



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LÍNEAS CELULARES PERMISIVAS AL
VIRUS HERPES CANINO, POR VISUALIZACIÓN DE EFECTO
CITOPÁTICO

LISSETTE MONSERRAT SALDÍAS GATICA

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de
Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LÍNEAS CELULARES PERMISIVAS AL
VIRUS HERPES CANINO, POR VISUALIZACIÓN DE EFECTO
CITOPÁTICO

LISSETTE MONSERRAT SALDÍAS GÁTICA

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de
Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: MARÍA O. CELEDÓN VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: ALICIA VALDÉS OLGUÍN

SANTIAGO, CHILE
2012

No hay errores. Los acontecimientos que atraemos hacia nosotros, por desagradables que sean, son necesarios para aprender lo que necesitamos aprender; todos los pasos que damos son necesarios para llegar adonde hemos escogido.

Richard Bach

AGRADECIMIENTOS

Y al llegar al final de esta etapa que quizá fue más larga de lo esperada, quisiera agradecer a todos aquellos que me han acompañado y han aportado a quien soy actualmente:

A mi madre que con su ejemplo me enseñó a seguir adelante siempre.

A mis hermanas y maravillosos sobrinos que me alegran el día con sus sonrisas.

A mis amigas y amigos con quienes he compartido largas noches de estudio, carretes, frustraciones y celebraciones.

A mi pololo que me ha dado el empuje para terminar.

A mis tíos que me apoyan incondicionalmente.

A mi profesor que demuestra que a veces es necesario nadar contra la corriente y me dio la oportunidad de trabajar en su proyecto.

Y a Dios porque me enseña diariamente que el fracaso es una oportunidad de ponerse de pie y continuar el camino y por haberme puesto en los lugares precisos junto a las personas indicadas.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.- CULTIVOS CELULARES	6
HISTORIA.....	6
GENERALIDADES	9
TIPOS DE CULTIVOS.....	9
VENTAJAS	11
DESVENTAJAS.....	12
2.- VIRUS HERPES CANINO	13
GENERALIDADES	13
TAXONOMIA	13
ESTRUCTURA VIRAL.....	14
REPLICACIÓN	14
CULTIVOS CELULARES EMPLEADOS PARA MULTIPLICAR VIRUS HERPES	15
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.....	16
LATENCIA-TRANSMISIÓN.....	16
EFECTOS <i>IN VITRO</i>	16
ENFERMEDAD CLINICA	18
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	25
OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE LAS CÉLULAS	25
INOCULACIÓN Y OBSERVACIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO	28
CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.....	33
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Principales hitos en el desarrollo del cultivo celular.....	6
Cuadro 2: Líneas celulares utilizadas en este estudio.....	21
Cuadro 3: Identificación de los frascos utilizados en el estudio.....	23
Cuadro 4: Día 2 de observación post-infección.	30
Cuadro 5: Día 4 de observación post-infección.	30
Figura 1: Áreas de mayor interés en el uso de cultivos de tejidos.....	8
Figura 2: Cuerpos de inclusión en línea celular MDCK (Navarro <i>et al</i> 2005)	17
Figura 3: Efecto citopático en línea celular MDCK (Navarro <i>et al.</i> 2003)	17
Figura 4: Esquema de subdivisión de los frascos y zona de observación utilizada	23
Figura 5: Líneas celulares al primer día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino	25
Figura 6: Líneas celulares al segundo día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino	26
Figura 7: Líneas celulares al tercer día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino	27
Figura 8: Líneas celulares al primer día de observación post-infección con Virus Herpes Canino.....	28
Figura 9: Líneas celulares al primer día de observación post-infección con Virus Herpes Canino.....	29
Figura 10: Líneas celulares al quinto día de observación post-infección con Virus Herpes Canino	31
Figura 11: Líneas celulares al quinto día de observación post-infección con Virus Herpes Canino	32
Figura 12: Línea celular RD contaminada con bacilos	33
Figura 13: Cámara de Neubauer.....	46

RESUMEN

En la actualidad los avances científicos y tecnológicos permiten realizar pruebas diagnósticas cada vez más sensibles y sencillas. Sin embargo el aislamiento viral sigue siendo la prueba más importante y utilizada cuando se inicia un estudio en virología. Para ello es necesario contar en el laboratorio con células que permitan la penetración y posterior multiplicación de las partículas virales. Si bien existe una amplia variedad de líneas celulares, es fundamental conocer cuáles son las líneas celulares específicas para un determinado virus que permitan llevar a cabo los objetivos antes mencionados. En el caso del Virus Herpes Canino tipo 1, denominado actualmente como CaHV1 (Davison *et al.*, 2009), se ha descrito sólo una línea susceptible, por lo que conocer la existencia de otras líneas útiles para su investigación es de gran relevancia, permitiendo un manejo más robusto en el estudio de este virus.

El objetivo de este trabajo fue probar la factibilidad de emplear otras líneas celulares que permitieran trabajar en el laboratorio con el CaHV1.

Se trabajó con 6 líneas celulares de uso habitual en el laboratorio de cultivos celulares del Instituto de Salud Pública (ISP): MDCK, Hep-2, L20b, MNA, Vero, RD, las cuales fueron sometidas a subcultivos y a un inóculo de origen nacional del CaHV1, buscando efecto citopático de lisis celular. Se observó efecto citopático de lisis celular característico del CaHV1 en la línea de origen canino MDCK, situación confirmatoria de los resultados obtenidos en investigaciones anteriores. Los cambios en las líneas celulares: Hep-2, RD, Vero, MNA observados durante el periodo post-infección, no pudieron ser cualitativamente identificados como característicos de efecto citopático de lisis celular provocada por CaHV1, de tal modo que los resultados experimentales demostrarían que la línea celular MDCK, por el momento, es la única viable para el diagnóstico del CaHV1 en el laboratorio.

SUMMARY

Nowadays, scientific and technological advances allow to run diagnostic tests that are increasingly sensitive and simple. However, virus isolation remains as the most important and used test whenever a study in virology is initiated. Cells that allow penetration and subsequent proliferation of virus particles are needed in the laboratory in order to test using the virus isolation technique. While there are a wide variety of cell lines, is essential to know what cell lines are specific to a particular virus and are able to carry out the above objectives. In the case of *Canid herpesvirus 1*(CaHV1) only one susceptible line has been described. Therefore the knowledge of other cell lines, useful for CaHV1 research is of great importance, allowing a more robust operation in the study of this virus.

The aim of this study was to test the feasibility of other cell lines that could allow work in the lab with canine herpes virus.

Six cell lines, commonly used at the Cell Culture Laboratory of the Instituto de Salud Publica (ISP) were used: MDCK, Hep-2, L20b, MNA, Vero, RD. These cell lines were subcultured and inoculated with a national-origin CaHV1 virus in order to look for cytopathic effect of cell lysis. Cytopathic effect of cell lysis, typical for the CaHV1 virus, was observed for the MDCK cell line of canine origin, confirming the results obtained in previous research. Changes were also observed in cell lines: Hep-2, RD, Vero and MNA during the post-infection period, but could not be qualitatively identified as the typical cytopathic effect of cell lysis caused by CaHV1. Therefore, experimental results demonstrate that the MDCK cell line is for now, the only viable cell line for CaHV1 virus diagnosis in the laboratory.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares pueden considerarse una herramienta muy valiosa en el estudio de diversas interrogantes biológicas y por este motivo es importante mantener en el laboratorio diversas líneas celulares que permitan abordar una amplia gama de problemas relacionados con la respuesta celular frente a diferentes estímulos o factores externos como virus u otros agentes.

El estudio de los virus presenta una complejidad adicional respecto al estudio de la gran mayoría de los microorganismos, fundamentalmente porque no realizan fisión binaria y no poseen maquinaria metabólica propia, siendo parásitos celulares obligados. Por lo tanto, no basta con la utilización de medios de cultivos para lograr su multiplicación, es necesario proveerles células vivas. Así, los cultivos celulares resultan un sistema ideal para la propagación viral y el estudio de los efectos en la morfología y comportamiento celular provocados en una infección *in vitro*. Por otra parte, la infección viral de una línea celular *in vitro*, permite establecer el tipo de efecto citopático que provoca un determinado virus. Diferencias en el tipo de efecto citopático, así como la eficiencia de la replicación viral en una línea celular, facilitan la elección del sistema más adecuado para estudiar la infección viral *in vitro* o realizar pruebas citológicas diagnósticas.

Los cultivos celulares pueden clasificarse principalmente en cultivos primarios y líneas celulares continuas, diferenciándose según la cantidad de divisiones mitóticas que pueden realizar, las necesidades nutritivas de mantención, entre otras. Existe una gran variedad de líneas celulares continuas, que provienen de células tumorales o se generan mediante mutaciones, en donde la célula puede alcanzar un número indeterminado de divisiones si se otorgan las condiciones óptimas para su reproducción. Si bien pueden utilizarse para estudiar diversos virus, no todas las líneas celulares son igualmente susceptibles y permisivas ante una infección viral. Por otra parte, frente a la imposibilidad de contar con la línea celular ideal para el virus en estudio, se debe conocer el rango de células hospedadoras en las cuales el virus genera efecto evidente en el laboratorio, utilizándolas como alternativas viables que permitan continuar con una investigación.

Existe un gran número de virus que generan efectos observables en líneas celulares, entre ellos se encuentra el virus herpes canino (CaHV1), el cual puede generar pérdidas económicas en criaderos ya que puede provocar gran mortalidad en cachorros y quedar latente en animales adultos. En esta Memoria de Título y mediante la observación microscópica de un efecto citopático característico de virus herpes: lisis celular, se determinó cuáles de las líneas celulares continuas disponibles son permisivas al aislado viral RP5¹, virus caracterizado biológicamente como CaHV1 y del cual se ha descrito sólo una línea celular susceptible.

¹ Corresponde al aislado viral obtenido en la investigación realizada por Navarro 2003.

REVISION BIBLIOGRÁFICA.

1.- CULTIVOS CELULARES

HISTORIA

El cultivo celular o cultivo de tejidos *in vitro* tiene su origen en el siglo XIX, como un método para estudiar el comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo. Inicialmente se utilizaban sólo fragmentos de tejidos, por lo tanto las células no se encontraban libres y el crecimiento se restringía a la migración de células desde el tejido con mitosis ocasionales. Posteriormente, se realizaron cultivos con fragmentos disgregados de tejidos, los cuales aumentaban el crecimiento celular en cultivo ya que se utilizaban células dispersas, donde la mitosis no se encontraba restringida sólo a los márgenes del fragmento. Ya en el siglo XX, Harrison estableció la metodología del cultivo celular. Años más tarde Carrel demostró que las células pueden crecer por largos períodos en cultivos asépticos, siempre y cuando se les entreguen los nutrientes necesarios en forma regular (Freshney, 2010; Alberts *et al.*, 2002).

Un hito importante en el desarrollo de las líneas celulares estables, fue el aporte realizado por Gey y colaboradores, quienes a partir de células de carcinoma cervical humano obtuvieron células que posteriormente serían conocidas como la línea celular HeLa. Así hasta la actualidad el cultivo de células *in vitro* ha mostrado grandes avances. En el Cuadro 1 se resumen los principales hitos en el desarrollo del cultivo celular (Freshney, 2010; Alberts *et al.*, 2002).

Cuadro 1: Principales hitos en el desarrollo del cultivo celular

1885	Roux demostró que las células embrionarias de pollo pueden mantenerse vivas en una solución salina, fuera del cuerpo del animal.
1907	Harrison cultivó médula espinal de anfibio en un coágulo linfático, demostrando así que los axones se producen como prolongaciones de células nerviosas.
1910	Rous indujo un tumor utilizando un extracto filtrado de células tumorales de pollo, que más tarde se demostró que contenían un virus de RNA (virus del sarcoma de Rous).
1913	Carrel demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo, siempre que fueran alimentadas regularmente y bajo condiciones asépticas.
1948	Earle y colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que en cultivo tisular forman clones de células.
1952	Gey y colaboradores establecieron una línea continua de células derivada de carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la conocida línea celular HeLa.
1954	Levi-Montalcini y colaboradores demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF, de Nerve Growth Factor) estimula el crecimiento de los axones en cultivo.
1955	Eagle desarrolló la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo y encontró que las células

	animales se pueden propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas.
1956	Puck y colaboradores seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados a partir de células HeLa en cultivo.
1958	Temin y Rubin desarrollaron un método cuantitativo para la infección de cultivos de células de pollo mediante el virus del sarcoma de Rous purificado. En la década siguiente Stoker, Dulbecco, Green y otros virólogos establecieron las características de ésta y de otras transformaciones víricas.
1961	Hayflick y Moorhead demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo mueren tras un número finito de divisiones.
1964	Littlefield introdujo el medio HAT para el crecimiento selectivo de híbridos celulares somáticos. Junto con la técnica de la fusión celular, este medio hizo accesible la genética de las células somáticas. Kato y Takeuchi obtuvieron una planta completa de zanahoria a partir de una sola célula de raíz de zanahoria mantenida en cultivo.
1965	Ham introdujo un medio definido, sin suero, capaz de permitir el crecimiento clonal de ciertas células de mamífero. Harris y Watkins produjeron los primeros heterocariontes de células de mamífero, mediante la fusión inducida víricamente de células humanas y de células de ratón.
1968	Augusti-Tocco y Sato adaptaron al cultivo células nerviosas tumorales de ratón (neuroblastoma) y aislaron clones que eran excitables eléctricamente y producían prolongaciones nerviosas. En esta época se aislaron otras células diferenciadas, entre ellas líneas celulares hepáticas y de músculo esquelético.
1975	Köhler y Milstein produjeron las primeras líneas celulares de hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales.
1976	Sato y colaboradores publicaron el primero de una serie de informes, demostrando que para crecer en un medio sin suero, las líneas celulares diferentes requieren mezclas diferentes de hormonas y de factores de crecimiento.
1977	Wigler, Axel y colaboradores desarrollaron un eficiente método para introducir genes humanos de copia única en el interior de células cultivadas, adaptando los métodos desarrollados inicialmente por Graham y van der Eb.

(Alberts *et al.*, 2002)

El estudio y los trabajos realizados en torno al cultivo de células *in vitro* han presentado un gran desarrollo desde finales del siglo XX y ha sido un aporte no sólo en el campo de la virología, sino que representa una herramienta muy útil para las ciencias biológicas (Freshney, 2010).

