

Interferencia del Herpesvirus equino 1 (EHV-1) en la apoptosis inducida*

Interference Equine herpesvirus 1 (EHV-1) induced apoptosis

SCROCHI, M.R.^{1,2,4}; ZANUZZI, C.N.^{2,4}; MUGLIA, C.I.^{4,6}; FUENTEALBA, N.A.^{1,4}; NISHIDA, F.^{3,4}; GIMENO E.^{3,4};
BARBEITO, C.G.^{2,3,4}; PORTIANSKY, E.L.^{3,4}; GALOSI, C.M.^{1,5}

Cátedra de ¹Virología, ²Histología y Embriología, ³Patología General/Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Calle 60 y 118 s/n., (1900) La Plata. ⁴CCT- CONICET, Calle 8 N° 1467 (1900) La Plata. ⁵Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires, Calle 10 y 526, (1900) la Plata, Buenos Aires. ⁶Laboratorio de investigaciones del sistema inmune (LISIN), Facultad Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Calle 45 y 115 (1900).

* Premio Estimulo a la Investigación Científica de la convocatoria 2012. Categoría Graduados de Facultades de Veterinaria del país.

RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que puede ser desencadenada por múltiples factores, tanto internos como externos; dentro de estos últimos se encuentran las infecciones virales. Algunos alphaherpesvirus han desarrollado diversas estrategias para retardar o inhibir la muerte celular obteniendo, de esta manera, su propio beneficio al poder permanecer durante más tiempo en la célula. Hasta el momento no se ha identificado ningún mecanismo relacionado con la modulación de la muerte celular durante la infección con Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1). El objetivo del presente trabajo fue describir el efecto producido por la infección con EHV-1 sobre cultivos celulares inducidos a la muerte por apoptosis. La evaluación de la apoptosis se realizó mediante el reconocimiento de la fragmentación en escalera del ADN, la evaluación de la relación Anexina V/ioduro de propidio (IP) y la determinación del clivaje de la citoqueratina 18, utilizando técnicas de inmunofluorescencia. Los resultados indican una posible interferencia del EHV-1 con la muerte por apoptosis hacia la mitad de su ciclo de replicación, que se incrementa hacia el final del mismo.

Palabras clave: (anexina V), (apoptosis), (citoqueratina 18), (fragmentación de ADN), (Herpesvirus equino 1).

Correspondencia *e-mail*: Mariela Scrochi scrochimariela@gmail.com

Recibido: 29-10-2013

Aceptado: 16-12-2013

SUMMARY

Apoptosis is a programmed cell death that can be triggered by many factors, both internal and external. Viral infections are included among the latter. Some alphaherpesvirus have developed several strategies to retard or inhibit cell death and thus the virus benefits itself by staying longer in the cell. So far, no mechanisms have been identified related to modulation of cell death during infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1). The aim of the present study was to describe the effect produced by the infection with EHV-1 on apoptosis-induced cell cultures. Assessment of apoptosis was performed by DNA laddering, the Annexin V/propidium iodide (PI) determination and the cytokeratin 18 cleavage analysis using immunofluorescence techniques. Results indicate a possible interference of EHV-1 with apoptotic cell death in the middle of its replication cycle, being increased by its end.

Key words: (annexin V), (apoptosis), (cytokeratin 18), (DNA laddering), (Equid herpes virus 1).

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se desencadena en respuesta a una variedad de estímulos inherentes a la célula^{7,11,17,20}, o como consecuencia de factores externos, como ciertos procesos infecciosos¹³. En la apoptosis se producen cambios morfológicos que reflejan la activación de diferentes mecanismos moleculares y bioquímicos. Su iniciación y ejecución están principalmente reguladas por enzimas. El complejo enzimático de cisteinil aspartato proteasas, más conocido como caspasas, participa activamente en el desencadenamiento de este tipo de muerte celular. Sin embargo, la apoptosis también puede ser activada por vías independientes de estas enzimas, en las que quedan implicados otros complejos enzimáticos^{11,17}.

