectados y su actividad quinasa se cuantificó *in vitro* como la capacidad de fosforilar a su sustrato, el $PI(4,5)P_2$, produciendo $PI(3,4,5)P_3$. Como muestra la **Figura 24A**, tras la internalización viral hay un ligero incremento de la actividad quinasa que alcanza su nivel máximo a los 30 mpi y se inhibe en presencia de LY, indicando, por tanto, que el aumento de los niveles de $PI(3,4,5)P_3$ es consecuencia de la activación específica de la PI3K durante la infección. No obstante, este sutil incremento podría no ser suficiente para aseverar la implicación de la PI3K en los primeros estadios de la infección, por lo que para obviar este inconveniente, nos planteamos analizar la activación de la PI3K mediante una estrategia alternativa. En este caso, analizamos la fosforilación de la quinasa Akt pues es el mayor efector de esta ruta de señalización y su fosforilación, consecuencia directa de la producción de $PI(3,4,5)P_3$, es utilizada, normalmente, como el principal sensor de los niveles de activación de la PI3K; aunque existen varios residuos susceptibles de ser fosforilados, la fosforilación de la Treonina 308 y de la Serina 473 son los que controlan, en último término, la

activación de Akt (Alessi y col., 1996; Bayascas y Alessi, 2005; Sarbassov y col., 2005). Para este análisis, los extractos de células Vero infectadas se recogieron a diferentes tiempos post-infección tras 60 min de adsorción asincrónica y se analizaron mediante *Western Blot* con un anticuerpo fosfoespecífico frente la Serina 473. La **Figura 24B** muestra cómo a partir de los 5 mpi se detecta la fosforilación de Akt induciéndose fuertemente a los 30 mpi. Los niveles de fosforilación parecen disminuir después de 2:30 h desde la adición del virus (90 mpi), sugiriendo que puede haber diferentes estadios de activación de la quinasa según las necesidades de cada una de las etapas virales, tal y como se ha descrito para otros virus (Soares y col., 2009). Este resultado apoya la discreta activación de PI3K mostrada en la **Figura 24A**, corroborando que durante los primeros estadios de la infección del VPPA se activa la ruta de señalización PI3K-Akt.

A continuación, para conocer si la activación de la PI3K ocurre estrictamente durante el proceso de entrada viral, analizamos la fosforilación de Akt durante los primeros 60 min de internalización viral tras realizar la infección de forma sincrónica. El *Western blot* de la **Figura 24C** muestra cómo el virus estimula fuertemente la fosforilación de la quinasa, y por tanto, la actividad de PI3K durante los primeros 30 min de internalización, siendo esta activación uno de los requisitos clave para estimulación de la macropinocitosis. La disminución que se observa a los 60 mpi coincide con los bajos niveles de fosforilación obtenidos a los 5 mpi en la infección sincrónica, sugiriendo de nuevo, que puede existir un control temporal sobre la actividad de la quinasa durante las primeras etapas de la internalización del VPPA.

Además del papel fundamental que la ruta PI3K-Akt juega durante los primeros estadios de la infección viral, esta ruta de señalización también es fundamental para el progreso de la infección al controlar la maquinaria celular de traducción de proteínas (Buchkovich y col., 2008; Soares y col., 2009). Por ello, y para evaluar si la activación de Akt se mantiene en estadios más avanzados durante la infección con el VPPA, analizamos la fosforilación de la quinasa a 3 y 16 horas post-infección tanto en el residuo Serina 473 como en el residuo Treonina 308. Los resultados obtenidos indican que el virus induce una fuerte activación de Akt a tiempos tempranos de infección, cuando todavía no ha comenzado la replicación viral, y que esta disminuye de manera significativa a tiempos tardíos cuando el ADN viral ya ha replicado (**Figura 24D**). Esta disminución a tiempos tardíos post-infección es coincidente con la activación de la apoptosis observada a partir de las 14 h durante la infección con el VPPA (Nogal y col., 2001), siendo además, una señal anti-proliferativa necesaria para el correcto avance del ciclo viral.

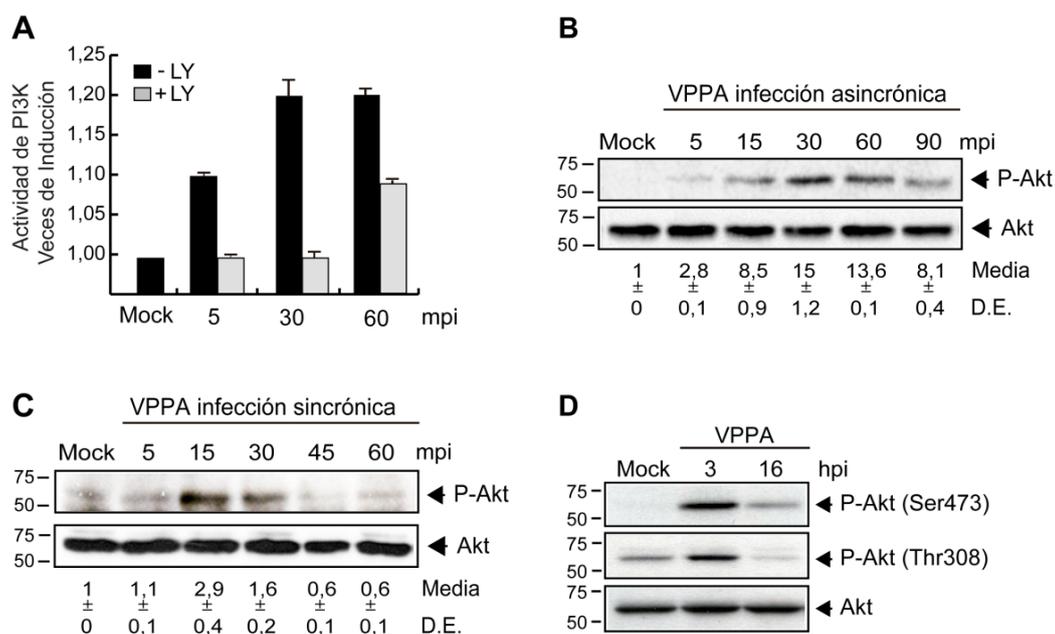


Figura 24. El VPPA activa la ruta de señalización PI3K durante la entrada e infección viral en células Vero. A) Las células se incubaron con DMSO o con 60 μ M de LY294002 y se infectaron asincrónicamente (período de adsorción 60 min) con una MOI de 10 ufp/célula. A diferentes tiempos de infección se inmunoprecipitó la PI3K de los extractos celulares y su actividad quinasa se analizó mediante un ensayo de ELISA. La gráfica representa la producción de PI (3,4,5) $_3$ respecto las células mock control (n=2; media \pm D.E.). **B-C)** Tras 24 h de cultivo en ausencia de FBS, las células se infectaron (B) asincrónicamente (adsorción 60 min) o (C) sincrónicamente con 10 ufp/célula, y el nivel de fosforilación de Akt se determinó mediante *Western blot* con una anticuerpo específico frente a la Serina 473. El análisis densitométrico de las bandas se muestran en la parte inferior donde los valores se representan en relación a las células mock (n=3; media \pm D.E.). **D)** Los niveles de fosforilación de Akt se analizaron mediante *Western blot* con los anticuerpos específicos contra la Serina 473 (Ser473) y Treonina 308 (Tre308) tras ser las células infectadas asincrónicamente con 5 ufp/célula. El nivel de expresión de Akt se analizó como control de expresión de la proteína. D.E., desviación estándar.

Por tanto, la activación transitoria de Akt durante las diferentes etapas del ciclo viral sugiere que durante la infección existe un importante control temporal sobre esta ruta de señalización, lo cual podría ser necesario para asegurar la síntesis de las proteínas virales durante los primeros estadios de la infección y permitir, posteriormente, que la célula entre en apoptosis favoreciendo así la diseminación viral y evitando, parcialmente, la respuesta inmune.

4.4.3. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la entrada e infección del VPPA

Una vez demostrado que el VPPA activa la ruta de señalización celular PI3K-Akt, nos propusimos analizar si la inhibición de la PI3K afecta a la entrada e infección del virus.

En primer lugar, examinamos la internalización viral en células Vero en presencia del inhibidor farmacológico LY. Después de tratar a las células con DMSO o LY a una concentración no tóxica de 60 μM (**Tabla Anexo 1**), las partículas virales se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-p72 17LD3 y el porcentaje de internalización viral se analizó a los 60 mpi mediante FACS o mediante el contaje automatizado de las partículas virales a partir de las imágenes adquiridas de los planos celulares mediante CLSM. Las **Figuras 25A** y **25B** muestran cómo en presencia del inhibidor farmacológico la internalización viral se reduce en torno a un 50% en comparación con las células tratadas con DMSO. Estos resultados, junto con la activación temprana mostrada en el apartado anterior, demuestran que la PI3K está implicada en la entrada e internalización del VPPA.

A continuación, estudiamos el efecto que, consecuentemente, podía tener la inhibición de la PI3K sobre la expresión de proteínas virales. Para ello, las células Vero se trataron con el inhibidor farmacológico a una concentración no tóxica de 20 μM (**Tabla Anexo 1**) y la infección se permitió durante 3 y 16 horas. El análisis de los niveles de expresión de las proteínas virales mediante *Western blot* revela que la inhibición de la quinasa impide la expresión tanto de proteínas virales tempranas (p32), como de proteínas virales tardías (p72), aun cuando a tiempos tardíos no se detecta fosforilación de Akt (**Figura 25C**). Estos resultados sugieren que para el correcto avance del ciclo viral se requiere la activación de Akt a tiempos tempranos, lo que redundaría en la replicación viral y, por tanto, en la expresión de proteínas virales tardías.

El control que ejerce la ruta de señalización PI3K-Akt en el progreso de la infección se verificó cuando analizamos el desarrollo de factorías virales en células Vero infectadas durante 16 h en presencia de LY, obteniendo un dramático descenso de las mismas en presencia del inhibidor farmacológico (**Figura 25D**). Asimismo, la producción viral obtenida fue considerablemente menor cuando la infección tuvo lugar en ausencia de PI3K activa (**Figura 25E**).

Tomados en conjunto, estos datos nos indican que la señalización celular controlada por la ruta PI3K-Akt es activada por el VPPA tanto durante la internalización viral, como a tiempos tempranos de infección. Es interesante señalar que estos resultados conectan con un trabajo previo del laboratorio en el que se describe cómo el virus regula la maquinaria de traducción celular para asegurarse la expresión de sus propias proteínas (Castello y col., 2009), y puesto que esta maquinaria está regulada por PI3K-Akt, parece lógico pensar que el virus dirija su

activación durante los primeros estadios de la infección para que se expresen ciertos factores virales y celulares que, probablemente, participarán en el control de las etapas tardías de la infección.

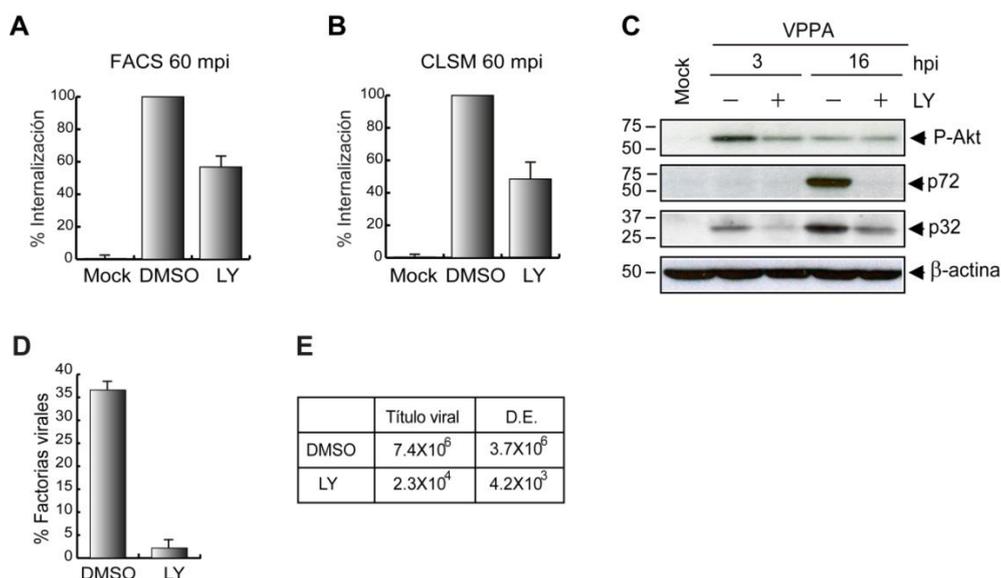


Figura 25. La actividad de PI3K es fundamental para la entrada e infección del VPPA en células Vero. A-B) Análisis de la internalización viral. Tras el tratamiento con DMSO o con 60µM de LY, las células fueron infectadas sincrónicamente con 10 ufp/célula durante 60 min. Las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y el porcentaje de internalización viral se analizó **A)** mediante FACS (n=4, cada uno realizado por duplicado; media ± D.E.), o **B)** mediante la cuantificación automática en el programa Image J a partir de cada uno de los planos seriados de la célula adquiridos por CLSM. En este caso, la inmunofluorescencia también se realizó con faloidina-TRITC y Topro3. La gráfica muestra el porcentaje medio de internalización viral respecto a la muestra DMSO control resultado del conteo de 100 células por condición (n=3; media ± D.E.). **C)** Análisis de la expresión de proteínas virales. Las células tratadas con DMSO o con 20µM de LY fueron infectadas asincrónicamente (adsorción 90 min) a una MDI de 5ufp/célula. La expresión de proteínas virales se analizó mediante *Western blot* con los anticuerpos específicos anti-p32 y anti-p72 a los tiempos indicados. La fosforilación de Akt se analizó como control del tratamiento y la expresión de β-actina como control de carga. **D)** La formación de factorías virales se analizó en células tratadas con DMSO o 20µM de LY tras 16 h de infección con una MDI de 5ufp/célula. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina-TRITC y Topro3 para marcar las factorías virales, los filamentos de actina y el ADN, respectivamente y se analizaron mediante CLSM. La gráfica representa el porcentaje de las factorías virales contabilizadas en 100 células por condición (n=3; media ± D.E.). **E)** La producción viral se analizó en sobrenadantes de células tratadas con DMSO o con 4 µM Cito D e infectadas con 1 ufp/célula tras 48 h de infección (n = 3, media ± D.E). D.E., desviación estándar. LY, LY294002.

4.5. EL VPPA REGULA LA GTPasa RAC1 DURANTE SU ENTRADA EN LA CÉLULA

Como se ha explicado detalladamente en Introducción, Rac1 es uno de los elementos clave para orquestar la entrada por macropinocitosis controlando el *ruffling* (Ridley y col., 1992), y su activación es imprescindible para la entrada e internalización de virus como VV (Mercer y Helenius, 2008; Mercer y col., 2010a), Ad (Amstutz y col., 2008; Li y col., 1998), Ébola (Saeed y col., 2008) y FLUAV (de Vries y col., 2011), entre otros. Para evaluar la posibilidad de que este factor fuera necesario en la entrada e infección del VPPA, analizamos tanto la activación de Rac1 durante la entrada viral, como la dependencia de la infección a su actividad GTPasa.

4.5.1. Activación de Rac1 durante la internalización del VPPA

Debido a que el control que ejerce Rac1 sobre la macropinocitosis está mediado por la activación de Pak1 tal como se explicó anteriormente, los ensayos utilizados comúnmente para estudiar la activación de la GTPasa están dirigidos a analizar la unión de Rac1-GTP con la región PBD de Pak1, pues sólo en su conformación activa Rac1 se puede unir a este dominio de Pak1 (Chong y col., 2001; Manser y col., 1994).

En primer lugar, para analizar si el VPPA induce la activación de Rac1 durante la entrada viral, las células Vero se infectaron sincrónicamente y los niveles de activación de Rac1 se analizaron a diferentes tiempos post-internalización mediante un ensayo de G-ELISA cuantificando la cantidad de Rac1-GTP activa en lisado celular, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en la **Figura 26A** muestran que durante la entrada del virus, Rac1 se activa fuertemente alcanzando el pico de máxima actividad a los 10 mpi. Otra forma alternativa de analizar la activación de Rac1 durante la entrada viral fue la realización un ensayo de *pull-down* de los extractos infectados utilizando esferas de agarosa que tienen unida la región PBD de la proteína Pak1; la fracción celular unida se analizó mediante *Western blot* con un anticuerpo específico frente a Rac1. Como se muestra en la **Figura 26B**, la forma activa de Rac1 unida al dominio de Pak1 (Rac1-GTP) se detecta, igualmente, a partir de los 10 mpi, reafirmando que la infección induce la activación de la GTPasa durante los primeros estadios de la entrada viral.

Esta activación rápida y transitoria es coincidente con los datos obtenidos en los anteriores capítulos del presente trabajo, donde se describe que la formación de *ruffles*, la perturbación del citoesqueleto de actina así como la activación de PI3K y EGFR son procesos

claramente visibles durante los primeros 30 min de internalización viral, corroborando que la macropinocitosis es un proceso regulado por el virus para entrar en la célula.