USOS DE LOS CULTIVOS CELULARES

La utilización de cultivos celulares para la multiplicación viral permitió su empleo masivo para la fabricación de vacunas. Por ejemplo, la vacuna contra la poliomielitis, desarrollada por John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller y Frederick Chapman Robbins, fue uno de los primeros productos obtenidos mediante técnicas de cultivos celulares (Celedón *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

El desarrollo del cultivo celular como una técnica moderna y sofisticada debe mucho a dos grandes ramas de la investigación médica: la producción de vacunas antivirales y el estudio de las neoplasias. La generación de nuevas líneas celulares, la estandarización de las condiciones de cultivo por el desarrollo comercial de sueros y medios confiables, el mayor control de la contaminación con antibióticos y el uso de equipamientos con filtro de aire han hecho que el cultivo celular sea asequible y útil en diferentes aplicaciones y es de uso rutinario en el diagnóstico viral, siendo aún el aislamiento viral la prueba estándar en un laboratorio de virología (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006).

Un factor adicional que influye en el desarrollo de ésta técnica es la creciente preocupación que genera el uso de animales de laboratorio en experimentos que no siempre justifican su uso, de ahí la importancia creciente de realizarlo en ensayos *in vitro* (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006). En la Figura 1 se esquematizan las áreas de mayor interés en el uso de cultivos de tejidos *in vitro*.

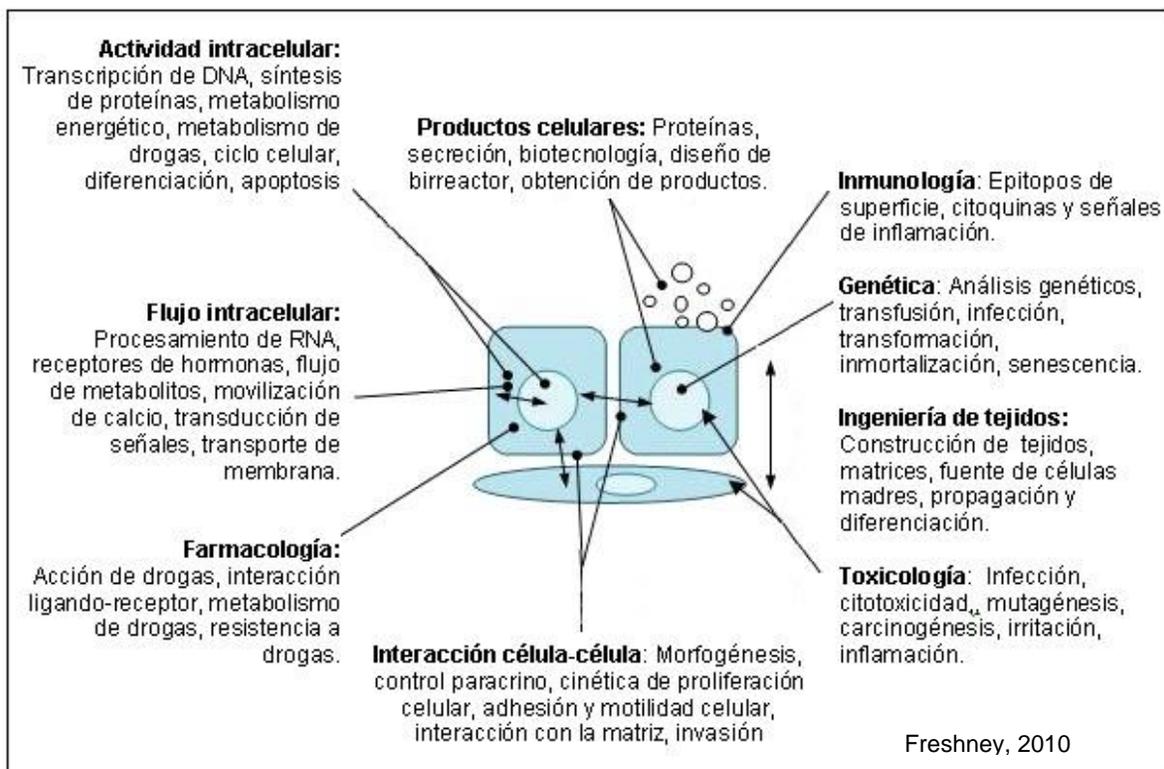


Figura 1: Áreas de mayor interés en el uso de cultivos de tejidos

GENERALIDADES

Las células eucariontes presentan una vida media que dependiendo del tipo celular pueden tener un número mayor o menor de divisiones. Esta característica también se evidencia *in vitro* donde la mayoría de las células mueren tras un número finito de divisiones (cultivo primario). Se sugirió que esta vida limitada estaba relacionada con la vida limitada del animal del que derivan las células. Sin embargo, en cultivo ocasionalmente surgen células que han sufrido algún cambio genético que las hace realmente inmortales. Estas células proliferan indefinidamente y pueden propagarse en forma continua a través de pasajes² o subcultivos constituyendo las líneas celulares continuas (Alberts *et al.*, 2002; Freshney, 2010).

La multiplicación y mantenimiento de los virus en el laboratorio requiere de células vivas, por lo tanto es necesario dominar las técnicas básicas para mantener cultivos de células en los cuales el virus se multiplicará. En condiciones de laboratorio, las células requieren del uso de medios de cultivo acuosos que contienen aminoácidos, vitaminas, sales minerales e hidratos de carbono, que se suelen complementar con antibióticos, antimicóticos y suero fetal como factor de crecimiento, esencial para la proliferación celular. Así, también existen diferentes requerimientos de medios de cultivo dependiendo el origen del cultivo celular (cultivos primarios o línea celular continua). Si bien todas las células animales derivan de tejidos vivos, en algunos casos, estas células han estado en cultivo por tanto tiempo, que pierden la morfología original y el índice mitótico se indetermina. Esta es una de las características de las líneas celulares continuas, cuyas células son muy convenientes porque crecen bien y se pueden usar para generar grandes cantidades de virus. Sin embargo, para el estudio inicial de un virus, se recomienda el uso de los cultivos primarios y luego el uso de las líneas celulares continuas, pues las primeras son de mayor similitud con las células que el virus infecta *in vivo* (Freshney, 2010; Murphy *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

TIPOS DE CULTIVOS

Los cultivos celulares pueden clasificarse según diferentes criterios:

1.- De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión, respectivamente:

- **Cultivos en monocapa estacionaria.** Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (monocapa confluyente), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (inhibición por contacto) entrando en una etapa de quiescencia. Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en esta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal. Los recipientes para el cultivo de células

² transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Este término es sinónimo del término subcultivo.

estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (Roux), entre otros. Que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina (Freshney, 2010).

- **Cultivos en suspensión.** Cuando las células crecen sin unirse a una superficie se llama cultivo en suspensión. Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; estas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes. Dentro de éstas matrices está el Methocel®, esencial para el crecimiento de cultivos en suspensión. Aunque el cultivo estacionario es ideal cuando se busca la elaboración de productos extracelulares, el cultivo en suspensión es deseable cuando los productos son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de anclaje de un determinado tipo de célula (Freshney, 2010).

2.- De acuerdo a la fuente de la cual se obtuvieron las células:

- a) Cultivos primarios.** Estos provienen de células que han sido disgregadas de un órgano fetal recién sacrificado. Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. Al ser fisiológica y morfológicamente más cercanas a las células de origen, se refleja una actividad y función similar a la que ocurre naturalmente *in vivo*, por lo que se prefiere en el aislamiento viral. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos (Freshney, 2010).
- b) Líneas celulares.** Están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos como el N,N-dimethylsphingosine (Freshney, 2010).

3.- Otras formas de clasificar los cultivos de células *in vitro* es:

- a) **Cultivos tridimensionales.** Son aquellos que buscan mantener la característica o arquitectura del tejido *in vivo*. Los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación y morfología epitelial y su interacción con otras células como las del tejido conectivo; igualmente con ellos se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden influenciar en tales interacciones intercelulares. Los intentos de producción de este tipo de cultivo van desde el uso de telaraña por Harrison en el año 1914, pasando por el crecimiento de explantes en esponja de celulosa, así como la utilización de fibras de sílica o de mallas de colágeno hidratado (Freshney, 2010).

- b) **Cultivo de órganos.** Permite la ampliación de un cultivo de células de tejido no disgregadas a un cultivo tridimensional que muestre en algo o en todo las características histológicas de los tejidos *in vivo*, para esto se utiliza un medio con interfaz líquido gaseosa. El cultivo de cortes de tejido el cual utiliza fragmentos de tejidos colocados en vasos de vidrio o plástico con un medio con interfaz líquida que va a promover la migración de las células cultivadas hacia un plano sólido provisto de un sustrato específico para cada célula (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006).

- c) **Co-cultivos.** Cultivos que permiten la recombinación de células de diferentes linajes como los queratinocitos de la epidermis en combinación con los fibroblastos de la dermis (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006).

VENTAJAS

Las principales ventajas de la utilización de cultivos celulares en el laboratorio son:

- Control del medio fisicoquímico: pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂), las cuales pueden ser controladas muy precisamente y las condiciones fisiológicas pueden ser mantenidas relativamente constantes (Freshney, 2010).
- Las líneas celulares, tanto transformadas como no transformadas, resultan muy útiles para la investigación celular como fuente de un elevado número de células de un tipo (uniformes), especialmente porque se pueden guardar en nitrógeno líquido a -196°C durante un período indefinido de tiempo, y después de ser descongeladas todavía son viables.
- Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro*, son descartados porque el uso de animales en experimentación resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos. Así mismo, la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo* (Freshney, 2010).
- Hay cierto tipo de investigaciones que no pueden realizarse sin el cultivo de células. Por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos que conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras (Freshney, 2010).

DESVENTAJAS

- La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido criticado, ya que se presentan problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular (Freshney, 2010).
- La proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células hallada *in vivo*, además porque el medio hormonal y nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas (Freshney, 2010).
- Se requieren estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen más lento que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los hongos y las levaduras. Además, a diferencia de los microorganismos, las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo simples por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo* (Freshney, 2010).
- Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal (Freshney, 2010)
- Problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios subcultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación (Freshney, 2010).

2.- VIRUS HERPES CANINO

GENERALIDADES

Los herpesvirus pueden afectar a insectos, reptiles, anfibios, moluscos, mamíferos incluyendo al humano, provocando enfermedades de variada gravedad (Peterson y Goyal, 1988; Murphy *et al.*, 1999). El virus herpes que afecta a los caninos domésticos (CaHV1) fue descrito en el año 1965 e identificado como agente causal del síndrome hemorrágico de los cachorros menores a cuatro semanas, además de estar involucrado en diferentes cuadros patológicos del sistema respiratorio y reproductor en caninos adultos (Carmichael *et al.*, 1965; Carmichael, 1999), pudiendo ser considerada como una infección nosocomial³ de gravedad variable (Kawakami *et al.*, 2010). En la actualidad, es considerado un virus cosmopolita cuya descripción en distintos países sugiere que es enzoótico en la población de caninos domésticos de Europa. Algunos estudios serológicos recientes demuestran la existencia del virus en Turquía, confirmando su presencia mundial (Ronsse *et al.*, 2005; Yeşilbağ *et al.*, 2012).

El virus CaHV1 Tiene como único hospedero al canino doméstico, sin embargo existen evidencias que caninos silvestres como los zorros rojos (*Vulpes vulpes*), pueden presentar anticuerpos y en inoculación experimental con el virus presentarían cuadro clínico (Reubel *et al.*, 2001).

Investigaciones pasadas han llegado a la conclusión que el CaHV1, a diferencia de otros *Alphaherpesvirinae*, posee un rango de células hospederas en el laboratorio muy estrecho, restringiéndose sólo a células de origen canino: cultivos primarios o línea celular estable *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) (Carmichael *et al.*, 1965; Nakamichi *et al.*, 2000).

TAXONOMÍA

La taxonomía de los *herpesvirus* ha sido actualizada en el año 2009 por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), Así, el CaHV1 pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Galosi, 2007; Davison *et al.*, 2009).

La familia *Herpesviridae* contiene a virus de mamíferos, aves y reptiles, dividiéndose en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*. Esta división se basó originalmente en las propiedades biológicas, pero en general, no se contradice con las posteriores caracterizaciones moleculares, incluyendo la secuencia de nucleótidos y análisis filogenético (Davison *et al.*, 2009). La subfamilia *Alphaherpesvirinae* caracteriza a virus que crecen rápidamente, producen efecto citopático de lisis en las células infectadas y establecen infecciones latentes generalmente en ganglios sensoriales. Otros virus de esta subfamilia son el herpesvirus porcino 1 (pseudorrabia), el

³ Infección contraída en el hospital por un paciente internado por una razón distinta de esa infección (Ducel *et al.*, 2002)

herpesvirus bovino tipo 2, herpesvirus humano 1, entre otros (Davison *et al.*, 2009, Galosi, 2007, Miyoshi *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 1999).

Las relaciones antigénicas entre los virus herpes son complejas, hay algunos antígenos compartidos dentro de las familias, pero las distintas especies tienen distintas glicoproteínas de superficie que inducen respuesta inmune (Murphy *et al.*, 1999; Nakamichi *et al.*, 2000).

ESTRUCTURA VIRAL

El virus herpes posee un genoma lineal: ADN de doble cadena con 125-290 mil pares de bases, contenido en una cápside de simetría icosaédrica constituida de 162 capsómeros aproximadamente. Esta cápside está rodeada por una matriz proteica amorfa (tegumento) que contiene numerosos polipéptidos con actividad enzimática. Exteriormente posee una envoltura lipídica asociada a glicoproteínas e hidratos de carbono, muchas de las cuales son responsables de inducir respuesta inmune. Debido a que es una partícula viral pleomórfica⁴ su diámetro varía de 150 a 200 nm (Galosi, 2007).

REPLICACIÓN

El ciclo de replicación del CaHV1 es común al de todos los alphaherpesvirus. Inicialmente el virus debe adsorberse a la membrana de la célula afectada, produciéndose esto gracias a la interacción de receptores específicos de la membrana celular con glicoproteínas virales (Galosi, 2007), en esta etapa cumple un importante rol el heparán sulfato presente en la célula receptora (Murphy *et al.*, 1999; Nakamichi *et al.*, 2000), así como mecanismos aún no identificados entre virión y célula. La presencia de receptores específicos para el CaHV1 en las células hospederas determina la susceptibilidad de éstas (Nakamichi *et al.*, 2000).

La segunda etapa, de penetración, puede darse por endocitosis o más frecuentemente por fusión de la membrana plasmática con la envoltura viral (Nakamichi *et al.*, 2000). La siguiente etapa es la decapsidación, en esta etapa la partícula viral libera su ADN en el núcleo celular generando inmediatamente una detención de la producción de macromoléculas de la célula hospedera, si la célula hospedera permite la replicación viral es considerada célula permisiva (Murphy *et al.*, 1999, Madigan *et al.*, 2004). Una vez ahí y por la acción de la ARN polimerasa II de la célula hospedadora se inicia la transcripción del ADN viral. Se producen tres clases de ARNm, de manera secuencial y sincronizada se traducen tres tipos de proteínas. Las primeras, denominadas alfa (α) o inmediatamente tempranas, caracterizadas por ser capaces de asociarse al ADN, están fosforiladas y actúan como reguladoras. Las beta (β) o tempranas son sintetizadas *de novo* y requieren de la presencia de algunas α ; son no estructurales, algunas actúan regulando la síntesis de las α y de

⁴ Que presenta dos o más formas estructurales durante su existencia.

macromoléculas celulares y además activan la síntesis del tercer tipo de proteínas: las gamma (γ), las cuales son llamadas tardías, son estructurales y actúan como reguladoras inhibiendo la síntesis de las proteínas α del ciclo siguiente de replicación (Galosi, 2007).