La apoptosis forma parte de los mecanismos de protección contra diversos agentes infecciosos. Por consiguiente, muchos virus pueden desencadenar mecanismos anti-apoptóticos o modular la respuesta pro-apoptótica que elabora la célula infectada para enfrentar la infección^{3,8,22,24}.

Durante una infección viral, la inhibición de la apoptosis celular podría prevenir la muerte prematura de la célula huésped, favoreciendo la replicación del virus o el establecimiento de una

fase de latencia. Por otro lado, los mecanismos pro-apoptóticos, que pueden activarse tras la infección, permitirían la eficiente difusión de la progenie viral hacia las células vecinas^{5,21,23}.

El Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1), perteneciente a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, es un patógeno que afecta a los miembros de la familia *equidae* y causa significativas pérdidas económicas en la industria hípica mundial. La infección está asociada con una variedad de manifestaciones clínicas que incluyen rinoneumonitis, aborto, muerte neonatal y síndrome neurológico. Al igual que otros alphaherpesvirus, el EHV-1 puede establecer infecciones latentes en los ganglios del nervio trigémino y reactivarse ante situaciones de estrés¹.

En las últimas décadas se ha demostrado que distintos alphaherpesvirus, entre ellos, el virus *Herpes simplex 1* (HSV-1)^{2,12}, el *Herpesvirus suino 1* (SuHV-1)¹⁰ y el *Herpesvirus bovino 1* (BoHV-1)⁸, pueden regular la apoptosis de las células infectadas, ya sea retardando o inhibiendo la misma. Poco se conoce sobre los mecanismos que el EHV-1 podría ejercer para regular la apoptosis de la célula huésped. Recientemente se demostró, en estudios realizados *in vitro*, un efecto inhibitorio de la apoptosis en neuronas infectadas con una cepa de EHV-1 y el mismo

fue asociado con el establecimiento del estado de latencia viral⁶.

Los ensayos *in vitro* utilizados para estudiar los efectos de un determinado virus sobre la apoptosis se pueden realizar mediante la exposición de las células infectadas a distintos agentes inductores de la misma, como la estaurosporina¹⁴, la actinomicina D y el sorbitol¹⁹. Este último es el más comúnmente utilizado y su mecanismo inductor de la apoptosis se relaciona con el shock osmótico que produce en las células expuestas¹⁹.

La modulación de la apoptosis ejercida por distintos herpesvirus es de gran importancia, tanto para su replicación como para su fase de latencia. Debido a que aún no se han establecido y profundizado las investigaciones sobre los efectos del EHV-1 sobre la muerte celular en células no neurales, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de este virus en cultivos celulares no neurales inducidos a la apoptosis. Nuestros resultados podrían contribuir a dilucidar la estrategia del virus en el sitio de replicación primaria (epitelio nasofaríngeo) del huésped natural para incrementar el número de partículas virales y conducir a la viremia y a la consecuente infección sistémica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus, células y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa viral japonesa HH1, aislada de un caso de aborto equino por Kawakami y col¹⁸. Para la multiplicación de la misma se utilizaron células Madin Darby-*bovine kidney* (MDBK) desarrolladas con Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 2mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina, 100 UI/ml de nistatina y 10% de suero fetal bovino (MEM-C) Para el mantenimiento de las células se utilizó MEM con 2% de suero fetal bovino (MEM-M). El stock viral se preparó inoculando monocapas confluentes de células MDBK, no mayores a las 24 hs de desarrollo. Cuando el efecto citopático fue extensivo, las células fueron congeladas a -70°C. Luego de tres ciclos de

congelado y descongelado, la suspensión fue centrifugada a 10000g, durante 30 minutos, para remover los restos celulares. El sobrenadante fue posteriormente fraccionado, cuantificado por el método de Reed y Muench y conservado a -70°C hasta su uso.

Para los ensayos de inducción a la apoptosis, la suspensión viral fue utilizada con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 CCID₅₀/célula.

Inducción de apoptosis por sorbitol

Para determinar la concentración óptima de sorbitol que es capaz de inducir el mayor porcentaje de apoptosis, se incubaron varias monocapas de células con diferentes concentraciones del mismo (entre 0,5 y 2M), durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se retiró el inductor, las monocapas se lavaron con MEM y se continuó la incubación con MEM-M, durante 2 horas a 37°C.

