



24/10
Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

"PRODUCCION DE UN ANTIGENO HEMAGLUTINANTE A
PARTIR DE CULTIVOS CELULARES INFECTADOS CON
VIRUS DE SARAMPION"

TESIS PROFESIONAL

P r e s e n t a

LEOBARDO MONTOYA RODRIGUEZ

Para obtener el Título de

L I C . E N B I O L O G I A



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pág.
I - INTRODUCCION.....	1
II - MATERIALES Y METODOS	12
III - RESULTADOS	16
IV - DISCUSION	23
V - BIBLIOGRAFIA	26
APENDICE	28

I. INTRODUCCION

FONDO HISTORICO.

Durante muchos años el estudio de la morfología de los virus se limitó a los grandes virus como poxvirus y herpesvirus, los cuales se describían como partículas o varillas discretas. Estas partículas fueron llamadas "cuerpos elementales" y, pese a que se observó que estaban muy ligados a la infección, fué hasta la década de 1930 cuando se aceptó universalmente que se trataba de los mismos agentes causales. (1)

A partir de 1940, se abrieron nuevos caminos para el estudio de los virus. La introducción del microscopio electrónico permitió visualizar a los virus por primera vez y se iniciaron estudios para la elaboración de técnicas de sombreado y preparación de las muestras; con lo que se aclararon muchas de las incógnitas existentes en torno a la morfología de los virus, este criterio resultó ser importante para su clasificación. Además, estos estudios trajeron consigo datos interesantes acerca del comportamiento y función viral. Se perfeccionaron técnicas para la purificación de ciertos virus animales y en esta misma década, un grupo de investigadores del Instituto Rockefeller, en los Estados Unidos, realizaron excelentes estudios químicos sobre el virus Vaccinia (4). Hirst descubrió que el virus de influenza causa aglutinación de eritrocitos de pollo; éste fenómeno llamado Hemaglutinación, fue rápidamente desarrollado -

hasta resultar ser un método adecuado para cuantificar virus del grupo Myxovirus. En la actualidad, se conocen otros grupos de virus que también causan hemaglutinación. Con esto, la década de 1940 resultó ser la más intensa en cuanto a investigación de virus de animales y marcó el inicio de la virología bacteriana. (4)

En las últimas tres décadas, muchos de los principales avances en biología molecular han resultado a partir de trabajos realizados con bacteriófagos. Entre éstos podemos mencionar los siguientes: (11)

- a) La demostración de que el inicio de la infección viral implica la separación del ácido nucleico del virus y la proteína protectora del mismo.
- b) La demostración de que el genoma viral puede ser o estar integrado dentro del genoma de la célula huésped.
- c) El descubrimiento del ARN mensajero y la elucidación de los factores que controlan la iniciación y terminación, tanto de la transcripción, como de la traducción de la información genética.

A finales de dicha década, alrededor de 1949, se desarrollaron técnicas para el crecimiento de células animales "IN VITRO" con lo cual se lograron rápidos avances en el campo de la virología animal.

En 1907, Harrison y Steinhard en 1913, entre otros, intentaron el mantenimiento del virus Vaccinia en fragmentos de córnea, sin tener ni lograr una metodología adecuada de cultivo de tejidos. Posteriormente con la aparición-

de los antibióticos, de medios más complejos y de la técnica de tripsinización, se disminuyeron en gran medida los problemas de contaminación y aumentaron las posibilidades de obtención de cultivos de células. Fue hasta 1949 con los trabajos de Enders, Weller y Robbins cuando se inició la aplicación efectiva de cultivos celulares a la virología, lo que trajo consigo un extraordinario progreso en la virología animal. - (4).

CULTIVOS CELULARES

En la actualidad, las células de muchos órganos pueden hacerse crecer "IN VITRO" y se ha establecido un gran número de líneas y cepas celulares al aplicarse la siguiente metodología como regla general:

Se fragmenta el tejido en cuestión y se disocia en sus componentes celulares por tratamiento con una solución diluida de tripsina-verseno.

Después de la extracción de la tripsina, la suspensión de células se coloca en un recipiente de vidrio o plástico de fondo plano, estéril.

Se adiciona un medio de crecimiento que contiene aminoácidos esenciales, vitaminas, sales, azúcares y un sistema-buffer que generalmente consiste de bicarbonato en equilibrio con una atmósfera que contiene aproximadamente 5% de dióxido de carbono. La proporción de suero animal presente en el medio varía en los diferentes cultivos. La penicilina y la estreptomycina son los antibióticos generalmente utili-

zados con el fin de evitar el crecimiento de posibles bacterias contaminantes, asimismo se añade un colorante, tal como rojo fenol como indicador de pH. (11,2)

CEPAS CELULARES

El primer cultivo a partir de la disgregación de un tejido se conoce como "Cultivo primario" cuando tales cultivos están confluentes, son "pasados" por desprendimiento de la superficie por medio de tripsina o de un agente quelante como EDTA (etilén diamin: tetracetato.) y resembradas en nuevos recipientes, en los cuales se forma un cultivo secundario. Estas células pueden continuar su multiplicación durante transferencias sucesivas, y del cultivo primario se dice que se ha originado una cepa celular cuyas células no presentan alteraciones morfológicas ni de crecimiento. Sin embargo estas células no pueden ser "pasadas" indefinidamente sin que sus características cambien y después de un cierto número de resiembras la tasa de su crecimiento disminuye, el tiempo que se utilizan en cada mitosis se incrementa gradualmente y cada vez es menor el número de células que entran al período S de su ciclo. El cariotipo de estas células cambia de su característica progenitora diploide a una de aneuploidia, que consiste en la aparición de cromosomas supernumerarios, fragmentos y aberraciones cromosómicas. Finalmente, la cepa celular muere. (11,14)

LÍNEAS CELULARES CONTINUAS

Mientras que las células derivadas de tejidos normales muestran las propiedades anteriormente mencionadas, las células provenientes de tejidos cancerosos (células transformadas) poseen un complemento cromosómico aneuploide y presentan un periodo vital ilimitado; éstas celular reciben el nombre de línea celular establecida. Además de estas dos características, presentan otra que es muy útil en los estudios de multiplicación viral. Estas células pueden crecer en suspensión como algunos cultivos bacterianos. (2,4)

IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS CELULARES COMO MODELO

En la actualidad, el conocimiento de los métodos para el cultivo de células, así como de las técnicas cuantitativas para el estudio de los virus de animales, es esencial para el investigador relacionado con esta área, debido a que la mayor parte de las investigaciones en virología animal requieren del manejo de éstas técnicas, ya que en la práctica, no es suficiente el saber cómo un virus afecta a un individuo, sino también cómo interactúa con las células y esto es más fácil de comprender, si el estudio se realiza "IN VITRO".

La presencia del virus es reconocida por la manifestación de algunas anomalías en los organismos o en células hospederas. En los organismos superiores los síntomas de infección viral, varían extensamente, desde infecciones no aparentes, detectables sólo por la formación de anticuerpos, desarrollo de infecciones locales o una enfermedad débil caracterizada por una respuesta febril que puede progresar hasta una enfermedad severa que culmina con la muerte.

