



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE REPLICACIÓN IN VITRO
DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOCENISTA

PRESENTA

MARICELA FAJARDO VÁZQUEZ

ASESOR

DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE



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.

Agradecimientos

A mis padres Eliza Vázquez López y Mario Fajardo Verónico por brindarme su apoyo, consejos y esfuerzo diario para hacer realidad este sueño, también a mis hermanos Alejandro, Teresa, Juan y Alberto por ser parte vital en mi vida y constante desarrollo ya que por ellos estoy aquí. A Alan y a mi pequeño tesoro Alizze que es el principal motivo en la vida que me impulsa a seguir adelante. A mi tía Leticia y primos que están conmigo a cada paso deseándome lo mejor para la vida.

A la UNAM por haberme aceptado en sus filas de estudiantes que con orgullo podemos decir que formamos parte de ella y a la cual agradezco haberme brindado a los mejores maestros a lo largo de mi estancia dentro de sus aulas.

A mis queridos asesores: Carlos Ignacio Soto Zarate y Gerardo García Tovar por su gran tolerancia y entrega para terminar la presente tesis, ya que no solo fueron unos asesores también fueron y serán parte de mi vida a lo largo de mi camino.

A todos los profesores de la FES que me brindaron sus grandes conocimientos, amistad y gran experiencia para llegar a finalizar mis estudios de licenciatura, mil gracias a todos. Al jurado asignado por la paciencia requerida y orientación que me dieron para mejorar este trabajo.

A todos mis amigos que fueron y siguen siendo parte de mi vida hasta hoy, pero sobre todo a Erika que estuvo a lo largo de este trabajo. Gracias amiga te lo agradeceré siempre.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Cátedra de Investigación “Morfología veterinaria y biología celular” (Clave PACIVE GVC-10) y de la Cátedra de Docencia “Mejoramiento de la enseñanza de la asignatura de Biología Celular para la carrera de Médico Veterinario Zootecnista” (Clave PACIVE CD-05).

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Justificación	11
Objetivos	12
Material y métodos	13
Resultados	15
Discusión	23
Conclusiones	26
Bibliografía	27

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la capacidad del virus de distemper canino para proliferar en diferentes líneas celulares, a saber; VERO, MDCK, células de linfoma de ratón, PK15 y RK13. Es importante señalar que las dos primeras ya se han utilizado previamente en estudios *in vitro*, mientras que las restantes se probaron por primera vez para ver si son viables para desarrollar en ellas un modelo de infección *in vitro*. El virus que se utilizó en este trabajo provino de un brote de campo ocurrido en la FESC en el 2005. En todos los experimentos realizados siempre se manejo cultivos dobles con exposición al virus de distemper canino y otros dos sin exposición (cultivo control) para cada línea celular, se observaron diariamente con el fin de detectar la presencia de algún efecto citopático, se anotaron los hallazgos y se realizó el registro fotográfico de los mismos. Producto del desarrollo del ciclo viral se hizo visible los diferentes efectos citopáticos, como; la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas, formación de cúmulos, fusión de membranas y finalmente formación de sincitios, estos efectos fueron muy similares en las diferentes líneas celulares estudiadas, sin embargo el tiempo empleado por el virus para desarrollarlos fue diferente en cada una de ellas. En todos los casos se comprobó la presencia del virus por medio de inmunofluorescencia directa. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede señalar que las líneas celulares estudiadas son útiles para desarrollar modelos de infección *in vitro* con el virus de distemper canino ya que éste fue capaz de desarrollar adecuadamente su ciclo viral. Sin embargo, es importante comentar que a pesar de los buenos resultados obtenidos la línea de linfoma de ratón es la que más dificultades presentó ya que, a diferencia de las otras líneas, estas células crecen en suspensión, mientras que el resto forman una monocapa sobre el sustrato. Al determinar que estas líneas celulares son útiles para realizar experimentos *in vitro* con el virus de distemper canino se logra aumentar las herramientas experimentales que pueden ser utilizadas al realizar estudios sobre el ciclo viral, modelos de infección y la biología celular del virus de distemper canino.