Diseño experimental

Para la realización de la experiencia se constituyeron los siguientes grupos experimentales:

Células no infectadas, ni inducidas a apoptosis (Inf- / Apo-);

Células infectadas, pero no inducidas a apoptosis (Inf+ / Apo-);

Células no infectadas, pero inducidas a apoptosis (Inf- / Apo+);

Células infectadas y posteriormente inducidas a apoptosis (Inf+ / Apo+).

Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con la suspensión viral (MOI=10). Posteriormente se retiró el inóculo viral, se lavó con medio libre de suero y se reincubó con medio MEM-M a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, durante 3, 9 y 18 h pos infección (pi), momento en que fueron removidas. En los grupos no infectados (Inf- / Apo-) y (Inf- / Apo+) el inóculo viral fue reemplazado por MEM-M. Las células de los grupos (Inf- / Apo+) y (Inf+ / Apo+) fueron inducidas a la apoptosis a las 3, 9 ó 18 hs pi mediante su incubación con la óptima concentración de sorbitol

previamente seleccionada, durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se retiró el inductor, las monocapas se lavaron con MEM y se continuó la incubación con MEM-M, durante 2 horas a 37°C, hasta su posterior análisis.

La misma experiencia también se realizó en células desarrolladas sobre cubreobjetos, las que posteriormente fueron fijadas con acetona fría en los siguientes puntos horarios: 3, 6, 9, 12, 15, 18 hs pi.

Técnicas de evaluación de la apoptosis

Fragmentación en escalera de ADN: Las células desarrolladas en frascos de cultivo fueron removidas con tripsina (0,25%) – EDTA (0,2%) (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN utilizando un equipo comercial (Promega, Lab., Madison, WI, EEUU) y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 80V. La visualización se realizó bajo luz UV, luego de la tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). El tamaño de las bandas fue calculado comparativamente con el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Milán, Italia). Durante la muerte por apoptosis se produce la fragmentación internucleosomal del ADN, determinando fragmentos de 100 – 200 pb.

Evaluación de la relación Anexina V/ioduro de propidio: Para diferenciar células en proceso de apoptosis de aquellas en necrosis, se utilizó un equipo comercial de detección de Anexina V FITC (BD Biosciences, San Jose, EEUU), en combinación con ioduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). La Anexina V FITC permite detectar células en apoptosis temprana, debido a que se une al fosfolípido fosfatidilserina que se trasloca desde la cara citosólica a la cara extracelular de la membrana plasmática, al comienzo de la apoptosis. Por su parte, el IP penetra en aquellas células cuya membrana celular se encuentra alterada, como sucede en las células necróticas. Por lo tanto, la tinción simultánea de las células con Anexina V FITC e IP permite diferenciar las células en apoptosis temprana, de aquellas necróticas.

Se puede considerar también, cómo células apoptóticas a aquellas que posean ambas coloraciones positivas, debido a que se las considera en un proceso avanzado de muerte celular programada⁷.

Las células fueron removidas con tripsina (0,25%) – EDTA (0,2%) (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU), lavadas y teñidas con Anexina V FITC/ IP, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra se analizó con un citómetro de flujo (FACS) equipado con el software FlowJo (España) para el análisis de los datos. Se determinaron los porcentajes de células necróticas (Anexina V FITC-/PI +), células apoptóticas tempranas (anexina FITC+/ PI-), células apoptóticas tardías/necróticas secundarias (Anexina V FITC +/PI +) y no-apoptóticas (células con Anexina FITC-/ PI-).