En las células, los síntomas de infección viral varían desde cambios morfológicos tales como redondeamiento, deterioro de organelos celulares, desarrollo de cuerpos de inclusión, hasta reacciones generales de necrosis, dando como resultado una desintegración completa. (11,15)

INTERACCION VIRUS-CELULA

Existe para cada virus de animal un tipo de célula hospedera a la cual es capaz de infectar y lograr su multiplicación. De esta manera se habla de células Permisivas. Sin embargo, existen células en las cuales el virus no logra su multiplicación, a éstas se les conoce como células Resistentes, cuando el impedimento se realiza en las primeras fases de la infección es decir cuando no se lleva a cabo la adsorción del virus a la célula. Si existe un bloqueo tardío y se permite la adsorción y la expresión de algunas actividades virales, pero finalmente se impide la multiplicación, se denominan células no Permisivas.

Con base en la relación anterior, se han establecido tres diferentes tipos de infección: (2,11)

- a) Infección productiva citocida, en la cual hay una gran multiplicación viral en corto tiempo y la célula muere.
- b) Infección persistente. En este tipo de infección puede haber una producción lenta de viriones y únicamente aquellas células que contengan una gran cantidad mueren. También puede integrarse el genoma viral a parte de éste al genoma celular y ser transmitido a las células de las siguientes generaciones, produciéndose de esta forma células neoplásicas. (5)

c) Infección abortiva. Cuando el virus infecta células no permisivas, no puede haber multiplicación viral debido a cierta propiedad ya sea de la célula o del mismo virus, que produce una alteración de alguna de las fases de la replicación viral. En este caso la célula puede o no morir. También se da el caso cuando la infección se realiza por mutantes víricos "deficientes", (4)

Existen numerosos ejemplos de éstos diferentes tipos de infección que en la actualidad se utilizan para la elección del cultivo celular adecuado según el virus y los objetivos experimentales de la investigación.

CLASIFICACION, MORFOLOGIA Y COMPOSICION DEL VIRUS DEL SARAMPION.

El virus del sarampión se encuentra clasificado de la siguiente manera (Propuesta por el Comité Provisional para la Nomenclatura de los virus, CPNV). (11)

División	Clase	Orden	Familia	Género	Nombre Común
Tipo de material Genético	Simetría de la nucleocapside.	Presencia o ausencia de envoltura.	Tamaño de la hélice.	Propiedades particulares.	Enfermedad que produce.
Ribovirus	Ribonucleica	Sagoviales	Paramyxoviridae	Paramyxovirus	Virus de Sarampión.

Los estudios con microscopio electrónico y difracción de Rayos X revelaron que las partículas víricas del sarampión varían en cuanto a su diámetro que va desde 1200 hasta 2500 Å. Poseen una membrana o cubierta externa que consiste de una bicapa de lipoproteínas. Con un espesor aproximado de 100 a 200 Å. A lo largo de esta superficie, se encuentran numerosas proyecciones de naturaleza glicoprotéica con propiedades hemaglutinantes y por esto reciben el nombre de hemaglutininas. (1,2)

En el interior de esta cubierta se encuentra la nucleocápside, compuesta por ribonucleoproteínas dispuestas sobre un eje de rotación alrededor del ácido nucleico (ARN) y que le da una simetría helicoidal, (2) el diámetro de la nucleocápside es de 170 a 180 Å y las unidades proteicas se encuentran separadas entre ellas por una distancia de 45 a 55 Å y al parecer existe una relación entre cada una de estas y un número determinado de nucleótidos. (11,2)

En la misma nucleocápside existen también, algunas enzimas necesarias para la replicación viral y que se encuentran inactivas en el virus intacto pero son activadas cuando la cápside es parcialmente degradada. (4)

El virus del sarampión fué cultivado por primera vez, por Enders y Peebles (3) en 1954 mediante la inoculación del virus en cultivos celulares de riñón humano y de simio. La adaptación siguiente se llevó a cabo en embriones de pollo y cultivos celulares primarios de embrión de pollo y esto condujo posteriormente a la obtención de una vacuna antisarampiñosa.

La primera cepa de virus aislada fue la denominada Edmington por el paciente del cual se aisló y a partir de ésta se derivaron otras cepas, mediante resiembras adicionales en culti

vo de tejidos a diferentes temperaturas. (Fig. 1) Una de estas cepas que se derivaron es la cepa Schwarz a partir de la cual se obtiene la vacuna que se utiliza actualmente en México. (3)

En la actualidad se sabe que el ríñon de mono y el de humano son los más sensibles así como los más adecuados para el aislamiento primario, el cual por las propiedades del virus (5) no se logra fácilmente. El virus de sarampión después de la adaptación a estos cultivos celulares, puede ser "cultivado" en una gran variedad de células (Ver tabla No. 1).

Esta última propiedad ha sido muy útil y explotada para realizar investigaciones con este virus y se ha logrado obtener además de la vacuna, antígenos de importancia inmunológica como son: Factor de fijación de complemento (F.C.), Hemolisinas (Hl.) y en los últimos años se ha obtenido también un antígeno de alta potencia para la prueba de hemaglutinación e inhibición de la misma. (7,8,10)

La prueba de inhibición de la hemaglutinación, al igual que el fenómeno de hemadsorción, se han convertido en importantes herramientas en diferentes tipos de investigaciones virales, tales como:

- a) Detección y aislamiento del virus.
- b) Identificación del virus y clasificación.
- c) Detección de anticuerpos.

El objetivo de este trabajo es precisamente obtener a partir de cultivos celulares infectados con virus de sarampión, un antígeno en forma soluble con propiedades hemaglutinantes.

SANGRE DEL PACIENTE

(EDMONSTON)

↓
RIÑÓN HUMANO*

↓ 24 Pases

↓
AMNIOS HUMANO*

↓ 29 Pases

↓
EMBRION DE POLLO

↓ 6 Pases

↓
EMBRION DE POLLO **

↓ 13 Pases

↓
VACUNA EDMONSTON "A"