La replicación del ADN es semiconservativa y se produce con intervención de polimerasas específicas codificadas por el virus. Una vez que se forman las cápsides incorporan el ADN genómico, asociándose con áreas alteradas de la zona interna de la membrana nuclear de la célula hospedadora y salen del núcleo a través de la membrana nuclear modificada de donde adquiere la envoltura. Finalmente, la maduración ocurre durante el tránsito de la partícula viral a través del retículo endoplásmico rugoso, en donde se produce la glicosilación de las proteínas inmunogénicas y la liberación de los viriones al medio extracelular, que se produce por exocitosis o por citólisis (Galosi, 2007).

CULTIVOS CELULARES EMPLEADOS PARA MULTIPLICAR VIRUS HERPES

Para el aislamiento viral se recomienda la utilización de células que sean de la especie a la cual el virus afecta de forma natural. Sin embargo, ya sea por características propias del virus o por características propias de las líneas utilizadas, existen dentro del género *Varicellovirus* algunos virus que pueden multiplicarse en un mayor rango de células hospedadoras en el laboratorio. Por ejemplo, para el aislamiento del Virus de la Pseudorrabia (Herpes Virus Suis 1) es posible la utilización de líneas celulares estables de origen porcino como PK15, así como también se ha demostrado que existe replicación en las líneas BT (cornete bovino), MDBK (riñón bovino) y Vero (riñón de mono verde africano), entre otras (Cedeño *et al.*, 1998; Peterson y Goyal, 1988). Para este virus se ha observado que la línea celular Vero es un sustrato que permite la multiplicación viral de manera mucho más rápida, demostrándose esto en la aparición de efecto citopático característico en un menor periodo de tiempo (Cedeño *et al.*, 1998). Existen evidencias experimentales no concluyentes que el CaHV1 genera efecto citopático en líneas celulares estables de origen renal equino (Larenas *et al.* 1992), pulmón de visón (Peterson y Goyal 1988) en esta última asociado a un bajo título viral. Sin embargo para esta memoria de título no fue posible contar con estas líneas celulares.

Otras líneas utilizadas en el aislamiento y multiplicación viral de especies del género *Varicellovirus* son: RK (riñón de conejo), Marc 145 (riñón de mono), ML (pulmón de visón), ED (dermis de equino), FK (riñón de ferret), TEK (riñón embrionario de pavo), BT (cornete bovino) entre otras (Cedeño *et al.*, 1998; Peterson y Goyal, 1988, Murphy *et al.*, 1999).

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

Debido a que el CaHV1 posee envoltura formada por lipoproteínas y glicoproteínas, es sensible a la acción de agentes físicos (calor) y químicos como el éter y cloroformo y desinfectantes comunes. Es importante considerar esta característica al momento de tomar las medidas de control adecuadas. Se inactiva a altas temperaturas (superiores a 40°C) por lo tanto su vida media en ambientes de 37°C es menor a cinco horas. La temperatura óptima de replicación oscila entre los 33-36°C que coincide con la temperatura a la que se mantienen los cachorros recién nacidos y las mucosas nasales y genital de perros adultos. Se inactiva completamente a pH<3 y pH>8 (Carmichael, 1999).

LATENCIA-TRANSMISIÓN

Como es característico de los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, éste permanece latente luego de la primera infección, produciéndose la latencia en ganglio trigémino y nódulos linfáticos retrofaringeos. Se han identificado además otros sitios de latencia como los ganglios lumbosacros, tonsilas y glándulas parótidas (Miyoshi *et al.*, 1999; Carmichael, 1999). En determinadas situaciones, generalmente relacionadas al estrés natural o inducido por la administración de corticoides, el virus se reactiva y es eliminado periódicamente en caninos domésticos (Ledbetter *et al.*, 2009), sin embargo, en experiencias realizadas en zorros rojos tratados con corticoides el virus no fue reactivado (Reubel *et al.*, 2001).

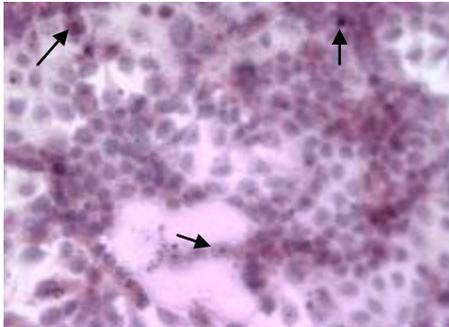
Debido a que en el medio ambiente el virus es inestable, la transmisión entre los animales requiere de un contacto estrecho entre ellos pudiendo ser por contacto directo con secreciones corporales, por vía venérea, oronasal y placentaria. La transmisión a los cachorros ocurre fundamentalmente durante el parto a medida que el cachorro va pasando a través del canal y toma contacto con las secreciones infecciosas de una hembra infectada. Cuando sucede la reactivación el virus es eliminado en general por secreciones nasales y rara vez por secreciones genitales por lo que la vía venérea es la menos frecuente de infección (Ledbetter *et al.*, 2009; Carmichael, 1999).

EFFECTOS IN VITRO

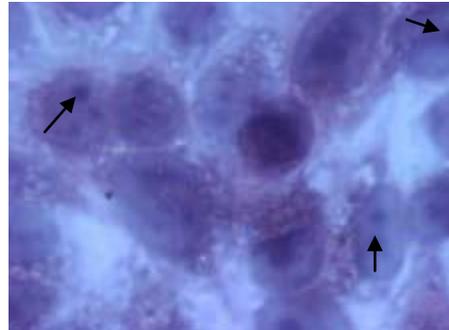
El CaHV1 tiene una estrecha gama de posibles células hospedadoras en comparación con otros alphaherpesvirus como el virus herpes felino o el virus de la pseudorrabia porcina. Se acepta mundialmente que sólo multiplica en cultivos primarios de células de origen canino tales como riñón y testículo o en la línea celular MDCK (Nakamichi *et al.*, 2000), ya que la evidencia de que otras líneas celulares podrían ser permisivas es poco significativa.

En el laboratorio se produce un efecto citopático (ECP) de lisis celular (muerte de la célula por lisis), el cual es medido cualitativamente observando la presencia de focos líticos en forma de típicos racimos de células redondeadas que se desprenden, dejando "placas claras". El efecto citopático (ECP) se

observa dentro de los tres primeros días post-infección (PI) y la destrucción total de la monocapa celular sucede a los cinco a siete días PI. También se observa aumento de la refringencia⁵ (células brillan) y cuerpos de inclusión intranucleares tipo A en las células infectadas. Existen antecedentes de que en ciertos aislamientos se produce la formación de sincisios (células gigantes) (Carmichael, 1999). No existen métodos estandarizados de medición cuantitativa del efecto citopático, aunque se han publicado algunos métodos que intentar lograrlo (McCoy y Wan, 2005; Campbell *et al.*, 2007). Estudios recientes demuestran que el virus también puede inducir apoptosis (Kim y Yi, 2005).

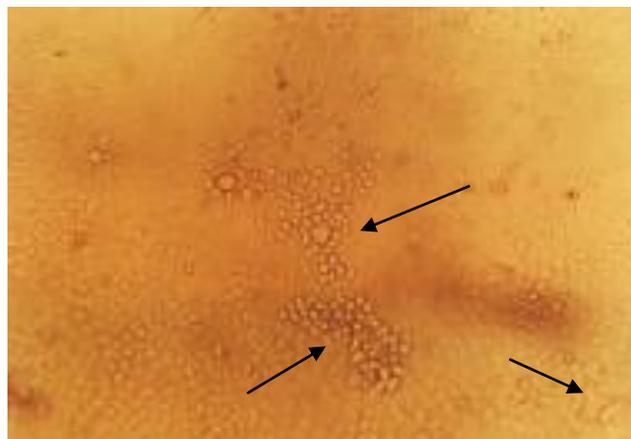


Formación o presencia de cuerpos de inclusión Intranucleares (tinción Hematoxilina-eosina).200X.



Formación o presencia de cuerpos de inclusión Intranucleares (tinción Hematoxilina-eosina).1000X.

Figura 2: Cuerpos de inclusión en línea celular MDCK (Navarro *et al.*, 2005)



Racimos de células redondeadas, placas claras. 100X

Figura 3: Efecto citopático en línea celular MDCK (Navarro *et al.*, 2003)

⁵ Capacidad para refractar la luz.

ENFERMEDAD CLINICA

El CaHV1 afecta a caninos domésticos causando un cuadro clínico que varía de gravedad dependiendo de la edad del animal afectado (Sellon, 2007)

1- Cachorros

Patogenia: tras la exposición oronasal de los cachorros neonatos, el CaHV1 replica inicialmente en las células epiteliales de la orofaringe y la mucosa de las tonsilas. Posteriormente entra en macrófagos los cuales lo diseminan vía hematógena a otros tejidos, como hígado, pulmones, glándulas suprarrenales, riñones y SNC. La menor temperatura corporal de los cachorros y la incapacidad de generar una respuesta febril, facilitan la diseminación sistémica del virus (Sellon, 2007).

Signos clínicos: cachorros infectados antes de las cuatro semanas de vida y posterior al tiempo de incubación (tres a seis días) van a presentar un trastorno necrosante y mortal que se inicia con un llanto persistente, dejan de mamar, hipotermia, heces blandas y hemorragias petequiales en las mucosas que llevan finalmente a la muerte alrededor de las 24 a 72 horas desde el inicio de los síntomas clínicos. Los cachorros mayores o aquellos que logran sobrevivir al cuadro necrosante generalmente desarrollan una enfermedad neurológica con signos de ataxia, ceguera o enfermedad vestibular (England, 2007a).

Hallazgos patológicos: al realizar la necropsia de los cachorros infectados se observan hemorragias petequiales en los órganos abdominales y en los pulmones (Sellon, 2007).

2- Adultos

Patogenia: En animales adultos debido a su capacidad de termorregulación bien desarrollada, la infección se confina en los aparatos respiratorios y genital pues son los que se mantienen a temperaturas menores al resto del cuerpo, sin desarrollar signos sistémicos y quedando el ADN vírico persistente en las neuronas de los ganglios trigéminos y en los linfocitos de los ganglios linfáticos retrofaringeos (Sellon, 2007; Carmichael, 1999), estudios recientes están investigando la presencia del virus en el ganglio vestibular y en el laberinto vestibular asociado a enfermedad vestibular en caninos domésticos, ya que esta asociación (virus herpes-enfermedad vestibular) es reconocida hace muchos años en humanos y felinos domésticos (Parzefall *et al.*, 2011).

Signos clínicos: Los signos y síntomas clínicos en los animales adultos varían desde una infección asintomática hasta la persistencia de problemas reproductivos.

Si la hembra se contagia durante la primera etapa de la gestación puede presentar muerte y momificación fetal. Si la infección ocurre durante la segunda mitad se observan generalmente abortos. Si la infección ocurre en la etapa final pueden observarse nacimientos prematuros. Normalmente se desarrolla inmunidad y las perras que han perdido una camada a causa de una infección por el CaHV1 posteriormente paren camadas sanas, esta inmunidad también es pasada a los cachorros y

están protegidos con los anticuerpos maternos hasta alrededor de la primera semana de vida (Lind-Forsberg, 2007). En la infección genital se observa hiperemia vaginal y prepucial (England, 2007b). El cuadro respiratorio aún es controversial y se ha determinado que el CaHV1 es agente actuante en el cuadro de traqueobronquitis infecciosa canina o comúnmente llamada “tos de las perreras”(Sellon, 2007). En investigaciones realizadas en un brote de traqueobronquitis infecciosa canina en Japón, se ha evidenciado que el CaHV1 puede actuar como agente causal de la infección nosocomial, con una gravedad variable que puede incluso llegar a la muerte del animal debilitado (Kawakami *et al.*, 2010). Debido a que el virus puede quedar latente en ganglio trigémico y otros sitios como glándulas parótidas, ganglio lumbosacro y tonsilas, la reactivación del virus por estrés o experimentalmente en perros adultos con drogas inmunosupresoras puede generar queratitis y lesiones oculares (Ledbetter *et al.*, 2009).

Hallazgos patológicos: Se puede observar hiperemia vaginal o prepucial, hiperplasia de los folículos linfoides de la mucosa vaginal y en ocasiones hemorragias de la submucosa (Carmichael, 1999; Murphy *et al.*, 1999).

SITUACIÓN NACIONAL

En Chile, la presencia del síndrome hemorrágico de los cachorros menores de cuatro semanas y el virus asociado, fue sugerida inicialmente en el año 1992 ya que en un criadero de ovejeros alemanes se presentó una mortalidad elevada en cachorros y las características clínicas eran similares a las provocadas por este agente infeccioso. En esa oportunidad se realizó la replicación viral en una línea celular de origen fetal equino, sin embargo no se ha determinado con exactitud a que línea celular estable correspondía (Larenas *et al.*, 1992). Posteriormente en el año 2003, se realizó el aislamiento viral utilizando la línea MDCK, aislado que se denominó RP5 (Navarro *et al.*, 2003). En el año 2005 se realizó la caracterización biológica del aislado, con el fin de utilizarlo en el diagnóstico viral (Navarro *et al.*, 2005) y acercarse a la confirmación científica de la presencia del virus en Chile.

Durante el año 2010 se realizó la caracterización molecular del aislado mencionado anteriormente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), llegando a la conclusión certera de que en Chile sí está el agente infeccioso, pese a que en la práctica clínica de la medicina veterinaria no existen datos específicos de la casuística, debido a que el cuadro clínico es subdiagnosticado (Fuentes, 2010; Carrasco, 2011).