Determinación del clivaje de citoqueratina 18 por inmunofluorescencia: En las células desarrolladas sobre cubreobjetos se evaluó el índice de clivaje de la citoqueratina 18, una proteína citoplasmática del citoesqueleto, blanco de las caspasas efectoras. Los cubreobjetos se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo monoclonal M30 CytoDeath (Roche, Mannheim, Alemania) diluido 1:10 en albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1%. Luego de dos lavados en solución tamponada de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) con 0,5% de *Tween 20* (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany), las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 (Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EEUU) diluido 1:1000 en BSA 0,1%. La tinción de los núcleos celulares se realizó con 5µg/ml de DAPI (6-diamidino-2-fenilindol - Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EEUU) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio acuoso Calbiochem FluoroSave Reagent (La Jolla, CA, EEUU) y luego se examinaron mediante microscopía confocal. La cuantificación de las células marcadas se realizó mediante un analizador de imágenes (cellSens

Dimension v1.6. Olympus Corporation. Japón).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedio \pm desvío estándar (S.D) y fueron analizados estadísticamente con el test de ANOVA de una vía. La probabilidad de error seleccionado como significativo fue de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Inducción de la apoptosis

La concentración óptima de sorbitol capaz de inducir el mayor porcentaje de apoptosis detectado mediante la técnica de fragmentación en escalera de ADN fue de 1 M. Esta concentración fue la elegida para inducir a las células en el presente ensayo.

Fragmentación en escalera de ADN

Se observó fragmentación del material genético en todos los tiempos analizados del grupo (Inf-/ Apo+). No se obtuvo escalera de ADN en ningún punto horario examinado de los grupos (Inf-/ Apo-) e (Inf+/ Apo-). En el grupo (Inf+/ Apo+), la fragmentación del ADN se detectó únicamente a las 18 h pi (Fig.1).

Evaluación de la relación Anexina V FITC/ Ioduro de propidio.

A las 3, 9 y 18 hs pi no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de células Anexina V FITC +/PI- de los grupos (Inf-/ Apo-) y (Inf+/ Apo-) ($P > 0,05$). A las 3 hs pi, el porcentaje de células Anexina V FITC +/ IP- en los grupos (Inf-/ Apo+) y (Inf+/ Apo+) superó estadísticamente al observado en los grupos (Inf-/ Apo-) y (Inf+/ Apo-) ($P < 0,01$). A las 9 hs pi, la marcación de células Anexina V FITC +/IP- en el grupo (Inf+/ Apo+) fue significativamente menor a la observada en el grupo (Inf-/ Apo+) ($P < 0,01$). A las 18 horas pi, la marcación de células Anexina V FITC +/PI- continuó siendo más elevada en el grupo (Inf-/ Apo+) que en el resto de los grupos ($P < 0,01$) (Figs. 2).

Determinación del clivaje de citoqueratina 18 por inmunofluorescencia

En el grupo (Inf-/ Apo-) se detectó el mayor porcentaje de marcación positiva a M30 a las 9 h pi. En el grupo (Inf+/ Apo-) se detectó marcación positiva a las 9, 15 y 18 h pi, con el mayor porcentaje de células apoptóticas a las 18 h pi. En el grupo (Inf-/ Apo+) se detectó un incremento gradual del porcentaje de marcación positiva, aunque los valores obtenidos a las 18 h pi fueron menores que los detectados en el grupo (Inf+/ Apo-). En el grupo (Inf+/ Apo+) no se detectó marcación positiva a las 9 h pi, mientras que en los restantes puntos horarios se observó un incremento gradual de marcación, que no alcanzó a aquellos registrados en las células del grupo (Inf+/ Apo-) (Fig. 3).

DISCUSIÓN

La regulación de la apoptosis es utilizada por muchos virus como un mecanismo celular capaz de favorecer su replicación y supervivencia^{4,8,9,10}. En los estudios realizados con distintos miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, se han combinado diferentes técnicas para determinar la posible interferencia viral con la apoptosis. De este modo, mediante fragmentación en escalera de ADN, análisis de cambios morfológicos nucleares, y PCR en tiempo real de proteínas mitocondriales se demostró que el BoHV-1 retrasa el comienzo de la apoptosis de la célula infectada en las primeras etapas del ciclo viral⁸. Un efecto similar se adjudicó al SuHV-1 utilizando técnicas de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) y estudios con inhibidores de la actividad de las caspasas¹⁰.