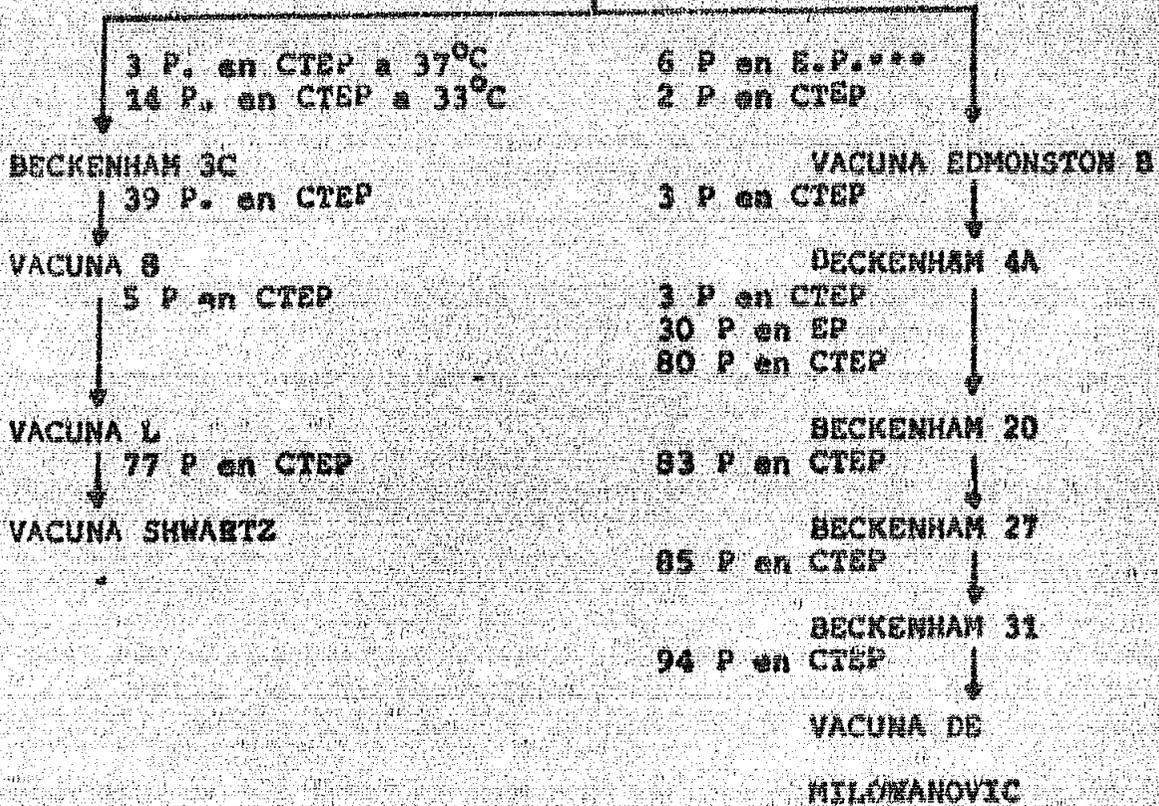


Fig. 1 Pases de la cepa viral hasta obtener la vacuna

Edmonston (A y B) y sus derivadas. (3)

*Cultivo Celular

**Cultivo Tisular de Embrión de Pollo

***Embrión de Pollo

TABLA I - CELULAS SENSIBLES AL VIRUS DE SARAMPION

CULTIVOS PRIMARIOS	
RIÑON DE MONO (<u>Baboon</u>)	AMNIOS HUMANO
RIÑON DE MONO VERDE	CORION HUMANO
RIÑON DE MONO (<u>Patas</u>)	PIBROBLASTOS DE EMBRION HUMANO
RIÑON DE MONO (<u>Rhesus</u>)	HIGADO DE EMBRION HUMANO
RIÑON DE EMBRION BOVINO	TRAQUEA DE EMBRION HUMANO
RIÑON DE RATON	LEUCOCITOS HUMANOS
RIÑON HUMANO	TIROIDES HUMANA
RIÑON DE PERRO	EMBRION DE POLLO
RIÑON DE COBAYO	RIÑON DE EMBRION HUMANO
RIÑON DE HAMSTER	
CEPAS DE CELULAS DIPLOIDES	
HELE	WI- 26
LEP 12	WI- 38
LIDA	PULMON DE EMBRION HUMANO
WI- 1	
LINEAS CELULARES	
Hela	VERO
KB	RK - 13
Hep 2	

II - MATERIALES Y METODOS

El material utilizado en este trabajo comprende:

- a) Material estéril (cristalería)
- b) Material biológico
- c) Equipo mecánico
- d) Medios de cultivo y soluciones.

(Cada uno de estos incisos se encuentran desglosados en el apéndice de este trabajo).

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas y fundamentalmente con células de la línea VERO. En la primera etapa se utilizaron cultivos en monocapa y se mantuvieron en estado estacionario y en la segunda, cultivos en monocapa en sistema rotatorio.

El virus del sarampión utilizado fue de la cepa Shwartz proveniente de una vacuna viva atenuada, liofilizada con un título $\log_{10} = 10^{4.3}$ /ml en DITC₅₀^{*}.

Las células fueron cultivadas y crecidas a una temperatura de 35°C en botellas Brockway de 75 cm² y el medio de crecimiento utilizado fue M-199 enriquecido con 5% de suero fetal de ternera inactivado a 56°C durante 30 minutos, 3 % de bicarbonato de sodio al 4.4% y una solución de antibióticos al 1%.

En la primera etapa, la infección celular se llevó a cabo por dos procedimientos diferentes:

- a) Directamente sobre el monoestrato celular y
- b) En una suspensión celular.

*DITC₅₀ - Dosis infectiva en cultivo de tejido al 50%

PREPARACION DEL MONOESTRATO CELULAR E INOCULACION DEL VIRUS

A partir de una botella que presentaba un crecimiento celular confluyente se hicieron diluciones y se sembraron dentro de nuevos recipientes, se mantuvieron a temperatura adecuada (35°C) y con un medio de crecimiento hasta que se observó la formación de un estrato con una sola célula de grosor. Una vez logrado esto, se decantó el medio, se añadió 1 ml de inóculo viral y se mantuvo en incubación a 33°C durante 1 hora, bañando la capa celular cada 15 minutos con el mismo inóculo. Pasado el tiempo estipulado para la adsorción del virus a la célula, se añadieron 20 ml de medio de mantenimiento en el que se sustituyó el suero por albúmina bovina al 2% y se colocó la botella en incubación a 33°C hasta el momento de la cosecha.

PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR E INOCULACION DEL VIRUS EN SUSPENSION

A una botella Brockway con una monocapa celular confluyente se le decantó el medio de mantenimiento, se agregaron 10 ml de una solución de tripsina-Verano y se dejó en contacto con la capa celular durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el exceso de solución y se incubó a 35°C durante 10 minutos a 1,000 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 1 ml de inóculo, se dejó en adsorción a 33°C durante una hora agitando cada 15 minutos. Después de este tiempo, se sembró en una botella nueva, se añadieron 20 ml de medio de mantenimiento y se incubó a 33°C hasta el momento de la cosecha.

SISTEMA ROTATORIO

Para montar este sistema fué necesario preparar una suspensión celular con una concentración de 400,000 cels/ml de -

medio de mantenimiento y se sembró un ml en cada tubo de 14 X 115 mm. Una vez sembradas las células en estos tubos, se taparon perfectamente y se colocaron en el tambor del rotor, dentro del cuarto estufa a 33°C y a una velocidad de 2.5 r.p.m.

Después de 72 hrs y una vez formada la monocapa celular al rededor de los tubos, se eliminó el medio de crecimiento y se bañó la monocapa con medio de mantenimiento. Se añadió 0.1 ml de inóculo, se incubó a 33°C durante 1 hr para permitir la adsorción, se eliminó el inóculo y se agregó finalmente 1 ml de medio de mantenimiento a cada tubo, colocándolos nuevamente en el rotor a 33°C hasta el momento de su cosecha.

El conteo celular se realizó por medio de una cámara Neubauer (hemocitómetro) y el volumen final al cual debe llevarse la suspensión para obtener la concentración celular deseada, lo obtenemos a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. promedio de células per cuadro de la cámara.}}{\text{Dilución de la suspensión celular.}} \times \frac{\text{Cte. de la cámara (10,000)}}{1} = \text{Factor de Dilución}$$

$$\frac{\text{No. deseado de cels/ml}}{\text{Factor de Dilución}} = \text{No. deseado de cels/ml}$$

Después de un tiempo de incubación (1 a 7 días) a 33°C, se realizaron las cosechas de los virus producidos en los diferentes sistemas, tomando muestras tanto del fluido del cultivo como de la suspensión una vez provocada la ruptura celular mediante ciclos rápidos de congelación - descongelación. Estas muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de montar la prueba de hemaglutinación y la titulación del virus en DITC₅₀ por el sistema de microplaca.