INTRODUCCIÓN

El distemper canino (moquillo canino o enfermedad de Carré) es una enfermedad producida por un Paramixovirus del género morbillivirus que fue aislado por primera vez en 1905 por Henri Carré. Esta enfermedad afecta a canideos, procinideos (mapaches) y mustélidos (hurones y visones) (1, 2). Asimismo se ha señalado que puede afectar a gatos, en donde aún no es clara la patogenia (2). Está estrechamente relacionado, antigénicamente hablando, con el virus del sarampión humano, peste bovina y paramixovirus de algunos mamíferos marinos (3,4, 5).

Se sospecha que el virus del distemper canino (VDC) es originario del continente americano, en 1735 se observaron los primeros casos en América del Sur, donde los perros sufrían de una enfermedad llamada “Peste varióle”, de este continente pasó a Europa a través de España (6).

Del conjunto de enfermedades que pueden ocasionar la muerte en los perros, el VDC fue, durante la primera mitad del siglo XX, una de las más extendidas en todo el planeta. Pero esta situación cambió en forma notoria a partir de la década de los 60's cuando comenzaron a utilizarse las primeras vacunas de virus vivo modificado, que reemplazaron a aquellas de virus inactivados que hasta entonces no habían podido controlar la enfermedad (7). No obstante, luego de algunos años de mantener al VDC bajo control comenzó a aumentar otra vez su incidencia, probablemente debido a desaciertos en la vacunación o a una inmunización deficiente, aunando a la diversidad genética de VDC o por evasión inmune de los perros vacunados (8).

Si bien desde el punto de vista microbiológico se acepta que existe un solo serotipo de VDC hay diferencias marcadas en cuanto a la patogenicidad que presentan las diferentes cepas aisladas. Algunas de éstas, como la Snyder Hill, A75/17 y R252 son altamente virulentas y neurotrópicas, mientras que la primera causa poliencefalomielitis, las dos últimas provocan desmielinización (9).

Epidemiología

Los animales infectados eliminan el virus por todas las secreciones y excreciones corporales, aunque para la transmisión del virus los aerosoles son los más importantes. La eliminación viral cesa de 1 a 2 semanas después de la recuperación, por lo tanto la fase de portador no es un gran problema. Si bien el VDC ataca a los perros de todas las edades son particularmente vulnerables los cachorros de entre tres y seis meses, momento que se correlaciona con la pérdida de los anticuerpos maternos luego del destete (10).

Aunque la inmunización al VDC es prolongada, no es lo suficientemente sólida para toda la vida. Los perros que no reciben inmunizaciones periódicas pueden perder su protección e infectarse después de un evento de estrés, inmunosupresión o por entrar en contacto con animales enfermos (9).

Patogénesis

Una vez que el virus ingresa al organismo del perro, a través de sus vías aéreas superiores, los macrófagos lo ingieren y durante las 24 horas siguientes es transportado por la linfa hasta los

linfonodos (10). Se multiplica primero en el tejido linfoide del aparato respiratorio (nódulos linfoides tonsilares, faríngeos y traqueobronquiales) y de ahí el virus se disemina al resto de los tejidos linfáticos corporales en los que su multiplicación viral dura de 2 a 6 días. La proliferación del VDC en estos sitios provoca la marcada linfopenia que presentan los perros infectados a causa del daño que provoca este virus en las células linfoides y que afecta tanto a las células T como a las B. Después de esto prosigue la viremia del día 6 al 9. Al final de esta fase sucede el epiteliotropismo y neurotropismo; del día 9 al 14 el huésped puede mostrar recuperación, enfermedad multisistémica grave o localización del VDC en el sistema nervioso central(SNC). Si la respuesta inmunológica falla el resultado es una diseminación rápida del virus a los epitelios, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y, por último, al sistema nervioso central (SNC). Si la respuesta inmunológica es tardía o débil se evitan los signos multisistémicos y se da la infección tardía del SNC ocasionando encefalomiélitis crónica con retraso de los signos neurológicos (11, 12). Su excreción se realiza por medio de exudados respiratorios, heces, saliva, orina y secreciones conjuntivales durante los 60 a 90 días después de la infección natural (10).

Signos clínicos

Estadio vírico

Los perros jóvenes sin vacunar por lo general desarrollan una enfermedad generalizada grave en la cual al inicio puede haber signos no neurológicos evidentes incluyendo secreción oculonasal, tos, disnea, vómito y diarrea. Los signos neurológicos comienzan de 1 a 3 semanas después de la recuperación de la enfermedad sistémica y puede incluir hiperestesia, rigidez cervical, convulsiones, tetraparesia y ataxia. También si son afectados durante la dentición permanente, se notará la hipoplasia del esmalte (decoloración parda) de los dientes. Los adultos experimentan un síndrome neurológico de subagudo a crónico caracterizado primariamente por tetraparesia progresiva en ausencia de anormalidades sistémicas (10).