Cómo ya se ha confirmado la presencia del virus en estudio en Chile y la prueba estándar para la identificación viral es el aislamiento en cultivos celulares, en la presente memoria se estudiaron líneas celulares alternativas a las de origen canino, para disponer de opciones en el laboratorio de manera de facilitar la investigación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar líneas celulares distintas de la MDCK que sean permisivas a la infección por el aislado RP5 del Virus Herpes Canino por medio de visualización de efecto citopático característico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar líneas celulares distintas de la MDCK permisivas a la infección por el aislado viral RP5 mediante la observación de lisis celular en los cultivos disponibles.
2. Determinar cualitativamente la línea celular en la cual se observa el efecto lítico en el menor tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Financiamiento: Este estudio se realizó en el Laboratorio de Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Se financió gracias a los recursos existentes en el laboratorio de virología de FAVET (medios de cultivo, frascos de cultivo de Roux, factores de crecimiento, etc.), aportes propios y las células se obtuvieron mediante un convenio de colaboración existente entre FAVET y el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Líneas celulares: Se utilizaron seis líneas celulares de uso rutinario para el diagnóstico de diversas enfermedades virales que afectan a humanos, disponibles en el laboratorio de cultivos celulares del Instituto de Salud Pública de Chile (Cuadro 2, anexo nº 1). Se mantuvieron dos frascos de células (duplicados) por cada línea celular para utilizar uno de los frascos como control y el otro como desafío, manteniéndose ambos en las mismas condiciones durante todo el periodo experimental.

Cuadro 2: Líneas celulares utilizadas en este estudio

Línea celular	Origen
RD	Rabdomiosarcoma <i>Homo sapiens</i> (humano).
Vero	Riñón <i>Cercopithecus aethiops</i> (Mono verde africano).
MNA (Neuro-2)	Neuroblastos (Células madre ameboides y neuronales) <i>Mus musculus</i> (Ratón).
Hep-2	Tejido epitelial contaminado con células HeLa de <i>Homo sapiens</i> (humano).
L20b	Tejido subcutáneo areolar y adiposo de <i>Mus musculus</i> (Ratón).
MDCK	Tejido renal de <i>Canis familiaris</i> (Perro doméstico).

Obtención de monocapas confluentes de las distintas líneas celulares: Para la obtención de monocapas confluentes, las células inicialmente mantuvieron por dos meses haciendo subcultivos de 1:2 frascos (etapa de entrenamiento) y así obtener una cantidad suficiente de células que permitiera conteo, siembra y congelamiento del excedente. Se decidió utilizar un protocolo uniforme para todas las líneas celulares, protocolo de rutina utilizado en el laboratorio de virología de FAVET, y omitir las recomendaciones específicas de mantenimiento y propagación para cada tipo de línea celular, de este modo se redujo la posibilidad de error atribuido a manejos diferentes (ver anexo nº 2).

Congelamiento y conservación de células de las distintas líneas celulares: Una vez establecidas las monocapas de células, se congelaron 1.000.000 de células por ml, inicialmente se resuspendieron en 1ml de suero fetal bovino y se llevó a congelamiento paulatino, primero 30 minutos a 4°C, posteriormente 30 minutos a -20°C y finalmente se dejaron a -80°C. Esta técnica no fue de utilidad ya

que al descongelar las células para la posterior siembra, ninguna lograba adherirse al frasco y por lo tanto no había formación de monocapa.

Para solucionar este inconveniente se decidió utilizar la técnica recomendada por el *American Type Cell Culture* (ATCC) donde la solución de congelamiento se formaba en base a 5% de dimetilsulfoxido (DMSO) y 95 % de medio de cultivo mínimo esencial de Eagle. Esta técnica fue exitosa, ya que al descongelar células para la posterior siembra se logró la formación de monocapa en los mismos tiempos esperados.

Aislado viral: se utilizó el aislado viral denominado RP5, (Navarro *et al.*, 2003) manteniéndose congelado a -20°C en dependencias de la Unidad de Virología de FAVET.

Reactivación viral: Previo a la realización del ensayo, se realizó la reactivación viral y verificación de viabilidad del aislado RP5, se inocularon (ver anexo n°3) seis monocapas de la línea celular estable MDCK, línea mundialmente descrita como permisiva para la infección de este virus, con 0,2 ml de 100 DICT₅₀ del inóculo.

Una vez observado el efecto citopático de lisis celular característico del CaHV1, o a los cinco días de observación, se procedió a realizar tres ciclos de congelamiento/descongelamiento -cuyo objetivo es generar lisis en las células que aún no han sido lisadas por las partículas virales y así liberar estas partículas al medio- el contenido de los frascos de cultivo se pasó a frascos de centrifuga, los que fueron centrifugados a 1.500Xg por cinco minutos, separando el detritus celular de la fase acuosa que contenía las partículas virales, correspondiendo este último al nuevo inóculo.

El inóculo se tituló utilizando el método de dilución de punto final (Dulbecco, 1988) y los cálculos posteriores para determinar su valor se realizaron mediante el método de Reed y Muench, 1938 (ver anexo n°6).

Inoculación del virus en los cultivos disponibles: Una vez reactivado el aislado RP5, se procedió a determinar las líneas celulares permisivas al CaHV1 inoculando con 100 DICT₅₀ cada una de las líneas celulares disponibles, se utilizó el mismo protocolo de inoculación viral para todas las líneas celulares (Ver anexo n°3). La inoculación se realizó 24 h. posteriores a la siembra, encontrándose las líneas en diferentes estados de formación de monocapa.

Se trabajó con duplicados de cada línea, correspondiendo uno al control y el otro al desafío. Cada frasco se identificó con un número (Cuadro 3), los frascos controles fueron sometidos a las mismas condiciones que los desafíos y como inóculo en los frascos control se adiciono solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) en igual volumen que el inóculo (20 µL).

Una vez inoculadas las líneas celulares, se realizaron dos pasajes ciegos (Ver anexo n°5), para aumentar la cantidad de viriones infectantes, y luego se procedió a la observación del efecto citopático durante 5 días.

Cuadro 3: Identificación de los frascos utilizados en el estudio

Línea	Condición (Frasco)	
	control	desafío
L20b	1	2
Vero	3	4
MDCK	6	5
Hep-2	8	7
MNA	10	9
RD	11	12

Observación y cuantificación del efecto citopático: Se observaron diariamente los frascos de cultivo, durante cinco días mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio óptico invertido Nikon eclipse TS100-f®, con un aumento de 100x y 400x. Para estandarizar la observación se definieron cuadrantes, de este modo la observación y posterior fotografía se realizó en cuadrantes conocidos (Figura 4).

Debido a la condición cualitativa de este estudio, se consideró línea celular permisiva a la infección con el aislado RP5 del CaHV1 a aquella que presentó efecto citopático de lisis celular en los cinco días de observación.

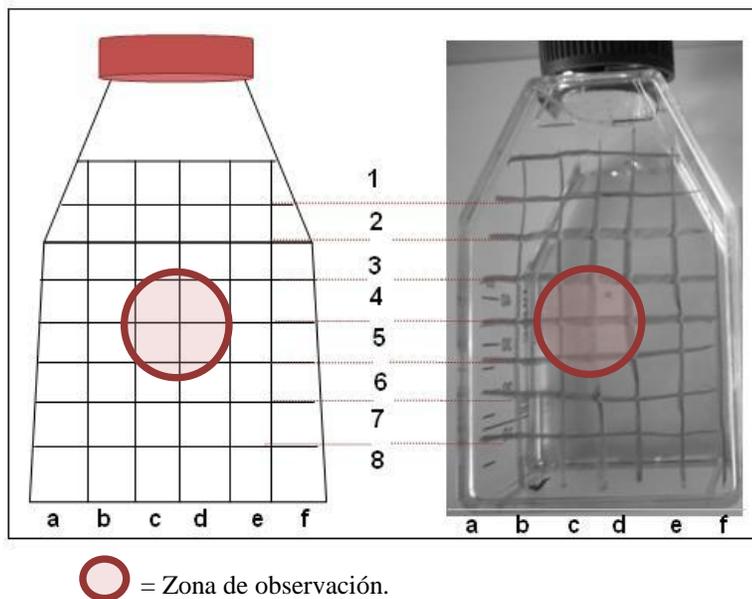


Figura 4: Esquema de subdivisión de los frascos y zona de observación utilizada

Normas de Bioseguridad: CaHV1 es considerado patógeno de nivel de riesgo dos, por lo tanto se manejó utilizando un nivel de bioseguridad dos que incluían las normas del nivel de bioseguridad uno más el uso de campanas de flujo laminar vertical, entrada restringida al área de manipulación con el virus, uso de delantal, mantención del aseo diario con descontaminación química de las superficies utilizadas. Todo el material que se utilizó en el trabajo con virus se sometió a autoclave previo a su lavado, el material de plástico (frascos de Roux) que no pueden someterse a ese proceso fueron llevados a irradiación para su esterilización (CONICYT, 2008).

RESULTADOS

OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE LAS CÉLULAS

Día 1: La confluencia (área del frasco cubierta por células) varían levemente entre las líneas, de mayor a menor área cubierta el orden es el siguiente: MDCK, Vero, RD, MNA, Hep-2, L20b.

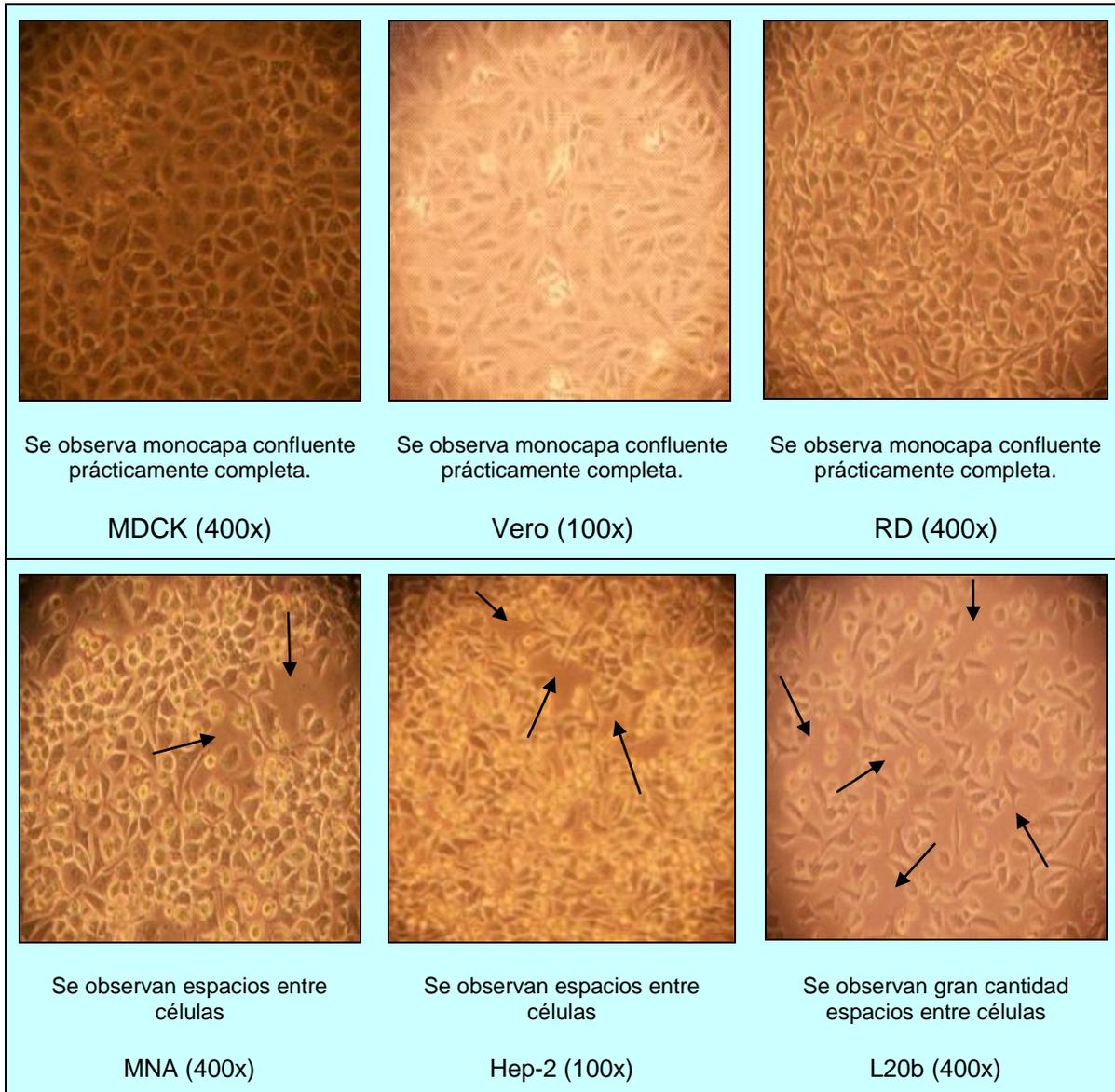


Figura 5: Líneas celulares al primer día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino

Día 2: La línea celular MDCK y Vero presentan 100% de confluencia, monocapa lista para el subcultivo. El resto de las líneas presentó células flotando refringentes y espacios entre las células. L20b sigue siendo la línea con menor velocidad en la formación de la monocapa.

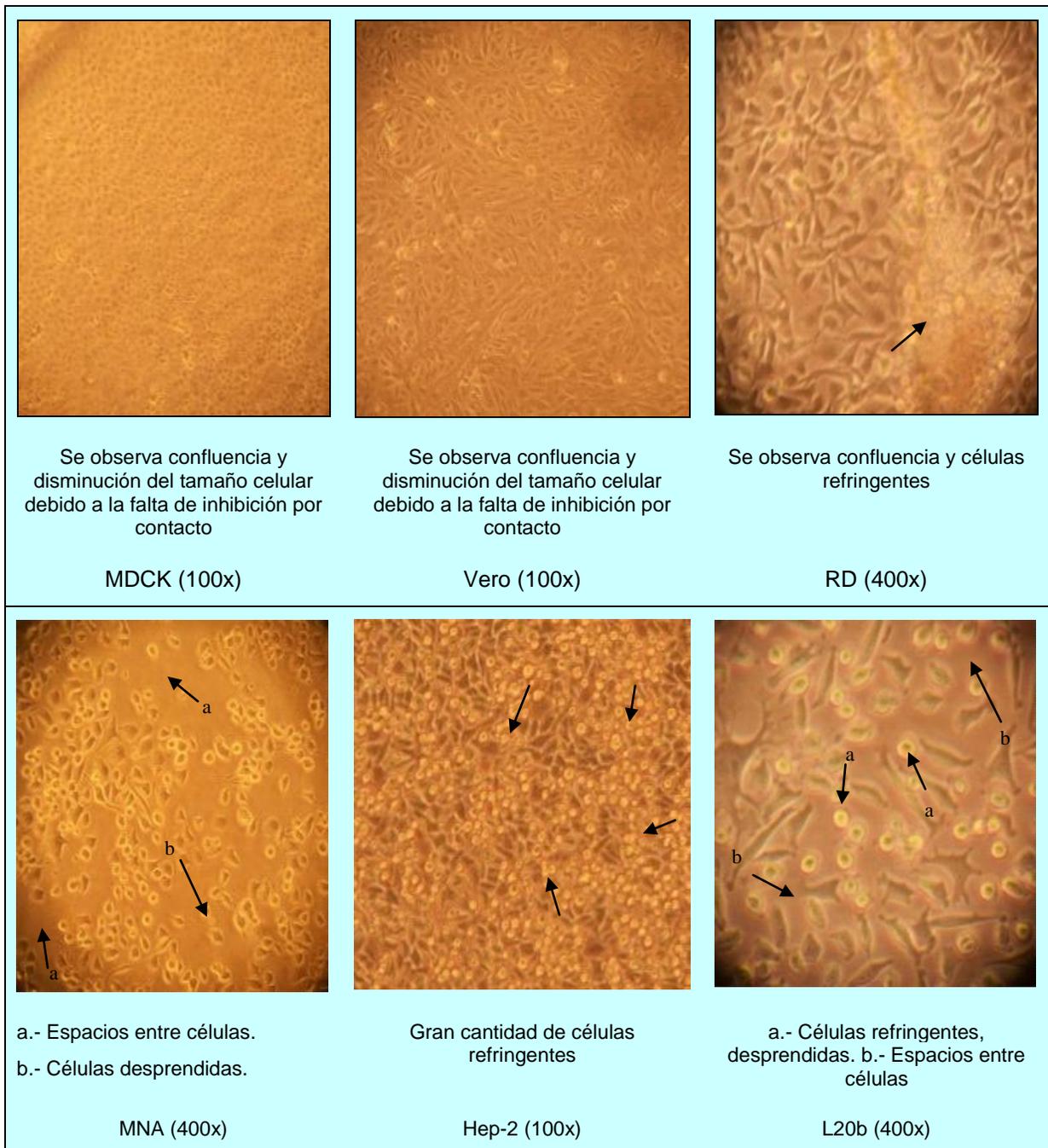


Figura 6: Líneas celulares al segundo día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino

Día 3: Las líneas MDCK y Vero continúan formando monocapa (segundo pasaje). RD, Hep-2, MNA presentan espacios entre las células, aún no se logra confluencia, muy similares al día anterior. L20b aumenta la cantidad de células flotado en el medio y refringentes (Figura 5).