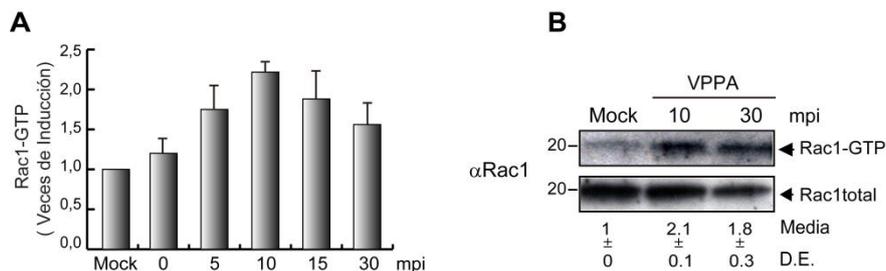


Figura 26. El VPPA activa a Rac1 durante su internalización en células Vero. **A)** Las células fueron cultivadas durante 24 h sin FBS, infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula y a los tiempos indicados se analizó la activación de Rac1 mediante **A)** un ensayo de G-ELISA (n=3; media ± D.E) y **B)** un *pull down* de los extractos celulares incubados con la región PBD de Pak1. Los niveles de Rac1-GTP unido al PBD y los de Rac1 en los extractos totales se detectaron mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-Rac1. Los valores obtenidos tras el análisis densitométrico se muestra en la parte inferior en relación a la muestra mock control (n=2; media ± D.E). D.E., desviación estándar.

4.5.2. Distribución de Rac1 durante la infección del VPPA

Además de controlar la formación de *blebs* y *ruffles*, se ha descrito que Rac1 puede localizarse en estas protrusiones de membrana durante el proceso de macropinocitosis (Kraynov y col., 2000; Mercer y Helenius, 2008). Para examinar si esto ocurría durante la entrada del VPPA, las células Vero se transfectaron con el plásmido de expresión EGFP-Rac1 y se infectaron sincrónicamente. La distribución y localización de Rac1 se analizó durante los primeros 30 min de infección mediante CLSM, y las partículas virales se visualizaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y el núcleo con Topro3. El análisis de uno de los planos celulares muestra que en las células mock, Rac1 se distribuye a lo largo del citoplasma agrupándose en algunas zonas de la membrana plasmática sin presentar apenas una morfología definida. Por el contrario, el patrón de distribución de Rac1 es claramente diferente en las células infectadas. En este caso, Rac1 se localiza principalmente en visibles estructuras de membrana con apariencia compatible con *ruffles* donde, en algunos casos, se encuentran además partículas virales que, posiblemente, vayan a entrar en la célula (**Figura 27A**). No sólo esto, sino que cuando se analizó la máxima proyección en z de diferentes planos adquiridos de las células infectadas (eje x-y), se observa un aumento generalizado en la agrupación de Rac1 en pequeñas estructuras (**Figura 27B**), similares al patrón de distribución que obtuvimos cuando analizamos la restructuración de los filamentos de actina mostrada en la **Figura 21**.

Estos resultados demuestran que la infección con el VPPA induce un fuerte cambio de distribución de Rac1 en la célula desde los primeros minutos de internalización viral, lo cual, junto con la activación de la GTP-asa durante la entrada, así como la coincidente activación del

citoesqueleto de actina, sugieren que Rac1 se localiza en zonas activas de macropinocitosis durante la entrada del virus.

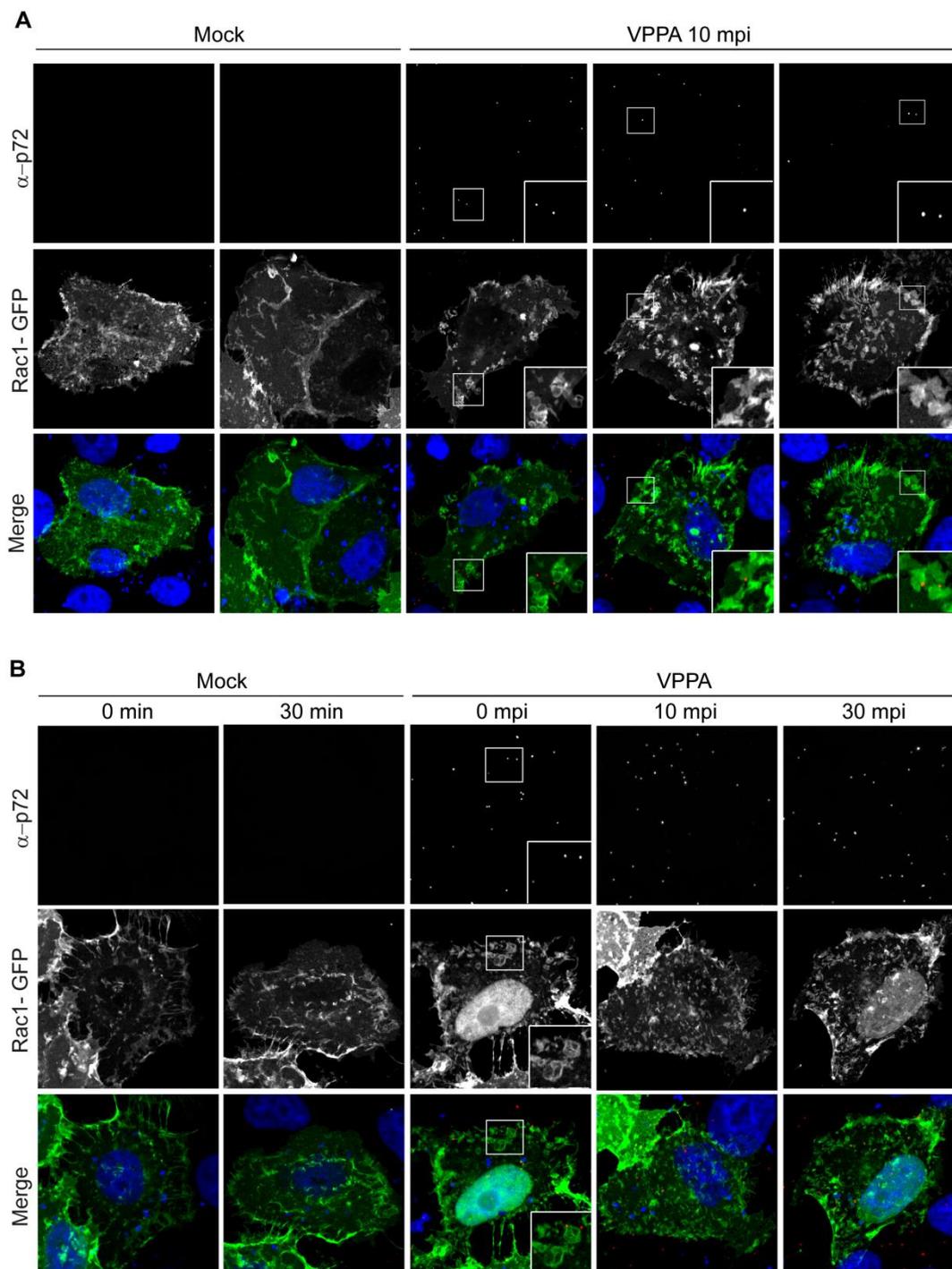


Figura 27. Localización de Rac1 en protrusiones de membrana durante la entrada del VPPA. A-B) Las células Vero fueron transfectadas con del plásmido de expresión EGFP-Rac1 durante 16 h e infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados, las células se fijaron e incubaron con Topro3 y el anticuerpo anti-p72 17LD3 para visualizar el núcleo y las partículas virales, respectivamente. La distribución de Rac1 se analizó mediante CLSM tomando (A) sólo un plano horizontal (x-y) o (B) tomando varios planos seriados y representando la máxima proyección en el eje z de los mismos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

4.5.3. Efecto de la inhibición de Rac1 sobre la internalización del VPPA

Para comprobar si la activación de Rac1 mediada por el VPPA es fundamental para la entrada viral, analizamos la internalización del virus en presencia de un inhibidor específico de la actividad GTPasa de Rac1 (NSC23766) (Gao y col., 2004). Las células Vero tratadas con el inhibidor farmacológico a una concentración no tóxica de 200 μ M (**Tabla Anexo 1**) se infectaron sincrónicamente y las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 a los 60 mpi. El análisis de la internalización viral mediante FACS revela una disminución de hasta el 90% en la entrada viral en presencia del inhibidor (**Figura 28A**), coincidiendo con los datos obtenidos en ensayos de inmunofluorescencia donde el número de partículas virales se contabilizó a partir del análisis de los distintos planos celulares adquiridos mediante CLSM tras el conteo de 100 células por condición (**Figura 28B**). Los paneles de la **Figura 28C** muestran la proyección en el plano horizontal de los diferentes planos celulares tomados en uno de los campos analizados. Asimismo, la proyección en el plano vertical de las imágenes muestra que el tratamiento con el inhibidor de Rac1 inmoviliza una pequeña fracción de los viriones en la membrana plasmática, impidiendo su internalización en comparación con las células tratadas con DMSO (**Figura 28D**).

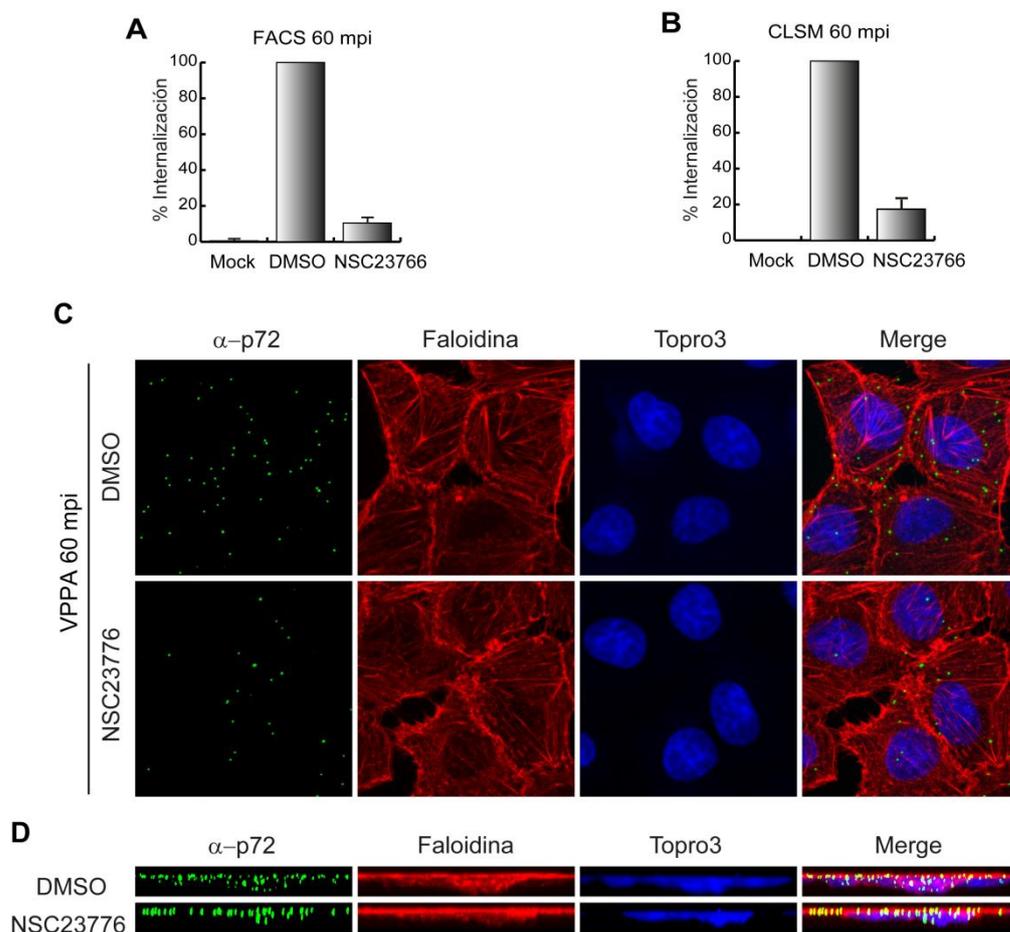


Figura 28. La actividad de Rac1 es fundamental durante la entrada del VPPA en células Vero. Las células fueron incubadas con DMSO o con 200 μM de NSC23766 e infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula durante 60 min. **A)** Las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y la internalización viral se analizó mediante FACS. La gráfica representa el porcentaje medio de internalización respecto a las células DMSO control (n=3, realizado por duplicado; media \pm D.E.). **B)** Tras la infección en presencia de NSC23766 o DMSO, la inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina-TRITC y Topro3 para visualizar las partículas virales, los filamentos de actina y el núcleo, respectivamente. Mediante CLSM se tomaron imágenes de planos seriados de la célula (eje x-y) y la internalización viral se cuantificó en cada uno de ellos tras el conteo de 100 células por condición con el programa Image J. El porcentaje de internalización se expresa respecto a las células DMSO control (n=3; media \pm D.E.). **C)** Representación de la máxima proyección en z de los planos tomados en el eje x-y de uno de los campos analizados mediante CLSM. **D)** Representación de la máxima proyección ortogonal de los planos x-z de uno de los campos analizados mediante CLSM. D.E., desviación estándar.

A continuación, nos propusimos evaluar si la inhibición de la actividad de Rac1 podría afectar a la formación de los *ruffles* inducidos por el virus durante la entrada. Para ello, las células se trataron con 200 μM de NSC23766, infectaron sincrónicamente durante 10 min y procesaron para el análisis mediante FESEM, como se describe en Materiales y Métodos. Como muestra la **Figura 29**, la inhibición de la actividad de Rac1 redujo fuertemente la formación de los *ruffles* generados durante la entrada del VPPA, acompañado con una disminución generalizada de la activación de la membrana plasmática, indicando que esta debe ser la causa de la fuerte inhibición en la internalización viral observada en presencia del inhibidor.

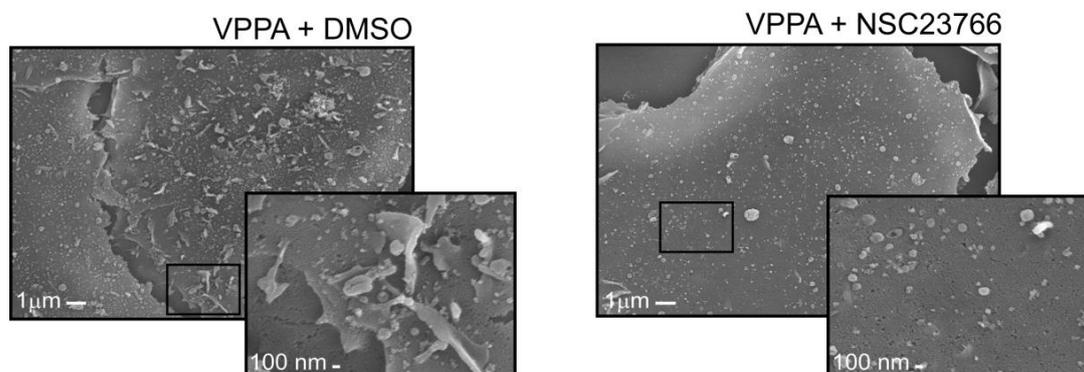


Figura 29. La formación de Ruffles dirigida por la infección del VPPA depende de la activación de Rac1. Las células Vero fueron tratadas con DMSO o con 200 μM del inhibidor NSC23766 e infectadas sincrónicamente con una MOI de 50 ufp/célula. Tras 10 min de infección, las muestras se fijaron y fueron procesadas para el análisis mediante FESEM. En la esquina inferior derecha se representa en detalle una de las zonas analizadas de la superficie celular.

4.5.4. Efecto de la inhibición de la actividad de Rac1 sobre la infección del VPPA

Para apoyar los datos obtenidos en el apartado anterior, analizamos el progreso de la infección en células en las que la actividad de Rac1 estaba comprometida, ya que, evidentemente, la reducción en la internalización viral se reflejará en una menor infección.

En primer lugar, la expresión de la proteína viral temprana p32 se analizó mediante *Western Blot* en células transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión GFP-Rac1-N17. Esta construcción de Rac1 presenta una mutación en el aspártico de la posición 17 que la imposibilita para unirse tanto a GDP como a GTP, estando siempre unida a los factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) e impidiendo que se activen las formas Rac1-WT de la célula (Ridley y col., 1992). Como muestra la **Figura 30A**, la expresión de la forma inactiva de Rac1 inhibió de manera significativa la expresión de la proteína temprana p32 confirmando a Rac1 un papel funcional en la infección.

Posteriormente, analizamos los niveles de expresión de las proteínas virales en presencia del inhibidor NSC23766 a una concentración de 200 μ M. Como esperábamos, tanto la expresión de la proteína viral temprana p32, como la tardía p72, se vieron inhibidas en presencia del inhibidor farmacológico cuando las células fueron tratadas 60 min antes de la adición del virus (**Figura 30B, Pre**). Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó 60 min después de la internalización viral (**Figura 30B, Post**), los niveles de expresión de ambas proteínas virales fueron muy distintos entre sí. En el caso de p32, la expresión se recuperó completamente cuando el inhibidor farmacológico se añadió 60 min después de la entrada viral, indicando que la actividad de Rac1 es fundamental durante los primeros 60 min de internalización, apoyando los resultados obtenidos anteriormente. En contra de lo esperado, la expresión de la proteína tardía p72 se inhibió igualmente cuando el tratamiento se realizó después de la internalización viral, sugiriendo que Rac1 podría, además, desempeñar alguna función en el control de la expresión de p72 o sobre eventos tardíos de la infección.

