



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Evaluación de los Eventos Morfológicos Tempranos de la
Penetración del Virus Rábico en Cultivos Celulares
a Bajas Multiplicidades

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA LICENCIATURA DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Instituto Mexicano del Seguro Social C. M. N.

P R E S E N T A

EDUARDO ENRIQUE SILVA LEMOINE

ASESORES DE TESIS:

M. V. Z. PABLO HERNANDEZ JAUREGUI

M. V. Z. LAURA PATRICIA NOE

MEXICO. D. F.

ABRIL, 1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

1.- R E S U M E N

= = = = =

En este trabajo se estudió en cultivos celulares la cepa ERA de virus rábico, para hacer una evaluación de las estructuras en los estados tempranos de la infección. Las incubaciones se llevaron a cabo usando una baja multiplicidad del virus rábico y evitando usar sustancias -- que pudieran alterar la morfología de las células y del virus.

La evaluación de la estructura se realizó con el microscopio electrónico de transmisión, el grupo testigo no mostró ninguna alteración a diferencia del grupo problema en el que se lograron demostrar las primeras fases del ciclo viral y diferentes formas de penetración del virus rábico. Se observó el virus en proceso de degradación en vesículas de pinocitosis.

| <u>I N D I C E</u> | PAG. |
|----------------------------|------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| MATERIAL Y METODOS | 21 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSION | 29 |
| CONCLUSION | 43 |
| REFERENCIAS | 44 |

2.- I N T R O D U C C I O N

= = = = =

La rabia es una enfermedad viral infecciosa, de curso generalmente agudo, que afecta a todos los animales de sangre caliente. Desde el punto de vista epizootiológico la rabia puede dividirse: en rabia urbana y rabia silvestre. Esta división es un tanto arbitraria y está de acuerdo a los vectores. En la rabia urbana el principal modo de transmisión es debido a mordeduras de perro y en menor grado a mordeduras de gato. La rabia silvestre involucra un gran número de especies dependiendo de la zona que se trate y frecuentemente no es detectada a menos que ocurran brotes epidémicos, afecta a una gran variedad de roedores y carnívoros en casi todos los países del mundo, siendo éstos los responsables de la perpetuación y transmisión de la enfermedad. (5)

En las colonias de murciélagos se han encontrado que éstos son portadores y en menor grado padecen la enfermedad. En América Latina el principal transmisor es el murciélago hematófago: Desmondus rotundus y Desmondus murinos; siendo portador asintomático de la enfermedad durante períodos hasta de cinco meses durante los cuales elimina el virus por la saliva. Las características, comportamiento y hábitos alimenticios colocan al murciélago hematófago en una categoría aparte de los demás animales silvestres (5).

Propiedades del virus.

La dimensión de la partícula se estima entre 100 y 150 nanómetros. En suspensiones acuosas es fácilmente destruido por ácidos, álcalis, fenol, formol, cloroformo, bicloruro de mercurio y otros desinfectantes. En capas muy delgadas de tejidos se inactiva rápidamente por la luz ultravioleta. Es destruido por la pasteurización. Se deteriora con relativa rapidez en suspensiones, particularmente en las diluidas, a la temperatura ambiente. Fragmentos de tejido nervioso en solución de glicerol al 50% conservan su virulencia durante meses, si se hallan en refrigeración. El virus en la saliva seca pierde su virulencia en pocas horas a temperatura ambiente. (5, 6)

Clasificación del virus.

Ha sido clasificado recientemente dentro del género de los lyssavirus (6). Este género junto con el de los vesiculovirus y otros virus, todavía no asignados a ningún género, para los cuales no se aprobó nombre, constituyen la familia Rhabdoviridae (6).

Una de las bases para separar la familia Rhabdoviridae en los actuales géneros vesiculovirus y lyssavirus, fue que los primeros se multiplican tanto en vertebrados como en artrópodos a diferencia de los lyssavirus que sólo se replican en vertebrados.

Independientemente del género a que sea finalmente asignado el virus de la rabia; el hecho es que ésta continúa siendo una enfermedad importante en el mundo desde el punto de vista económico y de salud pública.

Morfología del virus rábico

Es de forma cilíndrica con un extremo redondeado y el otro aplanado, se compara con la forma de una bala.

Por medio de estudios de microscopía electrónica utilizando la técnica de tinción negativa se ha observado una superficie cubierta de proyecciones superficiales (Peplómeros) de seis a ocho nanómetros (nm) de largo, con el extremo libre redondeado dándole a los peplómeros la apariencia de una perilla, la distancia entre peplómero y peplómero es de 4 a 5 nm (8).

Cuando el virus es tratado con detergentes iónicos se desdobra en una cinta ondulada de ribonucleoproteína de 4.2 nm. de longitud total, con 2 X 6.5 nm. de ancho y alto y una periodicidad de 7.5 nm. (4)

La ribonucleoproteína no es infecciosa, esta cinta se enrolla formando de 15 a 20 espiras en el cuerpo del virión y 4 espiras decrecientes en el extremo redondeado. Un virión completo mide 75 a 80 nm. de diámetro-incluyendo los peplómeros por 170 a 180 nm. de largo. (6).

El virus rábico está constituido por cuatro proteínas mayores y una menor.

La proteína de peso molecular más alto del virión es una glicoproteína (GLP) de 80 000 daltons de peso molecular y en cantidad aproximada de 1783 unidades por virión. La segunda proteína de envoltura (EP-2) con un peso molecular de 40 000 daltons y en una cantidad de 789 unidades por virión. La tercera proteína de envoltura (EP-3) con un peso molecular de 25 000 daltons y en una cantidad de 1661 unidades por virión. La nucleoproteína menor (NCP M) de 55 000 daltons de peso molecular y en cantidad de 76 unidades por virión. (6)

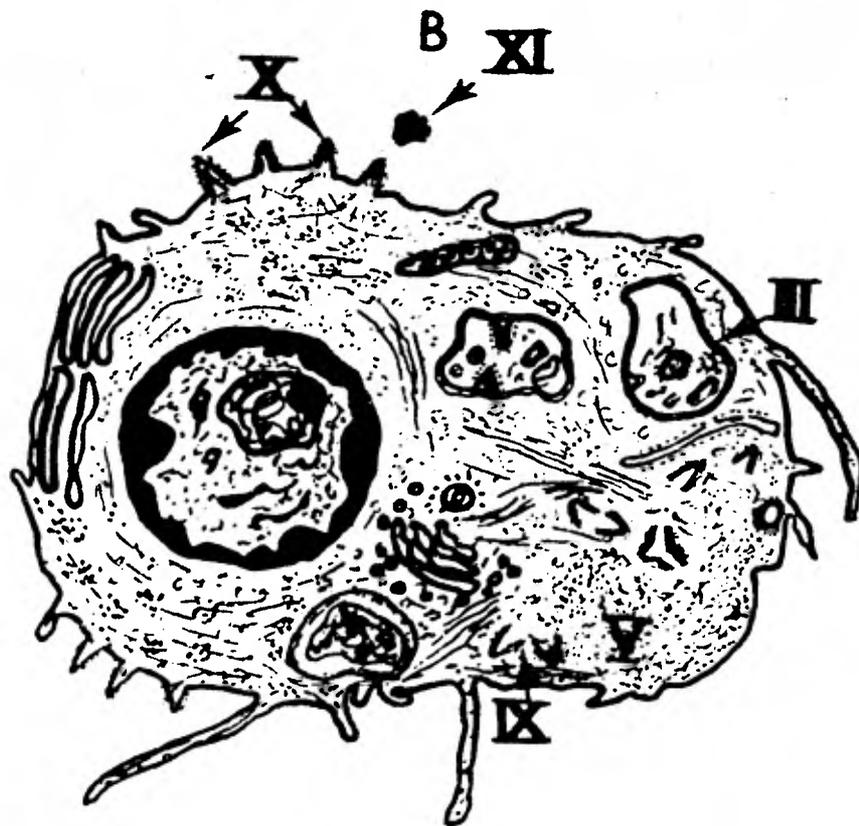
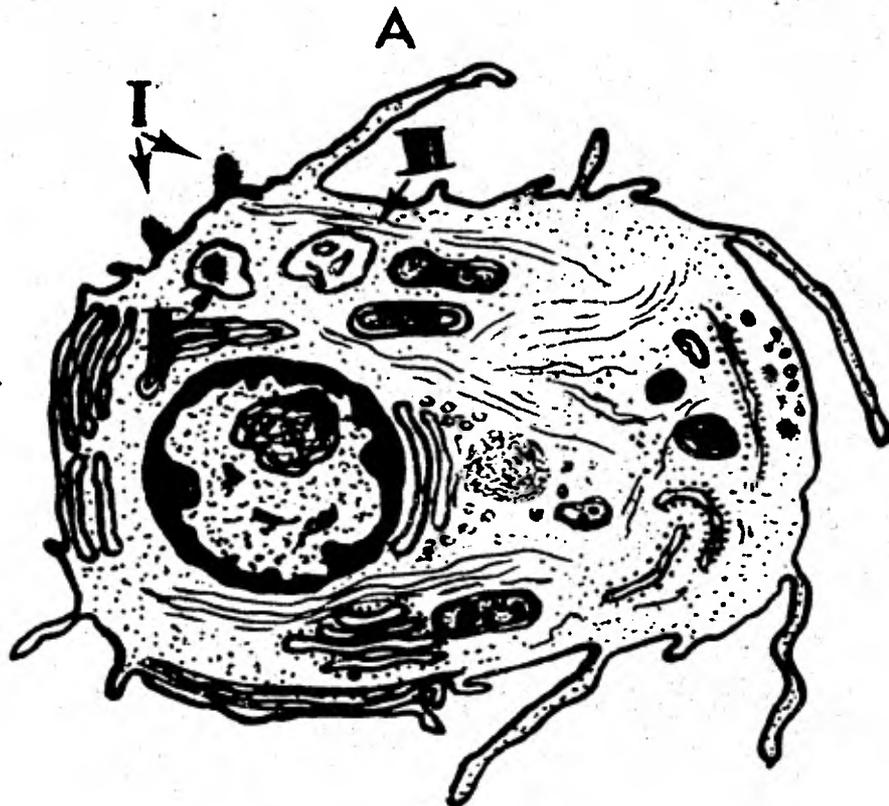
Aparentemente el proceso de enrollar la nucleocápside ocurre simultáneamente con la gemación viral.