La interferencia de la apoptosis por parte de algunos virus está íntimamente relacionada con la codificación de diversas proteínas virales. Se ha demostrado que la glicoproteína G (gpG)¹⁶ y la proteína UL14 del BoHV-1 protegen a las células de riñón de feto bovino (MDBK) y de mieloma humano (K562) de la apoptosis inducida por shock osmótico mediante sorbitol⁹. Del mismo modo, el HVS-1 ejerce un efecto antiapoptótico mediante la expresión de la gpD²⁵, la gpJ¹⁵, las proteínas quinasas U_s3⁴ y

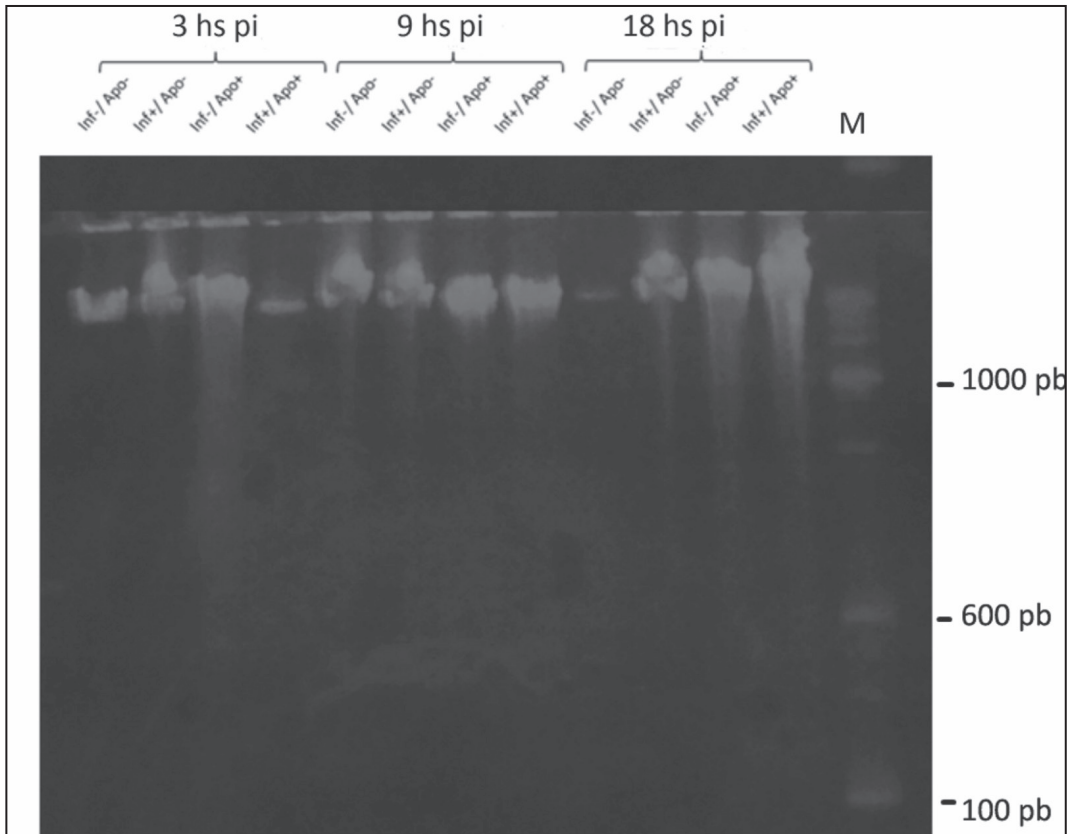


Figura 1. Fragmentación en escalera del ADN. Corrida electroforética en gel de agarosa del cultivo de células MDBK infectadas con EHV-1 (MOI 10), e inducidas a apoptosis por sorbitol 1M a las 3, 9 y 18 hs pi. M: marcador de peso molecular de 100 pb. La fragmentación del material genético se detectó en el grupo ((Inf-/ Apo+) en todos los tiempos analizados. En el grupo (Inf+/ Apo+) la fragmentación del ADN se detectó únicamente a las 18 h pi

Us11¹⁴, y las proteínas g134.5, ICP4 y ICP27².