El progreso de la infección en presencia del inhibidor de Rac1 también se valoró cuantificando el número de factorías virales así como la producción viral. Las factorías virales se visualizaron tras 16 h de infección mediante CLSM tras la incubación de las células infectadas con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y Topro-3. Como se observa en la **Figura 30C**, el número de células que desarrollan factorías virales en ausencia de Rac1 activado disminuye en torno al 65% comparado con las células control. De igual forma, como se esperaba, la producción viral a las 48 hpi se redujo fuertemente cuando la actividad de Rac1 se vio comprometida (**Figura 30D**).

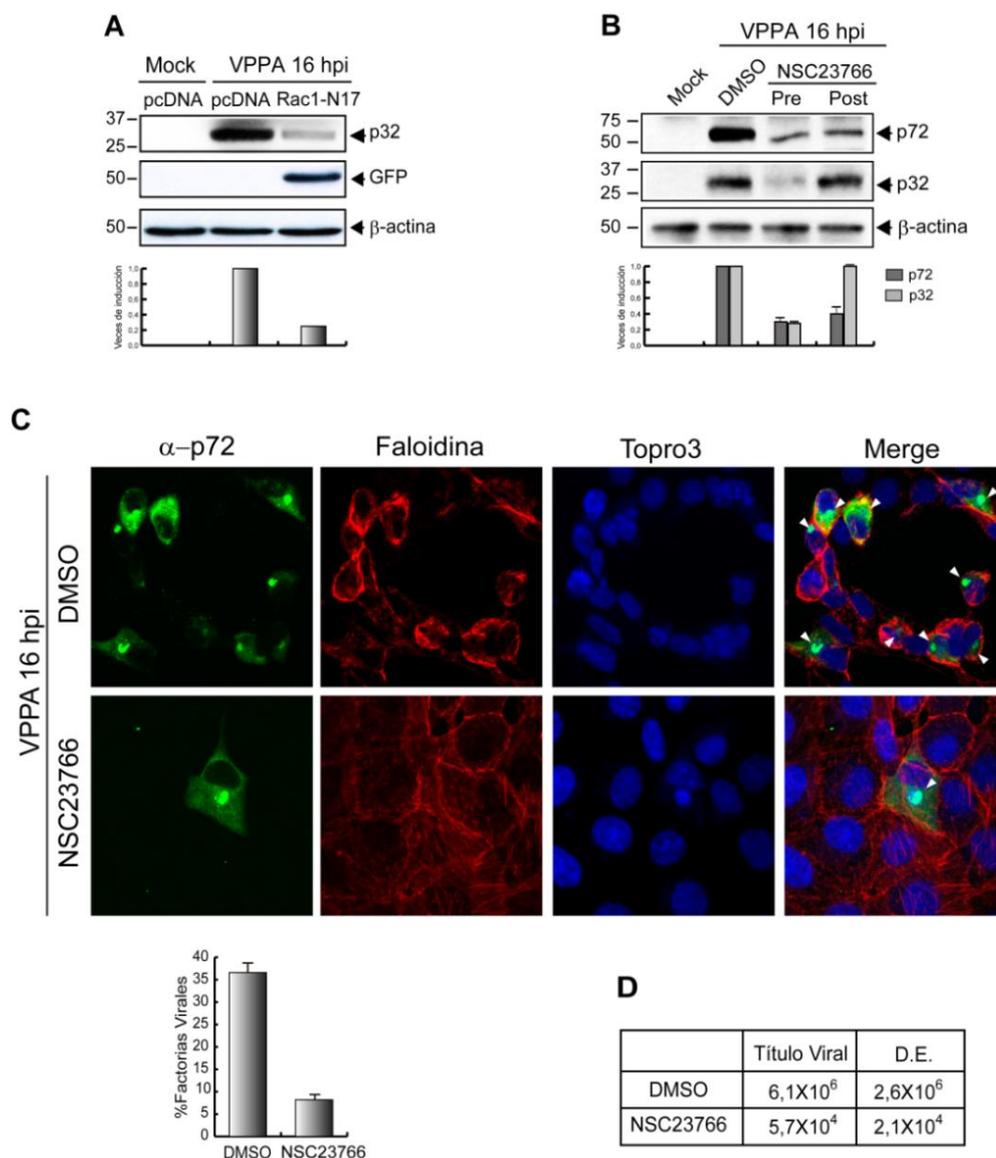


Figura 30. Rac1 es importante durante la entrada e infección del VPPA en células Vero. **A)** Las células transfectadas con pcDNA o pGFP-Rac1-N17, fueron infectadas asincrónicamente con una MDI de 1ufp/célula durante 16 h. La expresión de proteínas virales se analizó mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. Los niveles de GFP se analizaron como control de expresión. **B)** Las células fueron tratadas con DMSO o con 200 μM de NSC23766 durante 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adición del virus a una MDI de 1 uf/célula. Tras 16 h de infección, los extractos totales se analizaron por *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. El análisis densitométrico se muestra en la parte inferior y los valores representan la expresión de las proteínas virales en células infectadas y transfectadas con pcDNA (A) o tratadas con DMSO (B) en relación al control (n= 2; media ± D.E.). La expresión de β-actina se analizó como control de carga. **C)** Análisis de factorías virales. Tras el tratamiento con DMSO o con 200 μM de NSC23766, las células se infectaron de forma asincrónica con una MDI de 5 uf/célula durante 16 hpi y la inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina- TRITC y Topro3 para visualizar las factorías virales, los filamentos de actina y el ADN, respectivamente. Las imágenes de uno de los planos x-y fueron adquiridas mediante CLSM; las puntas de flecha indican las factorías virales. La gráfica representa el porcentaje medio de factorías virales contabilizando 100 células por condición (n=3; media ± D.E.). **D)** Los sobrenadantes de células tratadas con DMSO o NSC23766 e infectadas con 1 uf/célula se recogieron tras 48 h y el número de virus infectivos se tituló mediante experimentos de plaqueo (n = 3, media ± D.E.). D.E., desviación estándar.

Por lo tanto, en base a estos datos, concluimos que la significativa disminución en el progreso de la infección en presencia del inhibidor de Rac1 es consecuencia, no sólo de la menor internalización de los viriones, sino además de la inhibición específica que se produce en ausencia de Rac1-GTP sobre la síntesis de p72, imposibilitando así la formación de nuevas partículas virales y apuntando a un papel relevante para Rac1 tanto durante la entrada del virus, como en el progreso del ciclo viral productivo.

4.6. LA QUINASA PAK1 ES ESENCIAL PARA LA ENTRADA DEL VPPA

Entre las quinasas que controlan la macropinocitosis, Pak1 es una de las más relevantes puesto que es necesaria durante todos los estadios del proceso endocítico, una vez activada por Rac1 o Cdc42 (Dharmawardhane y col., 2000; Sells y Chernoff, 1997). De este modo, los sistemas virales cuya internalización depende de la activación de Pak1, tales como VV (Mercer y Helenius, 2008), Ad3 (Amstutz y col., 2008) o Ébola (Nanbo y col., 2010), explotan la macropinocitosis como vía endocítica de entrada.

Puesto que en el presente trabajo se ha descrito y demostrado que la entrada del VPPA en la célula huésped depende fuertemente de la activación de Rac1, nos propusimos analizar si Pak1 también tiene un papel relevante en el proceso de entrada viral.

4.6.1. Activación de Pak1 durante la internalización del VPPA

Como se ha descrito en la Introducción, entre los diferentes residuos susceptibles de ser fosforilados durante la activación de Pak1, la treonina 423 juega un papel fundamental pues su fosforilación es imprescindible para la completa activación de la quinasas (Zenke y col., 1999). Para explorar la fosforilación de este residuo durante la entrada del VPPA, células Vero se infectaron de manera sincrónica y los extractos totales se analizaron mediante *Western blot* con un anticuerpo que reconoce la fosforilación en la Treonina 423 de Pak1. La **Figura 31** muestra que muy tempranamente, a partir de 30 mpi, se detecta un incremento en la fosforilación de la quinasas que aumenta hasta 120 mpi, tiempo a partir del cual empieza a disminuir hasta llegar a su estado basal a las 14 hpi. Estos resultados indican que el virus estimula fuertemente la fosforilación de Pak1 y que es en un estadio temprano de la entrada viral cuando se inicia esta activación; asimismo, dado que el nivel de fosforilación disminuye a tiempos posteriores, mientras que el nivel de expresión de Pak1 se mantiene estable, puede inferirse la existencia de un control temporal de la activación de esta quinasas a lo largo del ciclo viral.

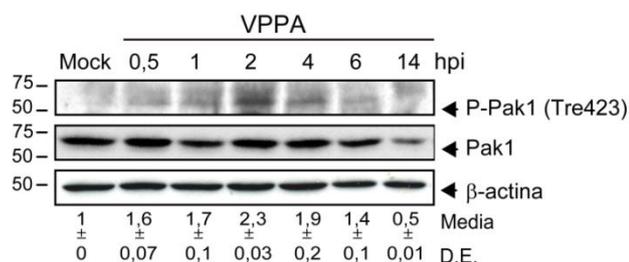


Figura 31. La infección del VPPA activa a Pak1 en células Vero. Tras la infección sincrónica con una MDI de 5 ufp/célula, los extractos celulares se procesaron para el análisis mediante *Western blot*. La fosforilación de Pak1 se analizó con un anticuerpo que reconoce la fosforilación en la treonina 423 (Tre423); los niveles de Pak1 se analizaron como control de expresión y los de β -actina como control de carga. El análisis densitométrico se realizó tomando el mock como muestra control (n=2, media \pm D.E). D.E., desviación estándar.

4.6.2. Efecto de la inhibición de Pak1 sobre la internalización del VPPA

El IPA-3 se ha identificado como un inhibidor directo, no competitivo y altamente específico de Pak1. En presencia de IPA-3, Pak1 no puede autofosforilarse en la treonina 423 porque el inhibidor lo impide uniéndose al dominio regulador de la quinasa (Deacon y col., 2008). Para analizar el papel de Pak1 en la internalización viral, las células Vero se trataron con IPA-3 a una concentración no tóxica de 30 μM (Tabla Anexo 1), infectaron sincrónicamente durante 60 min y las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3. El análisis de la internalización viral mediante FACS muestra que en presencia del inhibidor farmacológico la entrada del VPPA se inhibe en torno al 70%, en comparación con la internalización en las células tratadas con DMSO (Figura 32A). Esta inhibición se produjo igualmente cuando la internalización viral se analizó mediante CLSM cuantificando las partículas virales en los diferentes planos celulares, tras el análisis de 100 células por condición (Figura 32B).

Estos resultados, junto con los mostrados en la Figura 31, demuestran claramente que la función de Pak1 es importante durante los primeros estadios de la entrada del VPPA, pues además de que la internalización viral depende de su actividad quinasa, el virus dirige su activación.

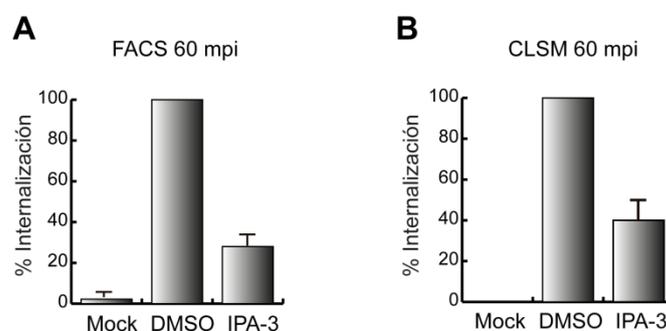


Figura 32. Pak1 es fundamental en la internalización del VPPA en células Vero. A) Las células fueron incubadas con DMSO o con 30 μM de IPA-3 e infectadas sincrónicamente con una MDI de 10 ufp/célula durante 60 min. A) Las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti-p72 17LD3 y las células se analizaron mediante FACS. La gráfica representa el porcentaje medio de internalización viral respecto a las células DMSO control (n=9, realizado por duplicado; media \pm D.E.). B) Tras la infección en presencia de IPA-3 o DMSO, la inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo anti-p72 17LD3, faloidina-TRITC y Topro3 para visualizar las partículas virales, los filamentos de actina y el núcleo, respectivamente. Mediante CLSM se adquirieron imágenes de planos seriados de la célula (eje x-y) y la internalización viral se cuantificó en cada uno de ellos con el Image J tras el conteo de 100 células por condición. El porcentaje de internalización se expresa respecto a las células DMSO control (n=3; media \pm D.E.). D.E., desviación estándar.

4.6.3. Efecto de la inhibición de Pak1 sobre la infección del VPPA

Además del papel que desempeña Pak1 durante la entrada viral, evaluamos su función durante el progreso de la infección. En primer lugar, analizamos la expresión de las proteínas virales a 16 hpi en presencia de concentraciones crecientes no tóxicas de IPA-3 (**Tabla Anexo 1**) tras infecciones asincrónicas. Los extractos de células infectadas se analizaron mediante *Western blot* y se incubaron con el anticuerpo anti-VPPAt. Como muestra la **Figura 33A**, existe una inhibición dosis-dependiente sobre la expresión de las proteínas virales, tanto tempranas como tardías, cuando la actividad de Pak1 está comprometida, pudiendo ser consecuencia directa de la menor internalización viral aunque con este tipo de análisis no podríamos descartar otras funciones en etapas posteriores.

Para esclarecer este punto, y dado que previamente hemos descrito que la activación de la quinasa se mantiene durante la infección viral, nos preguntamos si Pak1 podría estar actuando en etapas posteriores a la internalización independientemente de su papel en la entrada del virus. Para ello, las células Vero se trataron con 10 μM de IPA-3 durante 60 min antes de la adsorción viral o 60 min después de la adición del virus. La expresión de proteínas virales se analizó mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 33B**. Como puede observarse, el post-tratamiento de las células infectadas con IPA-3 (Post) permite la completa recuperación de la expresión de la proteína viral temprana p32 y en un porcentaje muy elevado la de la proteína tardía p72, en comparación con la fuerte inhibición que se obtiene cuando la actividad de Pak1 se inhibe antes de la entrada del virus (Pre), confirmando que la actividad de Pak1 es muy importante durante los primeros 60 min de internalización viral. No obstante, el pequeño porcentaje de inhibición obtenido en la expresión de p72 así como la fuerte inhibición en los niveles de expresión de la proteína p24 con el post-tratamiento, sugiere que la actividad de Pak1 podría ser también necesaria en etapas posteriores a la entrada viral, coincidiendo con la fosforilación de la quinasa durante el progreso de la infección.

Igualmente, como era de esperar, la producción viral tras 48 h de infección se ve comprometida en presencia de IPA-3 a una concentración de 5 μM , como consecuencia, principalmente, del bloqueo de la entrada del virus en la célula mediado por la inhibición de la quinasa (**Figura 33C**).

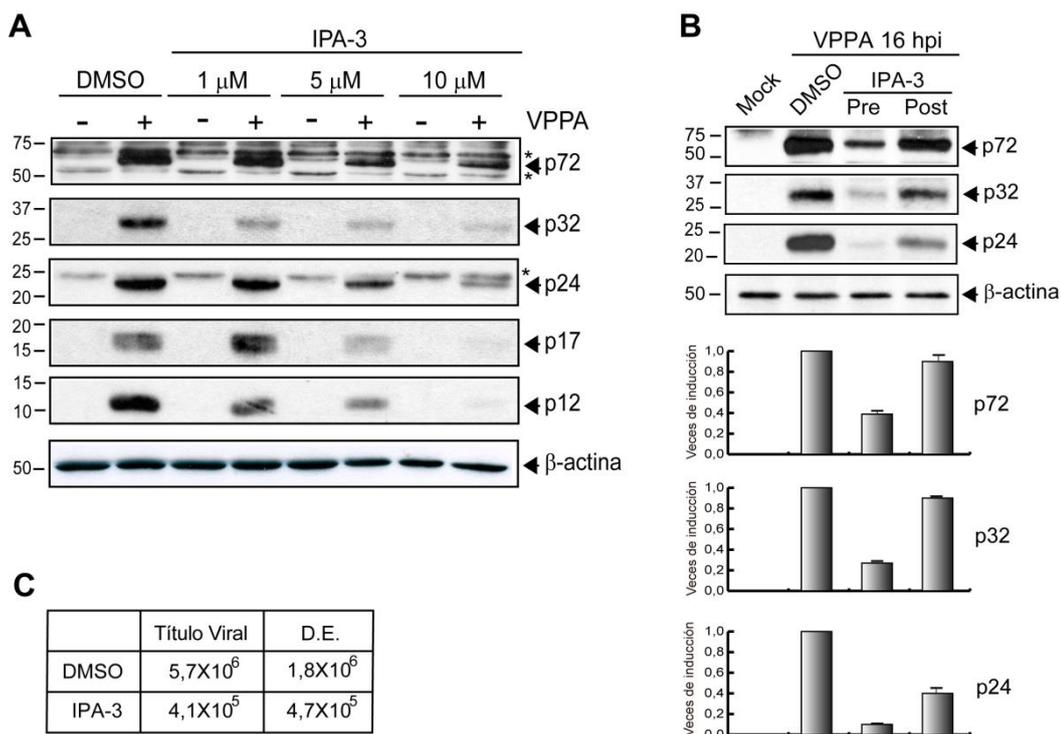


Figura 33. La inhibición de la actividad de Pak1 afecta a la entrada e infección del VPPA en células Vero. A) Análisis de la expresión de proteínas virales. Tras la incubación con DMSO o IPA-3 a diferentes concentraciones, las células fueron asincrónicamente infectadas con una MDI de 1 ufp/célula y a las 16 h de infección los extractos celulares se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. **B)** Las células fueron tratadas con DMSO o 10 μ M de IPA-3 durante 60 min antes (Pre) o 60 min después (Post) de la adición del virus a 37°C a una MDI de 1 ufp/célula. Tras 16 h de infección, los extractos totales celulares se analizaron por *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. El análisis densitométrico se muestra en la parte inferior de la figura y los valores se representan en relación a la expresión de las proteínas virales en células DMSO control (n= 2; media \pm D.E.). **C)** Análisis de la producción viral. Los sobrenadantes de células tratadas con DMSO o 5 μ M de IPA-3 e infectadas con 1 ufp/célula se recogieron tras 48 h de infección y el número de virus infectivos se tituló mediante experimentos de plaqueo (n = 3, media \pm D.E). La expresión de β -actina se analizó como control de carga. D.E., desviación estándar; *Proteínas celulares inespecíficas detectadas con el anticuerpo utilizado.