MICROTITULACION DE LA SUSPENSION VIRAL

La cantidad de partículas virales presentes en una suspensión, así como el grado de infectividad del virus, se relacionan mediante ésta prueba con el número de respuestas positivas producidas en el sistema huesped-hospedero, empleado. Para este fin se utiliza una suspensión de células VERO con una concentración de 400,000 cels/ml de diluyente (M-199 con 5% de suero fetal de ternera) 3% de Bicarbonato de Sodio y 1% de antibiótico.

Se efectúan diluciones logarítmicas en números enteros de 10^{-1} hasta 10^{-5} de la muestra a titular. Una vez realizadas todas las diluciones, con una pipeta se toma 1ml de cada dilución, empezando por la más baja y se agrega 0.1 ml en cada uno de los 10 pozos de la microplaca correspondientes a la dilución y se repite ésta operación con cada una de ellas. Se agrega 0.05 ml de la suspensión celular en cada uno de los pozos de la placa. Se limpia la superficie con papel filtro estéril y se coloca una película adhesiva. Se incuba a 35°C durante siete días y se registra al final la existencia o ausencia de ECP*. En cada una de las líneas correspondientes a las diferentes diluciones se preparan dos pozos como control celular.

El título DITC_{50} se calcula por el método de Karber:

Fórmula:

$$\log \text{DITC}_{50} = \left(\log \text{ de la dilución más baja.} \right) \left(\frac{\text{suma del \% ECP de c/dilución} - 0.5}{100} \right)$$

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

- 1.- Reconstitución del antígeno en caso de estar liofilizado.
- 2.- Depositar 0.05 ml en el primer pozo de la microplaca con fondo en "U" y control en el número nueve.

*ECP. Efecto citopático.

- 3.- Agregar 0.025 ml de PBS pH 7.2 en los demás pozos.
- 4.- Diluir con microdilutores 0.025 ml.
- 5.- Agregar 0.025 de PBS para igualar volumen.
- 6.- Agregar 0.05 ml de eritrocitos de mono al 0.5% en PBS.
- 7.- Incubación de la microplaca durante 1 hr a 35°C.
- 8.- Lectura.

III - RESULTADOS

Al llevar a cabo los procedimientos descritos anteriormente, las células VERO fueron infectadas con una muestra viral con un título inicial de $10^{4.3}/\text{ml}$ log en DITC₅₀. Una vez adaptado el virus a este tipo de células, el título se incrementó después de cuatro pases en las mismas y se obtuvo un título final de $10^{5.5}/\text{ml}$ log DITC₅₀, a partir del cual se inició el trabajo experimental en el sistema rotatorio. La tabla No. II y la gráfica No. 1 nos muestran los títulos obtenidos en las diferentes resiembras de las muestras virales en cultivos celulares.

En la tabla No. III se aprecia que el momento propicio para la realización de las cosechas es cuando el cultivo infectado presenta un 100% de ECP pero sin que se encuentre destruido el tejido.

El efecto citopático se hizo patente de una forma clara en aquellos cultivos infectados en monocapa y mantenidos tanto en estado estacionario como en sistema rotatorio. Los cultivos infectados en suspensión manifestaron un desarrollo de la infección muy drástico, razón por la cual se trabajó con los primeros con la finalidad de seguir el desarrollo gradual del ECP. La siguiente serie de fotografías nos muestran dicho efecto.

TABLA II - Resultados obtenidos de las cosechas de cultivos celulares infectados en monocapa y mantenidos en estado estacionario. Las cosechas se realizaron cuando el cultivo presentaba un 100% de ECP.

No. Resiembra	Título log DITC ₅₀
0	10 ^{4.3} /ml
1	10 ^{4.3} /ml
2	10 ^{4.5} /ml
3	10 ^{5.0} /ml
4	10 ^{5.5} /ml
5	10 ^{5.5} /ml
6	10 ^{4.9} /ml

TABLA III- Resultados de las titulaciones al momento de las cosechas realizadas en diferentes tiempos y grados de ECP en cultivos celulares mantenidos en estado estacionario. Partiendo de un inóculo con título log 10^{5.0}/ml DITC₅₀.

Tiempo (hrs)	ECP	Título (log DITC ₅₀)
48	50%	10 ^{4.8} /ml
72	80%	10 ^{4.5} /ml
96	100%	10 ^{5.0} /ml
120	100% ⁺⁺	10 ^{4.0} /ml

⁺⁺A este tiempo se presentan zonas del tejido con degeneración celular.

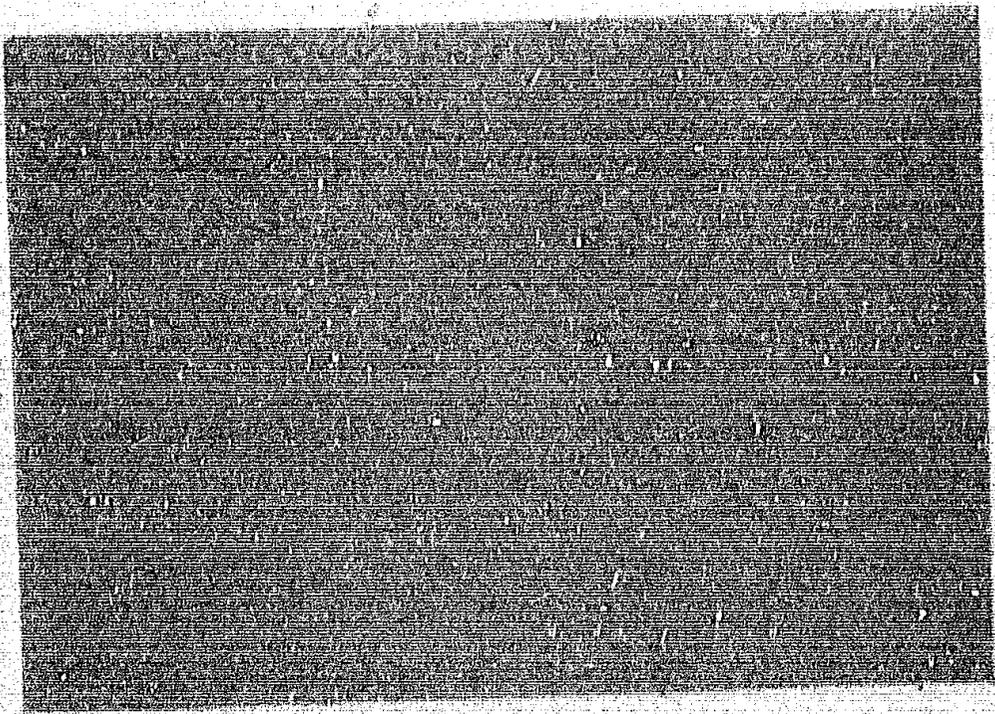


Fig. 1.- Cultivo de células VERO en monocapa, antes de la inoculación del virus del sarampión.

Aumento 4x.