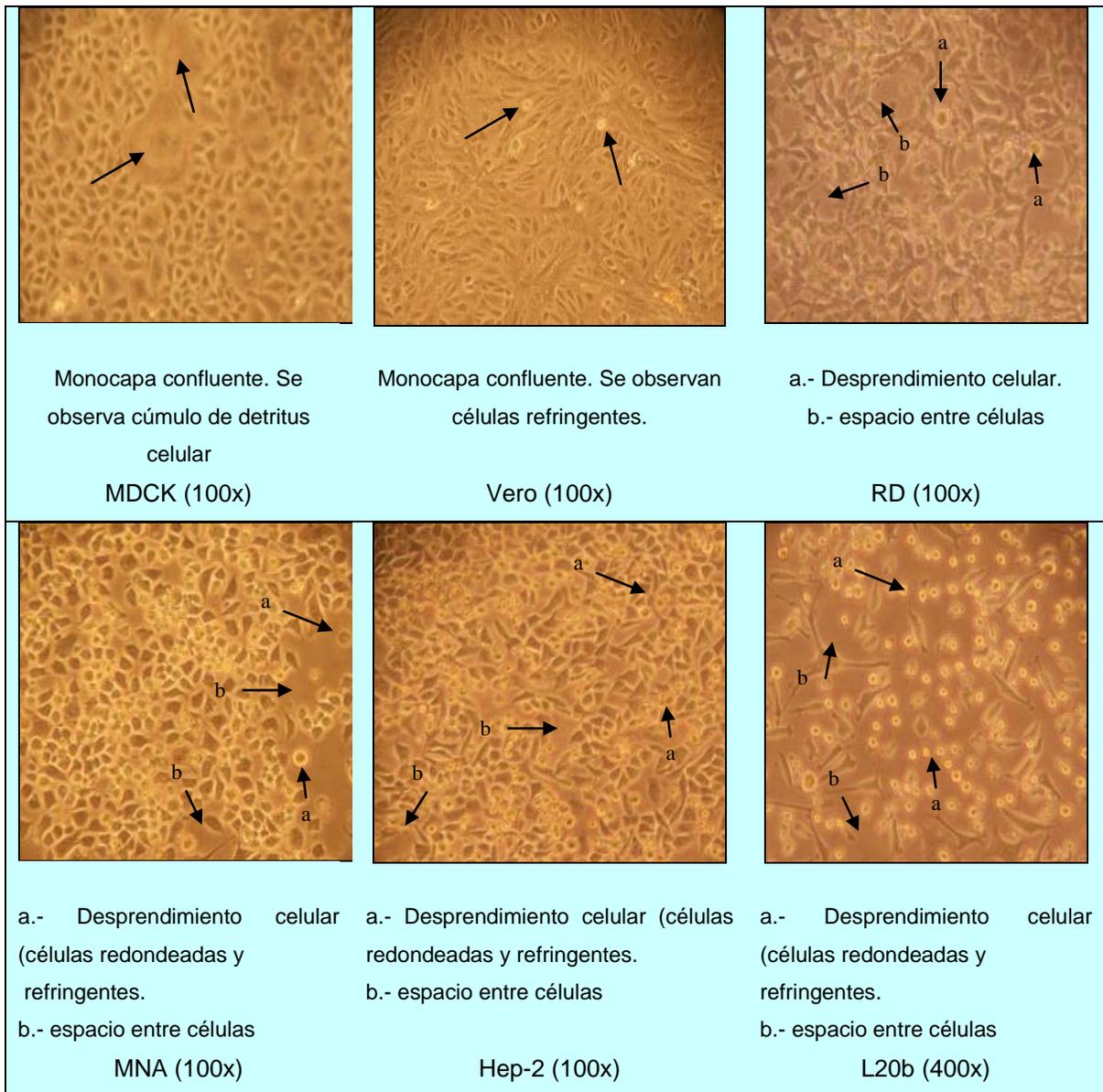


Figura 7: Líneas celulares al tercer día de observación previo a la inoculación con Virus Herpes Canino

Día 4: Las líneas celulares Hep-2 y MNA forman monocapa confluyente. Línea celular RD aún presenta espacios entre células (menos que el día anterior).

La línea L20b presenta gran cantidad de células flotando en el medio, medio de cultivo turbio (color ámbar turbio).

Día 5: La línea L20b se desprende totalmente. Línea celular RD con pocos espacios entre células.

INOCULACIÓN Y OBSERVACIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO

De un total de seis líneas celulares mantenidas en el laboratorio por seis meses, sólo se evidenció efecto citopático característico del virus en estudio en la línea celular MDCK.

Día 1. No se observan cambios evidentes en ninguno de los frascos (contaminado versus desafío). Al momento de la inoculación no todas las líneas presentaban igual estado de formación de monocapa: Hep-2 falta completar monocapa, L20b presenta desprendimiento celular en frasco control y desafío.

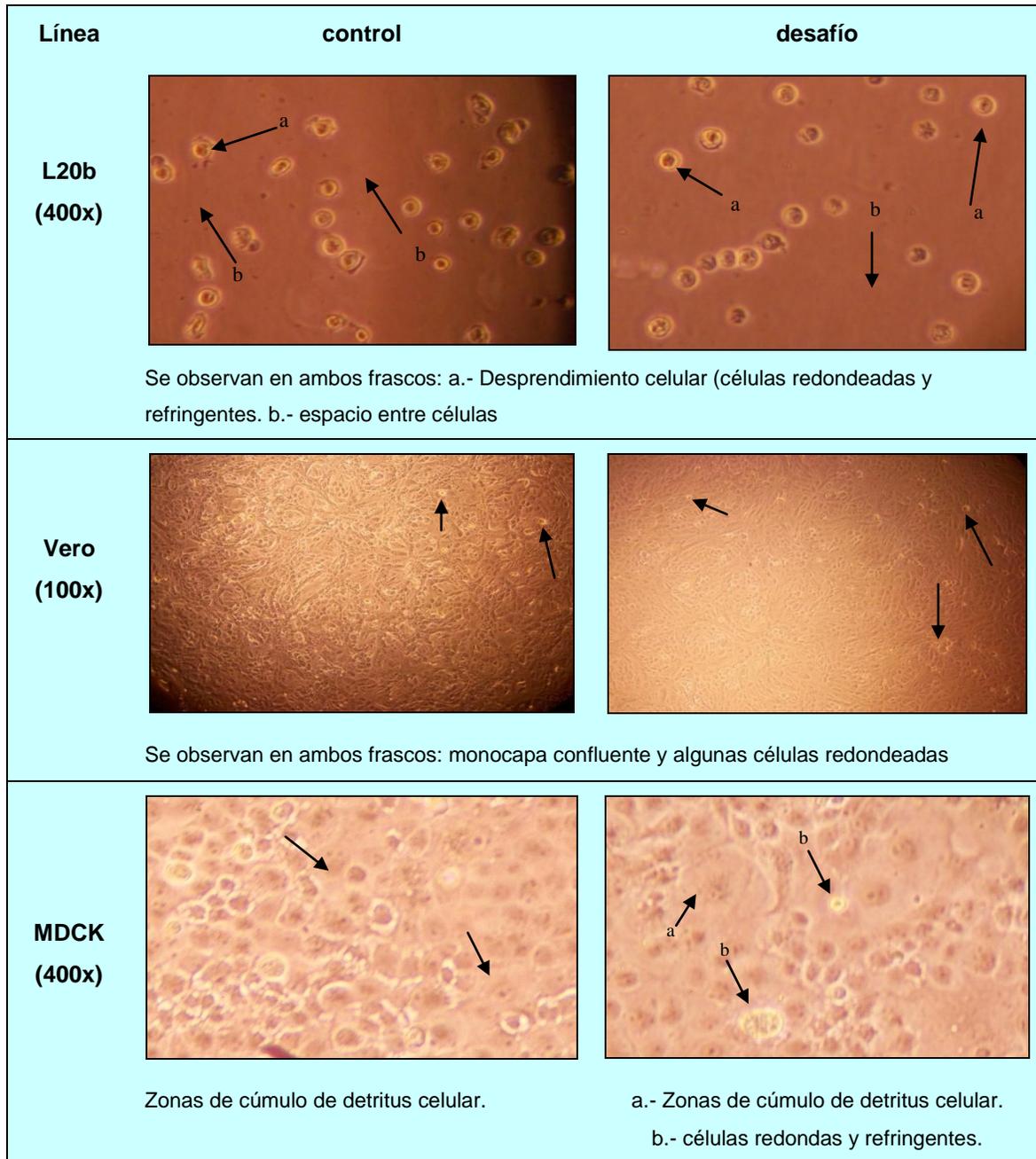


Figura 8: Líneas celulares al primer día de observación post-infección con Virus Herpes Canino

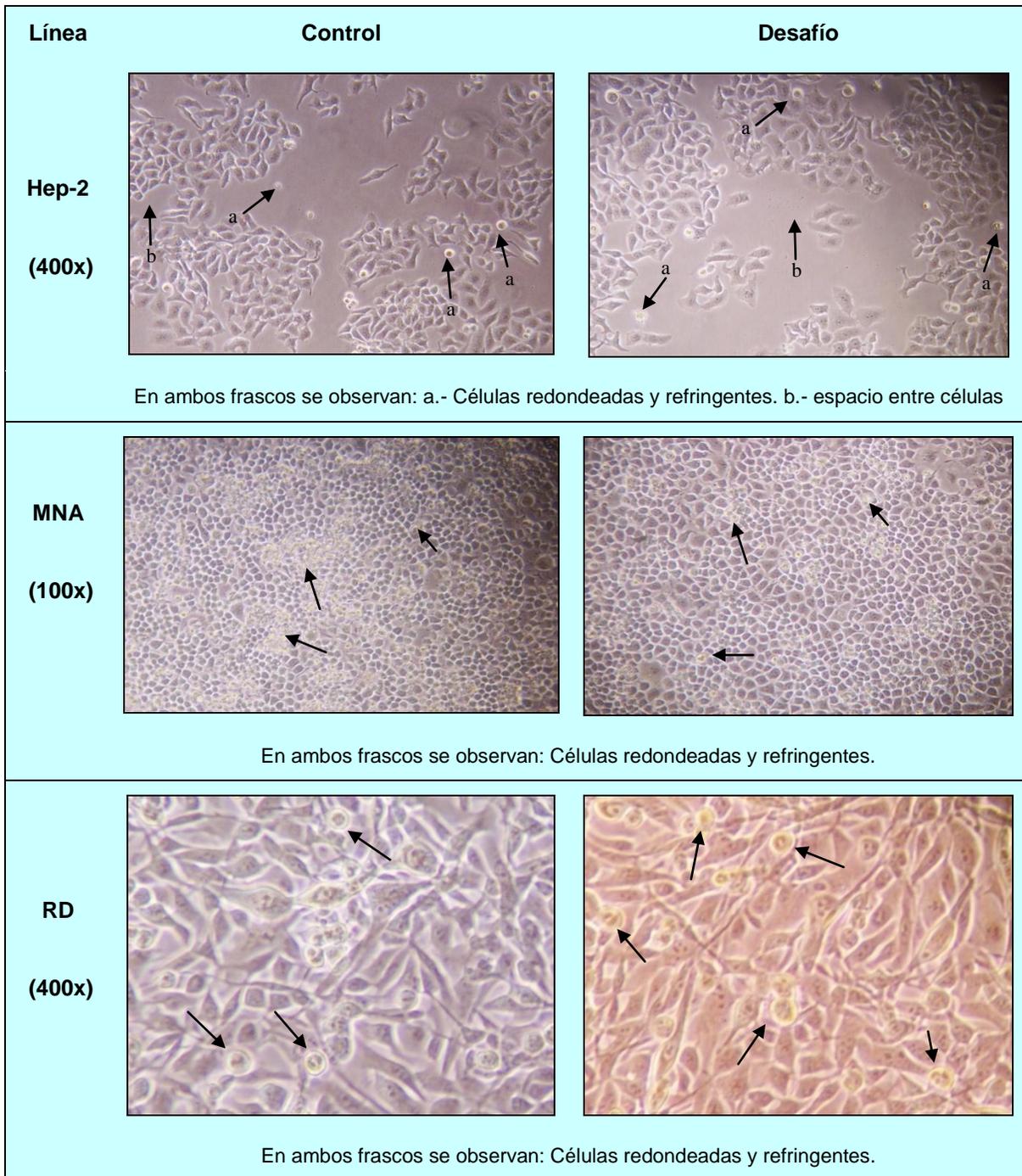


Figura 9: Líneas celulares al primer día de observación post-infección con Virus Herpes Canino

Día 2:

Cuadro 4: Día 2 de observación post-infección con Virus Herpes Canino

Línea (frasco)	Medio de cultivo	Monocapa
L20b 1 control	Rosado pálido, levemente turbio	Pocas células adheridas al frasco.
L20b 2 desafío	fucsia	Monocapa totalmente desprendida
Vero 3 control	Amarillo transparente	Monocapa más “desordenada”
Vero 4 desafío	Amarillo transparente	Sin cambios.
MDCK 5 desafío	rosado	Leve destrucción de la monocapa.
MDCK 6 control	fucsia	Mayor destrucción de la monocapa que en el frasco control.
Hep-2 7 desafío	Anaranjado transparente	No hay cambios evidentes entre frascos
Hep-2 8 control	Anaranjado transparente	
MNA 9 control	Amarillo	Células redondas y brillantes
MNA 10 control	Amarillo	
RD 11 control	Naranja transparente	Sin cambios evidentes
RD 12 desafío	Naranja transparente	

Día 4:

Cuadro 5: Día 4 de observación post-infección con Virus Herpes Canino

Línea (frasco)	Medio de cultivo	Monocapa
L20b 1 control	Naranja levemente turbio.	Pocas células adheridas al fondo del frasco.
L20b 2 desafío	Fucsia.	Monocapa totalmente desprendida.
Vero 3 control	Naranja levemente turbio.	Gran cantidad de células desprendidas.
Vero 4 desafío	Fucsia.	Gran cantidad de células desprendidas aglomeradas formando racimos.
MDCK 5 desafío	Amarillo	Indicios de desprendimiento por los bordes.
MDCK 6 control	Amarillo turbio	Células refringentes, formación de espacios entre las células.
Hep-2 7 desafío	Naranja turbio.	Células más pequeñas respecto al desafío.
Hep-2 8 control	Naranja	Más células desprendidas respecto al control.
MNA 9 desafío	Naranja turbio	Gran cantidad de células desprendidas.
MNA 10 control		
RD 11 control	Naranja turbio	Células brillantes y globosas.
RD 12 desafío		Pocas células adheridas al fondo del frasco.