Los primeros signos aparecen al mismo tiempo que el ascenso febril inicial. Los animales afectados están apáticos o rechazan los alimentos. Las tonsilas palatinas están enrojecidas e inflamadas, la conjuntiva y la mucosa nasal presentan inflamación catarral, también encontramos gastritis, enteritis y vómito. A los pocos días se normaliza la temperatura corporal (24 a 48 hrs) y mejora el estado general y el apetito. Siempre se encuentra leucopenia inicial que va seguida de leucocitosis, neutrofilia y linfopenia. Las alteraciones de las vías circulatorias terminales originan lesiones degenerativas e inflamatorias en los órganos. El virus se multiplica y tras un breve intervalo apirético, se produce el segundo ascenso febril con linfocitosis y monocitosis. La acción del virus debilita el sistema inmune y facilita así la acción de organismos secundarios que ocasionan síntomas generales como; fiebre, tos, diarrea, etc. (10, 11, 12).

Estadio secundario

El paciente tiene una segunda fase de fiebre de duración variable; los síntomas se pueden asociar con infecciones secundarias (estafilococos, estreptococos, salmonelas, etc.). La rinoconjuntivitis se hace mucopurulenta, los animales presentan fotofobia y la córnea luce escarificada y turbia. Las úlceras corneales pueden causar estafiloma y panoftalmia. El pelo se torna mate y erizado. Son posibles los exantemas y pústulas (impétigo), sobre todo en el

vientre bajo y en los conductos auditivos. La punta de la nariz se agrieta y muestra depósitos hiperqueratósicos que se desprenden más tarde. Los síntomas respiratorios se pueden complicar aún más que en el primer acceso febril y terminar en una bronconeumonía como resultado de la asociación con bacterias. El aparato digestivo está casi siempre implicado y en él se presentan los siguientes síntomas; anorexia, vómito y diarrea. El VDC causa lesiones en el esmalte si la infección ocurre durante el cambio de dentición, dejando depresiones punteadas en forma de alveolos o surcos de color pardo que representan la hipoplasia del esmalte (13, 14).

En el aparato urinario se observa nefritis, con albuminuria, acetonuria, pigmentos biliares y excepcionalmente hematuria. Los trastornos nerviosos aparecen poco después de mejorar el estado general y consisten en embotamiento psíquico, somnolencia o estados de excitación con aullidos sin motivo aparente y aumento de la agresividad, mioclonias o parálisis del tren posterior. Generalmente, los perros que desarrollan hiperqueratosis nasal y plantar son los que presentan diversas complicaciones neuronales (6, 9, 10).

Curso de la enfermedad

El curso del distemper canino generalmente se presenta en tres distintas formas; agudo, subagudo o crónico, y también según los síntomas que predominen puede ser catarral, gástrico, respiratorio, neumónico y/o nervioso.

Aguda

Es la forma más común. El periodo de incubación normalmente es de 7 a 14 días. Entre los 3 a 7 días, se presenta fiebre y leucopenia que casi siempre pasan inadvertidas. La fiebre disminuye durante algunos días hasta que se desarrolla una segunda fase febril, que normalmente va acompañada de conjuntivitis, rinitis y anorexia. Posteriormente se presentan los signos gastrointestinales y respiratorios como tos, diarrea, vómitos, anorexia, deshidratación y pérdida de peso. Con frecuencia las infecciones bacterianas secundarias complican este cuadro (15).

Subaguda

Los signos del SNC pueden desarrollarse a partir de la enfermedad sistémica como una encefalomiелitis aguda. La presentación neurológica incluye; contracciones bruscas involuntarias de un músculo o grupo de músculos, parálisis que comienza a menudo en los miembros pelvianos (ataxia), convulsiones, sialorrea, movimientos masticatorios, movimientos de pedaleo de los miembros, micción involuntaria y/o defecación, hiperestesia, vocalización y reacciones de miedo.(15)

Dependiendo de la severidad de la infección, todos o ninguno de los signos neurológicos pueden ser evidentes. Después de la recuperación del distemper agudo o de una presentación inaparente, los trastornos neurológicos pueden tardar en presentarse algunas semanas o hasta meses. Puede verse hiperqueratosis en las almohadillas plantares y en la nariz (15).