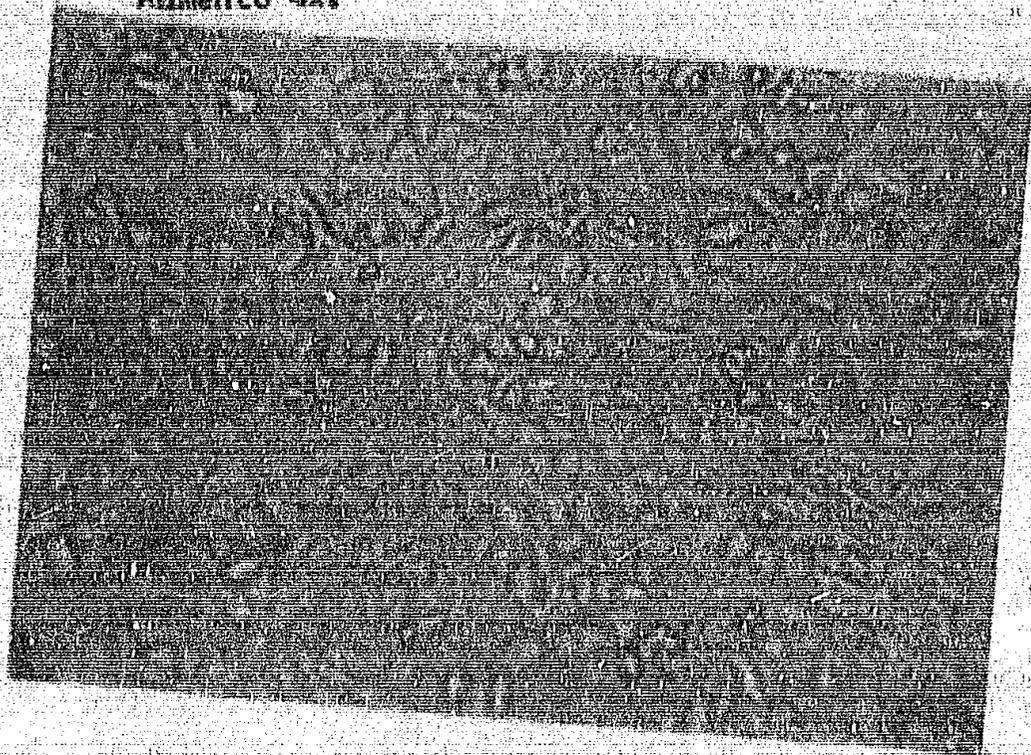


Fig. 2.- Morfología celular después de 24 hrs de infectado el cultivo. Se aprecian cambios en su morfología.

Aumento 10x.

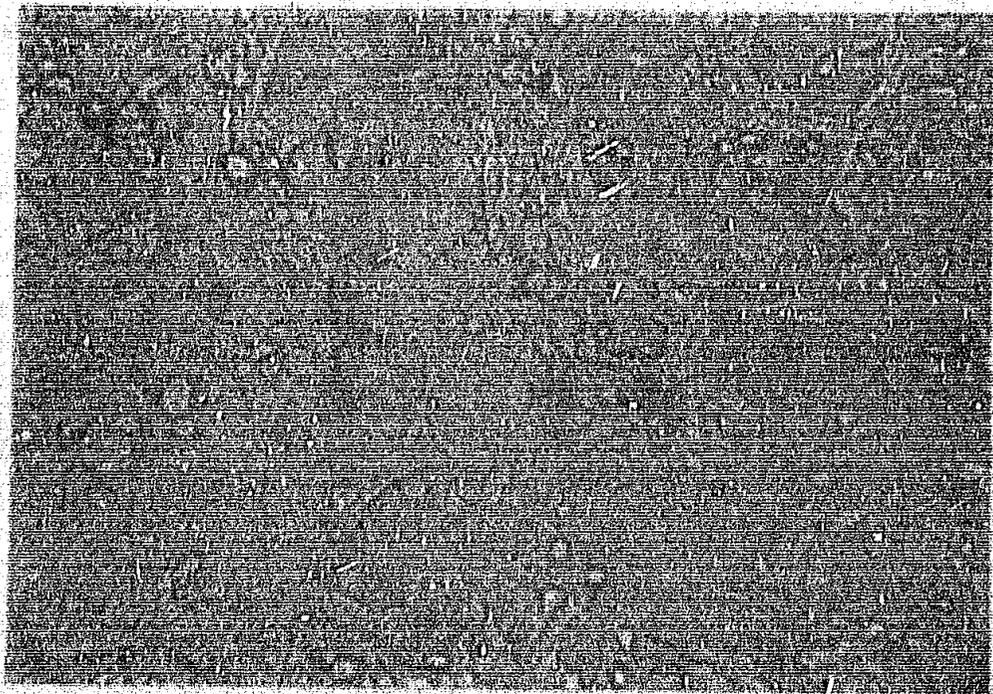


Fig. 3.- Aspecto del cultivo celular, 48 hrs después de inoculado el virus. El tejido celular muestra cambios morfológicos evidentes.

Aumento 10x.

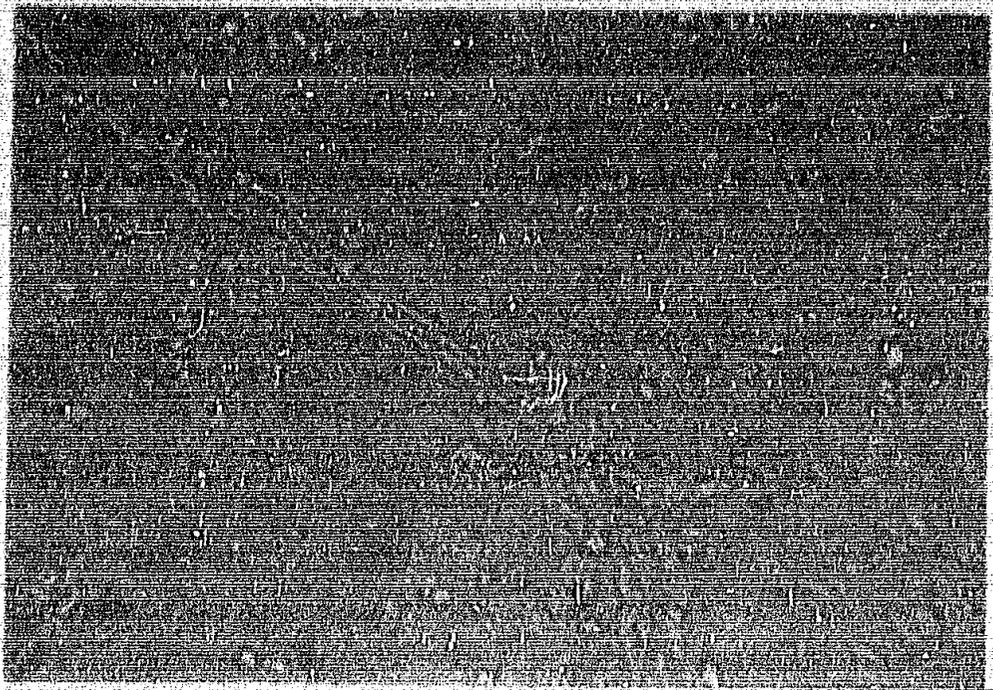


Fig. 4.- 72 hrs después de la inoculación del virus, aparecen sincitios en áreas localizadas.

Aumento 10x.