Finalmente, para caracterizar el papel funcional de Pak1 durante la infección del VPPA, analizamos la expresión de las proteínas virales en presencia de diferentes construcciones de Pak1 que tienen modificado el dominio de activación quinasa. Para ello, las células Vero se transfectaron con los plásmidos de expresión EGFP, EGFP-Pak1-WT, EGFP-Pak1-AID (construcción dominante negativa), EGFP-Pak1-T423E (construcción constitutivamente activa), y posteriormente se infectaron durante 16 h. Como se muestra en la **Figura 34**, la expresión de la construcción Pak1-AID que contiene exclusivamente el dominio de autoinhibición, inhibió más de un 50% la expresión de la proteína viral temprana p32, así como la tardía p12, mientras que las células transfectadas con la forma WT de la proteína expresaron prácticamente los mismos niveles que las células infectadas con el plásmido GFP control. Además, la expresión de la construcción constitutivamente activa de Pak1 indujo un fuerte aumento en los niveles de

expresión de las proteínas virales, especialmente de la proteína temprana p32, lo que induce fundamentalmente a pensar que Pak1 es importante para la infección en el proceso de entrada.

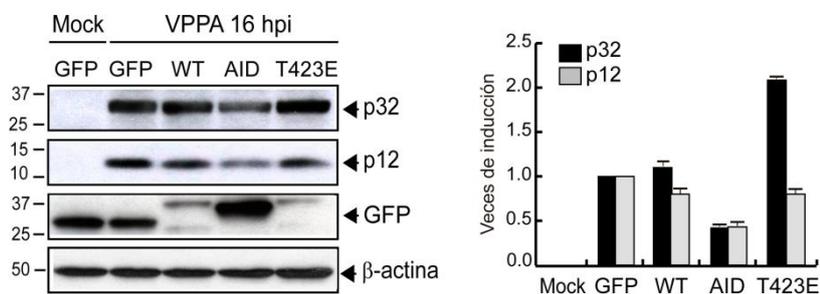


Figura 34. Papel funcional de Pak1 en la infección del VPPA en células Vero. Las células se transfectaron con los plásmidos de expresión GFP, Pak1-WT-GFP, Pak1-AID-GFP (dominante negativo) y Pak1-T423E-GFP (constitutivamente activo) y tras 24 horas se infectaron asincrónicamente con una MDI de 1 ufp/célula durante 16 h. Los niveles de expresión de proteínas virales se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-VPPAt. La expresión de GFP se analizó como control de expresión y la de β -actina como control de carga. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas tomando como control la muestra infectada GFP (n= 2; media \pm D.E). D.E., desviación estándar.

Estos datos, junto con la activación de Rac1 mostrada anteriormente, demuestran que el VPPA activa y dirige la ruta de señalización celular de Rac1/Pak1 durante la internalización viral, y soportan muy eficazmente que la macropinocitosis sea un tipo de mecanismo prioritario utilizado por el virus para entrar en la célula huésped.

Discusión

5.1. MACROPINOCITOSIS: MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN DEL VPPA EN LA CÉLULA HUÉSPED

La endocitosis constituye un mecanismo eficiente utilizado por muchos virus para traspasar la barrera física impuesta por la membrana plasmática celular e internalizar en la célula asegurándose una infección productiva, como se muestra en la **Figura 2** del presente trabajo. El tipo de endocitosis utilizado dependerá en gran medida de la activación de las rutas concretas de señalización celular dirigida por la interacción del virus con la célula. El conocimiento de las rutas de señalización que intervienen durante la entrada viral y los mecanismos que lo regulan es clave para comprender la patogénesis viral al ser la entrada en la célula huésped el primer paso durante la infección.

En la presente Tesis Doctoral, combinando diferentes e independientes aproximaciones experimentales, hemos demostrado que el mecanismo endocítico (o uno de los mecanismos endocíticos) empleado activamente por el VPPA es la macropinocitosis.

La macropinocitosis se caracteriza por la activación generalizada de la membrana plasmática celular dirigiendo la formación de protrusiones de membrana en forma de *ruffles* o *blebs*, a través de los cuales el *cargo* entra la célula a través de vesículas no recubiertas (Swanson y Watts, 1995).

En este estudio hemos demostrado que tras la infección de células Vero con el aislado viral Ba71V, existe una fuerte activación de la membrana plasmática celular acompañada de la formación de protrusiones de membrana compatibles con *ruffles* (**Figura 12**). Estas estructuras son visibles desde los 10 mpi y su formación disminuye a lo largo de la internalización viral, en consonancia con estudios previos que describen que a los 30 mpi el 60% de los virus han internalizado (Alcamí y col., 1989a).

El tamaño y la forma de los *ruffles* y *blebs* depende del estímulo y tipo celular. En el caso de macrófagos y células tumorales estimuladas con PMA, las protrusiones de membrana pueden alcanzar hasta 5 μm (Araki y col., 1996; Meier y col., 2002), pero sin embargo, el tamaño de las protrusiones dirigidas por virus suele ser más moderado; por ejemplo, los *ruffles* generados por la infección con el aislado filamentoso de FLUAV (Rossman y col., 2012) y los *blebs* generados por la infección de células Hela con VV alcanzan alrededor de 1 μm (Mercer y Helenius, 2009), lo cual coincide con las estructuras entre 0,8 y 1 μm que se forman durante la entrada del VPPA (**Figura 12**). Estos resultados están parcialmente en línea con el trabajo de Alcamí y col. en el que el análisis de la internalización viral mediante TEM en células Vero infectadas con el aislado Ba71V purificado por Percoll, muestra que el 50% de las partículas virales internaliza por invaginaciones de membrana desprovistas de recubrimiento proteico (Alcamí y col., 1989a). El mismo patrón de internalización fue obtenido en células Vero infectadas con el aislado L60

no purificado, si bien en este caso, el porcentaje de virus internalizado por invaginaciones desprovistas de recubrimiento proteico fue inferior (Valdeira y Geraldés, 1985). Por otra parte, el estudio de Alcamí y col. muestra que el otro 50% entra mediante *coated pits*, apuntando a un mecanismo de CME, aunque sorprendentemente, en ningún caso se observaron partículas virales endocitadas en *coated vesicles*. Cuando los mismos estudios se realizaron en macrófagos alveolares porcinos, el 80% de las partículas virales analizadas se encontraron en invaginaciones de membrana no recubiertas, indicando, que en este tipo celular la CME no parece ser el principal mecanismo de internalización (Alcamí y col., 1990).

En el caso de la infección de IPAM (línea celular establecida de macrófagos porcinos), en el presente trabajo hemos descrito que tanto la infección con el aislado E70 como con el aislado Ba71V, induce la formación de estructuras esféricas compatibles con *blebs* por su tamaño y enriquecimiento del marcador Rock1. Además, la miosina II, componente fundamental de estas estructuras, es importante durante los primeros 60 min de internalización viral lo cual, junto con la localización de las partículas virales en *blebs*, sugiere que la internalización del virus en éstas células depende y tiene lugar a través de éstas protrusiones. Tomados en conjunto, estos resultados apuntan a la macropinocitosis como mecanismo explotado por el virus para entrar en macrófagos. Por otra parte, el hecho de que el mismo aislado viral, Ba71V, genere un diferente patrón de protrusiones de membrana dependiendo de la célula huésped, evidencia que la señalización mediada entre el virus y la célula tiene un papel muy significativo en el proceso de internalización viral. Ejemplos comparables los encontramos en células Hela infectadas con VV donde diferentes aislados virales explotan distintos tipos de macropinocitosis durante la entrada (Mercer y col., 2010a). Por último, es importante señalar que las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos de FESEM mostrados en el presente trabajo y los realizados mediante TEM en trabajos anteriores (Alcamí y col., 1989a; Racoosin y Swanson, 1989; Valdeira y Geraldés, 1985) son diferentes, y por lo tanto, estos estudios no pueden considerarse totalmente comparables.

En el presente estudio se demuestra por primera vez que la entrada del VPPA en células Vero está fuertemente inhibida en presencia de EIPA, un inhibidor específico de los canales Na^+/H^+ , y por tanto, de la macropinocitosis. El papel fundamental de los canales Na^+/H^+ durante los primeros 60 min de internalización viral se demostró, además de por FACS y CLSM, comparando los niveles de expresión de proteínas virales con dos tipos de tratamiento diferentes. Cuando el EIPA se añade antes de la infección no hay expresión de proteínas virales; sin embargo, cuando se añade después de la internalización del virus pero antes de que comience la transcripción temprana, los niveles de expresión son comparables al de las células no tratadas, indicando claramente que los canales Na^+/H^+ son importantes para la internalización y no en pasos posteriores de la infección. Como consecuencia de esta inhibición en la entrada

viral, el desarrollo de factorías virales así como la producción también se vieron comprometidos. Estos resultados se reprodujeron cuando la infección en presencia de EIPA tuvo lugar con una preparación viral purificada mediante gradiente de Percoll, indicando que independientemente del grado de pureza de la preparación viral utilizada, la internalización del virus depende de los canales de Na^+/H^+ .

En contraste con estos resultados, un reciente estudio describe que el tratamiento de células Vero con EIPA a una concentración de 50 μM inhibe únicamente el 30% de la expresión de la proteína viral temprana p32, y que esta ligera disminución podría ser debida al efecto citotóxico de la droga. En este sentido, nuestro estudio demuestra que el porcentaje de células muertas tras 3 h de tratamiento con 60 μM de EIPA es del 2,5% (**Tabla Anexo 1**) no afectando, en absoluto, ni a la morfología celular ni a sus capacidades de adhesión. Las concentraciones de EIPA no tóxicas utilizadas generalmente en la literatura para obtener una disminución mayor del 50% en la internalización viral, son superiores a 50 μM ; por ejemplo, la inhibición de la internalización de VV en células Hela en presencia de EIPA alcanza valores del 30 y 90% con concentraciones no tóxicas de 50 y 100 μM , respectivamente (Mercer y Helenius, 2008), y resultados parecidos se obtienen cuando se analiza la infección del virus Ébola en células Vero, en consonancia con nuestros datos (Aleksandrowicz y col., 2011)

La inducción de la internalización de marcadores de endocitosis de fase fluida como el dextrano es otro de los aspectos imprescindibles durante la entrada por macropinocitosis. En la **Figura 18A** mostramos que la infección con el VPPA conduce a la internalización del marcador endosomal y que esta se inhibe específicamente en presencia de EIPA. Los niveles de internalización obtenidos fueron similares a los que se han publicado durante la entrada por macropinocitosis de virus como VV (Mercer y Helenius, 2008) o Ébola (Nanbo y col., 2010). Asimismo, durante el proceso de internalización hay una clara colocalización de las partículas virales y del dextrano a los 30 mpi, indicando que ambos utilizan las mismas vesículas endocíticas para internalizar, a diferencia de otros sistemas virales que activan la macropinocitosis sólo para dirigir su internalización por otros mecanismos endocíticos.

El citoesqueleto de actina juega un papel fundamental durante la formación de las protrusiones de membrana. Como hemos descrito anteriormente, el VPPA induce perturbaciones durante la entrada viral y la internalización del virus disminuye en torno al 50 % en presencia de Cito D (**Figura 19**). En línea con estos experimentos, se ha descrito que la adsorción e internalización viral no está afectada en presencia de Citocalasina B (Valdeira y col., 1998). Alternativamente, otro trabajo defiende que este componente del citoesqueleto no es importante durante las primeras etapas de la infección, ya que la expresión de proteínas virales no se ve comprometida en presencia de Jasplaklinolide o Latrunculia A (Hernaez y Alonso, 2010). En este trabajo es discutible que la concentración de los compuestos fuese la óptima

puesto que es inferior a las que se utilizan habitualmente en este tipo de estudios. En consonancia con la inhibición de la entrada viral en presencia de Cito D, el papel estructural que este componente del citoesqueleto tiene durante los primeros 30 min de internalización se demostró mediante el análisis por CLSM (**Figura 20**), donde se pone de manifiesto que existe un importante cambio en el patrón de distribución de los filamentos de actina, coincidiendo con la activación generalizada de la membrana plasmática observada en estudios de FESEM tras la entrada viral. Estos resultados coinciden con otros estudios en distintos sistemas virales, donde se describe que la reorganización de la actina cortical en forma de *ruffles* o de *blebs* se estimula durante los primeros min de infección con Ad2, VV o virus Ébola (Aleksandrowicz y col., 2011; Li y col., 1998; Mercer y Helenius, 2008). Además del papel en la entrada viral, nuestros datos indican que el citoesqueleto de actina también es importante durante etapas post-internalización, afectando, por tanto, a la formación de factorías y a la producción viral. En línea con estos resultados, se ha publicado que la expresión de la proteína viral tardía p72 está inhibida en torno a un 80% cuando la infección en macrófagos porcinos tiene lugar en presencia de 10 μ M de Cito D (Basta y col., 2010), y que el virus induce la polimerización de estos filamentos a tiempos tardíos post-infección al ser necesarios para el proceso de salida viral (Jouvenet y col., 2006).

Otro de los componentes importantes durante algunos procesos de entrada viral es el sistema de microtúbulos (Mercer y col., 2010b). En el caso de la infección del VPPA, nuestros datos demuestran que este componente del citoesqueleto no está involucrado en la internalización del virus. En nuestras manos, el tratamiento con Nocodazol reduce la síntesis de las proteínas virales tardías confirmando resultados previos (Heath y col., 2001) y conectando con la función que tiene el sistema de microtúbulos durante el transporte retrógrado de la proteína viral p54 favoreciendo la formación de factorías perinucleares (Alonso y col., 2001).

Como se ha comentado anteriormente, la señalización que se activa como consecuencia de la interacción virus-célula es la base que orquesta el tipo de mecanismo endocítico utilizado por los virus, y aunque algunos factores celulares sólo participan en un determinado tipo de entrada, otros comparten distintos escenarios. Para comenzar a estudiar la señalización que dirige la entrada del VPPA, centramos nuestra atención en el papel de factores importantes para la macropinocitosis como son el EGFR, la Rho-GTPasa Rac1 y las quinasas PI3K y Pak1, estando la función de todos ellos íntimamente relacionada.

En primer lugar, estudiamos la posible función del EGFR en la infección pues podría ser uno de los elementos que median la interacción del virus y la célula, conectando con trabajos previos que describen que la entrada del virus, tanto en células Vero como en macrófagos porcinos, es un proceso mediado por receptor (Alcamí y col., 1989b; Alcamí y col., 1990). En este caso, el tratamiento con un inhibidor específico de la actividad de EGFR inhibió de forma

drástica la internalización viral y además, demostramos que el virus activa a este receptor durante los primeros min de entrada viral. Al igual que el VPPA, otros virus activan al EGFR durante la entrada por macropinocitosis, como son VV y HCMV (Chan y col., 2009; Mercer y col., 2010a).