- 1.- La extrucción del peplómero sólo ocurre en la parte de la membrana que está dando lugar a la gemación de un virus.
- 2.- La gemación del virus está ligada estrechamente por una parte de la presencia de peplómeros y por otra a la de la nucleocápside.
- 3.- La espiralización o enrollamiento de la nucleocápside está sincronizada con el proceso de gemación. El único proceso celular de sincronización y complejidad comparables es el de la mitosis y la hace una célula completa no un virus (11).

El ciclo del virus rábico (6)

El ciclo de multiplicación de los virus ARN en general está constituido por once diferentes pasos que fluyen uno en el otro y en ocasiones se mezclan entre sí, ejemplificados en el esquema A y B.

- I.- El primer paso de cualquier virus es la absorción o adherencia a una célula susceptible. (fig. 1).
- II.- El segundo paso es la penetración que también tiene variaciones según el tipo de virus. Puede ser penetración por captación celular en vesícula picnocitótica, penetración o por viropexis, es decir la unión de la envoltura viral a la célula y el subsecuente vaciado de la nucleocápside al citoplasma celular (fig. 2).
- III.- Una vez dentro de la célula, ocurre la denudación o liberación del ácido nucleico funcional.
- IV.- Una vez liberado el ácido de el virus. Existen varias terminologías dependiendo si el ARN viral es al mismo tiempo ARN mensajero o si requiere de la síntesis de un ARN antes de ser traducible a proteína. Se llama cadena positiva a la que contiene el virión y cadena negativa a la que sintetiza la célula infectada. Si el ARN es viral y es al mismo tiempo mensajero, se llama mensaje que es opuesto al ARN antimensaje que no tiene sentido para la célula. Si el ARN positivo es mensaje de la denudación, se forman los polirribosomas e inicia la síntesis de proteínas tempranas. Si el ARN positivo es antimensaje, después de la denudación sigue la síntesis de ARN complementario mensaje para poder proceder a la síntesis de proteínas tempranas; - en este caso, los virus siempre llevan su propia enzima, ARN replicasa, integrada al virión, ya que este ácido nucleico se replica en ausencia de síntesis de proteínas.



Sokol estudió la composición química del virus rábico, llegó a la conclusión de que el virión desintegrado contenía doble actividad antigénica, que el virión completo. (4, 6)

Las glicoproteínas purificadas carecen de actividad hemoaglutinante pero ejercen una fuerte actividad inhibidora de la hemoaglutinación; esta actividad es también ejercida por los viriones parcialmente destruidos. Esta observación la explica de varias maneras una de las cuales sería que la ruptura de los viriones provoca la liberación de sitios antigénicos y unidades inhibidoras de la hemoaglutinación previamente ocultos. (7)

Schenider encontró que desintegrando los viriones rábicos con saponina aumentaba cuatro veces la actividad hemoaglutinante. Se pueden obtener unidades completas que retengan dos valencias que sigan causando hemoaglutinación y no inhibición de la hemoaglutinación como las glicoproteínas purificadas, para obtener estas unidades se requiere de una técnica especial (6).

El virión puede presentar varias alteraciones que pueden ser en cuanto a su longitud, cuando miden 125 nm. de largo se llaman partículas truncadas (T), si miden 150 nm. de largo se denominan partículas (B) en forma de bala, otra alteración que puede presentar el virión es en cuanto al diámetro (4) .

Morfogénesis del virus rábico

El virus rábico puede ocasionar un efecto citopático en cultivos celulares esto acontece en casos excepcionales, generalmente la infección es bien tolerada. (14).

La principal evidencia de la multiplicación viral es la formación de corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos. En el sistema nervioso central reciben el nombre de corpúsculos de Negri. Estas mismas estructuras en otras células infectadas reciben el nombre de matrices virales, los corpúsculos de Negri carecen de membrana delimitante, están compuestos por largas filas de nucleocápsides que son las precursoras de los viriones (5).

Durante mucho tiempo, la relación entre matriz viral y la virogénesis permaneció obscura. De acuerdo con algunas observaciones hechas por Iwasaki (9) el proceso de espiralización de la nucleocápside y el proceso de gemación viral son simultáneos, el virus modifica primero la membrana celular y después inicia su gemación probablemente ambos están sincronizados, el grado de modificación de la membrana celular, termina en la base del virus naciente.

La gemación viral no ocurre con preferencia en ninguna membrana celular puede utilizar cualquiera de las membranas de la célula empezando con la membrana del retículo endoplásmico liso y rugoso, en algunas ocasiones llega a usar la capa externa de la membrana nuclear.

Esquema A.- Eventos tempranos del ciclo del virus rábico en cultivos celulares.

- I.- Absorción o adherencia del virus rábico a una célula.
- II.- Penetración del virus rábico en vesículas de picnoci-tosis.
- III.-Denudación del virus.

Esquema B.- Eventos tardíos del ciclo del virus rábico en culti--vos celulares.

III al VIII.- Se denomina fase de eclipse en estos estados del ciclo del virus rábico no se logran observar estructu-ras virales bien delimitadas, la única evidencia es la presencia de matrices virales (V).

- IX.- Virus madurando en matriz viral.
- X.- Virus madurando en membrana citoplasmática.
- XI.- Liberación viral.

en el citoplasma como único medio de liberarse en el caso de los virus envueltos que maduran en la membrana plasmática; generalmente, la citolisis no ocurre o por lo menos es muy lenta, dando lugar a la máxima liberación de viriones maduros que es el último paso del ciclo del virus (Fig. 5).

XI.-Liberación viral. El período de latencia de los virus abarca desde el paso I hasta el paso XI, en tanto que el período o fase del eclipse, es un término microscópico en el que el virus no es observable y este abarca desde el paso III al VIII que es cuando se empiezan a reconocer los viriones (Fig. 5).