Hasta el momento, un solo trabajo describe el efecto del EHV-1 en la supervivencia celular⁶, en el cual se infectaron células de cultivo primario de neuronas de ratón con una cepa de EHV-1, cuya MOI era 10 veces menor a la utilizada en nuestro ensayo. En dicho trabajo, las células se analizaron con tinción de Anexina V FITC/IP y la técnica de TUNEL, y se evaluaron los niveles de distintas caspasas, encontrándose que la mayoría de las neuronas infectadas permanecían sin cambios morfológicos de apoptosis, y eran capaces de sobrevivir más de ocho semanas en cultivo⁶.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la cepa HH1 sobre células infectadas e inducidas a la apoptosis, utilizando como inductor de dicho proceso al sorbitol. La concentración óptima de uso del sorbitol seleccionada para

nuestros ensayos concuerda con la utilizada por otros autores^{8,9}. Con las técnicas empleadas para analizar eventos tempranos y tardíos de la apoptosis, se detectó que la cepa HH1 interfirió en la apoptosis de las células inducidas durante la primera etapa del ciclo de replicación viral, particularmente a las 9h pi, momento en el que se detectó una disminución de la apoptosis, la cual podría estar modulada por la transcripción de los genes tempranos del virus. Hacia las 18 hs pi, en coincidencia con la fase final del ciclo viral (18 h), el efecto inhibitorio o de retraso de la apoptosis cesaría permitiendo, de este modo, que ocurra la lisis celular y la consecuente liberación de la progenie viral al medio.

Nuestros resultados apoyan aquellos descritos en neuronas, por Cymerys et al.⁶ y contribuyen a comprender aún más las estrategias desarrolladas por el EHV-1 durante la infección celular.