En relación con las quinasas más importantes implicadas en la entrada viral por macropinocitosis, se encuentra la PI3K. Este enzima es, además, fundamental en la replicación, el crecimiento o la síntesis de proteínas, y puesto que su señalización es clave en articular el ciclo celular, los virus han desarrollado multitud de estrategias para utilizarla en su favor a distintos niveles del ciclo infeccioso (Buchkovich y col., 2008; Cooray, 2004). En concreto, en relación con la macropinocitosis, la PI3K regula la formación de las protrusiones de membrana y/o macropinosomas (Amyere y col., 2000; Araki y col., 2007; Araki y col., 1996). En este aspecto, hemos demostrado que el VPPA activa fuertemente la PI3K durante los primeros 30 min de infección (**Figura 24C**). Esta activación se analizó estudiando los niveles de fosforilación de la proteína Akt, al ser un evento consecuencia directa de la activación de PI3K (Alessi y col., 1996; Bayascas y Alessi, 2005; Sarbassov y col., 2005). Además, recientes datos de nuestro laboratorio no presentados en esta memoria demuestran que en presencia de LY (inhibidor específico de PI3K) la fosforilación de Akt observada durante la internalización del virus está totalmente comprometida. En línea con estos datos, las **Figuras 25A y 25B** muestran que la internalización viral analizada a los 60 mpi se inhibe en torno al 50% en presencia de LY. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la PI3K contribuye de manera directa a la entrada viral, probablemente de la misma forma que ocurre durante la entrada del HCMV a través de la activación, principalmente, del EGFR (Chan y col., 2009). Es interesante mencionar que dependiendo del modelo de estudio, el grado de participación de la PI3K en la macropinocitosis puede variar; en algunos casos, controla solamente el cierre del macropinosoma, en otros, participa además en la formación de *ruffles* e incluso se ha descrito que controla la actividad de Rac1, poniendo de manifiesto su papel multifuncional (Amyere y col., 2000; Araki y col., 2007; Hawkins y col., 1995; Kotani y col., 1995; Wennstrom y col., 1994). En relación a su actividad durante la entrada por macropinocitosis de otros virus, el tratamiento con inhibidores específicos de PI3K disminuye, en general, entre el 30 y 50 % de la entrada viral (Aleksandrowicz y col., 2011; Mercer y Helenius, 2008; Schelhaas y col., 2012). Respecto al papel de la PI3K en el control del tráfico y biogénesis de los endosomas, este enzima es fundamental en algunos tipos de endocitosis (Lindmo y Stenmark, 2006). Recientemente, se ha publicado que durante la infección con el VPPA la funcionalidad de los endosomas tardíos es importante para la desencapsidación viral y que la actividad de la PI3K así como como la de la fosfatidilinositol quinasa 5 (PIK5), que regulan la dinámica de los fosfatidilinositoles en la membrana endosomal, es importante durante las primeras 3 horas de

infección (Cuesta-Geijo y col., 2012). En línea con estos datos, en este estudio mostramos que tanto la fosforilación de Akt, como el aumento en la producción de PI(3,4,5)P₃, ocurren durante las primeras etapas de la infección indicando que la activación específica de PI3K es también necesaria en procesos muy tempranos post-internalización. La activación de la señalización mediada por PI3K-Akt durante la infección del VPPA no es un evento restringido sólo a los procesos de entrada y tráfico endosomal, sino que nuestro trabajo también demuestra que esta señalización es fundamental para la correcta consecución del ciclo infeccioso. En la **Figura 24D** se muestra que tras la endocitosis, el virus fosforila fuertemente a Akt a tiempos tempranos post-infección (3 hpi) disminuyendo esta activación a tiempos tardíos (16 hpi). Esta temporalidad en la activación de la PI3K puede responder a que al igual que para otros muchos virus ADN, la activación de la ruta es beneficiosa durante las etapas del ciclo infeccioso en las que la proliferación, la síntesis de proteínas y la energía son requerimientos necesarios para la infección. Sin embargo, su inhibición también debe de ser controlada para evitar la respuesta de estrés o inducir la apoptosis celular en el momento preciso de la infección; en este último caso, se sabe que la infección del VPPA activa a la caspasa-3 a partir de las 14 hpi (Nogal y col., 2001), coincidente con una favorable disminución de la señalización proliferativa a tiempos tardíos de infección. Por otro lado, hemos demostrado que cuando la actividad de la PI3K está comprometida, la expresión de proteínas virales está drásticamente inhibida, afectando especialmente a la expresión de la proteína tardía p72, lo que redundaría en la nula detección de factorías virales así como un pronunciado descenso en el título viral. El hecho de que en presencia de LY haya cierta expresión de p32 pero la expresión de p72 sea indetectable, sugiere que la PI3K debe de ser fundamental para la replicación viral, pues su actividad es crítica para la expresión de proteínas que dependen de la replicación, tal como se ha descrito para otros virus (Soares y col., 2009). Esta observación está en consonancia con los datos publicados por Cuesta-Geijo y col., en los que se demuestra que el tratamiento con wortmanina (otro inhibidor de la actividad PI3K) tres horas después de la internalización del virus, reduce en torno al 50% la producción viral (Cuesta-Geijo y col., 2012). Por otro lado, cabe destacar que al controlar la maquinaria de traducción celular, esta señalización debe ser fundamental para dirigir la síntesis de proteínas virales en línea con un trabajo previo de nuestro grupo en el que se describe que el VPPA controla la maquinaria de traducción de proteínas celulares cap-dependiente durante la infección (Castello y col., 2009).

En resumen, la vía de señalización de PI3K-Akt parece ser la piedra angular en la infección del VPPA, controlando procesos muy tempranos durante el ciclo viral, tales como la entrada y tráfico endosomal, y participando de manera activa en procesos clave para el desarrollo de una infección productiva. Por ello, tanto el mecanismo molecular de acción de la PI3K durante la entrada del virus, como el papel específico que desempeña durante la

macropinocitosis, los factores celulares que regula durante la misma, así como los genes virales implicados en su activación, están siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio y constituyen uno de los principales retos de nuestro grupo por su relación potencial con el desarrollo de vacunas.

La parte final de nuestro estudio se centró en analizar la participación de dos protagonistas clave en el control de las protrusiones de membrana producidas durante la entrada del VPPA. En primer lugar, demostramos que el virus activa fuertemente a la Rho-GTPasa Rac1 durante los primeros 30 min de internalización (**Figura 26**), datos coincidentes con otro estudio realizado en el mismo modelo de infección y publicado durante la elaboración de la presente Tesis (Quetglas y col., 2012). Además, esta activación rápida y transitoria corresponde con la activación temporal de la membrana plasmática observada en las imágenes adquiridas mediante FESEM (**Figura 12**). Existe una amplia evidencia constatando que Rac1 es fundamental para la formación de protrusiones de membrana mediante el control de factores que regulan el citoesqueleto de actina (Bar-Sagi y Feramisco, 1986; Ridley, 1994; Ridley, 2006; Ridley y col., 1992; Wells y col., 2004) y en línea con estos datos, nuestros resultados demuestran que Rac1 controla la formación de los *ruffles* durante la entrada viral pues en presencia de un inhibidor específico de la actividad GTPasa de Rac1 (NSC23766), la formación de estas estructuras está fuertemente comprometida. No sólo esto, sino que en presencia de dicho compuesto, el porcentaje de internalización viral se vio drásticamente reducido, reforzando el papel fundamental de Rac1 en la internalización viral (**Figura 28**). Es interesante remarcar que la localización de Rac1 en estructuras de membrana inducidas por la infección de VPPA mostrada en este estudio, está en línea con la estimulación de la macropinocitosis por otros virus (Kraynov y col., 2000; Mercer y Helenius, 2008).

En contraste con los resultados aquí mostrados, se ha publicado que Rac1 no es fundamental para la entrada del VPPA aunque sí durante las primeras etapas de la infección, aparentemente para controlar procesos posteriores en el ciclo viral (Quetglas y col., 2012). Las discrepancias en ambos estudios pueden ser explicadas, a nuestro juicio, por varias diferencias metodológicas. En primer lugar, la relación entre la MDI y la concentración del inhibidor de Rac1 utilizada en el trabajo de Quetglas y col. es mayor que la que utilizamos en nuestro estudio, pudiendo estar desequilibrado en relación a la concentración del tratamiento; en segundo lugar, el análisis mediante CLSM para cuantificar el número de partículas virales internalizadas es diferente, ya que, en nuestro caso, para examinar la entrada tomamos planos seriados de la célula de manera que el porcentaje de internalización viral lo calculamos como la suma de la información obtenida en cada uno de ellos en presencia o ausencia del inhibidor de Rac1. Por el contrario, Quetglas y col. analizan sólo un plano celular, pudiendo perder información relevante. Por otra parte, en línea con nuestros datos de FACS y CLSM, la **Figura**

30B muestra que la inhibición de la expresión de la proteína p32 con el Pre-tratamiento se recupera cuando el inhibidor farmacológico se añade 60 min después de la adición del virus, en contraste con la ligera inhibición que obtienen con cualquiera de los tratamientos realizados en Quetglas y col. Por tanto, como consecuencia del exhaustivo análisis realizado en el presente trabajo a partir de aproximaciones experimentales muy distintas, concluimos que Rac1 tiene un papel clave y predominante en la internalización del VPPA, si bien no podemos descartar otras funciones de la GTPasa en eventos más tardíos en la infección, como de hecho se pone de manifiesto en la inhibición de la proteína p72 (**Figura 30B**). Por otro lado, de acuerdo con los datos publicados por Quetglas y col., la función de las Rho-GTPasas parece ser clave en la maduración de los viriones y en la liberación de éstos al espacio extracelular (Quetglas y col., 2011), coincidiendo con la reducción de la producción viral obtenida en el este estudio cuando la actividad de Rac1 está inhibida.

Aunque en líneas generales la macropinocitosis está fuertemente regulada por Rac1 y Cdc42 al controlar la dinámica de los filamentos de actina, cada sistema viral controla esta señalización de una forma específica, no sólo seleccionando que factores están implicados, sino también a qué nivel de ruta de señalización actúan y qué factores regulan. Al igual que ocurre durante la entrada del VPPA, la macropinocitosis de otros muchos virus depende de la actividad de Rac1. Por ejemplo, la infección de la cepa WR de VV induce una fuerte activación de Rac1 durante la internalización (Mercer y Helenius, 2008) y sin embargo, la internalización de la cepa IHD-J depende en mayor medida de Cdc42, lo que determina una distinta restructuración de los filamentos de actina durante la internalización del virus (Mercer y col., 2010a). En este sentido, se ha publicado que la infección con el aislado Ba71V de VPPA no activa a Cdc42 durante la infección de células Vero (Quetglas y col., 2011). En el caso de Ad3, la entrada por macropinocitosis depende de Rac1, al igual que la infección del virus Ébola (Saeed y col., 2008), pero no de Cdc42 (Amstutz y col., 2008); y aunque Ad2 utiliza la CME para entrar en la célula, la activación de Rac1 es fundamental para la infección pues su internalización depende de la activación de la macropinocitosis (Li y col., 1998; Meier y col., 2002). Finalmente, en algunos casos, la entrada viral por macropinocitosis o por mecanismos endocíticos que comparten características con la macropinocitosis, parecen ser independientes de Rac1 y Cdc42; tal es el caso de la infección de CV y la de HPV-16 (Coyne y col., 2007; Schelhaas y col., 2012).

Como último factor imprescindible para la entrada viral por macropinocitosis, analizamos el papel que desempeña la quinasa Pak1 durante la entrada del VPPA en células Vero. Los resultados expuestos en esta memoria demuestran que el virus activa Pak1 durante la entrada viral, estando esta activación en consonancia con la de Rac1 al efectuar este factor su función a través de la activación de la quinasa. Estos resultados, junto con la acusada inhibición de la

internalización viral en presencia del inhibidor específico de Pak1 (IPA-3) (**Figura 32**), así como la reversión de la inhibición de la expresión de p32 cuando el tratamiento con IPA-3 se realiza después de la internalización viral (**Figura 33B**), demuestran que Pak1 es fundamental durante el proceso de entrada del VPPA y añaden otro punto de coincidencia con la clasificación de los virus que explotan la macropinocitosis como mecanismo endocítico. Nos parece interesante remarcar que, aunque en menor medida, la actividad de Pak1 también parece importante en procesos posteriores a la entrada viral, tal y como se muestra en la expresión de la proteína p24 en presencia de IPA-3 (**Figura 33B**). En línea con estos datos, la fosforilación de Pak1 mostrada a lo largo del ciclo viral podría justificar la función de la quinasa en estadios post-internalización controlando la dinámica de los filamentos de actina, que como ya hemos demostrado en este estudio y coincidiendo con otros trabajos (Basta y col., 2010; Jouvenet y col., 2006), no sólo es importante durante la entrada del virus sino también en etapas posteriores. Recientemente se ha publicado que durante la infección de células Caco-2 con Ecovirus tipo 1 (EV1) Pak1 desempeña un papel predominante durante etapas post-internalización, aunque también dirige la entrada viral por macropinocitosis (Krieger y col., 2013).

A diferencia de los otros factores celulares analizados en este estudio, en los que el grado de implicación en la macropinocitosis puede variar dependiendo del tipo de virus o modelo celular utilizado, Pak1 se erige como un factor fundamental en todas las etapas de la macropinocitosis, por lo que todos los virus que utilizan esta ruta para internalizar en la célula dependen de su actividad; ejemplo de ello son VV, HPV-16, Ad3, Ébola o FLUAV (Amstutz y col., 2008; de Vries y col., 2011; Mercer y Helenius, 2008; Rossman y col., 2012; Saeed y col., 2010; Schelhaas y col., 2012).

Por tanto, como resumen del trabajo aquí expuesto, el análisis de células Vero infectadas con la cepa viral Ba71V ha demostrado que durante la primera hora de internalización el VPPA induce la formación de protrusiones de membrana compatibles con *ruffles* y que éste proceso depende de la actividad de la GTPasa Rac1. En línea con estos resultados, hemos demostrado que el virus activa fuertemente a Rac1 durante los primeros 30 min de infección y favorece, al mismo tiempo, su distribución en protrusiones de membrana. Asimismo, el porcentaje de internalización viral está dramáticamente disminuido cuando la actividad de Rac1 está inhibida. Otro de los elementos fundamentales durante la entrada del VPPA es el citoesqueleto de actina, pues además de que la internalización viral está comprometida en presencia de inhibidores específicos, la infección induce la restructuración de los filamentos durante los primeros estadios de la entrada viral. Además, la formación de protrusiones de membrana compatibles con *blebs* se induce durante la primera hora de internalización viral en células IPAM independientemente del aislado viral utilizado. En relación a las quinastas que orquestan la

señalización de la macropinocitosis, hemos descrito que Pak1 se fosforila a partir de los 30 mpi y que su actividad quinasa es fundamental para la entrada viral. Igualmente, la activación de PI3K está fuertemente dirigida por la infección siendo un factor importante no sólo durante el proceso de entrada, sino también en etapas posteriores. Por último, pero no menos importante, hemos descrito que la entrada del VPPA cumple dos características específicas de la entrada por macropinocitosis. En primer lugar, la internalización del virus depende completamente de los canales Na^+/H^+ al inhibirse ésta en presencia de EIPA, y en segundo lugar, la infección induce la internalización de marcadores específicos con los cuales colocaliza en vesículas citoplasmáticas, indicando que el VPPA internaliza en la célula de forma directa por macropinocitosis.

5.2. MECANISMOS ALTERNATIVOS DE ENDOCITOSIS PARA LA ENTRADA DEL VPPA.

La entrada del VPPA es un proceso dependiente de energía, temperatura y pH vacuolar en el que factores como el colesterol y las proteasas celulares son fundamentales para el proceso (Alcamí y col., 1989a; Bernardes y col., 1998; Geraldés y Valdeira, 1985; Valdeira y col., 1998). Estudios previos han descrito que la entrada del virus, tanto en células Vero como en macrófagos, está mediada por receptores saturables presentes en la membrana siendo responsables de la unión e internalización viral. Todas estas características son compatibles, no sólo con la macropinocitosis, sino con otros tipos de endocitosis explotadas por los virus para internalizar en la célula huésped. La idea tradicional de que cada sistema viral utiliza un único tipo de mecanismo endocítico ha ido quedando obsoleta en los últimos años; virus como Ad (Amstutz y col., 2008; Meier y col., 2002), KSHV (Clement y col., 2006; Valiya Veetil y col., 2010) o FLUAV (de Vries y col., 2011) son ejemplos claros de cómo un mismo virus puede emplear diferentes tipos de endocitosis, estando esta versatilidad dirigida tanto por factores virales como celulares.