Día 5:

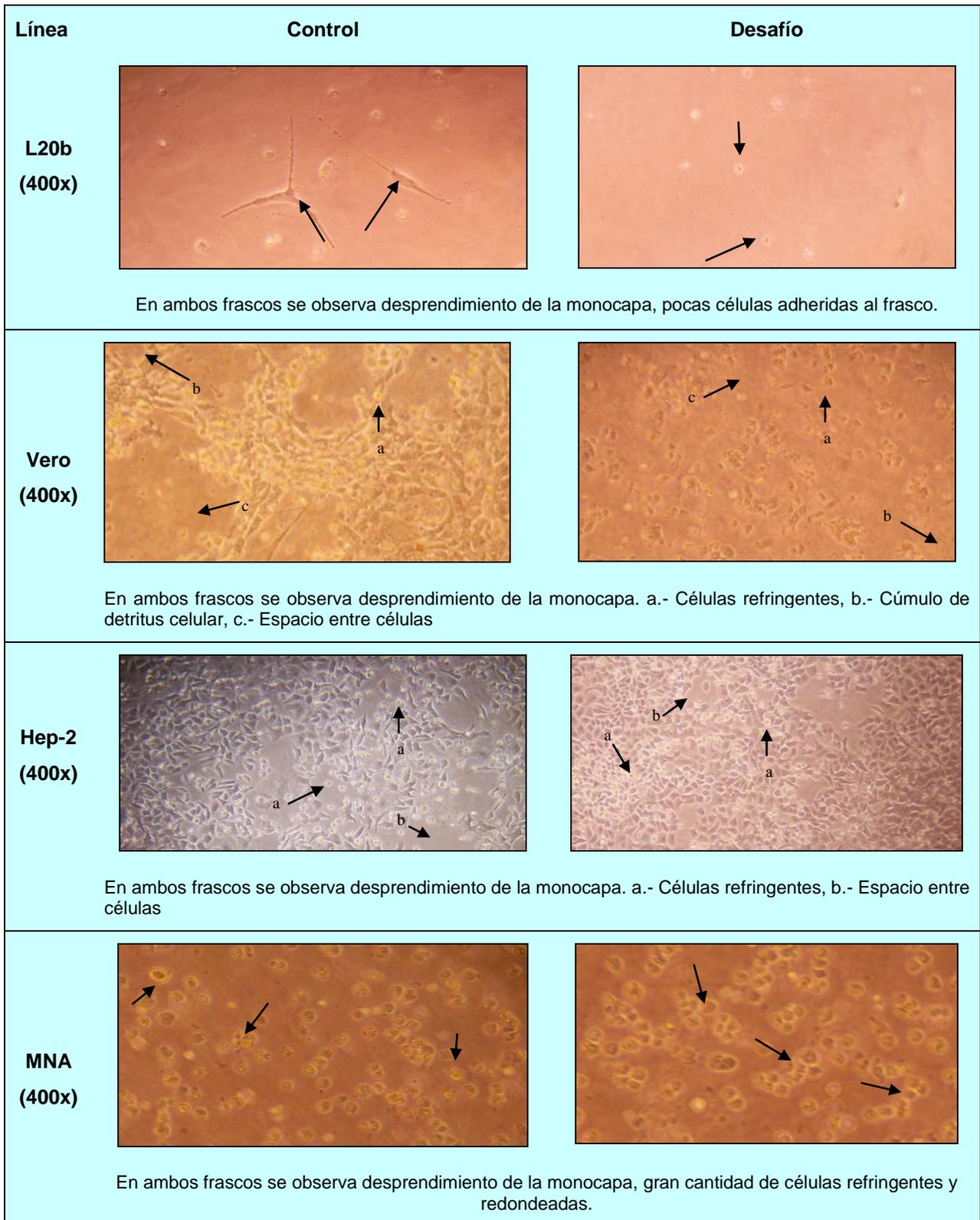


Figura 10: Líneas celulares al quinto día de observación post-infección con Virus Herpes Canino

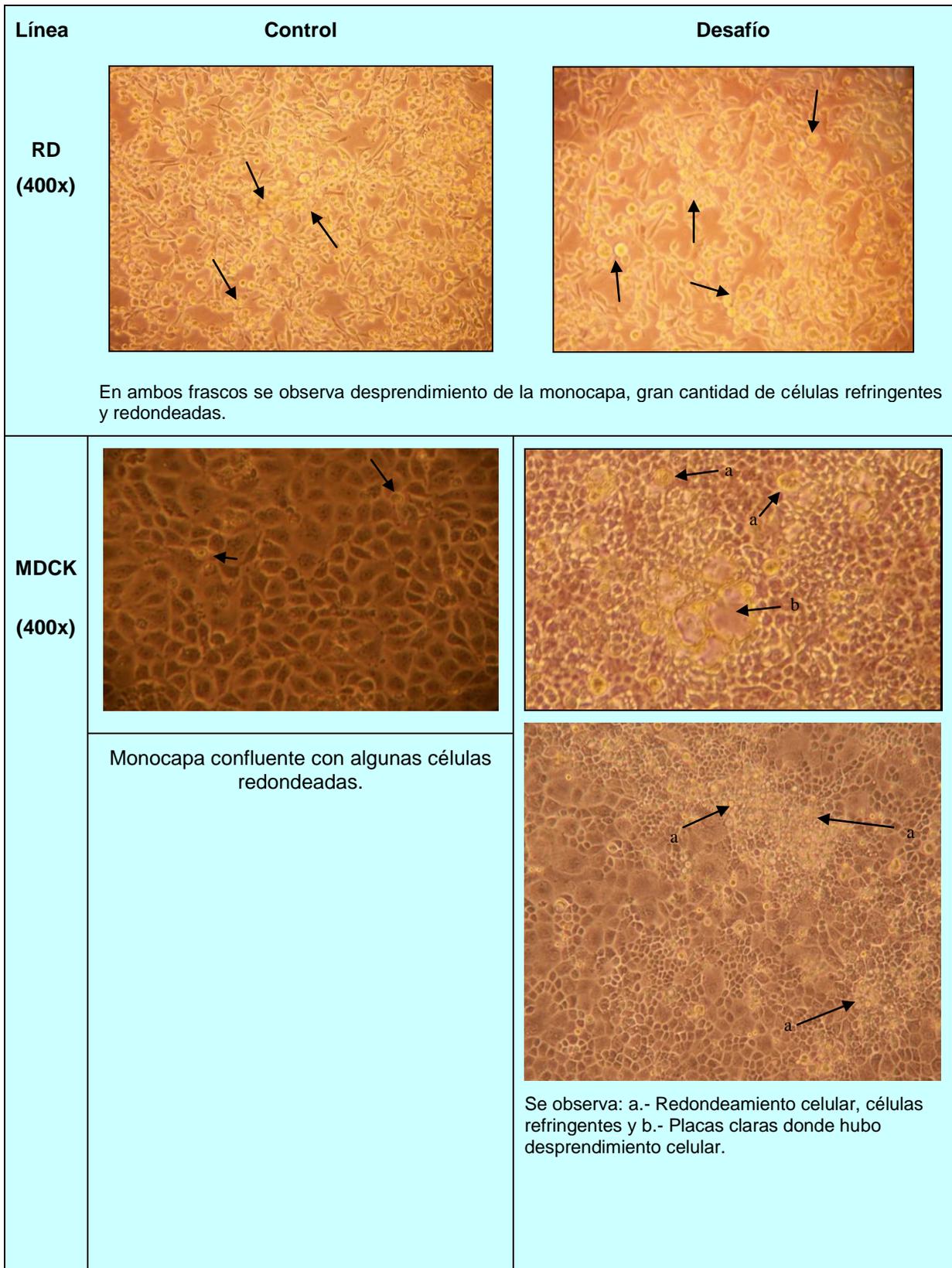


Figura 11: Líneas celulares al quinto día de observación post-infección con Virus Herpes Canino

CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA

Si bien las normas de bioseguridad se siguieron de forma rigurosa, ocurrió contaminación bacteriana de algunas de las líneas celulares (RD y Vero). Para evitar la pérdida de este material se intentó la desinfección siguiendo el protocolo descrito por Freshney (Freshney, 2010) (ver anexo nº4), no obstante luego de aplicado el protocolo el crecimiento celular no fue óptimo y se desecharon los frascos contaminados, utilizando células congeladas para reproducir el experimento.

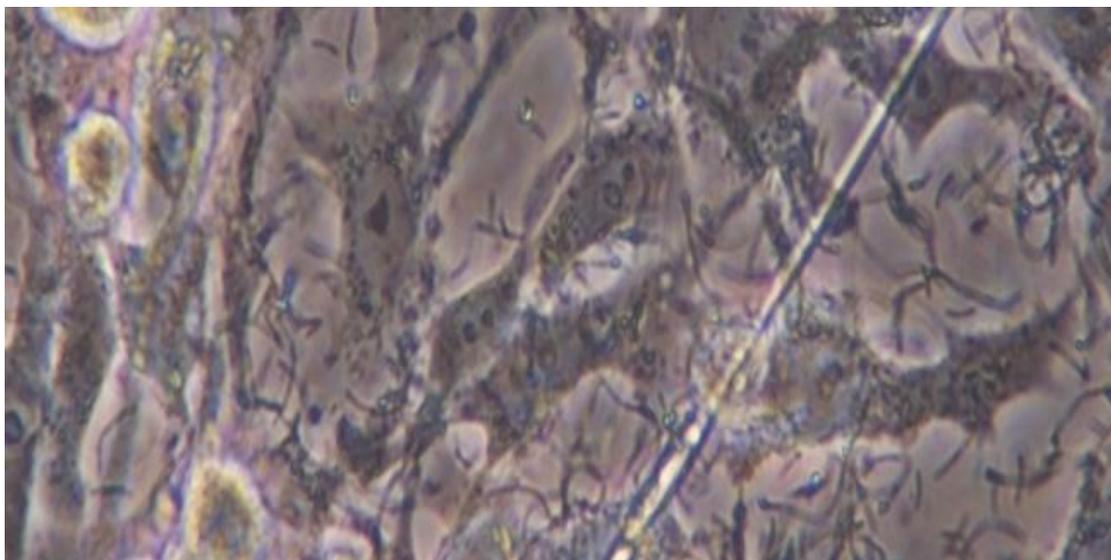


Figura 12: Línea celular RD contaminada con bacilos

DISCUSIÓN

El aislamiento viral en células *in vitro* es la prueba que presenta mayor sensibilidad y confiabilidad en la virología actual, para ello es necesario considerar la rapidez de la detección viral y la sensibilidad de las células al virus (Peterson y Goyal, 1988; Nakamichi *et al.*, 2000). Es de conocimiento mundial que el CaHV1 pese a pertenecer a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* presenta un estrecho rango de células en las cuales se multiplica en el laboratorio, restringiéndose sólo a células de origen canino. Fue objetivo de este trabajo buscar líneas celulares alternativas a las de origen canino cuyo uso en el laboratorio sea habitual y no presenten mayores complicaciones en su mantención.

La investigación se realizó en líneas celulares de uso habitual en el ISP para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades de impacto en la salud pública del país (ver anexo nº7), en este caso: L20b, Hep-2, MNA, RD, Vero, MDCK. Durante la primera etapa, de mantención de las líneas celulares, la estandarización del protocolo fue el punto crítico, ya que cada línea presenta distintos requerimientos de mantención (ATCC, 2011). Durante los primeros cinco días de observación las líneas MDCK y Vero formaron la monocapa más rápidamente. En cambio, la línea L20b fue la más lenta y presentó una tendencia a desprenderse al cuarto día, coincidiendo con las recomendaciones del ATCC que aconsejan realizar cambio de medio de cultivo cada dos o tres días. Estas recomendaciones no se siguieron ya que se utilizó un protocolo común de mantención en todas las líneas y esto podría explicar la dificultad que hubo para la formación y mantención de la monocapa.

También se observó contaminación bacteriana en las líneas Hep-2, Vero y MDCK. Si bien la primera recomendación de Freshney (2010) es eliminar la línea contaminada, el mismo autor define un protocolo de descontaminación cuando es absolutamente vital mantener la línea celular, éste se aplicó porque existía una restricción en la disponibilidad de las células.

Durante el proceso de congelamiento/descongelamiento del *stock* de células se evidenció una dificultad para recuperar las células posterior al congelamiento. Inicialmente se utilizó sólo suero fetal bovino, como agente crioprotector, el cual probablemente no protegió de forma adecuada a las células de la formación de hielo intracelular y cambios osmóticos que generaron lisis de las células y por lo tanto imposibilidad de recuperarlas para la formación de monocapas celulares. Cuando se decidió utilizar el protocolo que incluía el uso de DMSO como agente crioprotector la recuperación de células para su siembra fue positiva y se logró la formación de monocapa (Freshney, 2010; Hay *et al.*, 2000). Finalmente el objetivo de esta etapa se cumplió y se lograron mantener las células para la siguiente etapa de inoculación viral.