Crónica

La encefalitis crónica del perro viejo es un desorden progresivo que afecta usualmente a perros mayores de 6 años. Se presenta con ataxia, movimientos en círculo, presión de la cabeza contra objetos y cambios en la personalidad (no hay respuesta a estímulos externos o no reconoce a los dueños). La persistencia del virus en el SNC produce una reacción inflamatoria que induce una encefalitis crónica. La forma crónica la constituye el virus instalado en el SNC como consecuencia de un curso espontáneo de la enfermedad en la que el animal afectado no recibió atención veterinaria oportuna. En este caso se presentan lesiones de tipo degenerativo, que se manifiestan por espasmos tónico-clónicos, paraplejias, hemiplejias, parálisis de los miembros pelvianos y a veces, de los miembros torácicos, ataques epilépticos, alucinaciones, etc., a consecuencia de lo cual se desarrolla un estado caquético que conduce a la muerte. Es importante señalar que estos animales ya no tienen la capacidad de infectar a otros animales (6, 9, 15).

Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas que presenta el animal con el VDC generalmente aporta suficiente información para permitir en la práctica veterinaria arribar a su diagnóstico sin la ayuda de pruebas de laboratorio complementarias (9, 12, 16).

El análisis hematológico de un perro con VDC revela linfopenia y trombocitopenia como anormalidades constantes (10). Es posible realizar el aislamiento viral de sangre, excreciones y secreciones, nódulos linfáticos, hígado, bazo y pulmones durante la fase aguda de la enfermedad y, puede aislarse, asimismo del cerebro en perros con manifestaciones clínicas nerviosas. Con frecuencia se encuentran inclusiones intracitoplásmicas en frotis conjuntivales teñidos (4).

La prueba de ELISA para la detección de inmunoglobulina G (IgG) e IgM séricos contra el virus plantea el inconveniente de no permitir diferenciar si los anticuerpos son vacunales, de una exposición previa o si corresponden a la enfermedad actual y la IgM aparece como resultado de una infección o vacunación reciente (9, 12, 17).

Una alternativa plausible del diagnóstico precoz y confiable de VDC es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite detectar la proteína de la nucleocápside viral (NP) y puede resultar positiva aún cuando las pruebas de aislamiento y de inmunocitoquímica no logren detectar al virus. Es un buen método para el diagnóstico temprano en perros no vacunados recientemente. Un resultado positivo de PCR nos indica, casi sin margen de error, que el ARN del agente está presente en el animal y si está el ARN, la infección es segura esto se logra cuando el ARN por medio de ARNT pasa a DNA y así se logra leer el PCR (15, 18).

Tratamiento

No existe en la actualidad ningún medicamento antiviral específico contra el VDC por lo tanto el tratamiento es sintomático, inespecífico y de sostén, recomendándose la administración de antibióticos de amplio espectro, terapia de fluidos, antivirales no específicos, antineuríticos, en

ocasiones se han utilizado tranquilizantes para evitar las convulsiones, con este tratamiento un bajo porcentaje de animales llegan a recuperarse. Algunos investigadores han obtenido resultados favorables administrando corticosteroides por corto tiempo, ya que el tratamiento prolongado está contraindicado debido a su efecto inmunodepresor. Se ha reportado la existencia de algunos "remedios" cuestionables, por ejemplo altas dosis de ácido ascórbico o la inhalación de éter, pero ninguno de ellos ha sido probado bajo condiciones científicas y controladas, por lo que no existe evidencia de su efectividad (10,19).

Los agentes microbianos como ya se dijo están indicados se puede administrar ampicilina de 10 a 20 mg/kg vía intravenosa cada 6 a 8 horas por 5 días y alternativamente enrofloxacin 50 mg /kg cada 24 horas vía oral en los mayores de seis meses de edad esta última, la metroclopramida .2 a .4 subcutánea cada 8 horas, también si es de la elección del medico se puede administrar antiespasmódicos narcóticos (17).

Control y prevención.