Durante los capítulos anteriores de la presente Tesis, hemos remarcado la importancia de la macropinocitosis en la entrada del VPPA; sin embargo, como se acaba de comentar, la existencia de otros mecanismos de endocitosis no son del todo descartables. En este sentido, recientemente se ha publicado un estudio que implica a la CME en la infección del VPPA (Hernaiz y Alonso, 2010). Utilizando nuestro mismo modelo experimental, Hernaiz y Alonso han demostrado que la infección, medida como expresión de la proteína viral temprana p32, está inhibida en células Vero que expresan el dominante negativo funcional de la proteína Eps15 (factor de reclutamiento en la membrana plasmática durante la CME) y de la dinamina-2 (factor imprescindible en la escisión de la vesícula endocítica). Además, los autores describen que alrededor del 60% de las partículas virales colocalizan con la cadena pesada de la clatrina

durante los primeros 20 min de internalización y que la expresión de la proteína p32 se inhibe cuando las células son tratadas con dinasore (inhibidor específico de la dinamina) y clorpromazine (CPZ; inhibidor de la CME), aunque la expresión de la proteína viral se recupera cuando el CPZ se añade 3 h después de la internalización viral. En contraste, datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la CME no es la ruta endocítica principalmente utilizada por el VPPA para internalizar, en contraposición al claro papel de la macropinocitosis, ya que aunque en nuestras manos el tratamiento con dinasore y CPZ inhibe la expresión de proteínas virales, coincidiendo con los datos publicados por Hernaez y Alonso, la internalización viral está sólo ligeramente reducida en presencia de dinasore y en absoluto afectada en presencia de CPZ (Sánchez y col., 2012). La causa(s) de estos datos aparentemente contradictorios puede residir por un lado, en las aproximaciones experimentales utilizadas en uno u otro estudio y por otro, en el complejo proceso que cada sistema viral explota para entrar en la célula huésped, pudiendo, probablemente, utilizar el virus tanto la macropinocitosis como la CME de forma independiente o complementaria. Aun así, a continuación se discutirán algunos de los factores a tener en cuenta en relación a la CME y la entrada del VPPA.

En primer lugar, debido a las restricciones impuestas por el gran tamaño de la partícula viral (200 nm de diámetro), la CME no se concibe, en principio, como el mecanismo más plausible para la entrada del VPPA en la célula puesto que las vesículas recubiertas de clatrina suelen tener un tamaño entre 85 y 120 nm, siendo utilizadas por virus pequeños como el Ad2/5 (Meier y col., 2002; Meier y Greber, 2004) y SFV (Helenius y col., 1980). Sin embargo, es cierto que en los últimos años, se ha descrito la eficiente participación de los filamentos de actina en la dinámica de la membrana plasmática promoviendo la internalización mediante CME de virus de mayor tamaño como el VSV (Curetton y col., 2009) y el KHSV (Greene y Gao, 2009), lo que abriría la posibilidad de que el VPPA también pueda internalizar utilizando estas vesículas.

En segundo lugar, es importante recalcar que uno de los factores más importantes que hay que tener en cuenta en los estudios de entrada viral es que los componentes celulares implicados en un tipo de entrada u otro pueden desempeñar varias funciones en la célula, lo que obliga a utilizar aproximaciones experimentales que definan específicamente su papel en la entrada y no en etapas posteriores a ésta. En este sentido, una de las diferencias fundamentales entre el trabajo de Hernaez y Alonso y el desarrollado en nuestro laboratorio es que, en su caso, siempre analizan la entrada del VPPA mediante la expresión de la proteína temprana p32 a las 6 hpi, y aunque obviamente este análisis puede servir para determinar si un factor celular es importante durante los primeros estadios de la infección, no permite implicarlo en la internalización viral. En línea con esto, aunque el CPZ no tuvo ningún efecto cuando analizamos la internalización viral por FACS (Sánchez y col., 2012), experimentos preliminares no publicados de nuestro

laboratorio indican que el CPZ ejerce su función inhibitoria durante los primeros 60 min de infección, pues la expresión de todas las proteínas virales se recupera si el tratamiento se realiza después de 60 min de internalización viral, en contraste con la fuerte inhibición que obtenemos cuando se realiza antes de la infección. Estos resultados, aparentemente contradictorios con los obtenidos mediante el análisis de la internalización por FACS, apuntan a un papel de la CME durante la primera hora de infección; sin embargo, hay que tener en cuenta que el CPZ, además de inhibir la formación de vesículas de clatrina, puede tener otros efectos secundarios. Entre ellos, se ha descrito que afecta a la fagocitosis (Elferink, 1979; Watanabe y col., 1988), e interfiere en la biogénesis de fagosomas y macropinosomas mediante la inhibición de la reorganización de los filamentos de actina (Amyere y col., 2000; Wells y col., 1999) e incluso, varía la fluidez de la membrana afectando a procesos fundamentales para varios tipos de endocitosis (Giocondi y col., 1995; Ogiso y col., 1981). Así y como consecuencia de esta variedad de efectos, se ha descrito que aunque HPV-16 y SV40 internalizan independientemente de CME, el tratamiento con CPZ es capaz de inhibir la infección (Schelhaas y col., 2012). No obstante y volviendo al VPPA, el hecho de que Hernaez y Alonso estudien la función de la CME no sólo mediante el uso del CPZ, sino que analizan la infección en presencia del mutante dominante negativo de Eps-15, confiere un papel funcional a este factor durante la infección del VPPA.

En cuanto a la función de la dinamina-2 durante la entrada e infección del virus, nuestros datos indican que aunque podría estar involucrada en la internalización viral, es más bien un factor fundamental en el avance de la infección (Sánchez y col., 2012), probablemente, mediante el control de procesos post-internalización. Conectando con estos datos, recientemente se ha implicado a la dinamina en el control de tráfico endosomal mediante la fisión de estructuras tubulares, lo cual es importante para la acidificación de los endosomas así como para el control de las rutas de reciclamiento y degradación (Mesaki y col., 2011). Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en ambos estudios (Hernaez y Alonso, 2010; Sánchez y col., 2012), el tratamiento con dinasore podría afectar al correcto avance de la infección impidiendo la acidificación endosomal, proceso imprescindible para la desencapsidación del virus (Alcamí y col., 1989a; Geraldés y Valdeira, 1985; Valdeira y col., 1998; Valdeira y Geraldés, 1985). Es interesante señalar que algunos trabajos han involucrado a esta GTPasa en la macropinocitosis, lo que puede estar en consonancia con nuestros datos (Sánchez y col., 2012). En concreto, se ha descrito que la dinamina-2 es un modulador esencial en la localización de Rac1 en los *ruffles* circulares y que la macropinocitosis inducida por PDGF en fibroblastos de rata se inhibe cuando la actividad de la GTPasa está comprometida (Liu y col., 2008; Schlunck y col., 2004). No obstante, la implicación de la dinamina en la entrada viral por macropinocitosis está siendo objeto de debate en la literatura, de manera que en algunos

sistemas la entrada viral es completamente independiente de su actividad (como ocurre en células Hela infectadas con VV (Mercer y Helenius, 2008)), pero en otros casos, como en la entrada de EV1 en células Caco-2, la función de la dinamina-2 es imprescindible durante la internalización por macropinocitosis (Krieger y col., 2013).

A pesar de las posibles explicaciones funcionales y metodológicas expuestas hasta ahora para concitar los datos publicados (Hernaez y Alonso, 2010; Sánchez y col., 2012), hay que considerar que tanto la macropinocitosis como la CME pueden ser una opción empleada por el VPPA para internalizar en la célula, ya sea utilizando uno de los mecanismos de forma prioritaria, o valiéndose conjuntamente de ambos para la eficiente internalización y producción viral, como ocurre con otros sistemas virales. Por ejemplo, en el caso de la infección de Ad2, aunque la internalización en células epiteliales es estrictamente dependiente de la CME, la unión del virus a integrinas de la membrana plasmática activa la macropinocitosis mediante la señalización de PI3K, Rac1 y Cdc42, teniendo un papel fundamental en la liberación de las partículas virales desde los endosomas al citosol para la eficiente producción viral (Meier y col., 2002). También se ha publicado que durante la infección del virus Ébola en células Vero y Hela, la macropinocitosis es la vía endocítica prioritaria pues la internalización de partículas infecciosas similares a la partícula viral completa (VLPs) depende de los canales Na^+/H^+ , Pak1, el citoesqueleto de actina y CtBP, aunque la CME tiene un papel minoritario al colocalizar las VLPs con clatrina y depender al infección de la función de la dinamina (Aleksandrowicz y col., 2011; Nanbo y col., 2010; Saeed y col., 2010). No sólo esto, sino que en el caso de FLUAV, tanto la forma esférica como filamentosa del virus activan la macropinocitosis y sin embargo, tras esta señalización común, las partículas virales filamentosas internalizan por *ruffles* y macropinosomas, mientras que las esféricas lo hacen mayoritariamente por vesículas recubiertas de clatrina (Rossman y col., 2012). Por último, cabe destacar que algunos factores celulares comprometidos con un tipo específico de endocitosis excepcionalmente pueden intervenir en otros procesos. Tal es el caso de la internalización de Mimivirus en macrófagos donde a pesar de que la vía endocítica utilizada es la fagocitosis, durante la internalización viral se observa una clara colocalización de las partículas virales con la clatrina, mientras que sorprendentemente, ni el tratamiento con CPZ ni el mutante Eps 15 inhiben la entrada viral.

Todos estos ejemplos dan muestra de la gran versatilidad que los virus exhiben durante su entrada en la célula huésped, pudiendo explotar un mecanismo endocítico concreto o varios al mismo tiempo, y en cada caso, el engranaje molecular que dirige la internalización estará gobernado por un repertorio específico de factores celulares y virales que pueden coincidir o no con los cánones de endocitosis establecidos, demostrando cómo los virus aprovechan la maquinaria celular en su propio beneficio.

Por tanto, los resultados expuestos en el presente estudio, junto con los publicados tanto por nuestro grupo (Sánchez y col., 2012) como por Hernaez y Alonso (Hernaez y Alonso, 2010) abren la puerta hacia una posible ruta alternativa para la entrada del VPPA en la que la macropinocitosis y la CME más que ser rutas excluyentes, sean mecanismos cooperativos asegurando una infección productiva. La **Figura 35** y la **Tabla 4** recogen los posibles mecanismos utilizados por el VPPA para entrar en la célula, así como los factores importantes descritos para su internalización discutidos en el presente trabajo.

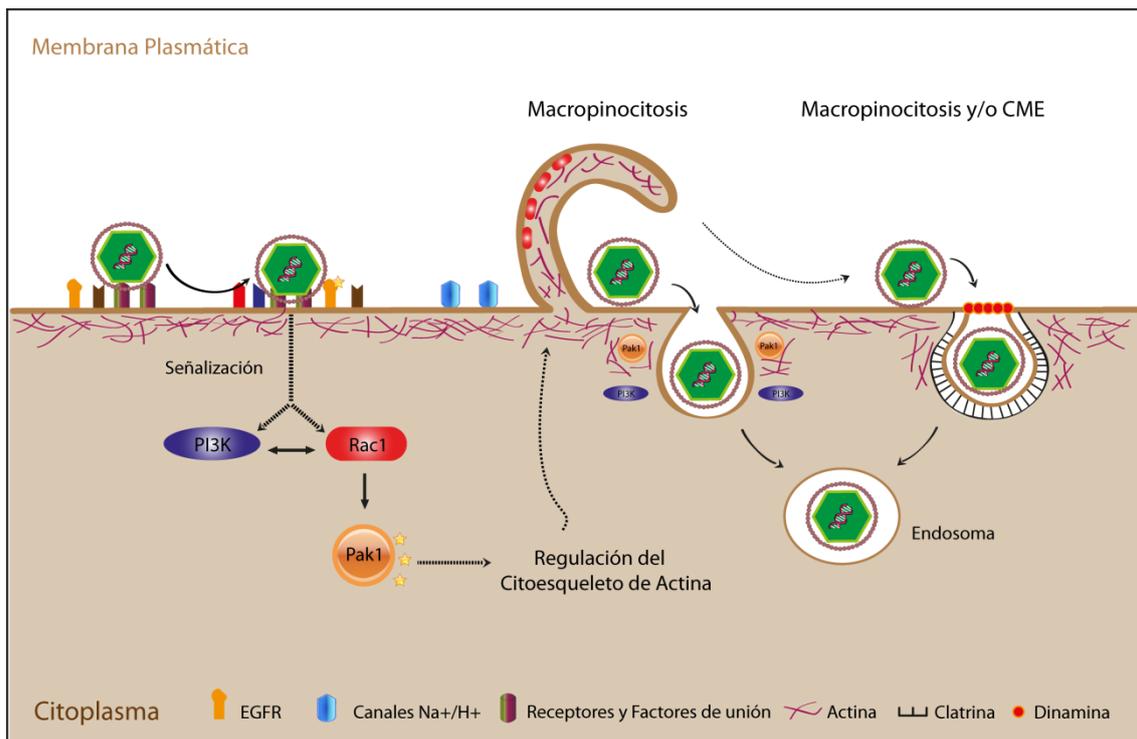


Figura 35. Modelo propuesto para la entrada del VPPA en células Vero. La interacción de la partícula viral con los receptores de membrana y factores de unión provoca la activación de rutas de señalización controladas por PI3K, EGFR y Rac1. Esta señalización, activa a la quinasa Pak1, que en último término, regula la dinámica de los filamentos de actina formando protrusiones de membrana en forma de *Ruffles*, internalizando el VPPA en la célula mediante macropinocitosis. Alternativamente, el virus podría entrar en la célula estrictamente por CME, o bien, esta endocitosis podría ser dirigida por la señalización que orquesta la macropinocitosis, al necesitar de la restructuración del citoesqueleto de actina para la efectiva internalización del virus por vesículas recubiertas cuyo tamaño podría limitar la internalización viral. En cualquier caso, las partículas virales llegarían a endosomas tempranos enriquecidos en EEA1 y fosfatidilinosítoles continuando su tráfico endosomal hasta la liberación del material genético al citoplasma celular.

<i>Factores Celulares</i>	<i>Inhibidores</i>	<i>Internalización</i>	<i>Post-internalización</i>
Canales Na ⁺ /H ⁺	EIPA	Sí ¹	No ²
Actina	Citocalasina D y B Latrunculina A	Sí ¹ /No ³	Sí ^{1,4} /No ²
Miosina II	Blebistatina	Sí ¹	Sí ¹
EGFR	324674	Sí ¹	Desconocido
PI3K	LY294002 Worthmanina	Sí ¹	Sí ^{1,2}
Rac1	NSC23766, Rac1-N17	Sí ¹ /No ²	Sí ^{1,2}
Pak1	IPA-3, Pak1-AID	Sí ¹	No
Tirosinas quinasas	Genisteina	Sí ¹	Desconocido
Dinamina-2	Dinasore	Sí ¹	Sí ^{1,2}
Clatrina	Clorpromazine	No ¹	Sí ^{1,2}
Microtúbulos	Nocodazol	No ¹	Sí ^{1,5}
Acidificación Vacuolar	Cloroquina, NH ₄ Cl	No ^{6,7}	Sí ⁴
Colesterol	MβCD	No ⁸	Sí ⁸

Tabla 4: Factores celulares involucrados en la internalización y/o infección del VPPA. En la tabla se representan los factores celulares que desempeñan un papel importante durante la infección del VPPA y han sido discutidos en el presente trabajo. La participación de estos factores se clasifica en base a su función estrictamente durante la internalización viral o en etapas post-internalización, según los datos publicados hasta la fecha. Además, también se muestra el tipo de inhibidor o construcción dominante negativa utilizado durante la infección para el análisis. Los números indican el trabajo específico que lo describe, tal como sigue: 1. (Sánchez y col., 2012); 2. (Hernaez y Alonso, 2010); 3. (Valdeira y col., 1998); 4. (Basta y col., 2010); 5. (Heath y col., 2001); 6. (Valdeira y Galdes, 1985); 7. (Galdes y Valdeira, 1985), 8. (Bernardes y col., 1998).

5.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

La exploración de un nuevo y posiblemente revelador mecanismo para confirmar la hipótesis que acabamos de mencionar, así como el estudio específico de la(s) vía(s) endocíticas empleadas por el VPPA durante la infección de macrófagos porcinos, célula diana en la infección natural, constituirán la continuación de la presente Tesis doctoral.

Puesto que los macrófagos constituyen una de las primeras líneas de defensa frente a la infección, conocer exactamente cómo el virus utiliza la endocitosis para entrar en esta célula huésped y cómo es capaz de evadir su destrucción por parte del ambiente oxidativo del macrófago y del sistema endosomal, puede ser fundamental para el desarrollo de vacunas o fármacos antivirales en el organismo desde los primeros momentos de la infección.

Conclusiones

1. La entrada del VPPA en la célula huésped estimula la formación de protrusiones de membrana típicas del proceso endocítico de macropinocitosis compatibles con *Ruffles* y *Blebs*. La formación de estas estructuras está en consonancia con la activación generalizada del citoesqueleto de actina durante la infección, de cuyo proceso depende la entrada viral.
2. La internalización de la cepa viral Ba71V en células Vero induce la formación de *Ruffles* en la membrana plasmática mediante la activación de la Rho-GTPasa Rac1 siendo su actividad imprescindible para la internalización en la célula huésped.
3. La señalización celular que se activa durante la entrada del VPPA y dirige la eficiente internalización del virus, está orquestada por factores celulares como el receptor del EGF o las quinasas PI3K y Pak1. Asimismo, la PI3K es un elemento central en la consecución de la infección viral controlando otras etapas post-internalización y necesarias para una infección productiva.
- 4- El tipo de protrusiones de membrana formadas como consecuencia de la señalización celular dirigida por el virus parece depender en mayor medida del tipo celular más que del tipo de cepa viral.
- 5- Aunque la macropinocitosis es un mecanismo prioritario durante la entrada de la cepa viral Ba71V en células Vero, otros procesos endocíticos podrían ser explotados por el virus de forma independiente o simultánea.