La etapa de inoculación viral se cumplió siguiendo los protocolos ya descritos en materiales y métodos. Desde el inicio hubo diferencias entre las distintas líneas, ya que no se logró la formación

uniforme de la monocapa a las 24 h. Esto probablemente se explicaría porque cada línea poseía un índice mitótico diferente, consecuentemente tuvieron tiempos de formación de monocapa diferentes. También las condiciones en las que la monocapa de células se forma pueden variar de una línea celular a otra, una forma de haber solucionado esto sería sembrar mayor cantidad de células por ml. en aquellas líneas que tengan un crecimiento más lento o haber dado las condiciones ideales por línea celular recomendadas por el ATCC, sin embargo dada las características del ensayo, se requería que las condiciones fueran uniformes en todas las líneas, asimismo no se pueden descartar variaciones asociadas a la manipulación dada por la experiencia en el laboratorio.

En el segundo día post-infección con Virus Herpes Canino se observaron las primeras diferencias en el medio de cultivo y las características de la monocapa, tanto entre líneas celulares, como entre desafío y control. Las variaciones de tonalidad en el medio de cultivo, indicaron que Vero y MNA presentaron medios amarillos lo que indicó mayor acidez provocada por un mayor metabolismo celular. Sin embargo estas diferencias no pudieron ser atribuidas a acción viral pues se observaron en los frascos control y desafío. Habría sido adecuada la mantención e inoculación de un mayor número de frascos por cada línea celular, sin embargo hubo limitantes económicas y de disponibilidad celular que impidieron mantener un mayor número de muestras por cada línea celular.

En el cuarto día post-infección con Virus Herpes Canino los cambios fueron más relevantes, MDCK presentó diferencias respecto al control, mayor cantidad de células refringentes y espacios entre las células. La otra línea que presentó diferencias entre el desafío y el control fue la línea celular Vero, sin embargo estas diferencias no pudieron ser atribuidas con certeza al CaHV1. Las líneas L20b, MNA, RD presentaron desprendimiento de las células en control y desafío, probablemente atribuible a la escasez de nutrientes en el medio, situación similar a la ocurrida en la etapa de mantención celular previo a la inoculación. Posibles explicaciones a los resultados en estas líneas de origen no canino, pueden relacionarse con que la partícula logre penetrar en la célula pero no culmine el proceso de replicación y por lo tanto no genera efecto en la célula, que el cambio observado en la célula sea sólo producto del envejecimiento celular, por manejo inadecuado de las condiciones necesarias en la mantención de las líneas o porque se obviaron las recomendaciones del ATCC para que todas las líneas estuvieran bajo las mismas condiciones.

Finalmente, al quinto día de observación la línea MDCK mostró un efecto citopático atribuible al CaHV1 y la línea Vero también presentó cambios entre desafío y control pero fue difícil clasificarlos cualitativamente como atribuibles a la acción del CaHV1 porque no fueron como los descritos en la bibliografía consultada (Carmichael *et al.*, 1965). Existe la posibilidad que el CaHV1 no genere los mismos cambios de lisis celular en la línea Vero, ya que el comportamiento viral puede variar de una línea a otra. Para comprobar que los cambios observados en Vero son atribuibles a la acción del CaHV1 habría sido necesario aplicar pruebas de diagnóstico virológico como inmunoperoxidasa,

inmunoensayo enzimático o inmunofluorescencia que permitieran detectar partículas virales unidas a las células. Otra alternativa sería utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que detectaría partículas virales incluso dentro de las células.

Los resultados concuerdan con la bibliografía citada, los cuales indican que el CaHV1 pese a tener una estrecha relación con otros miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* como el virus de la pseudorrabia , posee un rango de células hospederas muy estrecho y se restringe sólo a células de origen canino, ya sean de cultivo primario o línea celular estable. Sin embargo se debería considerar en estudios posteriores confirmatorios los cambios que la línea Vero presentó durante el experimento.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se observó efecto citopático de lisis celular característico del CaHV1 en la línea de origen canino MDCK, situación confirmatoria de los resultados obtenidos en investigaciones anteriores.
- El CaHV1 no produjo efecto citopático de lisis celular en las líneas Vero, RD, Hep-2, MNA y RD.
- El objetivo de este trabajo fue probar la factibilidad de otras líneas celulares que permitieran trabajar en el laboratorio con el CaHV1, los resultados experimentales demostraron que la línea celular MDCK, por el momento es la única viable -dentro de las disponibles- para el diagnóstico viral en el laboratorio, dado que es la única que presentó efecto citopático y su uso en el laboratorio no es tan exigente respecto a requerimientos de mantención y medios de cultivos.
- Se propone realizar estudios que confirmen o descarten la presencia de partículas virales en el interior de las células de las líneas estudiadas, inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia o PCR y continuar en la búsqueda de líneas celulares alternativas para el uso de aislamiento viral en el laboratorio del CaHV1, teniendo presente que esta búsqueda debe apuntar a una línea celular cuya mantención sea igual o menos compleja que la línea MDCK.

- **BIBLIOGRAFÍA**

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. Garland Publishing. New York, E.E.U.U. pp. 1616.

ATCC (AMERICAN TYPE CELL CULTURE). 2011. Advanced Catalog Search. [en línea] <<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/AllCollectionSearch/tabid/454/Default.aspx>> [consulta: 10-03-2011]

CAMPBELL, C.; MOTZFELDT-LAANE, M.; HAUGARVOLL, E.; GIAEVER, I.2007. Monitoring viral-induced cell death using electric cell–substrate impedance sensing. Biosens. Bioelectron. 23: 536-542.

CARMICHAEL, L.; STRANDBERG, J.; BARNES, F. 1965. Identification of a cythopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpes virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120: 644-650.

CARMICHAEL, L. 1999. Neonatal Viral Infections on Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1). [en línea]. **In:** Recent Advances in Canine Infectious Diseases <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/carmichael/chapter_frm.asp?LA=1> [Consulta: 03-01-2010].

CARRASCO, L. 2011. Detección del gen de la Glicoproteína B del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Memoria para optar al título de médico veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y pecuarias. pp. 52.

CEDEÑO, I.; ROLO, M.; PALENCIA, L.; LÓPEZ, N. 1998. Susceptibilidad de cinco líneas celulares estables al virus de pseudorrabia. FCV-LUZ. 8: 77-84

CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. 2000. Apuntes del curso Virología Avanzada del Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Medicina Preventiva. pp. 40.

CONICYT. 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2^a ed. [en línea] <http://www.conicyt.cl/573/articles-37914_manual.pdf> [consulta: 10-03-2011]

DAVISON, A.; EBERLE, R; EHLERS, B.; HAYWARD, G.; McGEOCH, D.; MINSON, A.; PELLET, P.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.; THIRY, E. 2009. The order *Herpesvirales*. Arch. Viral. 154: 171-177.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L. 2002. Prevención de las enfermedades nosocomiales. 2^a ed. OMS. Malta. pp 65.

DULBECCO, R. 1988. Nature of viruses: Endpoint Method-Measurement of the infections titer of viral sample. **In:** Dulbecco, R.; Ginsberg, H. Virology. 2^a ed J.P. Lippincot. Philadelphia, E.E.U.U . pp. 5-22.

ENGLAND, G. 2007a. Asistencia de cachorros neonatos y debilitados. **In:** Ettinger, S.; Feldman, E. Tratado de medicina interna veterinaria. 6^a ed.Elsiever. Madrid, España. pp. 1711-1718.

ENGLAND, G. 2007b. Infertilidad en las perras. **In:** Ettinger, S.; Feldman, E. Tratado de medicina interna veterinaria. 6^a ed.Elsiever. Madrid, España. pp. 1685-1690.

FRESHNEY, R. 2010. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 6ª ed. Wiley-Blackwell New York, EEUU. pp. 796.

FUENTES, A. 2010. Determinación del Gen UL37 del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Memoria para optar al título de médico veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y pecuarias. pp. 47.

GALOSI, C. 2007. Herpesvirus canino 1: agente etiológico y enfermedad. *Analecta Veterinaria*. 27: 28-35.

HAY, R.; MIRANDA-CLELAND, M.; DURKIN, S.; REID, Y. 2000. Cell line preservation and authentication. *In:* Masters, J. *Animal Cell Culture*. 3ª ed. Oxford University Press Inc. New York, E.E.U.U. pp. 315.

ISP. 2011. Programas de vigilancia. [en línea] <<http://www.ispch.cl/vigilancia-virologia>> [Consulta: 22-11-2011]

KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; IMAI, A.; OHASHI, E.; MATSUNAGA, S.; TOHYA, Y.; OHSHIMA, T.; MOCHIZUKI, M. 2010. Nosocomial Outbreak of Serious Canine Infectious Tracheobronchitis (Kennel Cough) Caused by Canine Herpesvirus Infection. *JCM*. 48: 1176–1181.

KIM, O.; YI, S. J. 2005. The replication of canine herpesvirus (CHV) induces apoptosis in canine kidney cell line. *Acta Vet. Hung.* 53: 147-151.

LARENAS, J.; SANTIBÁÑEZ, M.C.; BERRÍOS, B. 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *Mevepa*. 1:13- 16.

LEDBETTER, E.; KIM, S.; DUBOVI, E.; BICALHO, R. 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Vet. Microbiol.* 138: 98-105.

LIND-FORSBERG, C. 2007. Anomalías en la gestación, parto y el periodo puerperal. *In:* Ettinger, S.; Feldman, E. *Tratado de medicina interna veterinaria*. 6ª ed. Elsevier. Madrid, España. pp. 1656-1705.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2004. Virología básica. *In:* Brock, *Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson educación. Madrid, España. pp 231-263.

McCOY, M.; WANG, E. 2005. Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *J. Virol. Methods*. 130: 157-161.

MIYOSHI, M.; ISHII, Y.; TAKIGUCHI, M.; TAKADA, A.; YASUDA, J.; HASHIMOTO, A. 1999. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 375-379.

MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M. 1999. *Veterinary Virology*. 3ª ed. Academia Press. New York, E.E.U.U. pp. 629.

NAKAMICHI, K.; OHARA, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. 2000. Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 965-970.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J. 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. Arch. Med. Vet. 35: 227-231.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A. 2005. Virus herpes canino tipo 1 en Chile: Propiedades biológicas. Arch. Med. Vet. 37: 133-137.

PARZEFALL, B.; FISCHER, A.; BLUTKE, A.; SCHMAHL, W.; MATIASEK, K. 2011. Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dog. Vet. J. 189: 100-102.

PETERSON, R.; GOYAL, S. 1988. Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 11: 93-98.

PUCK, T.; CIENVRA, S.; ROBINSON, A. 1961. Genetic of somatic mammalian cells. J. Exp. Med. 33: 339-349.

REED, I.; MUENCH, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. Am J Hyg. 27: 493-497.

RONSE, V.; VERTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLE, C.; BRUNET, S.; POULET, H. 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. Theriogenology. 64: 61-74.

REUBEL, G.; PEKIN, J.; VENABLES, D.; WRIGHT, J.; ZABAR, S.; LESLIE, K.; ROTHWELL, T.; HINDS, L.; BRAID, A. 2001. Experimental infection of European red foxes (*Vulpes vulpes*) with canine herpesvirus. Vet. Microbiol. 83: 217-233.

SELLON, R. 2007. Virosis caninas. In: Ettinger, S.; Feldman, E. Tratado de medicina interna veterinaria. 6ª ed. Elsevier. Madrid, España. pp.651-652.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FRESHNEY, R. 2006. Basic principles of cell culture. In: Culture of cells for tissue engineering. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, EEUU. pp 3-22.

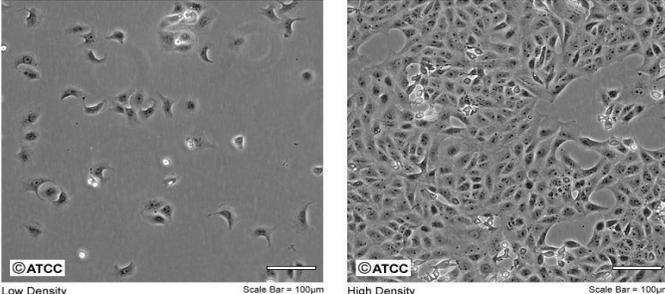
YEŞILBAĞ, K.; YALÇIN, E.; TUNCER, P.; YILMAZ, Z. 2012. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. Res. Vet.Sci. 92:36-39.

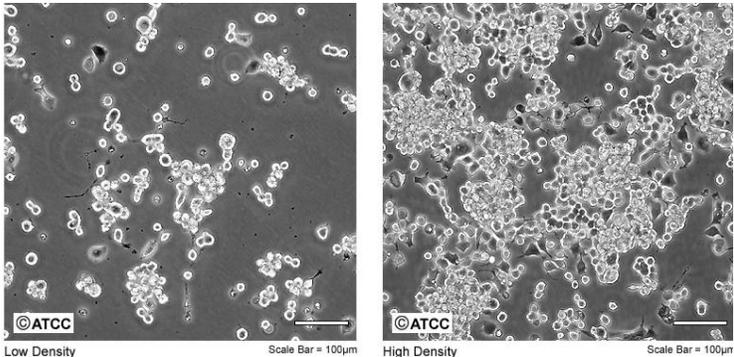
ANEXOS

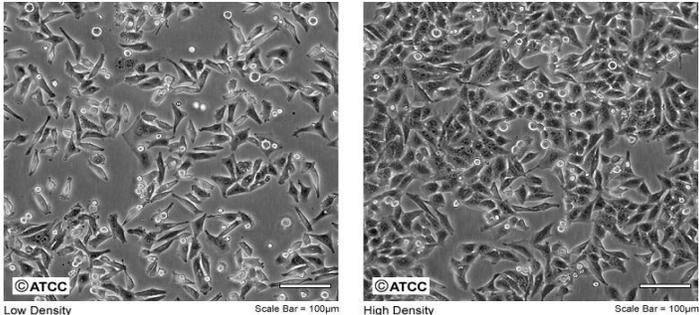
Anexo nº 1

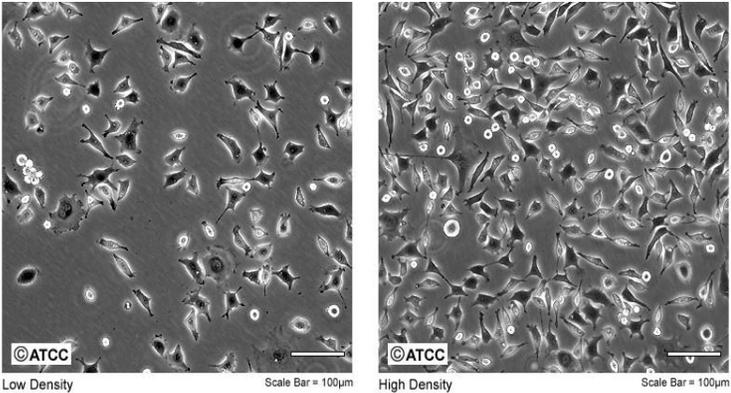
A continuación se describen características importantes de cada una de las líneas utilizadas.