Los perros infectados son la principal fuente de diseminación del virus por lo que deben ser separados de otros caninos. El programa de vacunación de cachorros contra VDC debería incluir una combinación de virus modificados de virus heterotípico; virus de sarampión – virus de distemper canino (VS-VDC) a las 8 semanas de edad. Luego, dos revacunaciones con VDC separadas por 4 semanas y una revacunación anual, ya que puede haber pérdida de anticuerpos debido a variaciones de las vacunas o del huésped. Cualquier vacuna del tipo modificado puede ser fatal para otros animales salvajes y de zoológico (por ejemplo; pandas rojos o hurones de patas negras). Los cachorros que no han ingerido calostro no deben vacunarse con vacunas que contengan virus vivo modificado antes de las 4 semanas de edad, ya que puede producir encefalitis postvacunal, así como en ciertos animales salvajes y algunas especies de zoológico. Para este grupo de animales deben utilizarse vacunas de virus inactivado. La inmunización con el virus de sarampión (VS) induce una inmunidad limitada que puede proteger a los perros contra la enfermedad del moquillo. También existen vacunas recombinantes y vacunas de ADN (por ejemplo; vaccinia, poxvirus de canario, adenovirus o baculovirus) que son adecuadas para ser utilizadas en perros. Como insertos se utilizan los genes que codifican para las proteínas H y F, que producen una inmunidad protectora (20).

La virología y el cultivo celular

El cultivo celular es el arte de crecer células *in vitro*. El cultivo celular permite estudiar a las células en su ambiente y como un todo antes de ver lo intrincado de sus componentes. El cultivo celular es una herramienta importante para desarrollar los métodos de la biología celular y molecular, áreas del conocimiento que rompen las fronteras tradicionales entre la biología y la virología (21).

Al inicio del siglo XX el cultivo celular fue concebido como un método para estudiar el comportamiento de las células animales libres de variaciones sistémicas que pudieran originarse *in vivo* tanto durante la homeostasis normal o bajo el estrés de un experimento. El desarrollo del cultivo celular se debe mucho a las necesidades de dos ramas importantes de la investigación médica; la producción de vacunas antivirales y el entendimiento de las

neoplasias. La estandarización de las condiciones y de las líneas celulares para la producción y ensayo con virus sin duda proveyó mucho ímpetu al desarrollo de la moderna tecnología del cultivo celular, particularmente en la producción de grandes números de células disponibles para análisis bioquímicos (22).

El cultivo de células animales en el laboratorio fue inicialmente más un arte que ciencia, y estuvo restringido a células crecidas de órganos o tejidos mantenidos en soluciones nutritivas bajo condiciones estériles. La duración finita de la vida de esos cultivos primarios, su dependencia de medios naturales como linfa, plasma o extractos de embrión de pollo y la contaminación con bacterias, micoplasmas y hongos, inicialmente hicieron el trabajo con cultivos extremadamente difícil. Por esta razón, la mayoría de los virus eran crecidos en animales de laboratorio (23).

El trabajo de muchos investigadores llevó a una serie de avances metodológicos importantes. Estos incluyeron el desarrollo de medios definidos óptimos para el crecimiento de células mamíferas, incorporación de antibióticos en los medios de cultivo y el desarrollo de líneas inmortales. Estos avances permitieron el crecimiento de células animales en cultivo hasta llegar a ser una metodología reproducible y de rutina (23).

El desarrollo de las técnicas y metodologías que hicieron realidad el establecimiento de los cultivos celulares abrieron la posibilidad de realizar estudios *in vitro*, estos estudios han abarcado diferentes campos de la biología, pero han sido particularmente importantes para impulsar el estudio de los virus, debido a las ventajas prácticas y económicas que presentan en contraposición a los estudios realizados en un animal vivo (22).

En 1949, John Enders, Thomas Weller y Frederick Robbins hicieron el descubrimiento de que poliovirus podía multiplicarse en cultivos celulares de células de origen no neuronal. Este hallazgo revolucionario, por el cual estos tres investigadores recibieron el premio Nobel en fisiología o medicina en 1954, condujo a la propagación de muchos otros virus en cultivos celulares, el descubrimiento de nuevos virus humanos (adenovirus, sarampión y rubéola) para los cuales no había huéspedes animales y el desarrollo de vacunas virales. La capacidad de infectar cultivos de manera sincrónica permitió la realización de estudios bioquímicos y de biología molecular de la replicación viral. Se puede señalar que la tecnología de los cultivos celulares revolucionó la capacidad para investigar la replicación de los virus, esto es, los ciclos virales podían ser estudiados bajo condiciones controladas (23).