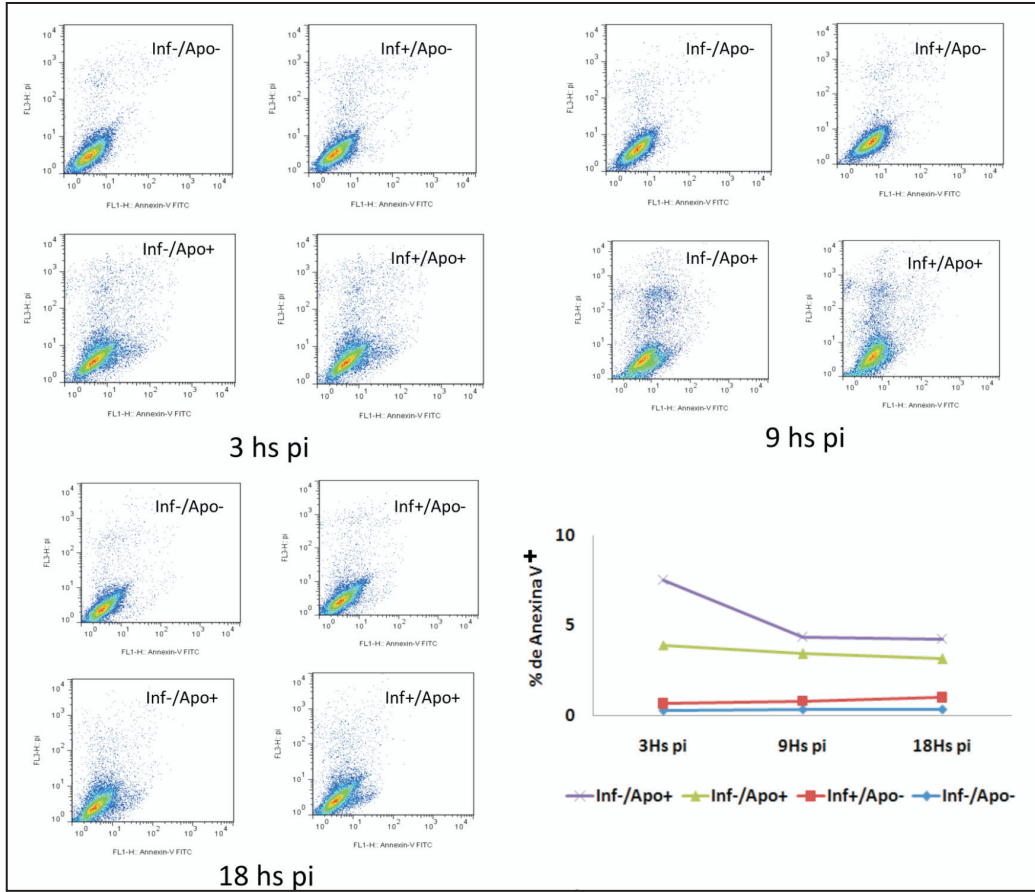


Figura 2. Evaluación de la apoptosis mediante citometría de flujo en los distintos grupos experimentales a las 3, 9 y 18 hs. Cultivo de células MDBK infectadas e inducidas a apoptosis por sorbitol 1M. Se observan los gráficos de la distribución de las poblaciones celulares teñidas con Anexina V FITC/IP a las 3, 9 y 18 hs pi. En el gráfico de líneas ubicado en el sector inferior derecho de la figura se presentan los porcentajes de células apoptóticas, definidas como Anexina V FITC+/IP-, obtenidos para los distintos tiempos.

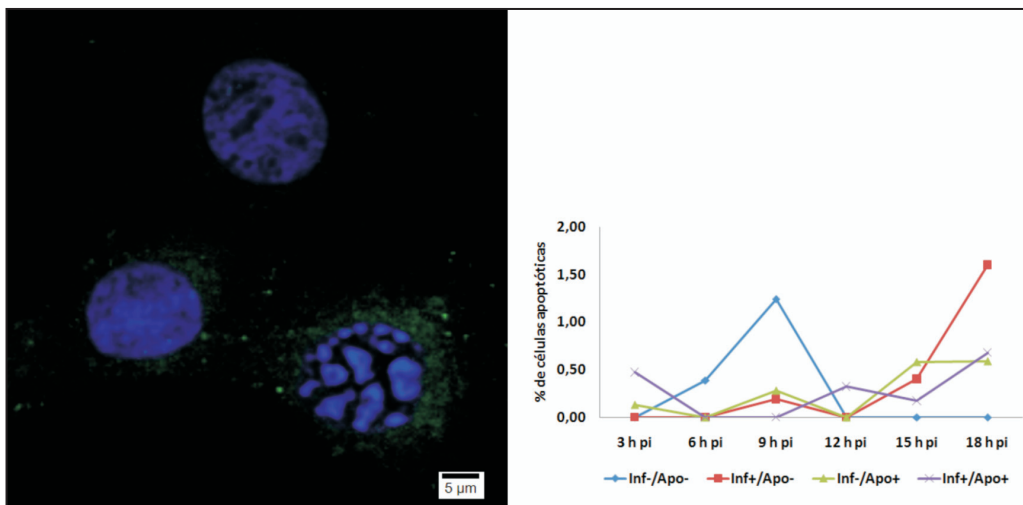


Figura 3. Determinación del clivaje de la citoqueratina 18 por inmunofluorescencia a las 3, 9 y 18 hs pi. Izquierda: marcación positiva a M30 (verde, anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488) y coloración nuclear con DAPI (azul). Derecha: porcentajes de marcación positiva a M30 para cada punto horario, en los correspondientes grupos.

Los mismos fueron realizados con cultivo de células provenientes de otra especie diferente a la normalmente infectada por el virus. Los resultados aquí presentados concuerdan con los trabajos obtenidos por otros autores al estudiar el mecanismo de apoptosis con otros herpesvirus en los que se utilizaron células homólogas^{8,10}. Conocer la interacción que el virus establece con las células desde el momento de la infección, permitiría el desarrollo de nuevas drogas dirigidas a interactuar específicamente con los mecanismos que utiliza el propio virus para favorecer su replicación y supervivencia.

Se proyecta a futuro profundizar en los mecanismos empleados por el virus para interferir en la apoptosis y la realización de ensayos similares con cultivos celulares homólogos, así como también en modelos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por CIC Pcia de Bs As, Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata y FONCYT (PICT 2011-1123).