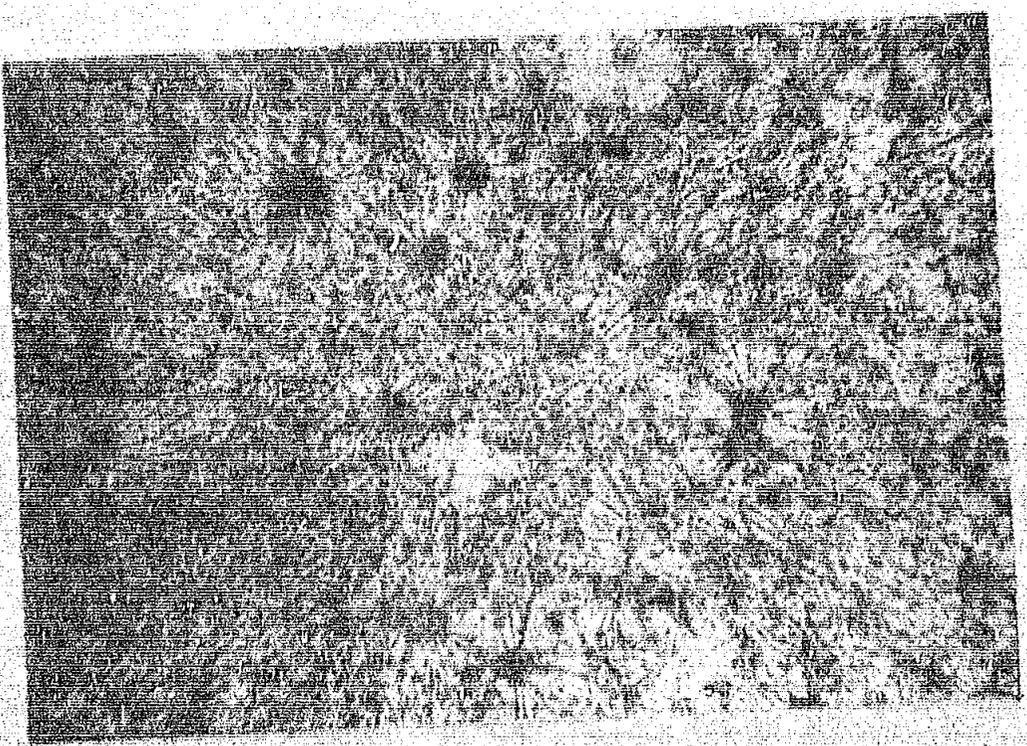


Fig. 5.- 96 hrs después de infectado el tejido muestra-
numerosos sincitios con grandes proyecciones y
zonas de tejido destruidas.
Aumento 4x.

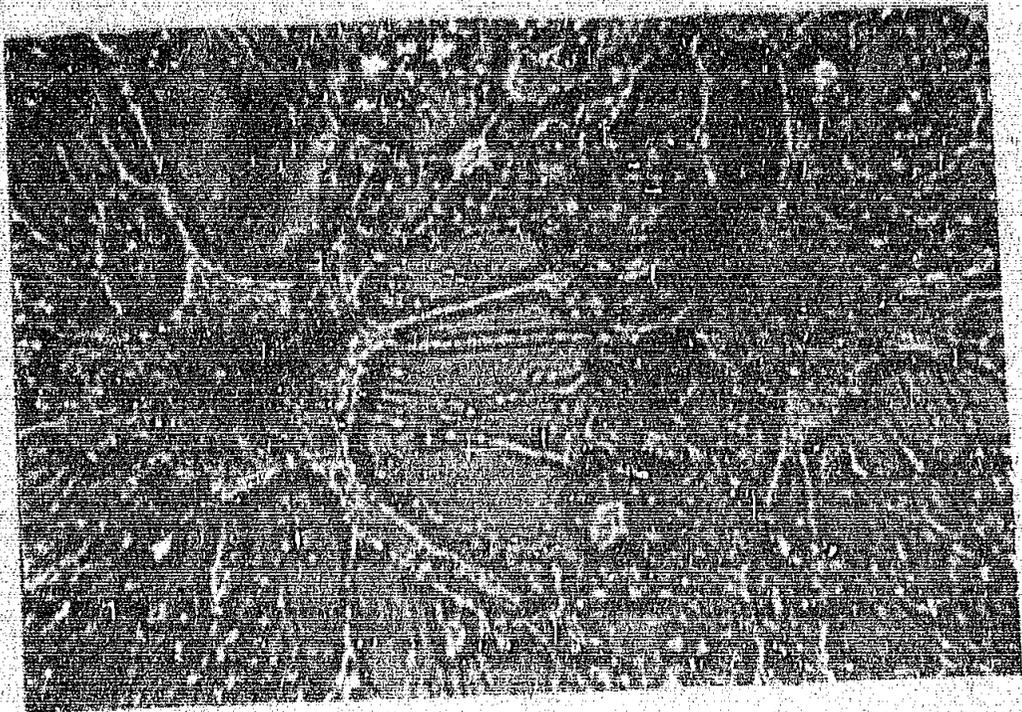
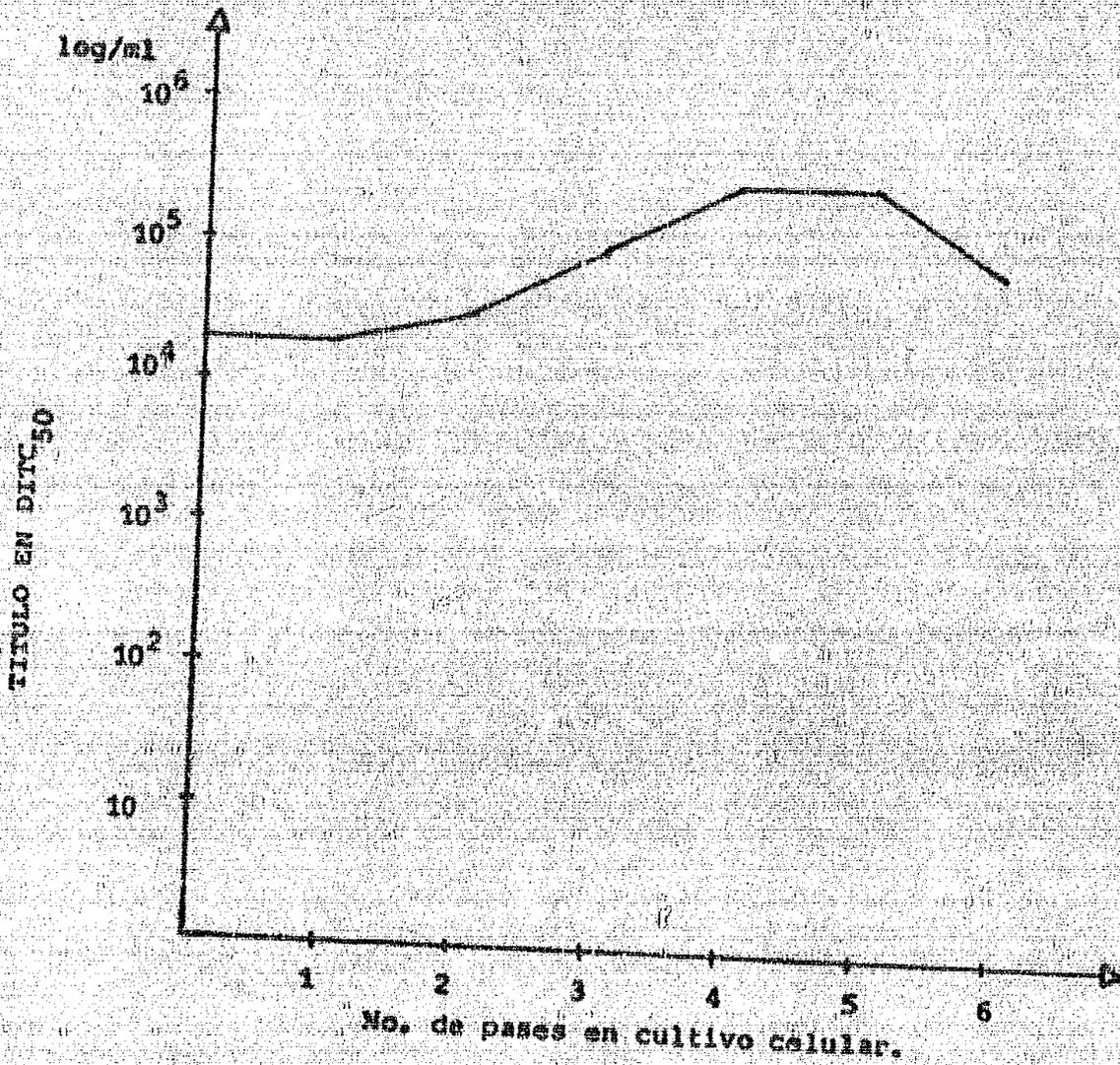