En la actualidad el cultivo celular es aún el método más común para la propagación de virus, por encima de otros métodos como son; animales de laboratorio, huéspedes naturales y/o huevos embrionados (23).

Evidencia de crecimiento viral en los cultivos celulares.

Algunos virus matan a las células en las cuales se replican y las células infectadas pueden eventualmente desprenderse de la placa de cultivo. Conforme más células están infectadas, los cambios llegan a ser evidentes y son llamados efectos citopáticos (ECP). Muchos tipos de efectos citopáticos pueden ser vistos con un simple microscopio de luz. Estos cambios

incluyen el redondamiento y desprendimiento de las células de la placa, lisis celular, hinchazón del núcleo y, algunas veces, formación de células fusionadas llamado sincitios. Otros ECP requieren la observación con microscopio de alto poder. Estos incluyen el desarrollo de masas intracelulares de viriones o de componentes virales no ensamblados en el núcleo y/o citoplasma (cuerpos de inclusión), formación de arreglos cristalinos de proteínas virales, unión y duplicación de membranas y fragmentación de organelos. El tiempo requerido para el desarrollo de la citopatología varía grandemente entre los virus animales. El desarrollo de los ECP en las células infectadas es frecuentemente monitoreado en virología diagnóstica durante el aislamiento de los virus de especímenes obtenidos de pacientes o animales infectados. Sin embargo, el ECP es también de valor en el laboratorio de investigación; puede ser usado para monitorear el progreso de una infección y es con frecuencia una de las características fenotípicas por las cuales los virus mutantes son caracterizados. Un ECP que caracteriza a los Paramyxovirus es que causan fusión celular (sincitios). Asimismo, algunos virus se multiplican en células sin causar ECP obvios (23,21).

Cultivos celulares

El crecimiento normal de las células en cultivo permite la formación de una monocapa que llega a cubrir la superficie total del recipiente (confluencia), cuando esto ocurre su multiplicación es inhibida debido al contacto que se presenta entre las células (quiescencia). Los recipientes para realizar el cultivo de células son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (Roux), botellas, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado. Su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realiza con enzimas proteolíticas como la tripsina (24,25).

Cultivos primarios

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares, a saber; conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, son diploides ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y presentan la inhibición por contacto. El hecho de estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida. (25).

Líneas Celulares

Las líneas celulares están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células derivadas de tumores o de un proceso de transformación. Este tipo de cultivo tiene la característica de no mostrar inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación (25, 26).

Desarrollo del ciclo viral

El virus de distemper canino tiene una envoltura membranosa que rodea a la su nucleocápside. Esta envoltura se deriva de la membrana celular de la célula huésped pero contiene proteínas virales. Estas proteínas virales están involucradas en la unión del virion a los receptores de la

célula huésped y frecuentemente forman proyecciones desde la superficie de la envoltura. Estas proteínas parecen compartir características estructurales en los diferentes virus. En contraste, la naturaleza de los receptores de la célula huésped reconocidos por estos virus es bastante variada (27,28,FIG1).

Los paramyxovirus (como el VDC) usan a los carbohidratos como moléculas de reconocimiento en las células huésped, las glicoproteínas de su envoltura reconocen un grupo de glicolípidos que contienen ácido N-acetilneuramínico en la membrana plasmática del huésped. Así, entran en su huésped por fusión directa de su envoltura con la membrana plasmática. En estos virus, la unión y penetración son actividades separadas y mediadas por diferentes proteínas de la envoltura. Por ejemplo, el virus de distemper canino tiene dos glicoproteínas H (hemoaglutinina) y F (proteína de fusión) y penetran a la célula huésped por receptores de membranas específicos para cada una de ellas (27,28 FIG 1).