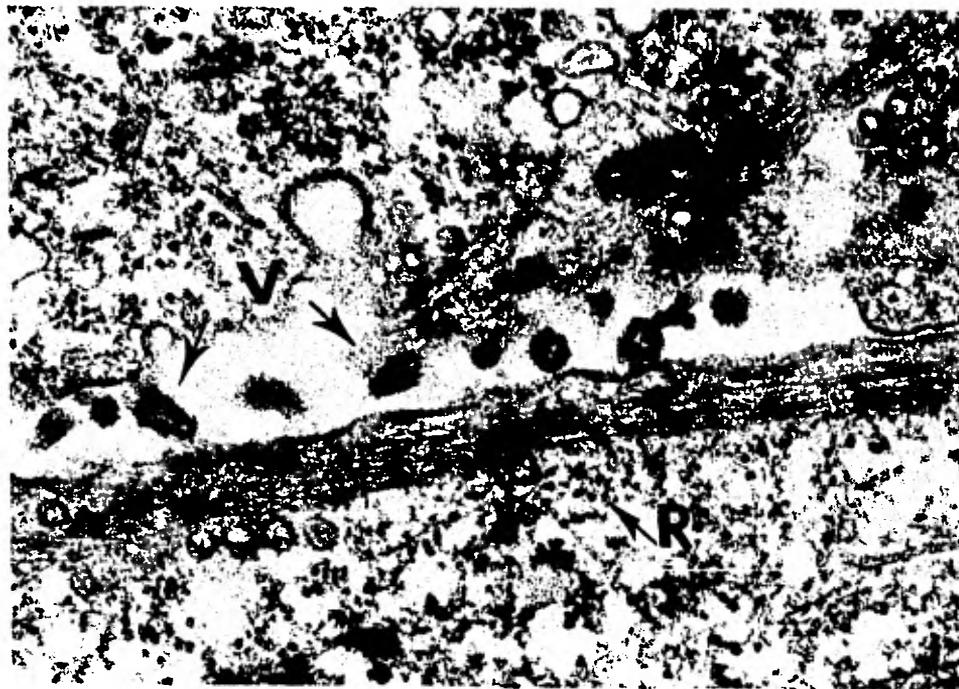


FIG. 1



FIG. 2

Figura 1.- Electromicrografía de dos células 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA. Se observan virus (V) en el medio intracitoplasmático en aproximación a la célula se demuestran ribosomas (R), así como algunos polirribosomas. (amp. X 64,000)

Figura 2.- Electromicrografía de una célula 13 CL infectada con virus rábico cepa ERA. Se observa un virus (V) penetrando a una célula se puede observar la incipiente formación de una vesícula de pinocitosis. (amp. X 64,000).

- V.- El siguiente paso es la síntesis de proteínas tempranas por el ARN progenitor o el ARN complementario del progenitor, estas proteínas tempranas sirven para establecer la infección en la célula (Fig. 3).
- VI.- La síntesis de ARN de progenie, ocurre por medio de la formación de una molécula de ARN, a este lo recorren simultáneamente varias moléculas de polimeraza y sobre una sola molécula de ácido nucleico (Positiva o Negativa) se sintetizan simultáneamente varias moléculas complementarias en diversos grados de maduración; el siguiente paso se inicia cuando se han acumulado varios ARN virales.
- VII.- Por definición, las proteínas tardías son las que se sintetizan en el ARN de progenie y en este caso ocurre una síntesis masiva de proteína también llamadas proteínas precursoras; éstas generalmente van a formar el virión, por lo que se requieren en gran cantidad, la mayoría de las cápsides virales están formadas por unidades repetitivas.
- VIII.- Ensamble de las nucleocápsides, es el proceso de agregado de las cápsides junto con el ácido nucleico.
- IX.- La maduración viral consiste en una gemación a través de la membrana celular en el caso de los virus envueltos y en la simple concreción de las nucleocápsides en el caso de los virus desnudos (Fig. 4).
- X.- La citolisis ocurre casi exclusivamente en los virus que maduran

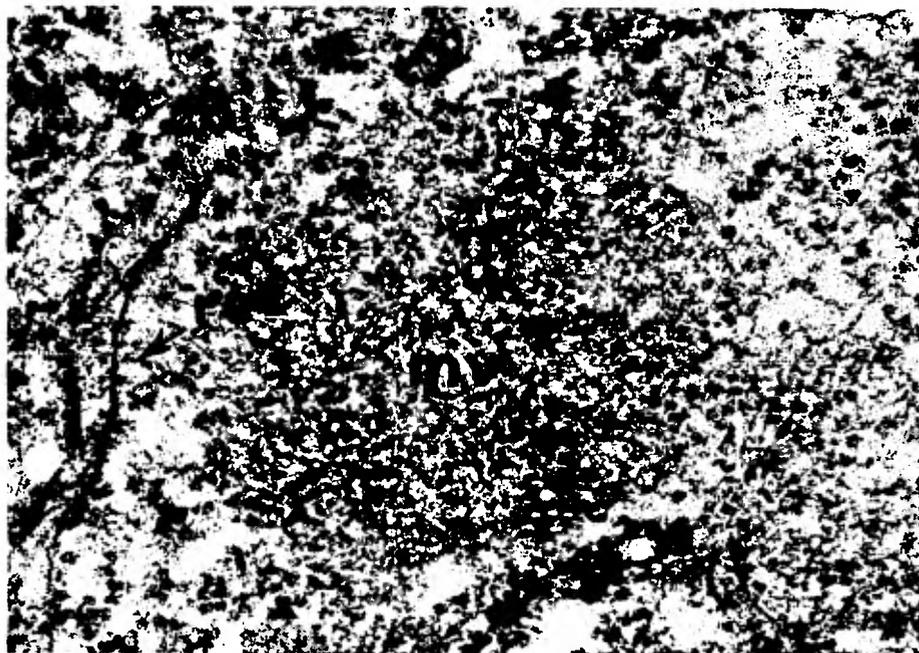


FIG. 3

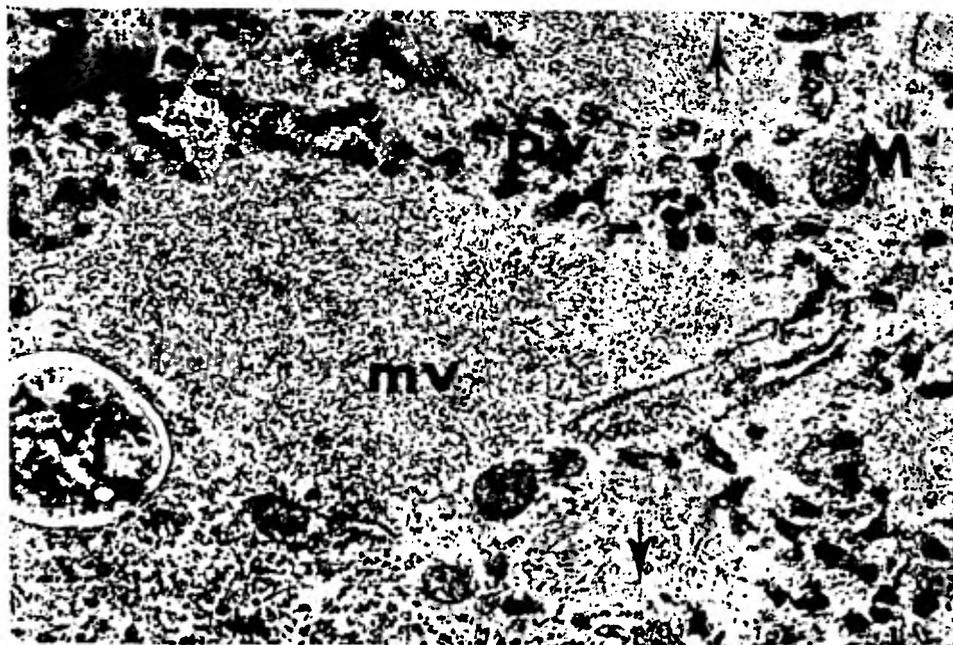


FIG. 4

Figura 3.- Electromicrografía de una célula 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA. Se observa una parte del citoplasma en que se encuentra una matriz viral (mv) circundada en su porción izquierda por retículo endoplásmico rugoso (rer). La matriz viral es la primera estructura que se reconoce durante el eclipse viral. (amp. X 64,000):

Figura 4.- Electromicrografía de una célula 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA. Se observa una matriz viral (mv) de grandes dimensiones y otras más pequeñas (flechas) se demuestra gran cantidad de partículas virales (pv) madurando a asociadas a la matriz viral circundando a esta encontramos retículo endoplásmico rugoso así como una vacuola de Tergestión lisosomal (vt), las mitocondrias (M) presentan forma redondeada. (amp. X 35,000)



FIG. 5

Figura 5.- Electromicrografía de dos células 13-CL infectadas con virus rábico cepa ERA. En esta fotografía se observan dos partículas virales (pv) madurando en la membrana citoplasmática, se demuestra la formación de una vesícula de pinocitosis con la consecuente liberación del virus de progenie, se inicia una nueva infección.
(amp. X 121, 800)

Replicación del virus rábico en cultivos celulares

En la mayoría de los sistemas celulares, la adherencia y penetración del virus rábico puede aumentarse con la adición de poliones como son la Dietilamino Dextran (DEAE dextran) y el sulfato de prolamina. Para que una cepa de virus rábico se adapte al cultivo celular se necesitan hacer repetidos pases (5, 7).