Bibliografía

Aderem A. y Underhill D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual review of immunology, 17: 593-623

Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M. y Fukami Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J Biol Chem, 262: 5592-5595

Alcamí A., Carrascosa A.L. y Viñuela E. (1989a). The entry of African swine fever virus into Vero cells. Virology, 171: 68-75

Alcamí A., Carrascosa A.L. y Viñuela E. (1989b). Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells. Virology, 168: 393-398

Alcamí A., Carrascosa A.L. y Viñuela E. (1990). Interaction of African swine fever virus with macrophages. Virus Res, 17: 93-104

Alcamí A. y Viñuela E. (1991). Fc receptors do not mediate African swine fever virus replication in macrophages. Virology, 181: 756-759

Aleksandrowicz P., Marzi A., Biedenkopf N., Beimforde N., Becker S., Hoenen T., Feldmann H. y Schnittler H.J. (2011). Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. J Infect Dis, 204 Suppl 3: S957-967

Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. y Hemmings B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J, 15: 6541-6551

Almazan F., Rodriguez J.M., Andres G., Perez R., Vinuela E. y Rodriguez J.F. (1992). Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. J Virol, 66: 6655-6667

Alonso C., Miskin J., Hernaez B., Fernandez-Zapatero P., Soto L., Canto C., Rodriguez-Crespo I., Dixon L. y Escribano J.M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. J Virol, 75: 9819-9827

Amstutz B., Gastaldelli M., Kalin S., Imelli N., Boucke K., Wandeler E., Mercer J., Hemmi S. y Greber U.F. (2008). Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. EMBO J, 27: 956-969

Amyere M., Payraastre B., Krause U., Van Der Smissen P., Veithen A. y Courtoy P.J. (2000). Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential

permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell*, 11: 3453-3467

Andres G., Garcia-Escudero R., Vinuela E., Salas M.L. y Rodriguez J.M. (2001). African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol*, 75: 6758-6768

Andres G., Simon-Mateo C. y Vinuela E. (1997). Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol*, 71: 2331-2341

Angulo A., Viñuela E. y Alcamí A. (1993). Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol*, 67: 5463-5471

Araki N., Egami Y., Watanabe Y. y Hatae T. (2007). Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp Cell Res*, 313: 1496-1507

Araki N., Hatae T., Furukawa A. y Swanson J.A. (2003). Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *J Cell Sci*, 116: 247-257

Araki N., Johnson M.T. y Swanson J.A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*, 135: 1249-1260

Argilaguet J.M., Perez-Martin E., Gallardo C., Salguero F.J., Borrego B., Lacasta A., Accensi F., Diaz I., Nofrarias M., Pujols J., Blanco E., Perez-Filgueira M., Escribano J.M. y Rodriguez F. (2011). Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*, 29: 5379-5385

Argilaguet J.M., Perez-Martin E., Nofrarias M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., Mora M., Ballester M., Galindo-Cardiel I., Lopez-Soria S., Escribano J.M., Reche P.A. y Rodriguez F. (2012). DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS one*, 7: e40942

Ballester M., Rodriguez-Carino C., Perez M., Gallardo C., Rodriguez J.M., Salas M.L. y Rodriguez F. (2011). Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection. *J Virol*, 85: 8263-8269

Bar-Sagi D. y Feramisco J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*, 233: 1061-1068

Bar-Sagi D., McCormick F., Milley R.J. y Feramisco J.R. (1987). Inhibition of cell surface ruffling and fluid-phase pinocytosis by microinjection of anti-ras antibodies into living cells. *Journal of cellular physiology Supplement*, Suppl 5: 69-73

Barr F. y Lambricht D.G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology*, 22: 461-470

Basta S., Gerber H., Schaub A., Summerfield A. y McCullough K.C. (2010). Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages. *Vet Microbiol*, 140: 9-17

Bayascas J.R. y Alessi D.R. (2005). Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell*, 18: 143-145

Benmerah A., Bayrou M., Cerf-Bensussan N. y Dautry-Varsat A. (1999). Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci*, 112 (Pt 9): 1303-1311

Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L. y Finberg R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275: 1320-1323

Bernardes C., Antonio A., Pedroso de Lima M.C. y Valdeira M.L. (1998). Cholesterol affects African swine fever virus infection. *Biochim Biophys Acta*, 1393: 19-25

Blome S., Gabriel C. y Beer M. (2013). Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res*, 173: 122-130

Breese S.S., Jr. y DeBoer C.J. (1966). Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 28: 420-428

Brodsky F.M., Chen C.Y., Kneuhl C., Towler M.C. y Wakeham D.E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 517-568

Brown F.D., Rozelle A.L., Yin H.L., Balla T. y Donaldson J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, 154: 1007-1017

Brunk U., Schellens J. y Westermark B. (1976). Influence of epidermal growth factor (EGF) on ruffling activity, pinocytosis and proliferation of cultivated human glia cells. *Exp Cell Res*, 103: 295-302

Bryant D.M., Kerr M.C., Hammond L.A., Joseph S.R., Mostov K.E., Teasdale R.D. y Stow J.L. (2007). EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *J Cell Sci*, 120: 1818-1828

Buchkovich N.J., Yu Y., Zampieri C.A. y Alwine J.C. (2008). The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat Rev Microbiol*, 6: 266-275

Burckhardt C.J. y Greber U.F. (2009). Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathog*, 5: e1000621

Burrage T.G. (2013). African swine fever virus infection in *Ornithodoros* ticks. *Virus Res*, 173: 131-139

Buss F., Kendrick-Jones J., Lionne C., Knight A.E., Cote G.P. y Paul Luzio J. (1998). The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol*, 143: 1535-1545

Carpenter C.L., Tolias K.F., Couvillon A.C. y Hartwig J.H. (1997). Signal transduction pathways involving the small G proteins rac and Cdc42 and phosphoinositide kinases. *Advances in enzyme regulation*, 37: 377-390

Carrasco L. y Almendral J.M. (2006) *Virus patógenos. Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias.* Universidad Autónoma de Madrid.

Carrascosa A.L., Bustos M.J., Galindo I. y Viñuela E. (1999). Virus-specific cell receptors are necessary, but not sufficient, to confer cell susceptibility to African swine fever virus. *Arch Virol*, 144: 1309-1321

Carrascosa A.L., del Val M., Santaren J.F. y Vinuela E. (1985). Purification and properties of African swine fever virus. *J Virol*, 54: 337-344

Carrascosa A.L., Saastre I., Gonzalez P. y Vinuela E. (1993). Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy. *Virology*, 193: 460-465

Carrascosa A.L., Sastre I. y Vinuela E. (1991). African swine fever virus attachment protein. *J Virol*, 65: 2283-2289

- Carrascosa J.L., Carazo J.M., Carrascosa A.L., Garcia N., Santisteban A. y Vinuela E.** (1984). General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, 132: 160-172
- Carrascosa J.L., Gonzalez P., Carrascosa A.L., Garcia-Barreno B., Enjuanes L. y Vinuela E.** (1986). Localization of structural proteins in African swine fever virus particles by immunoelectron microscopy. *J Virol*, 58: 377-384
- Castello A., Quintas A., Sánchez E.G., Sabina P., Nogal M., Carrasco L. y Revilla Y.** (2009). Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog*, 5: e1000562
- Clement C., Tiwari V., Scanlan P.M., Valyi-Nagy T., Yue B.Y. y Shukla D.** (2006). A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol*, 174: 1009-1021
- Cooray S.** (2004). The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol*, 85: 1065-1076
- Costard S., Mur L., Lubroth J., Sanchez-Vizcaino J.M. y Pfeiffer D.U.** (2013). Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res*, 173: 191-197
- Coue M., Brenner S.L., Spector I. y Korn E.D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett*, 213: 316-318
- Coyne C.B., Shen L., Turner J.R. y Bergelson J.M.** (2007). Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe*, 2: 181-192
- Cuesta-Geijo M.A., Galindo I., Hernaez B., Quetglas J.I., Dalmau-Mena I. y Alonso C.** (2012). Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry. *PLoS one*, 7: e48853
- Cureton D.K., Massol R.H., Saffarian S., Kirchhausen T.L. y Whelan S.P.** (2009). Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog*, 5: e1000394
- Cureton D.K., Massol R.H., Whelan S.P. y Kirchhausen T.** (2010). The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Pathog*, 6: e1001127

Chan G., Nogalski M.T. y Yurochko A.D. (2009). Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 22369-22374

Charras G.T., Hu C.K., Coughlin M. y Mitchison T.J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*, 175: 477-490

Chen C. y Zhuang X. (2008). Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11790-11795

Chen Y. y Norkin L.C. (1999). Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp Cell Res*, 246: 83-90

Chong C., Tan L., Lim L. y Manser E. (2001). The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem*, 276: 17347-17353

Damke H., Baba T., Warnock D.E. y Schmid S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*, 127: 915-934

Davies P.F. y Ross R. (1978). Mediation of pinocytosis in cultured arterial smooth muscle and endothelial cells by platelet-derived growth factor. *J Cell Biol*, 79: 663-671

de Leon P., Bustos M.J. y Carrascosa A.L. (2013). Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res*, 173: 168-179

de Matos A.P. y Carvalho Z.G. (1993). African swine fever virus interaction with microtubules. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 78: 229-234

de Vries E., Tscherne D.M., Wienholts M.J., Cobos-Jimenez V., Scholte F., Garcia-Sastre A., Rottier P.J. y de Haan C.A. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog*, 7: e1001329

Deacon S.W., Beeser A., Fukui J.A., Rennefahrt U.E., Myers C., Chernoff J. y Peterson J.R. (2008). An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem Biol*, 15: 322-331

del Val M., Carrascosa J.L. y Vinuela E. (1986). Glycosylated components of African swine fever virus particles. *Virology*, 152: 39-49

Dharmawardhane S., Sanders L.C., Martin S.S., Daniels R.H. y Bokoch G.M. (1997). Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytotic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *J Cell Biol*, 138: 1265-1278

Dharmawardhane S., Schurmann A., Sells M.A., Chernoff J., Schmid S.L. y Bokoch G.M. (2000). Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell*, 11: 3341-3352

Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., Liverani E., Nix R., Silk R. y Zhang F. (2004). African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol*, 100: 117-134

Dixon L.K., Alonso C., Escribano J.M., Martins C., Revilla Y., Salas M.L., Takamatsu H. (2012). Asfarviridae Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier: 153-162

Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L. y Upton C. (2013). African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 173: 3-14

Doherty G.J. y McMahon H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78: 857-902

Donaldson J.G., Porat-Shliom N. y Cohen L.A. (2009). Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling*, 21: 1-6

Dulbecco R. y Freeman G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8: 396-397

Earp L.J., Delos S.E., Park H.E. y White J.M. (2005). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 285: 25-66

Elferink J.G. (1979). Chlorpromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical pharmacology*, 28: 965-968

Enjuanes L., Carrascosa A.L., Moreno M.A. y Vinuela E. (1976). Titration of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol*, 32: 471-477

Escribano J.M., Galindo I. y Alonso C. (2013). Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. *Virus Res*, 173: 101-109

Esteves A., Marques M.I. y Costa J.V. (1986). Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology*, 152: 192-206

Etienne-Manneville S. y Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629-635

Gao Y., Dickerson J.B., Guo F., Zheng J. y Zheng Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 7618-7623

Garcia-Barreno B., Sanz A., Nogal M.L., Vinuela E. y Enjuanes L. (1986). Monoclonal antibodies of African swine fever virus: antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture. *J Virol*, 58: 385-392

Garcia-Beato R., Salas M.L., Vinuela E. y Salas J. (1992). Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology*, 188: 637-649

Garcia-Escudero R., Andres G., Almazan F. y Viñuela E. (1998). Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J Virol*, 72: 3185-3195

Geraldes A. y Valdeira M.L. (1985). Effect of chloroquine on African swine fever virus infection. *J Gen Virol*, 66 (Pt 5): 1145-1148

Ghigo E. (2010). A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology*, 53: 274-283

Ghigo E., Kartenbeck J., Lien P., Pelkmans L., Capo C., Mege J.L. y Raoult D. (2008). Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog*, 4: e1000087

Giocondi M.C., Mamdouh Z. y Le Grimellec C. (1995). Benzyl alcohol differently affects fluid phase endocytosis and exocytosis in renal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1234: 197-202

Gold E.S., Underhill D.M., Morrissette N.S., Guo J., McNiven M.A. y Aderem A. (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 190: 1849-1856

Gomez-Puertas P., Rodriguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C. y Escribano J.M. (1998). The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 243: 461-471

Gomez-Puertas P., Rodriguez F., Oviedo J.M., Ramiro-Ibanez F., Ruiz-Gonzalvo F., Alonso C. y Escribano J.M. (1996). Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol*, 70: 5689-5694

Gomez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Sanchez-Cordon P.J. y Carrasco L. (2013). Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. *Virus Res*, 173: 140-149

Granja A.G., Nogal M.L., Hurtado C., Del Aguila C., Carrascosa A.L., Salas M.L., Fresno M. y Revilla Y. (2006a). The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway. *J Immunol*, 176: 451-462

Granja A.G., Nogal M.L., Hurtado C., Vila V., Carrascosa A.L., Salas M.L., Fresno M. y Revilla Y. (2004). The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem*, 279: 53736-53746

Granja A.G., Perkins N.D. y Revilla Y. (2008). A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300. *J Immunol*, 180: 2429-2442

Granja A.G., Sabina P., Salas M.L., Fresno M. y Revilla Y. (2006b). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *J Virol*, 80: 10487-10496

Granja A.G., Sánchez E.G., Sabina P., Fresno M. y Revilla Y. (2009). African swine fever virus blocks the host cell antiviral inflammatory response through a direct inhibition of PKC-theta-mediated p300 transactivation. *J Virol*, 83: 969-980

Greber U.F. (2002). Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci*, 59: 608-626

Greene W. y Gao S.J. (2009). Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog*, 5: e1000512

Grimmer S., van Deurs B. y Sandvig K. (2002). Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci*, 115: 2953-2962

Haigler H.T., McKanna J.A. y Cohen S. (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol*, 83: 82-90

Hannemann S., Madrid R., Stastna J., Kitzing T., Gasteier J., Schonichen A., Bouchet J., Jimenez A., Geyer M., Grosse R., Benichou S. y Fackler O.T. (2008). The Diaphanous-related Formin FHOD1 associates with ROCK1 and promotes Src-dependent plasma membrane blebbing. *J Biol Chem*, 283: 27891-27903

Harrison S.C. (2005). Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Advances in virus research*, 64: 231-261

Hartwig J.H., Bokoch G.M., Carpenter C.L., Janmey P.A., Taylor L.A., Toker A. y Stossel T.P. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*, 82: 643-653

Haspot F., Lavault A., Sinzger C., Laib Sampaio K., Stierhof Y.D., Pilet P., Bressolette-Bodin C. y Halary F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one*, 7: e34795

Hawkins P.T., Anderson K.E., Davidson K. y Stephens L.R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*, 34: 647-662

Hawkins P.T., Eguinoa A., Qiu R.G., Stokoe D., Cooke F.T., Walters R., Wennstrom S., Claesson-Welsh L., Evans T., Symons M. y et al. (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Current biology : CB*, 5: 393-403

Heath C.M., Windsor M. y Wileman T. (2001). Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol*, 153: 449-455

Helenius A., Kartenbeck J., Simons K. y Fries E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol*, 84: 404-420

Hernaiz B. y Alonso C. (2010). Dynamin- and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. *J Virol*, 84: 2100-2109

Hinshaw J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: 483-519

Hogle J.M. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual review of microbiology*, 56: 677-702

Holzinger A. y Meindl U. (1997). Jasplakinolide, a novel actin targeting peptide, inhibits cell growth and induces actin filament polymerization in the green alga *Micrasterias*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 38: 365-372

Huotari J. y Helenius A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30: 3481-3500

Hurtado C., Bustos M.J. y Carrascosa A.L. (2010). The use of COS-1 cells for studies of field and laboratory African swine fever virus samples. *J Virol Methods*, 164: 131-134

Hurtado C., Granja A.G., Bustos M.J., Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., de Yebenes V.G., Salas M.L., Revilla Y. y Carrascosa A.L. (2004). The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology*, 326: 160-170

Jones A.T. (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med*, 11: 670-684

Jouvenet N., Monaghan P., Way M. y Wileman T. (2004). Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J Virol*, 78: 7990-8001

Jouvenet N., Windsor M., Rietdorf J., Hawes P., Monaghan P., Way M. y Wileman T. (2006). African swine fever virus induces filopodia-like projections at the plasma membrane. *Cellular microbiology*, 8: 1803-1811

Kane P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 70: 177-191

Karjalainen M., Kakkonen E., Upla P., Paloranta H., Kankaanpaa P., Liberali P., Renkema G.H., Hyypia T., Heino J. y Marjomaki V. (2008). A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol Biol Cell*, 19: 2857-2869

Kee S.H., Cho E.J., Song J.W., Park K.S., Baek L.J. y Song K.J. (2004). Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiol Immunol*, 48: 823-829