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, GP.; Slater, JD.; Smith, KC. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In *Infectious diseases of Livestock*, J.A.W.a.T. Coetzer, R.C., ed. (Cape Town, Oxford Press). 2004; pp. 829-59.
- Aubert, M.; Blaho, JA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol*. 1999; 73: 2803-13.
- Aubert, M.; Pomeranz, LE.; Blaho, JA. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis*. 2007. 12: 19-35.
- Benetti, L.; Roizman, B. Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004,101: 9411-16.
- Cheung, AK.; Chen, Z.; Sun, Z.; Mc Cullough, D. Pseudorabies virus induces apoptosis in tissue culture cells. *Arch Virol*. 2000; 145: 2193-200.
- Cymerys, J.; Slonska, A.; Godlewski, MM.; *et al*. Apoptotic and necrotic changes in cultured murine neurons infected with equid herpesvirus 1. *Acta virol*. 2012; 56: 39-48.
- Dash P. Apoptosis. University of London. 2006. En: <http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/-dash>. consultado 5 de abril de 2011.
- De Martino, L.; Marfe, G.; Di Stefano, C.; *et al*. Interference of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in sorbitol-Induced apoptosis. *J Cell Biochem*. 2003; 89: 373-80.
- De Martino, L.; Marfe, G.; Irno Consalvo, M.; Di Stefano, C.; Pagnini, U.; Sinibaldi-Salimei, P. Antiapoptotic activity of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) UL14 protein. *Vet Microbiol*. 2007; 123: 210-16
- Deruelle, MJ.; De Corte, N.; Englebienne, J.; Nauwynck, HJ.; Favoreel, HW. Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. *J Gen Virol*. 2010; 91: 1127-32.
- Dubin, M.; Stoppani, AOM. Muerte celular programada y apoptosis, función de las mitocondrias. *Medicina*. Buenos Aires. 2000; 60: 375-86.
- Galvan, V.; Brandimarti, R.; Roizman, B. Herpes simplex virus 1 blocks caspase-3-independent and caspase-dependent. *J Virol*. 1999; 73: 3219-26.
- Hay, S.; Kannourakis, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol*. 2002; 83: 1547-64.
- Javouhey, E.; Gibert, B.; Arrigo, AP; Diaz, JJ.; Diaz-Latoud, C. Protection against heat and staurosporine mediated apoptosis by the HSV-1 US11 protein. *Virology*. 2008; 376: 31-41.
- Jerome, KR.; Chen, Z.; Lang, R.; *et al*. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol*. 2001; 167: 3928-35.

16. Jin, L.; Peng, W.; Perng, GC.; *et al.* Identification of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that both inhibit apoptosis and enhance the spontaneous reactivation phenotype. *J Virol.* 2003; 77: 6556-6561.
17. Jordán, J. Apoptosis, muerte celular programada. *Ámbito farmacéutico.* 2003; Vol. 22 Núm: 6
18. Kawakami, Y.; Tokui, T.; Nakano, K.; Kum, T.; Hiramune, T.; Murase, N. An outbreak of abortion due to equine rhinopneumonitis virus among mares in the Hidaka district, Hokkaido. I. Epizootiological survey and virus isolation. *Bull Natl Inst Hlth.* 1970; 61:9-16
19. Koyama, AH.; Arakawa, T.; Adachi, A. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes Infect.* 2000; 2: 599-06.
20. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, *et al.* Classification of cell death. *Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.*
21. Longo, M.; Fiorito, F.; Marfè, G.; *et al.* Analysis of apoptosis induced by Caprine Herpesvirus 1 *in vitro.* *Virus Res.* 2009; 145: 227-35.
22. Munger, J.; Chee, A.; Roizman, B. The US3 protein kinase blocks apoptosis induced by the *d120* mutant of Herpes Simplex virus 1 at a premitochondrial Stage. *J Virol.* 2001; 5491-97
23. Pagnini, U.; Montagnaro, S.; Sanfelice di Monteforte, E.; *et al.* Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 103: 283-93
24. Perng, GC.; Jones, C.; Ciacci-Zanella, J.; *et al.* Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 2000; 287: 1500-03.
25. Sciortino, MT.; Medici, MA.; Marino-Merlo, F.; *et al.* Involvement of gD/HVEM interaction in NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76: 1522-32.