Kaplan citado por (6) utilizando la cepa HEP adaptada a células Nil 2 encontró un período de latencia de 16 horas en altas multiplicidades, observó virus madurando en la membrana celular a las 6 horas post-infección.

Mondragón y Hernández, citado por (6) utilizando la cepa V-319 y células 13-S clona derivada de las células BHK-21 encontraron un período de latencia de 22 horas utilizando bajas multiplicidades en el orden de 0.1UFP por célula.

La multiplicidad de infección tiene influencia sobre las células valores superiores a 10 UFP por célula empieza la producción de interferón, además se encuentran partículas incompletas en exceso, así como fases aberrantes del ciclo del virus rábico (4, 7). El interferón en el medio de cultivo tiene un marcado efecto sobre la producción final del virus.

3.- PLANTEAMIENTO

DEL

PROBLEMA

El objetivo es establecer un modelo experimental en cultivos celulares para evaluar los eventos morfológicos tempranos de la penetración del virus rábico a bajas multiplicidades.

Para ello se utilizó una cepa de virus rábico adaptada a cultivos celulares (cepa ERA), usando el microscopio electrónico se pudo hacer el estudio de la infección temprana.

Otros estudios han demostrado la multiplicación del virus rábico con altas dosis (4, 9, 11). También han sido usadas sustancias facilitadoras de la penetración del virus a la célula como lo es la Dietilamino dextran (1, 4, 7). Las alteraciones inducidas por las sustancias facilitadoras de la penetración viral y de la alta multiplicidad utilizadas no permiten interpretar adecuadamente el ciclo viral. Como parte de esas alteraciones, la maduración viral intracitoplasmática y la destrucción celular observada por Hernández Baumgarten han sido consideradas como ciclos aberrantes (7, 9).

En este trabajo se excluye el uso de cualquier sustancia que altere el patrón de multiplicidad del virus rábico, además de utilizar bajas dosis de virus rábico, se usará la línea celular BHK-21 a la cual está adecuadamente adaptado el virus.

4.- M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se utilizó la clona celular 13-CL, que proviene de la línea celular de riñón de hamster recién nacido (BHK-21) (10).

Para obtener el monoestrato se cultivaron células hasta un 100% de confluencia, posteriormente se usó tripsina para obtener 200 000 células por ml. Para el estudio de la interacción del virus en estadios tempranos de infección en una caja de Petri de plástico de 3.5 centímetros de diámetro se colocaron 3 ml. de medio de cultivo con células, se les permitió crecer hasta un 90%. Al medio de cultivo BHK se le agregó 10% de suero fetal bovino, 10% de TPB y 20 000 unidades de penicilina por ml. combinada con estreptomycin 200 miligramos por ml.

Infección celular

Se formaron dos lotes de cajas de cultivos celulares. Cada lote estuvo formado por dos cajas, uno sirvió como testigo y el otro se infectó con virus rábico. A los dos lotes se le realizó el mismo procedimiento de fijación in situ.

Las dos cajas de cultivos celulares problema se le retiró el medio de cultivo y se infectaron con virus rábico cepa ERA con una dilución de 1 unidad formadora de placa por célula. Se permitió que el virus se asentará durante una hora sobre la superficie de las células (7).

El virus que quedó como sobrenadante en el medio de cultivo fue eliminado.

Se agregó medio de cultivo de mantenimiento y se dejó durante una hora para permitir la penetración del virus.

Microscopía electrónica (2)

Las células fueron fijadas in situ con glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.4 durante media hora.

Después de la fijación, fueron lavadas con amortiguador de cacodilatos y posteriormente fueron postfijados con tetróxido de Osmio al 1%. El objeto de la postfijación es el de que los tejidos tengan una preservación más adecuada. A continuación se enlistan los pasos del procedimiento de inclusión (2).

Se lavó con agua destilada, tres cambios
Preincubación con solución acuosa de acetato de uranilo, 30 min.
Se lavó con agua destilada, dos cambios
Deshidratación a temperatura ambiente con etanol:

al 35% durante 10 min.

al 50% durante 10 min.

al 75% durante 10 min.

al 90% durante 10 min.

90 de (HPMA) hidroxipropil metacrilato, tres cambios de 5 min. c/u.

95% de HPMA 15 min.

97% de HPMA 15 min.

Inclusión (2)

2 partes de HPMA / una parte de Epon 812 durante 15 min.

1 parte de HPMA / una parte de Epon 812 durante 15 min.

1 parte de HPMA / dos partes de Epon 812 durante 15 min.

Epon 812, tres cambios de 10 minutos cada uno

Polimerizar a 60 grados centígrados durante 24 horas (2).

Se cortó el monoestrato en el ultramicrotomo Porter Blum MT-1. Una vez obtenidos los corte finos fueron montados en rejillas de cobre y se contrastaron con metales pesados, fueron evaluadas al microscopio electrónico Philips EM-300 (12,13).

Se estudiaron 50 células infectadas en las cuales se cuantificaron el número de partículas virales sobre la superficie citoplasmática y el número de partículas virales incorporadas en vesículas de pinocitosis.

De todo este material se obtuvieron fotografías representativas.

5.- R E S U L T A D O S

= = = = =

Microscopía Electrónica de Transmisión

Células 13-CL sin infectar con virus rábico

A la observación en el microscopio electrónico se encontró que las células adoptan forma fusiforme, en el citoplasma se encuentran numerosos -- grupos de polirribosomas ubicados muy cerca unos de otros. Los ribosomas se ven en ocasiones interrumpidos en su organización por la presencia de vesículas, mitocondrias o de cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Estos organelos son de localización periférica hacia donde los polirribosomas son compactos. El núcleo es ovoide, la cromatina nuclear está dispuesta en granos uniformemente distribuidos, la eucromatina se asocia a la membrana nuclear formando áreas de mayor densidad. Uno o dos nucleolos pueden demostrarse dependiendo del nivel del corte. En las áreas menos densas, los ribosomas están más separados formándose espacios claros que frecuentemente son ocupados por microfilamentos y microtúbulos. Las mitocondrias adoptan formas alargadas, tienen matriz densa y presentan - finas crestas transversales. Ocasionalmente se demuestran vesículas de - degradación, con figuras de mielina (fig. 6). Grupos de filamentos se observan en dirección longitudinal al eje celular, que adoptan forma fusiforme, cuando se trata de grupos aislados se observan en cualquier dirección (Fig. 7). La presencia de partículas radiales de tipo viral, se demuestran frecuentemente dentro de vesículas del retículo endoplásmico liso (fig. 8). Las partículas radiales, están formadas por un halo denso y central, de donde emergen pequeños filamentos que terminan en una doble - membrana de forma esférica (fig. 9).

El aparato de Golgi es de localización supranuclear. De las cisternas emergen numerosas vesículas con doble membrana, son pequeñas y se distribuyen por todo el citoplasma celular. En ocasiones las vesículas alcanzan mayor diámetro englobando vesículas de menor tamaño o bien material finamente fibrilar que sugiere la desintegración de membranas (Fig. 10). En la membrana citoplasmática se originan vesículas de tipo pinocitósico de características muy semejantes a las antes descritas y que frecuentemente se les encuentra reunidas en grupos vaciando su contenido en otra vesícula de mayor tamaño. Tanto en el aparato de Golgi como en la membrana citoplasmática, se originan también vesículas cubiertas. Estas son de mayor tamaño y tienen como característica la adhesión de pequeños filamentos densos en la membrana externa de la vesícula (Fig. 9).

De acuerdo con la cantidad de ribosomas, de filamentos, de vesículas y de microtúbulos, las células adquieren contrastes en su densidad a los electrones que van de lo claro a lo oscuro.

Células 13-CL infectadas con virus rábico.

Para poder establecer una evaluación cuantitativa de las estructuras que intervienen en la replicación del virus rábico se estudiaron cincuenta células previamente infectadas con virus rábico en una dilución de la unidad formadora de placa por célula.

La penetración de los virus a la célula se realiza en el citoplasma mediante mecanismos de fagocitosis. En nuestro experimento fue común

observar los virus penetrando en la membrana citoplasmática por la porción redondeada del virus, esta penetración se realizó en vacuolas de picnocitosis.