Fig. 6.- Mayor aumento que muestra la morfología de los
sincitios.
Aumento 20x.



GRAFICA 1.- Producción del virus de sarampión mediante pases sucesivos en cultivo de células VERO. (Tabla II).

TABLA IV - Resultados de la prueba de hemaglutinación.

Cosechas a diferentes tiempos del sistema rotatorio.

Cosecha	S/D ⁺⁺	DILUCIONES				Tiempo (hrs)
		1:1	1:2	1:4	1:8	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	24
3	+	0	0	0	0	48
4	+	0	0	0	0	72
5	+	+	0	0	0	96
6	+	+	+	0	0	120
7	+	+	0	0	0	144
8	+	+	0	0	0	168

⁺⁺S/D: sin diluir.

TABLA V - Resultados de las titulaciones de 3 cosechas a diferentes tiempos, de los cultivos infectados y mantenidos en sistema rotatorio.

Cosecha	Tiempo (hrs)	log DITC ₅₀
	0	10 ^{5.5} /ml
1	72	10 ^{4.3} /ml
2	96	10 ^{3.0} /ml
3	120	10 ^{1.0} /ml

La tabla IV presenta los resultados obtenidos de la prueba de hemaglutinación aplicada a las diferentes cosechas del sistema rotatorio, para el cual se utilizó como inóculo la muestra viral con el título más alto obtenido en el sistema estacionario ($10^{5.5}/\text{ml}$ log). Los títulos en DITC_{50} de 3 de estas cosechas obtenidas del mismo sistema rotatorio, se encuentran en la tabla V. Se aprecia en estos resultados una considerable disminución del título. ($10^{5.5}/\text{ml}$ a $10^{1.8}/\text{ml}$ log DITC_{50}).

IV DISCUSION

Podemos señalar que existen diferentes factores que pueden influir en algunos de los resultados obtenidos. Los siguientes son algunos de ellos:

- a) Factores Físico-Químicos: Temperatura, pH, presencia o ausencia de algunos iones, concentración de sales (5,13) y presencia de inhibidores inespecíficos.
- b) Factores Biológicos: Espacie del donador de eritrocitos, características individuales del donador (edad, sexo, grupo sanguíneo). Línea celular utilizada para la propagación, número de pase en que se encuentra, cepa viral con que se trabaja, título ó cantidad de partículas virales presentes por ml y relación con el número de células en cultivo, (12)

Al considerar que la relación entre la cantidad de partículas virales y la cantidad de células en el cultivo es un factor importante para lograr un grado de infectividad y productividad óptima, se hicieron ensayos previos hasta obtener los mejores resultados en cuanto a la elevación del título de nuestra mues-

tra viral. Como se mostró anteriormente en los resultados (gráfica No. 1 y tabla No. II), se logró elevar el título de nuestro inóculo y se trabajó con estas cosechas. Uno de los principales problemas que se presentaron para lograrlo, fué la relativa facilidad con que los virus de sarampión pierden o disminuyen sus propiedades infectivas con pequeñas variaciones fisicoquímicas—principalmente temperatura, pH y luz.

El sistema empleado generalmente para la infección de células en cultivo, es aquél en el cual el inóculo se añade al monolayer celular previamente formado. En este trabajo se intentó utilizar un sistema de infección, mediante el cual se lograra elevar el título más rápidamente ya que al mismo tiempo que las células forman la monocapa se desarrolla la infección, mostrándose a las 48 hrs un clato ECP (15). Estos resultados no fueron constantes y por ello se manejó el primer sistema, mediante el cual se pudieron realizar cosechas y titulaciones a diferentes tiempos; con ésto se conoció el momento adecuado de cosecha para obtener la mayor productividad.

A diferencia del sistema rotatorio, el sistema estacionario resultó ser útil en cuanto a la producción del virus. Esto debido tal vez a que los cultivos en botellas presentan una mayor superficie de adsorción y las proteínas virales tienen mayor posibilidad de interactuar con los receptores presentes en la superficie celular, siendo ésta primera etapa indispensable para la infección productiva.

Por otro lado, los cultivos en los tubos además de presentar relativamente poca superficie de adsorción, el grado de inclinación al cual deben colocarse en el tambor produce que se —

formen en algunas zonas, capas gruesas de células modificando de ésta manera la relación que debe haber entre cantidad de células y partículas virales, lo que produce como consecuencia los títulos bajos en $DITC_{50}$ obtenidos de las cosechas, que se muestran al final de los resultados (tabla V).

Como se puede apreciar en la tabla IV de resultados de la prueba de hemaglutinación, se obtuvieron muestras de antígeno hemaglutinante con títulos muy bajos para su uso en laboratorio.

Sin embargo, el hecho de haber obtenido resultados positivos indica la presencia de hemaglutininas en las muestras cosechadas después de 48 hrs de infectadas.

Si relacionamos los resultados de la prueba de hemaglutinación con el título en $DITC_{50}$ de las cosechas, observamos que pese a ser importante la cantidad de partículas virales que infectan un cultivo celular y que de esto depende la producción de proteínas tempranas como las hemaglutininas, se pueden obtener títulos altos de hemaglutinación y títulos bajos de partículas virales debido a que las propiedades de las hemaglutininas pueden presentar mayor resistencia a los cambios que el mismo virus. De aquí que se puedan encontrar en una misma cosecha bajos títulos de infectividad y altas cantidades de hemaglutinina y viceversa.

Es necesario tomar en cuenta, también, que en nuestras cosechas se encuentra una gran cantidad de residuos celulares y proteínas virales. Por lo cual es necesario llevar a cabo una purificación del producto obtenido (6,7).