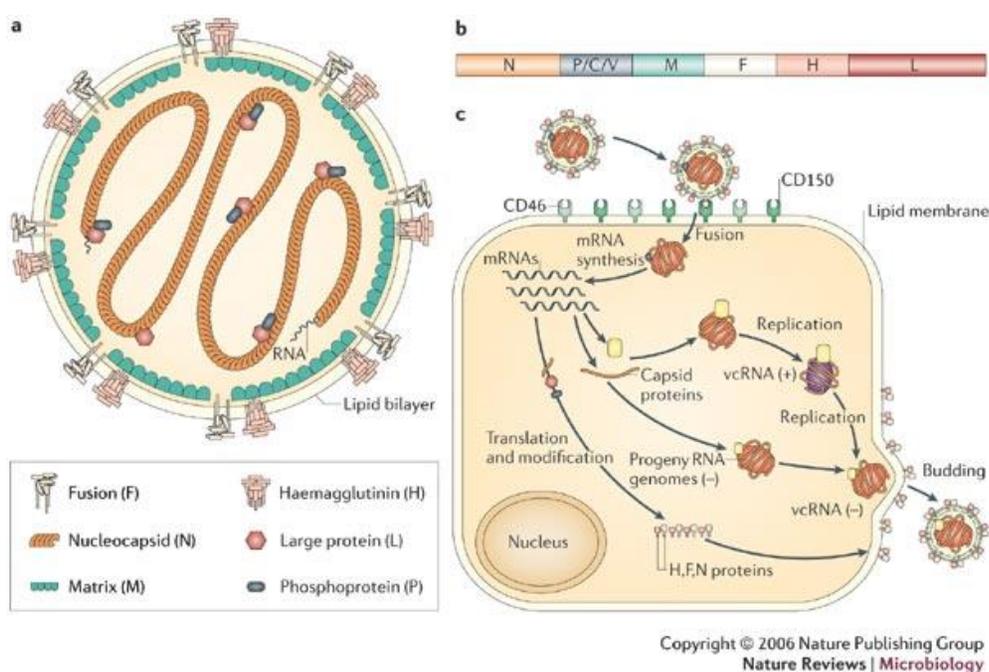


FIG 1. Representación esquemática del ciclo viral del virus de distemper canino (VDC)

Para este virus, el paso final en la penetración, es el transporte del genoma viral o nucleocápside a la membrana nuclear y la introducción del ácido nucleico viral dentro del núcleo vía los poros nucleares. El VDC replica su genoma y hace ARN mensajero en el núcleo. Mientras que los detalles son incompletos para la mayoría de los virus, las principales características de este proceso pueden ser descritas dado que están basadas en el fenómeno general de transporte dirigido de proteínas desde el citoplasma al núcleo. Así, la cápside es transportada a lo largo de los microtúbulos a una posición acoplada a un poro nuclear. Después del adosamiento, la cápside termina desensamblándose y el ARN viral y las proteínas asociadas son llevadas a través del poro dentro del nucleoplasma (27, 28,29,FIG1).

El genoma de los virus ARN cadena negativa (como el VDC) no puede ser traducido directamente ya que para que esto suceda requiere ser copiado en su molécula

complementaria, pero esta reacción requiere una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual sólo es transcrita por la molécula de ARN viral. La solución a esta aparente paradoja es simple. Dado que todos los virus ARN cadena negativa requieren de la presencia de una ARN replicasa antes de que puedan expresar su genoma, todos ellos empaquetan junto con su genoma las ARN replicasas necesarias. Las replicasas de los virus ARN cadena negativa deben catalizar tres reacciones durante el ciclo de replicación viral: 1) síntesis de ARNs mensajeros del genoma, 2) síntesis de una molécula completa de ARN cadena positiva anti-genoma complementaria al genoma, y 3) síntesis de un nuevo ARN genómico cadena negativa usando la molécula de ARN anti-genómico como molde. La maduración de los virus envueltos, generalmente requiere cuatro pasos. El primero, es la síntesis e inserción de las proteínas y glicoproteínas virales en las membranas del huésped. Este proceso usa la vía secretoria normal de la célula, pero involucra la traducción de ARNs mensajeros virales en lugar de ARN mensajeros de la célula huésped. Notar que la fusión de una vesícula portando glicoproteínas virales crea una nueva área de membrana y en el proceso desplaza a la membrana existente y sus componentes. Las reacciones del segundo paso ensamblan la nucleocápside viral. El tercer paso prepara para el proceso de exocitosis juntando a la nucleocápside y la membrana modificada. El paso final es la formación de un virión envuelto por gemación (27,28,29,FIG1).