El virus también puede penetrar lateralmente o por su porción aplanada siendo este último muy poco común; siempre se observó modificaciones de la estructura y de la membrana citoplasmática. Las modificaciones de la membrana citoplasmática consisten en una mayor electrodensidad y una evidente estructura bilaminar, así mismo se encontraron finos filamentos en los sitios de interacción de la membrana celular y las partículas virales (Fig. 11).

En nuestro trabajo también fue común observar vesículas que en su interior tenían partículas virales en proceso de degradación (Figs. 12, 13).

También observamos fagosomas y vesículas con contenido denso y amorfo (Fig. 14).

El número de estructuras virales en las células infectadas fue el siguiente: se encontraron 44 vesículas en cuyo interior se observaron vesículas virales, 191 partículas virales en la membrana plasmática y 39 fagosomas.

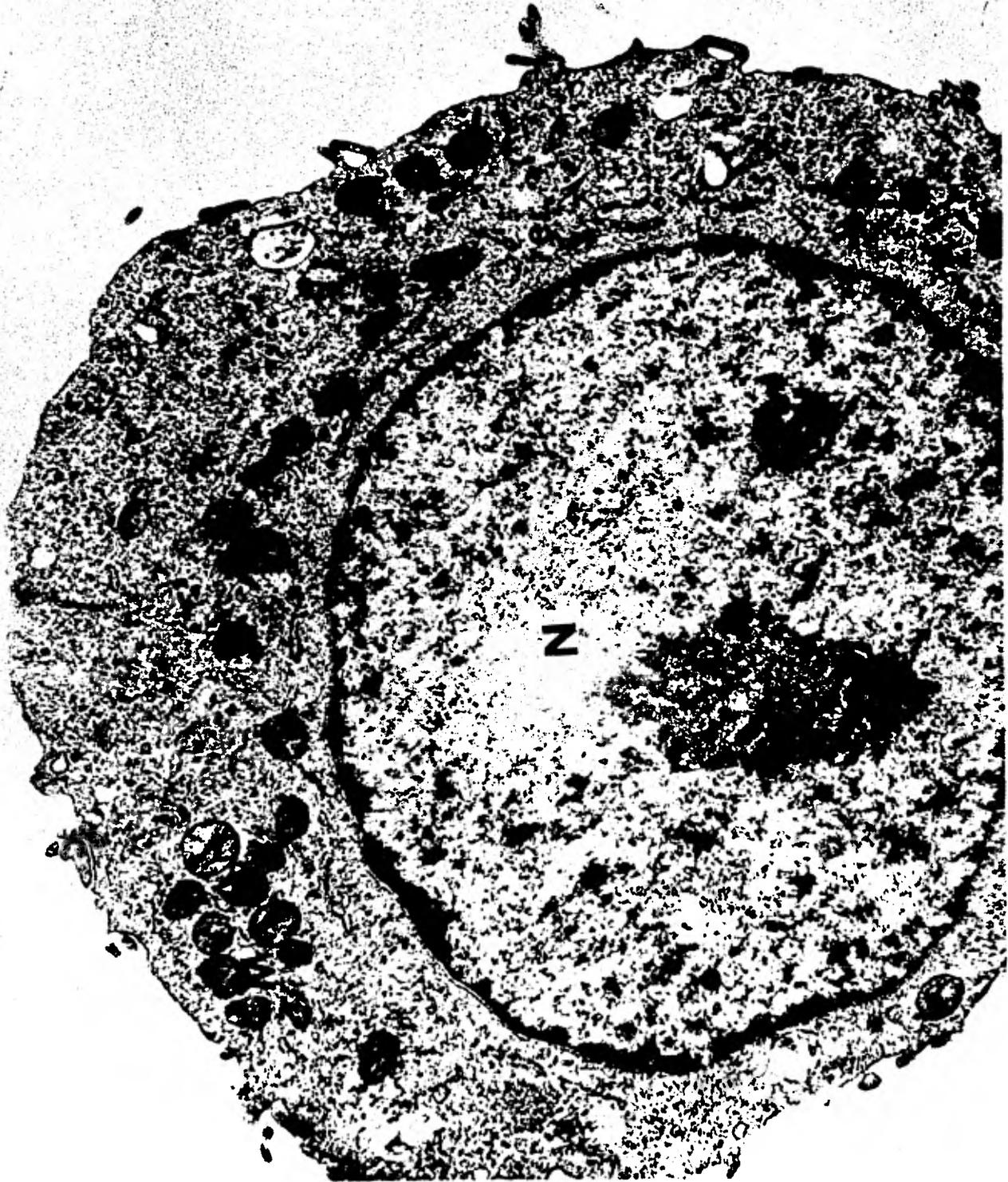


FIG. 6

Figura 6.- Electromicrografía de una célula 13-CL del grupo testigo sólo con medio de cultivo se observan numerosas mitocondrias (M) de forma redondeada dentro de la mitocondria podemos distinguir algunas crestas, el retículo endoplásmico rugoso está constituida por tubos cortos, el núcleo (N) es de forma ovoide también se observa el nucleolo (nu), la cromatina está irregularmente distribuida y se ve asociada a la membrana nuclear, el resto de los organelos está constituido por ribosomas que le dan el fondo a la célula (amp. x 41 580).