V - BIBLIOGRAFIA

- 1.- CHOPPIN, W.P. Y SCHEID, A., 1980 "The Role of Viral Glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses". Rev. Infect. Dis. Vol. 2 No. 1: 40-60.
- 2.- DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, N.H., GINSBERG, S.H., Y-WOOD, B. W., 1963. Tratado de Microbiología. Salvat 2a. Ed. Barcelona, Esp. : 1560 p.p.
- 3.- DUDGEON, A.J. 1972. "Vacunas Antisaramponas". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Vol. 73 No. 5: 401-409.
- 4.- JOKLIK, W.K., 1980. Principles of Animal Virology. Ed. A.C.C. N.Y. : 373 p.p.
- 5.- MUSSER, J.S. Y UNDERWOOD, E.G., 1960, STUDIES ON MEASLES VIRUS. "Physical Properties and Inactivation Studies of Measles Virus". J. Immunol., Vol. 83:292-297.
- 6.- NORRBY, E. 1962. "Hemagglutination by Measles Virus". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol 111: 814-818.
- 7.- NUMAZAKY, Y. Y KARZON, T.D., 1966 . "Density Separable Fractions During Growth of Measles Virus". J. Immunol. Vol. 97: 458-469.
- 8.- NUMAZAKY, Y. Y KARZON, T.D. "Soluble Antigen of Measles Virus". J. Immunol. Vol. 97: 470-476.
- 9.- PEREZ, T.R. 1981. Patología Molecular subcelular y celular. Prensa Medica Mexicana. México: 696 p.p.
- 10.- PERIES, R. J. Y CHANY, C. 1952. "Studies on Measles Viral Hemagglutination". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol 110: 477-482.

- 11.- RHODES, A.J. Y VAN ROOYEN, C. E., 1973. Tratado de Virología TORAY S.A. Barcelona, Esp.: 962 p.p.
- 12.- ROSEN, L., VIROLOGY., 1961. "Hemagglutination with animal Viruses. Vol. 13: No. 139.
- 13.- SCHLUEDERBERG, A. Y NAKAMURA, M. 1967. "A Salt- Dependant - Hemagglutinating Particle from Measles Infected Cells2. Virg logy No. 33: 297-306.
- 14.- WATSON, J.D. 1978. Biología Molecular del Gen. Fondo Educativo Interamericano, S.A. España: 740 p/p.
- 15.- YAÑEZ, G.D. 1977. "Correlación del Titulo de efecto citopático de un sistema de células W1-38 (Wistar-38) infectadas con virus de Sarampión". (Tésis profesional de biólogo: Universidad Autónoma del Estado de Morelos), Méx. 32 p.p.

APENDICE

MATERIALES

a) Material estéril.

Botellas Brockway 75 y 25 cm². (Para cultivo celular)

Tubos con tapón de rosca.

Tubos (para sistema rotatorio 115x 14 mm).

Placas de microtitulación con fondo plano para cultivo celular.

Placas con fondo en "U" para hemaglutinación.

Diluctores 0.025 ml.

Porta pipetas con pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml terminal.

Pipetas especiales (0.025 ml).

Vasos de precipitado y matraces.

Papel filtro y película adhesiva.

Criotubos (Viales).

Tripsinizador, magneto, equipo de filtración.

b) Material biológico.

Células VERO (riñón de mono verde africano).

Células Hep2C (carcinoma laríngeo humano).

Embriones de pollo (de 6 y 7 días) cultivo primario.

Virus de sarampión cepa Shwartz ($10^{4.0}$ / 0.5 ml DITC₅₀).

c) Equipo.

Centrífuga.

Potenciómetro.

Campana de flujo laminar.

Autoclave.

Rotor y tambor (sistema rotatorio).

Cuarto estufa, estufa 33°C y 35°C.

Incubadora.

Agitador vortex.

Refrigerador (-70°C y + 4°C).

Machero de gas.

Cámara Neubauer (cuenta glóbulos).

Microscopio, invertoscopio.

d) Medios de cultivo y soluciones.

MEDIO EAGLE - DIPLOID.

EAGLE (1955)

Componentes en mg/l

NaCl	6800.0	L-treonina	24.0
KCl	400.0	L-triptofano	4.0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	-----	L-valina	23.5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140.0	L-glutamina	292.0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-----	Biotina	1.0
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	200.0	Acido fólico	1.0
KH ₂ PO ₄	-----		
CaCl (anhidro)	200.0		
NaHCO ₂	2200.0		
Glucosa	1000.0		
L-arginina-HCl	21.0		
L-cisteina	12.0		
L-tirosina	18.0		
L-histidina	8.0		
L-isoleucina	26.0		
L-leucina	26.0		
L-lisina	29.0		
L-metionina	7.5		
L-fenilalanina	16.50		

MEDIO- 199, MORTON (1950).

Componentes en mg/ l

Sales inorgánicas

Cloruro de sodio	6800
Cloruro de potasio	400
Cloruro de calcio	200
Sulfato de magnesio	800
Fosfato de sodio	150
Nitrato férrico	0.72

Aminoácidos

L-arginina	70
L-histidina	20
DL-fenilalanina	50
L-lisina	70
DL-metionina	30
DL-serina	50
DL-treonina	10
DL-leucina	120
DL-isoleucina	40
DL-valina	50
Acido DL-Glutámico	150
Acido DL-aspartico	60
DL-alanina	50
L-prolina	40
Hidroxi-L-Prolina	10
Glicina	50
DL-triptofano	20
L-tirosina	40
L-cistina	0.1

L-cistina	20
Glutación (reducido)	0.05
L-glutamina	100

Vitaminas

Tiamina, HCl	0.01
Riboflavina	0.01
Piridoxina, HCl	0.025
Piridoxal, HCl	0.025
Acido nicotínico	0.025
Nicotinamida	0.025
Pantotenato de Ca	0.01
Inositol	0.05
Acido p-amino-benzoico	0.05
Cloruro de Colina	0.5
Acido ascórbico	0.05
D-Biotina	0.01
Acido fólico	0.01
Menadiona	0.01
Calciferol	0.01
Acetato de vit. A	0.1
A-Fosfato de Tocoferol	0.1
<u>Lípidos</u>	
Coesterol	0.2

Derivados de Acidos nucleicos mg/l.

Adenina	5.1
Guanina	0.3
Xantina	0.3
Hipoxantina	0.3
Timina	0.3
Uracilo	0.3
Ac. Adenilico	0.2
Adenosin-Trifosfato	5.0
Ribosa	0.5
Desoxiribosa	0.5

Otros (Miscelaneos) mg/l.

Acetato de sodio	84.0
Glucosa	1000
Rojo fenol	10

Agua tridestilada cbp. 1000ml.

Este medio se esteriliza por filtración bacteriológica, a través de una membrana con poros de 0.2 micrómetros de diámetro. Se somete a prueba de esterilidad y se conserva en refrigeración.

Solución de Bicarbonato de Sodio al 4.4%.

NaHCO_3	4.4 gr.
Rojo Fenol	0.1 ml.
Agua tridestilada	c.b.p. 100.0 ml.

Solución de antibióticos (concentrada).

Penicilina sódica	1×10^6 U.I.
Sulfato de estreptomycinina	1 gr. de base
Agua tridestilada	c.b.p. 100.0 ml.

Solución de Verseno al 0.05%.

Versenato de sodio(E.D.T.A.)	0.5 gr.
Solución A de PBS 10x	100 ml.
Agua destilada c.b.p.	900 ml.
Rojo Fenol	0.05 ml.
NaOH 1N	pH 7.5

Solución de tripsina al 0.25%.

Solución A de PBS	100 ml.
Tripsina	50 gr.
Rojo Fenol	1 ml.
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml.

Solución concentrada 10x de PBS. 0.001 M.

Na_2HPO_4 anhidro	12.36 gr.
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monobásico	1.8 gr.
NaCl	45.0 gr.
H_2O destilada	1000 ml.

Albúmina bovina al 0.4%.

Suero fetal de ternera inactivado a 56°C durante 30 min.

Azul de tripano al 0.5 %.