Kerr M.C., Lindsay M.R., Luetterforst R., Hamilton N., Simpson F., Parton R.G., Gleeson P.A. y Teasdale R.D. (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J Cell Sci*, 119: 3967-3980

Kerr M.C. y Teasdale R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10: 364-371

Kielian M. y Rey F.A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol*, 4: 67-76

King K., Chapman D., Argilaguet J.M., Fishbourne E., Hutet E., Cariolet R., Hutchings G., Oura C.A., Netherton C.L., Moffat K., Taylor G., Le Potier M.F., Dixon L.K. y Takamatsu H.H. (2011). Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, 29: 4593-4600

Koivusalo M., Welch C., Hayashi H., Scott C.C., Kim M., Alexander T., Touret N., Hahn K.M. y Grinstein S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol*, 188: 547-563

Kotani K., Hara K., Yonezawa K. y Kasuga M. (1995). Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochemical and biophysical research communications*, 208: 985-990

Kovacs M., Toth J., Hetenyi C., Malnasi-Csizmadia A. y Sellers J.R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, 279: 35557-35563

Kraynov V.S., Chamberlain C., Bokoch G.M., Schwartz M.A., Slabaugh S. y Hahn K.M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, 290: 333-337

Krieger S.E., Kim C., Zhang L., Marjomaki V. y Bergelson J.M. (2013). Echovirus 1 entry into polarized caco-2 cells depends on dynamin, cholesterol, and cellular factors associated with macropinocytosis. *J Virol*, 87: 8884-8895

Lafourcade C., Sobo K., Kieffer-Jaquinod S., Garin J. y van der Goot F.G. (2008). Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS one*, 3: e2758

Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G. y Di Fiore P.P. (2004). Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature*, 429: 309-314

Lewis W.H. (1931). Pinocytosis. 17-27

Li E., Stupack D., Bokoch G.M. y Nemerow G.R. (1998). Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol*, 72: 8806-8812

Liberali P., Kakkonen E., Turacchio G., Valente C., Spaar A., Perinetti G., Bockmann R.A., Corda D., Colanzi A., Marjomaki V. y Luini A. (2008a). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J*, 27: 970-981

Liberali P., Ramo P. y Pelkmans L. (2008b). Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24: 501-523

Limouze J., Straight A.F., Mitchison T. y Sellers J.R. (2004). Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil*, 25: 337-341

- Lindmo K. y Stenmark H.** (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*, 119: 605-614
- Liu Y.W., Surka M.C., Schroeter T., Lukiyanchuk V. y Schmid S.L.** (2008). Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells. *Mol Biol Cell*, 19: 5347-5359
- Lundmark R., Doherty G.J., Vallis Y., Peter B.J. y McMahon H.T.** (2008). Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *The Biochemical journal*, 414: 189-194
- Luo M.** (2012). Influenza virus entry. *Advances in experimental medicine and biology*, 726: 201-221
- Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C. y Kirchhausen T.** (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, 10: 839-850
- Manser E., Huang H.Y., Loo T.H., Chen X.Q., Dong J.M., Leung T. y Lim L.** (1997). Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Molecular and cellular biology*, 17: 1129-1143
- Manser E., Leung T., Salihuddin H., Zhao Z.S. y Lim L.** (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 367: 40-46
- Marsh M. y Helenius A.** (2006). Virus entry: open sesame. *Cell*, 124: 729-740
- Marttila M., Persson D., Gustafsson D., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Wadell G. y Arnberg N.** (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*, 79: 14429-14436
- Masereel B., Pochet L. y Laeckmann D.** (2003). An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem*, 38: 547-554
- Meier O., Boucke K., Hammer S.V., Keller S., Stidwill R.P., Hemmi S. y Greber U.F.** (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*, 158: 1119-1131
- Meier O. y Greber U.F.** (2004). Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, 6 Suppl 1: S152-163
- Mellman I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12: 575-625

Mercer J. y Helenius A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320: 531-535

Mercer J. y Helenius A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol*, 11: 510-520

Mercer J., Knebel S., Schmidt F.I., Crouse J., Burkard C. y Helenius A. (2010a). Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 9346-9351

Mercer J., Schelhaas M. y Helenius A. (2010b). Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 79: 803-833

Mesaki K., Tanabe K., Obayashi M., Oe N. y Takei K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS one*, 6: e19764

Mettlen M., Pucadyil T., Ramachandran R. y Schmid S.L. (2009). Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*, 37: 1022-1026

Miranda A.F., Godman G.C., Deitch A.D. y Tanenbaum S.W. (1974a). Action of cytochalasin D on cells of established lines. I. Early events. *J Cell Biol*, 61: 481-500

Miranda A.F., Godman G.C. y Tanenbaum S.W. (1974b). Action of cytochalasin D on cells of established lines. II. Cortex and microfilaments. *J Cell Biol*, 62: 406-423

Montgomery R.E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa. *J Comp Pathol*: 59-131

Moreno-Ruiz E., Galan-Diez M., Zhu W., Fernandez-Ruiz E., d'Enfert C., Filler S.G., Cossart P. y Veiga E. (2009). *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cellular microbiology*, 11: 1179-1189

Morgan C. y Howe C. (1968). Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. IX. Entry of parainfluenza I (Sendai) virus. *J Virol*, 2: 1122-1132

Mousavi S.A., Malerod L., Berg T. y Kjekshus R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal*, 377: 1-16

Nanbo A., Imai M., Watanabe S., Noda T., Takahashi K., Neumann G., Halfmann P. y Kawaoka Y. (2010). Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog*, 6: e1001121

Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F. y Rock D.L. (2004). Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 319: 337-342

Nemerow G.R. y Stewart P.L. (1999). Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 63: 725-734

Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., Rodriguez C., Cubelos B., Carrascosa A.L., Salas M.L. y Revilla Y. (2001). African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol*, 75: 2535-2543

Ogiso T., Iwaki M. y Mori K. (1981). Fluidity of human erythrocyte membrane and effect of chlorpromazine on fluidity and phase separation of membrane. *Biochim Biophys Acta*, 649: 325-335

Parrini M.C., Matsuda M. y de Gunzburg J. (2005). Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. *Biochem Soc Trans*, 33: 646-648

Parton R.G. y Simons K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 185-194

Patel M., Yanagishita M., Roderiquez G., Bou-Habib D.C., Oravec T., Hascall V.C. y Norcross M.A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS research and human retroviruses*, 9: 167-174

Pearse B.M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 1255-1259

Pelkmans L., Fava E., Grabner H., Hannus M., Habermann B., Krausz E. y Zerial M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, 436: 78-86

Pelkmans L. y Helenius A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic*, 3: 311-320

Pelkmans L., Kartenbeck J. y Helenius A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 3: 473-483

Pelkmans L., Puntener D. y Helenius A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 296: 535-539

Pizarro-Cerda J., Bonazzi M. y Cossart P. (2010). Clathrin-mediated endocytosis: what works for small, also works for big. *Bioessays*, 32: 496-504

Prados F.J., Viñuela E. y Alcamí A. (1993). Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of African swine fever virus. *J Virol*, 67: 2475-2485

Quetglas J.I., Hernaez B., Galindo I., Munoz-Moreno R., Cuesta-Geijo M.A. y Alonso C. (2011). Small rho GTPases and cholesterol biosynthetic pathway intermediates in African swine fever virus infection. *J Virol*, 86: 1758-1767

Quetglas J.I., Hernaez B., Galindo I., Munoz-Moreno R., Cuesta-Geijo M.A. y Alonso C. (2012). Small rho GTPases and cholesterol biosynthetic pathway intermediates in African swine fever virus infection. *J Virol*, 86: 1758-1767

Racoosin E.L. y Swanson J.A. (1989). Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 170: 1635-1648

Radhakrishna H., Al-Awar O., Khachikian Z. y Donaldson J.G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci*, 112 (Pt 6): 855-866

Radhakrishna H., Klausner R.D. y Donaldson J.G. (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol*, 134: 935-947

Revilla Y., Callejo M., Rodriguez J.M., Culebras E., Nogal M.L., Salas M.L., Vinuela E. y Fresno M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem*, 273: 5405-5411

Revilla Y., Cebrian A., Baixeras E., Martinez C., Vinuela E. y Salas M.L. (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology*, 228: 400-404

Revilla Y., Pena L. y Vinuela E. (1992). Interferon-gamma production by African swine fever virus-specific lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 35: 225-230

Ridley A.J. (1994). Membrane ruffling and signal transduction. *Bioessays*, 16: 321-327

Ridley A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, 16: 522-529

Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D. y Hall A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70: 401-410

Rodriguez J.M., Garcia-Escudero R., Salas M.L. y Andres G. (2004). African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol*, 78: 4299-1313

Rodriguez J.M. y Salas M.L. (2013). African swine fever virus transcription. *Virus Res*, 173: 15-28

Rodriguez J.M., Salas M.L. y Vinuela E. (1996). Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus. *J Virol*, 70: 8584-8589

Rodriguez J.M., Yanez R.J., Almazan F., Viñuela E. y Rodriguez J.F. (1993). African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J Virol*, 67: 5312-5320

Rojo G., Garcia-Beato R., Vinuela E., Salas M.L. y Salas J. (1999). Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology*, 257: 524-536

Rossman J.S., Leser G.P. y Lamb R.A. (2012). Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J Virol*, 86: 10950-10960

Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E. y Dixon L.K. (2008). African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerging infectious diseases*, 14: 1870-1874

Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T. y Davey R.A. (2010). Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog*, 6: e1001110

Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Freiberg A.N., Holbrook M.R. y Davey R.A. (2008). Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog*, 4: e1000141

Salas M.L. y Andres G. (2013). African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res*, 173: 29-41

Salas M.L., Rey-Campos J., Almendral J.M., Talavera A. y Vinuela E. (1986). Transcription and translation maps of African swine fever virus. *Virology*, 152: 228-240

Sampath P. y Pollard T.D. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry*, 30: 1973-1980

Sánchez-Torres C., Gómez-Puertas P., Gómez-del-Moral M., Alonso F., Escribano J.M., Ezquerro A. y Domínguez J. (2003). Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol*, 148: 2307-2323

Sánchez E.G., Quintas A., Nogal M., Castelló A. y Revilla Y. (2013). African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res*, 173: 58-75

Sánchez E.G., Quintas A., Pérez-Nuñez D., Nogal M., Barroso S., Carrascosa A.L. y Revilla Y. (2012). African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells. *PLoS Pathog*, 8: e1002754

Santaren J.F. y Vinuela E. (1986). African swine fever virus-induced polypeptides in Vero cells. *Virus Res*, 5: 391-405

Sanz A., Garcia-Barreno B., Nogal M.L., Vinuela E. y Enjuanes L. (1985). Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins. *J Virol*, 54: 199-206

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M. y Sabatini D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098-1101

Schafer D.A., D'Souza-Schorey C. y Cooper J.A. (2000). Actin assembly at membranes controlled by ARF6. *Traffic*, 1: 892-903

Schelhaas M., Shah B., Holzer M., Blattmann P., Kuhling L., Day P.M., Schiller J.T. y Helenius A. (2012). Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*, 8: e1002657

Schlunck G., Damke H., Kiosses W.B., Rusk N., Symons M.H., Waterman-Storer C.M., Schmid S.L. y Schwartz M.A. (2004). Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Mol Biol Cell*, 15: 256-267

Schmidt F.I., Bleck C.K., Helenius A. y Mercer J. (2011). Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J*, 30: 3647-3661

Schnatwinkel C., Christoforidis S., Lindsay M.R., Uttenweiler-Joseph S., Wilm M., Parton R.G. y Zerial M. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS biology*, 2: E261

Schneider-Schaulies J. (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, 81: 1413-1429

Sechi A.S. y Wehland J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 113 Pt 21: 3685-3695

Sells M.A. y Chernoff J. (1997). Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol*, 7: 162-167

Sells M.A., Knaus U.G., Bagrodia S., Ambrose D.M., Bokoch G.M. y Chernoff J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Current biology* : CB, 7: 202-210

Sever S., Damke H. y Schmid S.L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 150: 1137-1148

Skehel J.J. y Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69: 531-569

Smith C.J. y Pearse B.M. (1999). Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol*, 9: 335-338

Soares J.A., Leite F.G., Andrade L.G., Torres A.A., De Sousa L.P., Barcelos L.S., Teixeira M.M., Ferreira P.C., Kroon E.G., Souto-Padron T. y Bonjardim C.A. (2009). Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol*, 83: 6883-6899

Stein B.S., Gowda S.D., Lifson J.D., Penhallow R.C., Bensch K.G. y Engleman E.G. (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, 49: 659-668

Swanson J.A. (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci*, 94 (Pt 1): 135-142

Swanson J.A. y Watts C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, 5: 424-428

Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilaguet J.M., Netherton C.L., Oura C.A., Martins C. y Rodriguez F. (2013). Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res*, 173: 110-121

Takei K. y Haucke V. (2001). Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*, 11: 385-391

Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D. y Gordon S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology*, 23: 901-944

Ugolini S., Mondor I. y Sattentau Q.J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends in microbiology*, 7: 144-149

Underhill D.M. y Ozinsky A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*, 20: 825-852

Valdeira M.L., Bernardes C., Cruz B. y Geraldés A. (1998). Entry of African swine fever virus into Vero cells and uncoating. *Vet Microbiol*, 60: 131-140

Valdeira M.L. y Geraldés A. (1985). Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 55: 35-40

Valiya Veetil M., Sadagopan S., Kerur N., Chakraborty S. y Chandran B. (2010). Interaction of c-Cbl with myosin IIA regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *PLoS Pathog*, 6: e1001238

Vasquez R.J., Howell B., Yvon A.M., Wadsworth P. y Cassimeris L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*, 8: 973-985

Veiga E. y Cossart P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 7: 894-900

Villeda C.J., Williams S.M., Wilkinson P.J. y Vinuela E. (1993). Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol*, 133: 467-475

Viñuela E. (1985). African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 116: 151-170

Vlasak M., Goesler I. y Blaas D. (2005). Human rhinovirus type 89 variants use heparan sulfate proteoglycan for cell attachment. *J Virol*, 79: 5963-5970

Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Wymann M.P. y Williams R.L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell*, 6: 909-919

Wang L.H., Rothberg K.G. y Anderson R.G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, 123: 1107-1117

Wang X., Huong S.M., Chiu M.L., Raab-Traub N. y Huang E.S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 424: 456-461

Wardley R.C., Norley S.G., Wilkinson P.J. y Williams S. (1985). The role of antibody in protection against African swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 9: 201-212

Watanabe S., Hirose M., Miyazaki A., Tomono M., Takeuchi M., Kitamura T. y Namihisa T. (1988). Calmodulin antagonists inhibit the phagocytic activity of cultured Kupffer cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 59: 214-218

Wells A., Ware M.F., Allen F.D. y Lauffenburger D.A. (1999). Shaping up for shipping out: PLCgamma signaling of morphology changes in EGF-stimulated fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton*, 44: 227-233

Wells C.M., Walmsley M., Ooi S., Tybulewicz V. y Ridley A.J. (2004). Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci*, 117: 1259-1268

Wennstrom S., Hawkins P., Cooke F., Hara K., Yonezawa K., Kasuga M., Jackson T., Claesson-Welsh L. y Stephens L. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Current biology : CB*, 4: 385-393

West M.A., Bretscher M.S. y Watts C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol*, 109: 2731-2739

West M.A., Prescott A.R., Eskelinen E.L., Ridley A.J. y Watts C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Current biology : CB*, 10: 839-848

Wilen C.B., Tilton J.C. y Doms R.W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2

WuDunn D. y Spear P.G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol*, 63: 52-58

Yañez R.J., Rodríguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodríguez J.F. y Vinuela E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, 208: 249-278

Zenke F.T., King C.C., Bohl B.P. y Bokoch G.M. (1999). Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem*, 274: 32565-32573

Anexo 1

Inhibidores Farmacológicos	Tratamiento 3 horas		Tratamiento 18 horas	
	Concentración (µM)	% Células Muertas	Concentración (µM)	% Células Muertas
DMSO	0.2 %	1.3	0.2 %	1.6
Blebistatina	N/D	N/D	40	4
			60	7
EIPA	20	1.5	20	2.9
	40	2	40	3
	60	2.5	60	5
Citocalasina D	8	5.2	4	12
LY294002	60	3.6	20	3
324674	20	2.5	5	6.1
	40	4.3	10	6.5
	60	5.7	20	26.7
Genisteina	40	2	10	2
	60	2.5	20	2.2
	80	4.4	40	3
NSC23766	200	3	200	5
IPA-3	30	15	1	5.4
			5	5.6
			10	10
Dinasore	100	4	100	8
Nocodazol	N/D	N/D	16	2
			32	2.2
			64	3
Clorpromazine	20	8	10	10
	30	20	15	20
			20	50

Tabla. Citotoxicidad de los inhibidores farmacológicos. Las células Vero fueron tratadas con inhibidores farmacológicos a diferentes concentraciones durante 3 y 18 horas en medio sin suero fetal. Tras el tratamiento, se tripsinizaron y se tiñeron con azul Tripan. Se representa el porcentaje medio de células muertas de tres experimentos independientes (n=3; media ± D.E). D.E., desviación estándar.