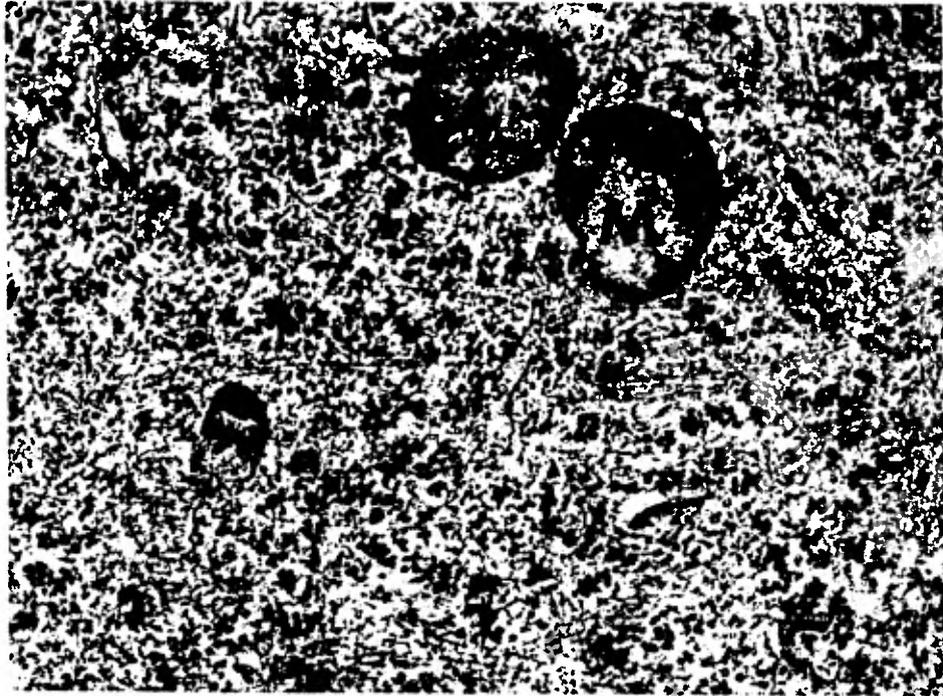


FIG. 7

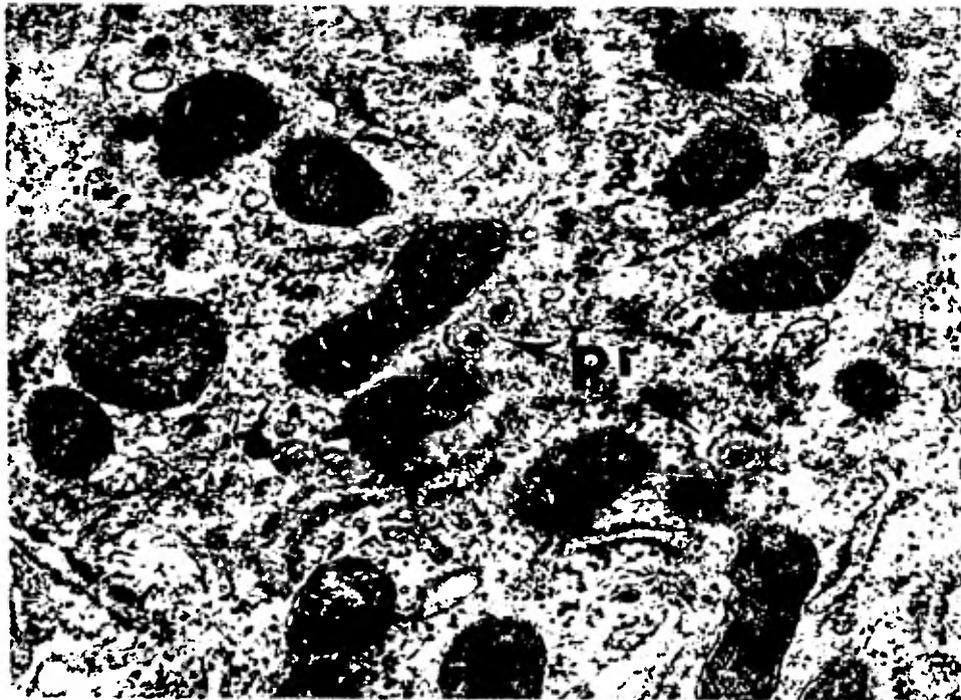


FIG. 8

Figura 7.- Electromicrografía de una célula 13-CL grupo testigo, sólo con medio de cultivo. Se observan gran cantidad de ribosomas y polirribosomas (PR) separados entre si por finos filamentos (F) que corren en diferentes direcciones, se ven dos mitocondrias (M) de matriz densa y de forma redondeada (amp. x 80,850).

Figura 8.- Electromicrografía de una célula 13-CL grupo testigo sólo con medio de cultivo. Se observa el citoplasma de una célula con gran cantidad de mitocondrias (M) de diferentes formas en las que se observan finas crestas transversales, así como densas matrices. Se logran distinguir entre las mitocondrias unas partículas radiales (pr) con un centro denso de donde salen finos filamentos que terminan en una doble membrana circundante (amp. x 50,820).

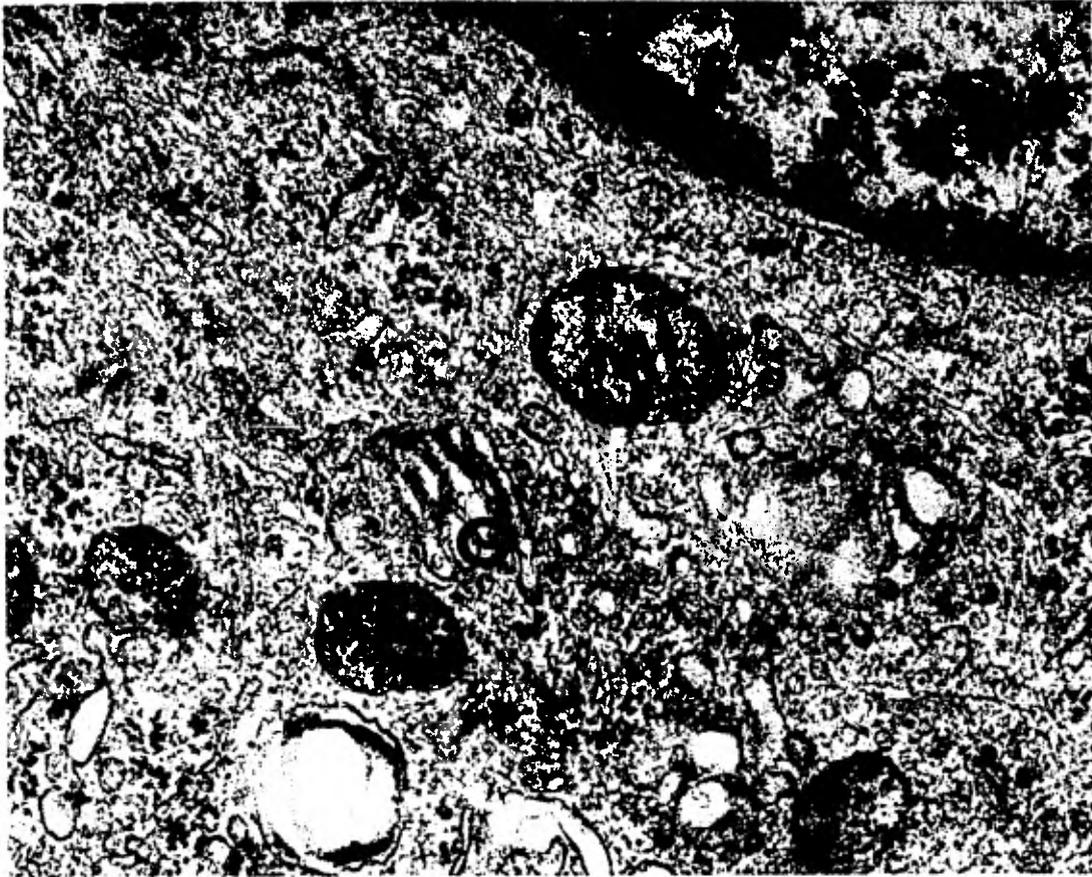


FIG. 9

Figura 9.- Electromicrografía de una célula 13-CL grupo testigo sólo con medio de cultivo. Se ilustra una cisterna del aparato de Golgi (G) y las múltiples vesículas que se originan de las cisternas de este organelo, se observa una porción del núcleo (N) y algunas mitocondrias (amp. x 35,000).

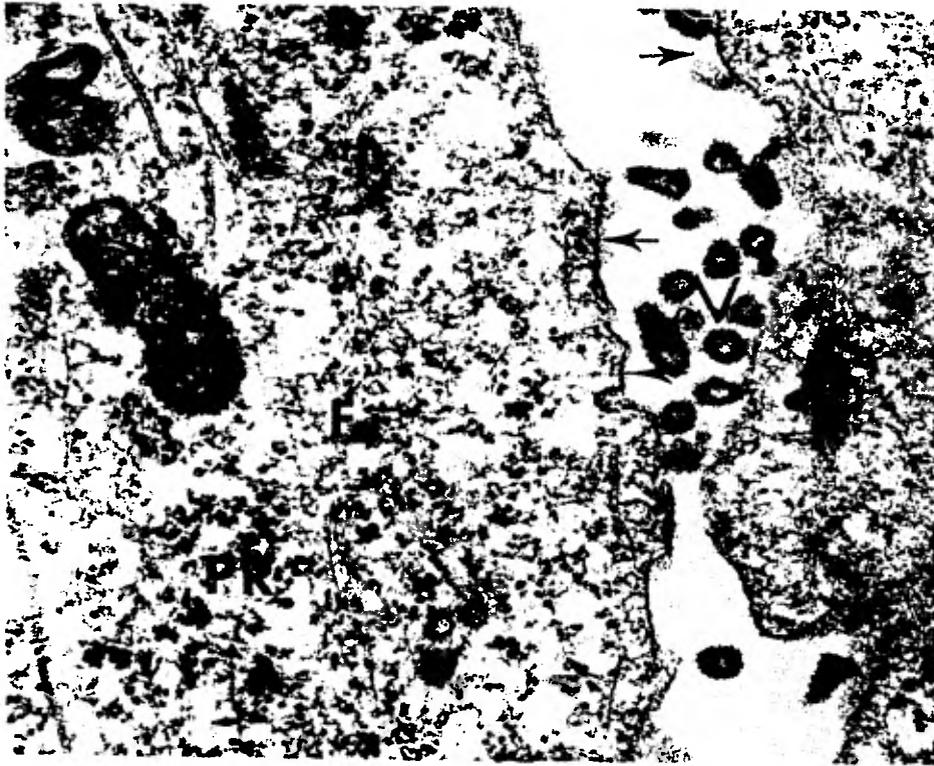


FIG. 10



FIG. 11

Figura 10.- Electromicrografía de dos células 13-CL infectadas con virus rábico cepa Era, con una hora de infección. Se observan virus (V) en el espacio intracitoplasmático, en acercamiento a la membrana citoplasmática se observan cambios de la membrana consistentes en una mayor densidad de la membrana (flechas). Los virus (V) se ven en diferentes formas y la penetración se realizará tanto por la parte plana del virus. Se observa un gran número de polirribosomas (PR) separados por una serie de filamentos (F) que corren en línea longitudinal (amp. x 80,850).

Figura 11.- Electromicrografía de dos células 13-CL infectadas con virus rábico a una hora de postinfección. Se observan dos virus en el espacio intracelular en aproximación a la célula por la parte plana del virus (amp. x 103,950).