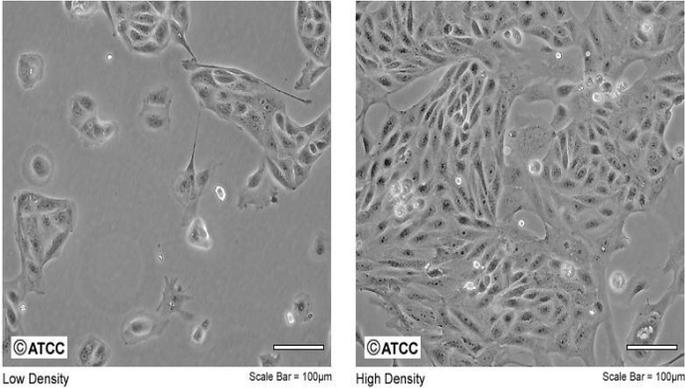
ATCC	CCL-136™
Nombre	RD
Propiedades de crecimiento	Adherente
Organismo de origen	<i>Homo sapiens</i> (humano), hembra, caucásica, 7 años.
Morfología	Células fusiformes y células grandes multinucleadas
Fuente	Tejido: Musculo Enfermedad: Rabdomiosarcoma
Propagación	El medio base para esta línea celular es el Eagle modificado por Dulbecco adicionado de suero fetal bovino a una concentración final del 10%.y mantención a temperatura de 37.0 ° C
Subcultivo	Se recomienda una relación de subcultivo 1:2 – 1:4, remover el medio de cultivo cada 3 o 4 días.
Comentarios	Línea celular altamente susceptible al poliovirus, muchos ECHO virus y algunos otros enterovirus.
Pasaje inicial	236

ATCC	CCL-81™
Nombre	Vero
Propiedades de crecimiento	Adherente
Organismo de origen	<i>Cercopithecus aethiops</i> (Mono verde africano), macho adulto
Morfología	Epitelial 
Fuente	Tejido: Riñón Enfermedad: Tejido sano.
Propagación	El medio base para esta línea celular es el medio mínimo esencial de Eagle adicionado de suero fetal bovino en una concentración final del 10%. Atmosfera recomendada:5% de dióxido de carbono (CO2) Temperatura: 37.0°C
Subcultivo	Se recomienda una relación de subcultivo 1:4, remover el medio de cultivo 2 a 3 veces por semana.
Comentarios	Línea celular muy utilizada en laboratorios de virología para el diagnóstico de diferentes virus y formulación de vacunas.
Pasaje inicial	172

ATCC	CCL-131™
Nombre	MNA (Neuro-2)
Propiedades de crecimiento	Adherente
Organismo de origen	<i>Mus musculus</i> (Ratón), ratón macho albino
Morfología	Neuroblastos (Células madre ameboides y neuronales) 
Fuente	Tejido: Cerebral Enfermedad: Neuroblastoma
Propagación	El medio base para esta línea celular es el Eagle modificado por Dulbecco adicionado de suero fetal bovino a una concentración final del 10%. Atmosfera recomendada: 5% de dióxido de carbono (CO ₂) Temperatura: 37.0°C
Subcultivo	Se recomienda una relación de subcultivo 1:3- 1:6, remover el medio de cultivo 1 a 2 veces por semana
Comentarios	La línea celular ha sido usada para estudios del mecanismo de la precipitación vinblastina de las proteínas microtubulares, la cinética del acople GTP a proteínas aisladas, el volcado de los microtúbulos in vivo, y la síntesis y ensamblaje de proteína microtubular. La organización Mundial para la Salud Animal (OIE) usa estas células para el diagnóstico rutinario de rabia.
Pasaje inicial	296

ATCC	CCL-23™
Nombre	Hep-2
Propiedades de crecimiento	Adherente
Organismo de origen	<i>Homo sapiens</i> (humano),
Morfología	Epitelial 
Fuente	Tejido: Células de laringe contaminadas con la línea celular HeLa. Enfermedad: Carcinoma epidermoide
Propagación	El medio base para esta línea celular es el Eagle modificado por Dulbecco adicionado de suero fetal bovino a una concentración final del 10%. Atmosfera recomendada: 5% de dióxido de carbono (CO ₂) y 95% de aire. Temperatura: 37.0°C
Subcultivo	Se recomienda una relación de subcultivo 1:4- 1:10, remover el medio de cultivo 2 a 3 veces por semana
Comentarios:	Originalmente se pensó que esta línea derivaba de un carcinoma epidermoide de la laringe pero luego se estableció, usando análisis isoenzimático, cromosomas marcadores HeLa y análisis de DNA, que se había originado vía contaminación con la línea celular HeLa Utilizada comúnmente para la identificación de los virus del papiloma humano 3, Adenovirus humano, Virus respiratorio sincisial, Virus Herpes simplex, Virus de la estomatitis vesicular, entre otros.
Pasaje inicial	210

ATCC	CCL-1™
Nombre	L20b (NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L])
Propiedades de crecimiento	Adherente
Organismo de origen	<i>Mus musculus</i> (Ratón)
Morfología	<p>Fibroblastos.</p>  <p>Low Density Scale Bar = 100µm High Density Scale Bar = 100µm</p>
Fuente	<p>Tejido: subcutáneo, areolar y adiposo. Enfermedad: Normal</p>
Propagación	<p>El medio base para esta línea celular es el medio mínimo esencial de Eagle adicionado de suero fetal equino en una concentración final del 10%. Atmosfera recomendada: 5% de dióxido de carbono (CO₂), con 95% de aire. Temperatura: 37.0°C</p>
Subcultivo	<p>Se recomienda una relación de subcultivo 1:2- 1:8, remover el medio de cultivo 2 a 3 veces por semana</p>
Comentarios	<p>Utilizada en el aislamiento y diagnóstico de algunos enterovirus. Presenta resistencia a los poliovirus 1, 2, 3; coxsackievirus B5; poliomavirus.</p>
Pasaje inicial	25

ATCC	CCL-34™
Nombre	MDCK (Madin Darby Canine Kidney)
Propiedades de crecimiento	Adherente.
Organismo de origen	<i>Canis familiaris</i> (Perro doméstico)
Morfología	Epitelial 
Fuente	Tejido: Renal Enfermedad: Normal
Propagación	El medio base para esta línea celular es el medio mínimo esencial de Eagle adicionado de suero fetal bovino en una concentración final del 10%. Atmosfera recomendada: 5% de dióxido de carbono (CO ₂) Temperatura: 37.0°C
Subcultivo	Se recomienda una relación de subcultivo 1:2- 1:6, remover el medio de cultivo cada 2 o 3 días.
Comentarios	Esta línea es susceptible a Coxsackievirus B 5 humano, Reovirus type 2, Adenovirus 4, virus vaccinia, virus de la estomatitis vesicular, Adenovirus 5, Coxsackievirus B 3 humano, Coxsackievirus B 4 humano, Poliovirus humano 2, influenza A y B entre otros.
Pasaje inicial	23

Anexo nº 2

PROTOCOLO OBTENCIÓN DE MONOCAPAS DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CELULARES (SUBCULTIVO)

1. Dejar en baño maría: medio de cultivo, tripsina, solución salina A 1x de Puck (Puck *et al.*, 1961), Suero Fetal bovino hasta que lleguen a una temperatura aproximada de 37°C.
2. Encender cámara de flujo laminar y dejar todos los materiales bajo ella para reducir el riesgo de contaminación bacteriana.
3. Remover y descartar el medio de cultivo de cada frasco de cultivo.
4. Lavar la monocapa de células dos veces con 5 ml de solución salina A 1x de Puck removiendo la mayor cantidad posible de suero, ya que puede generar inhibición de la tripsina.
5. Agregar 0,5 ml de tripsina-verseno al 1% al frasco mover el frasco para que todas las células tomen contacto con ella.
6. Llevar a estufa a 37°C por 5 – 15 minutos, observando constantemente bajo microscopio invertido, hasta que la monocapa se encuentre totalmente desprendida y disgregada.
7. Lavar con solución salina A de Puck (5 ml) y llevar a centrifuga 1.000xg por 5 minutos.
8. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento (células) con 2 ml de medio de cultivo de mantención.
9. Contar células presentes en cámara de Neubauer (Figura 13).
10. Sembrar 180.000 células por ml. en cada frasco
11. Adicionar medio de cultivo de mantención hasta lograr un volumen de 5 ml total (10% SFB).
12. Llevar a incubadora a 37°C por 24 horas y observar al microscopio si existe formación de monocapa.



Figura 13: Cámara de Neubauer *izq.* Cámara de Neubauer. *der.* Dibujo representativo de los cuadrantes para el conteo celular

MEDIO DE CULTIVO (2 LT) MEM

- H₂O_{DDE} 1.950 ml
- Piruvato de sodio 20 ml
- NaHCO₃ 4,4 gr.
- Buffer Happer 11. 9 gr.
- Fungizona 5 ml
- Combiotico 8 ml

Se filtra por millipore

COMBIOTICO

- Penicilina 100 UI/ml.
- Estreptomicina 100 µg/ml.
- Anfoterisina B 2,5 µg/ml.
- H₂O_{DDE}

Conservar a 0°C

SOLUCION SALINA A DE PUCK 10x

- NaCl 80 gr.
- KCl 4 gr.
- NaHCO₃ 3, 5 g
- Autoclavar y luego agregar
 - Dextrosa 10, 5gr.
 - H₂O_{DDE} 200 ml

SOLUCION SALINA A DE PUCK 1x

- Salina A 10x 100 ml
- H₂O_{DDE} 900 ml.

TRIPSINA VERSENO

- Salina A 1x 930 ml.
- Trispsina 1% 50 ml.
- Verseno (DMSO) 1% 20 ml.
- Rojo Fenol 1 gota
- Ajustar pH 7,6 con NaCHO₃

MEM DE MANTENCIÓN (10% SFB)

- 180 µl de combiotico
- 180 ml MEM
- 20 ml Suero Fetal Bovino (SFB)

Anexo nº 3

PROCOLO DE INOCULACIÓN VIRAL.

1. Retirar el medio de cultivo de mantención.
2. Lavar la monocapa con solución salina A 1x de Puck (Puck *et al.*, 1961).
3. Inocular 200 µL del aislado viral RP5.
4. Llevar a estufa a una temperatura de 33°C por 1 hora.
5. Lavar la monocapa con solución salina A 1x de Puck
6. Restituir con medio de cultivo a una concentración de 5% de suero fetal bovino.
7. Llevar a estufa a una temperatura de 33°C por 5 días, con observación diaria.

Anexo nº 4

PROCOLO DESCONTAMINACIÓN.

1. Lavar 5 veces con solución salina A 1x de Puck y una concentración de antibióticos mayor a la usada habitualmente (5ml de solución salina A de Puck más 5 µl de combiotico).
2. Agregar al medio de cultivo antibiótico (0,5 ml de combiotico más 4,5 ml de medio cultivo, 0,25 ml de suero fetal bovino).
3. Repetir este procedimiento durante los tres subcultivos siguientes.
4. Si es posible realizar un antibiograma para determinar a qué antibióticos es sensible la bacteria involucrada en la contaminación.

Anexo nº 5

PROCOLO PASAJES CIEGOS

El objetivo de un pasaje ciego es aumentar la cantidad de partículas virales pese a no observar efectos en las monocapas celulares a la observación con microscopio

1. Retirar el medio de cultivo de mantención.
2. Lavar la monocapa con solución salina A 1x de Puck (Puck *et al.*, 1961).
3. Inocular 200 µL del aislado viral RP5.
4. Llevar a estufa a una temperatura de 33°C por 1 hora.
5. Lavar la monocapa con solución salina A 1x de Puck
6. Restituir medio de cultivo a una concentración de 5% de suero fetal bovino.
7. Llevar a estufa a una temperatura de 33°C por 5 días, con observación diaria.
8. Someter los frascos a un proceso de congelamiento/descongelamiento (el objetivo es generar lisis celular y liberación de partículas virales que estén al interior de las células).
9. Pasar el contenido de los frascos a un tubo de centrifuga.
10. Llevar a centrifuga a 1.500 xg por 5 minutos a tº ambiente.
11. Utilizar el sobrenadante como nuevo inculo y repetir el proceso.

MÉTODO DE REED Y MÜENCH 1938

Este método tiene por finalidad ubicar la posición central en una serie ordenada de datos, quedando el 50% de las observaciones bajo ese valor, es decir corresponde al cálculo de la mediana en una serie agrupada o distribución de frecuencias. El Cuadro a continuación, representa el método de Reed y Müench. Para la aplicación de este método es necesario el cumplimiento de algunos supuestos:

- No deben presentarse reacciones inespecíficas en los sustratos inoculados.
- Las diluciones virales deben estar igualmente espaciadas.
- En cada nivel de diluciones se debe inocular igual número de individuos.
- Ninguno de los individuos inoculados con la mayor dilución debe presentar efecto.
- Todos los individuos inoculados con la dilución más baja deben presentar el efecto del virus.

Porcentaje de monocapas celulares positivas a ECP en la determinación del título viral del aislado RP5 (Método de Reed y Muench)

M	EC	No EC	FA		TOTAL	%	D
			EC	No EC			
6	6	0	29	0	29	100,00	10 ⁻¹
6	6	0	23	0	23	100,00	10 ⁻²
6	5	1	17	1	18	94,44	10 ⁻³
6	4	2	12	3	15	80,00	10 ⁻⁴
6	4	2	8	5	13	61,54	10 ⁻⁵
6	3	3	4	8	12	33,33	10 ⁻⁶
6	1	4	1	12	13	7,69	10 ⁻⁷
6	0	6	0	18	18	0,00	10 ⁻⁸

$$DP = (61,54 - 50) / (61,54 - 50) = (11,54) / (28,21) = 0,41$$

$$DICT_{50} = 10^{5,41} / 0,2 \text{ ml} \rightarrow \rightarrow DICT_{50} = 1,29 \times 10^6 / \text{ml}$$

M: número de monocapas celulares MDCK inoculadas; EC: con efecto citopático; No EC: sin efecto citopático; FA: frecuencia acumulada; D: dilución

USO DE LAS LÍNEAS CELULARES EN EL ISP

Las líneas utilizadas en este estudio, que fueron cedidas por medio de un convenio entre FAVET y el ISP son utilizadas para el monitoreo de las siguientes enfermedades (ISP, 2011):

- Sección Enterovirus: Polio, Rotavirus
- Sección Rabia: Rabia en murciélagos, Prevención
- Sección Virus respiratorios y exantemáticos: Sarampión, Rubeola, Influenza, VRS, ADV
- Sección Serología: Hantavirus, Dengue, Virus del Nilo, Hepatitis A, B, C
- Sección SIDA: Transmisión vertical, Vigilancia de Laboratorios VIH