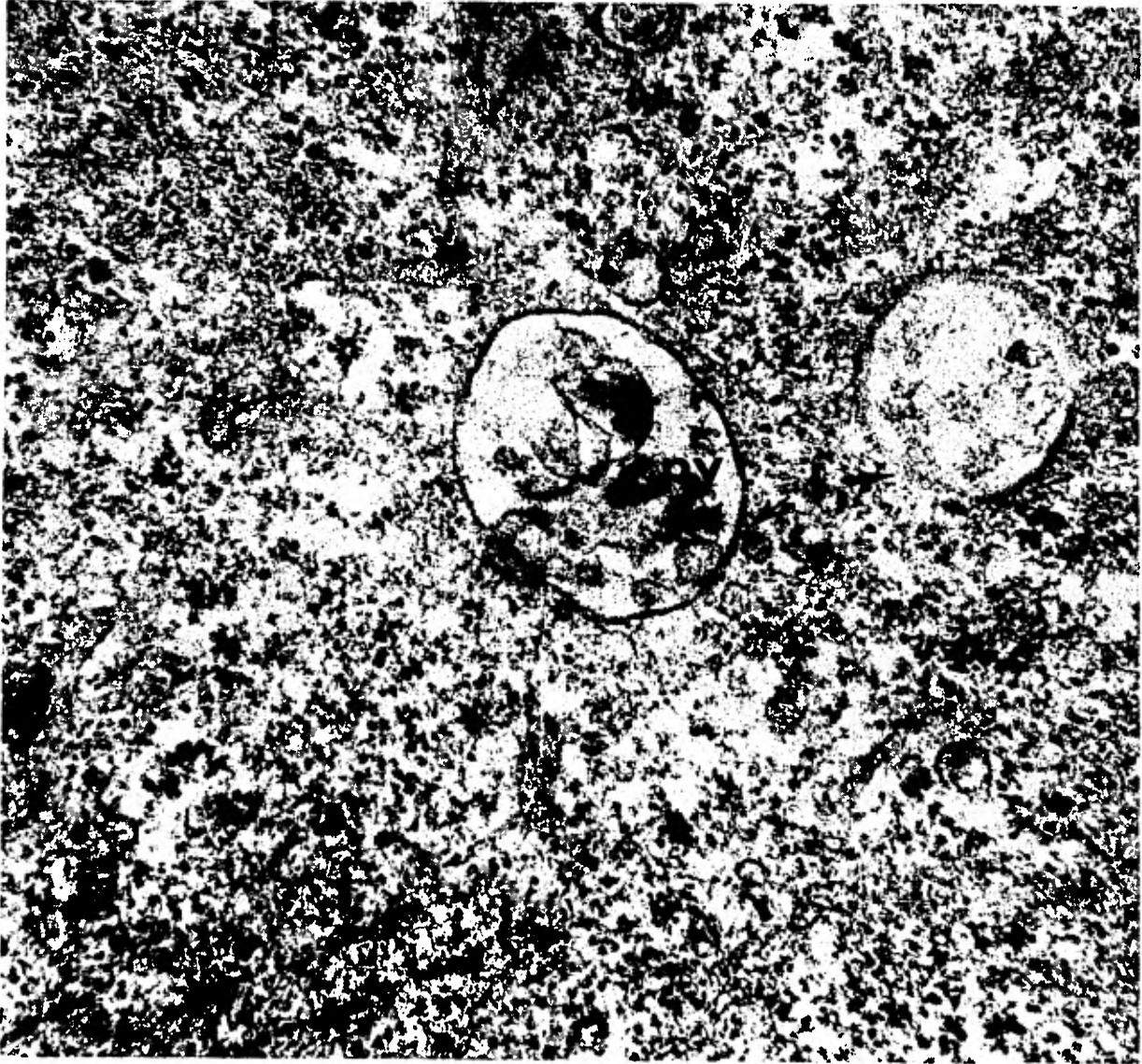


FIG . 12

Figura 12.- Electromicrografía de una célula 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA con una hora de infección. Se observan dos virus rábicos (V) en unas vacuolas de pinocitosis, forma en la que se incorporan a la célula. Se demuestra una partícula radial circundada (pr) por retículo endoplásmico liso y se ve gran cantidad de polirribosomas (amp. x 103,950).

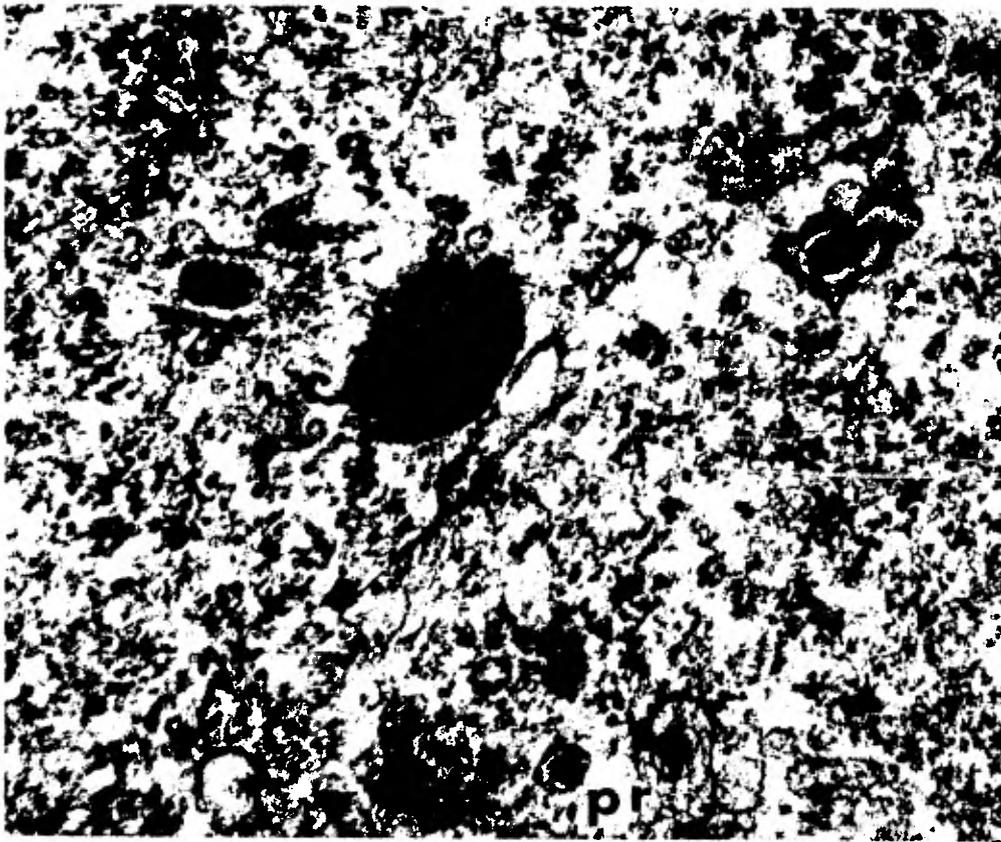


FIG. 13

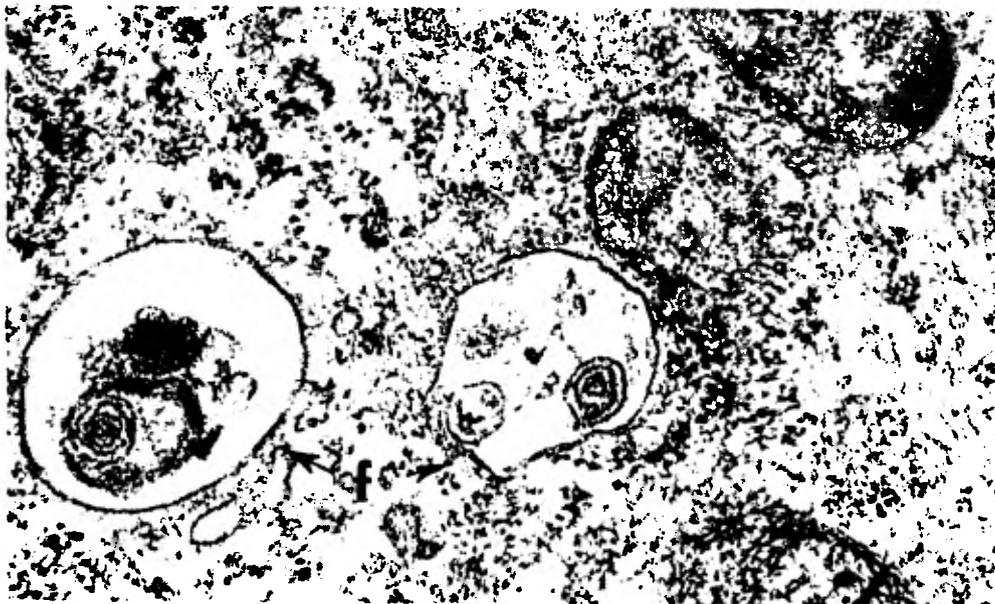


FIG. 14

Figura 13.- Electromicrografía de una célula 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA a una hora de postinfección. Se observan dos vacuolas de fagocitosis (vf) en una de ellas se ve una partícula viral próxima a desintegrarse (fase de desnudación) y se ven numerosos ribosomas y polirribosomas (amp. x 64,780).

Figura 14.- Electromicrografía de una célula 13-CL infectada con virus rábico cepa ERA, una hora postinfección. Se observan dos vacuolas de fagocitosis (f) conteniendo material de degradación. (amp. x 47,600)

6.- DISCUSION

En estudios anteriores del ciclo del virus rábico en cultivos celulares otros investigadores han utilizado sustancias que facilitan la penetración del virus a la célula. También han usado tripsina para remover el monoestrato celular de la caja de Petri. Hacer uso de productos químicos o sistemas mecánicos para remover el monoestrato celular, obviamente implica modificaciones en la interrelación del virus rábico con la célula, especialmente las estructuras celulares que se localizan en la superficie. Además, este tipo de procedimientos producen algunos artificios técnicos que hacen que la evaluación del modelo se complique y confunda la interpretación de los resultados.

Otros investigadores que han estudiado el ciclo del virus rábico (6, 8, 9) han utilizado altas dosis de virus rábico y los períodos de infección han sido hasta de noventa y seis horas. Con estos métodos se han encontrado muchas variantes en cuanto al tiempo en el que el virus rábico complementa un ciclo y se han observado virus madurando intracitoplasmáticamente, así como formas aberrantes de partículas virales (6).

Se ha descrito que las partículas virales penetran a las células en diferentes formas. Humler (8) encontró que las partículas virales se aproximan a la célula por su parte plana y que la penetración a la célula solo ocurre cuando el virus entra en contacto por la parte plana.

Iwasaki (9) describe la aproximación y penetración de los virus a la célula tiene lugar por la parte plana y no por parte redondeada. Encontró en estados tempranos de la infección los siguientes cambios: a los 5 minutos, los virus se observan intracitoplasmáticamente; una hora más tarde, observó un aumento en el número de fagosomas y la degradación de las partículas virales en vesículas de fagocitosis. A la cuarta hora postinfección, encontró la aparición del antígeno viral y a la quinta hora observó una serie de pequeños filamentos (nucleocápsides). A la sexta hora logró observar la primera generación del virus rábico.

Como eventos tardíos Iwasaki (9) observó a las veinticuatro horas una serie de vacuolas intracitoplasmáticas y un máximo de multiplicación viral. A las setenta y dos horas ya casi no hay multiplicación y es raro observar aparatos de Golgi asociados a lisis focal en el sitio original de la infección. A las noventa y seis horas de infección, la producción de partículas virales se suspende por completo y hay bastante lisis celular.

En nuestro experimento se realizaron una serie de variantes con el objeto de que las estructuras celulares sufrieran un mínimo de alteraciones. Las variantes fueron desde el proceso de conservación, la interrelación de la partícula viral con la membrana citoplasmática. Se consideró inadecuado el utilizar sustancias que faciliten la adhesión y penetración de los virus a la célula, pues se planteó el poder evaluar la interacción del virus rábico con la célula en las condiciones que se asemejan lo más posi-

ble a lo que ocurre en la naturaleza. Para evitar el daño celular y asegurarse de una buena conservación del monoestrato, las células fueron fijadas in situ.

Otra de las modificaciones fue en la dilución viral en nuestro experimento. Se utilizó una dilución bastante baja con el objeto de que las células no sufrieran demasiado daño por el exceso de penetración viral. El objeto de detener la infección en la primera hora fue para poder evaluar cuantitativamente las estructuras virales de los estados tempranos del ciclo del virus rábico.

En nuestros resultados se pudo observar que el virus rábico penetra a las células por la parte plana, lateral o redondeada, siendo la parte plana la forma más común de penetración.

El haber observado un buen número de fagosomas en el citoplasma de las células infectadas demuestra que la célula está respondiendo a la penetración de las partículas virales. En estudios realizados en células BHK (González 7) sin infectar con virus fue raro encontrar lisosomas y fagosomas.

También pudimos observar partículas radiales infectando células. Estas han sido descritas como partículas virales que infectan células BHK (9). En un estudio realizado sobre el virus de la coriomeningitis infecciosa estas partículas tienen un efecto potencializador sobre la multiplicación viral. En el presente estudio, debido al corto período de infección, no hay asociación.

Para lograr una mejor preservación de los cultivos celulares se utilizó glutaraldehído, que es un aldehído de cinco carbonos de una estructura relativamente simple. El glutaraldehído estabiliza las proteínas y preserva en gran parte la actividad enzimática, por lo que se pueden llevar a cabo estudios de citoquímica de alta resolución. Además tiene la ventaja de que se pueden utilizar fragmentos de tejido relativamente grandes.

7.- C O N C L U S I O N

El virus rábico penetra preferentemente por la parte plana, ocasionalmente lo hace por la porción redondeada.

El utilizar bajas dosis de virus rábico nos permite hacer una evaluación de los eventos tempranos del ciclo del virus rábico, sin provocar excesivo daño celular.

Con la fijación in situ se evitan daños químicos y físicos a las células.

Para poder hacer una evaluación más representativa de los estados tempranos del ciclo viral, es necesario hacer un estudio comparativo de las diferentes cepas de virus rábico, las adaptadas a cultivos celulares como las cepas de virus de calle.

8.- R E F E R E N C I A S

- 1.- Atanasiu, P., Lepine, P., Sisman, J., Danguet, M.G., Wetten, M.: Etude Morphologique du virus rabiques des rues en culture de Tissue. C.R. Acaddes Sci. 256: 3219-3221, 1963.
- 2.- Brinkley, B.R., Murphy, R., Richardson, K.C.: Procedure for embedding in situ selected cells cultured in vitro. J. Cell Biol 35: 279-283, 1967.
- 3.- Hagan, W.A. y Bruner, D.W.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Prensa Médica Mexicana. 3a. reimpresión 1977.
- 4.- Hernández-Baumgarten, E.: Comparative electron microscope studies of the virus cell interactions associated with several tissue culture adapted strains of rabies virus. Dissertation submitted in partial satisfaction to the requirements for the degree of Doctor in Philosophy in comparative Pathology, University of California, Davis Sep. 29, 1971.
- 5.- Hernández-Baumgarten, E.M.: La rabia pareasante bovina: Definición del problema y metodología de control en Ciencia Veterinaria. Vol. I Editado por R. Moreno Chan. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 104-131, 1976

- 6.- Hernández-Baumgarten, E.: Morfología, Morfogénes y crecimiento en cultivos celulares del virus rábico. En Ciencia Veterinaria. Vol. 2, Editado por R. Moreno Chan, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1-36, 1978.
- 7.- Hernández-Jáuregui, P., González-Vega, D., Ayala-Lagos, F., Cruz-Lavín, E., Hernández-Baumgarten, E.: Rabies replication pattern at low viral multiplicity. An in vitro ultrastructural and immunofluorescent study. Arch. Inv. Méd. (en prensa)
- 8.- Hummler, K., Koprowski, H., Wiktor, T.J.: Structure and development of rabies virus in tissue culture. J. Virol. 1: 152-170, 1967.
- 9.- Iwasaki, Y., Wiktor, T.J., Koprowski, H.: Early events virus replication in tissue cultures. An electron microscopic study. Lab. Invest. 28: 142-148, 1973.
- 10.- Mac Pherson, I., Stoker, M.: Polyoma transformation of hamster Cell clones. An investigation of genetic factor affecting cell competence. Virology 16: 147-151, 1962.
- 11.- Murphy, F.A.: Morphology and Morphogenesis. In the Natural History of rabies. G.M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 33-62, 1975.

- 12.- Reynolds, E.: The use of lead Citrate at High pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 298-313, 1963.
- 13.- Watson, M.L.: Stain of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Citol. 4: 175-178, 1958.
- 14.- Wiktor, T.J. and Clar, H.F.: Growth of rabies virus in cell culture. In the Natural History of Rabies, G.M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 155-180, 1975.