En los paramyxovirus una proteína de matriz (M) es requerida para una maduración adecuada. Las proteínas M se asocian con la superficie interna de la membrana plasmática en proximidad a las proteínas de envoltura. La interacción de las proteínas de la nucleocápside con las proteínas M inicia la formación de las gemas. Muchos paramyxovirus se reproducen muy pobremente en cultivos celulares, de tal forma que no son bien comprendidos detalles de sus mecanismos de transcripción y replicación. Sin embargo parecen usar las mismas estrategias descritas previamente para producir ARN mensajeros monocistrónicos de cada gen y hacer una copia completa de su genoma (27,28,29).

Actualmente se están realizando múltiples esfuerzos con el fin de generar modelos adecuados en los cuales realizar estudios *in vitro* con el VDC. Así tenemos que un grupo de investigación realizó la transfección de células A-72 (Fibroblasto de tumor adherente de perro) y CRFK (Células epiteliales de riñón de gato) con la Molécula de Señalización y Activación Linfocítica (SLAM, por sus siglas en inglés), que es un receptor del VDC, con ello lograron que el virus creciera rápidamente y produjera varios sincitios en las células que expresaban el SLAM. Estas células recién establecidas con la expresión del SLAM canino ayudarían a realizar análisis virológicos y serológicos de distemper canino (30,31,32,33).

Otro grupo de investigadores estudiaron la infección *in vitro* por VDC mediante un modelo de cultivos de células disociadas del hipocampo de una rata recién nacida y un VDC recombinante estrechamente relacionado con la cepa neurovirulenta A75/17, que adicionalmente expresa a la proteína verde fluorescente. Con este modelo reportan que las neuronas y astrocitos infectados pueden ser claramente detectados (31,32,33, 35,36,37).

JUSTIFICACIÓN

Para realizar estudios *in vitro* con el virus del VDC se han utilizado de manera preferencial células VERO(Células de riñón de mono verde) y en menor proporción células MDCK(Células de riñón de perro), pero no se han explorado otras líneas celulares y, por otra parte, existen pocos estudios en los que, de manera comparativa, se evalúe el comportamiento del virus en relación con la línea celular utilizada.(30)

Para el desarrollo de este trabajo se eligieron dos líneas celulares en las que ya se ha desarrollado el crecimiento del virus de distemper canino (VERO y MDCK) y se comparó el tiempo transcurrido para la aparición de los efectos citopáticos y sus características, con los hallazgos encontrados en líneas celulares aún no exploradas (PK15(Células de riñón de cerdo), RK13(Monocapa epitelial de riñón de conejo) y linfoma de ratón).(30)

Se evaluará la posibilidad del desarrollo de la infección en estas líneas celulares considerando que PK15 y RK13 son derivadas de riñón, igual que VERO y MDCK. Por otra parte es bien conocida la afinidad del virus de DC por los linfocitos razón por la cual se utilizaron las células de linfoma de ratón. Los datos generados permitirán ver los efectos causados por el VDC y señalar la factibilidad de realizar estudios *in vitro* con estas líneas celulares estudiadas, con ello se ampliarán las herramientas metodológicas aplicadas al estudio de este virus sobre todo a nivel de la biología celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Inducir y comprobar la infección del virus de Distemper Canino en cinco diferentes líneas celulares con el fin de determinar los efectos y tiempo de la infección.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener y mantener las líneas celulares que serán utilizadas en este estudio.
- Inducir la infección viral de DC en las líneas celulares VERO, MDCK, RK13, PK15 y Linfoma de ratón.
- Comprobar la presencia del virus de DC mediante inmunofluorescencia directa.
- Describir los efectos causados por el VDC en las diferentes líneas celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para la realización de este trabajo se utilizaron cultivos de las siguientes líneas celulares; VERO, MDCK, RK13, PK15 y Linfoma de ratón, para cada línea se cultivaron dos controles y dos cajas de cultivo infectadas y se repitió dos veces más los mismos pasos en diferentes tiempos para corroborar los resultados, para la inmunofluorescencia se hizo un cultivo con dos controles y dos cajas infectada para cada línea celular. Estas células fueron mantenidas en DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), a 37°C y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro.

Virus

El virus usado provino de un brote de campo ocurrido en la FES Cuautitlán y aislada a partir de un macerado de bazo, que fue filtrado y, finalmente, usado para infectar un cultivo de células Vero, en el cual fue posible replicar el virus. El aislado viral fue titulado mediante un ensayo de infectividad y se determinó un título TCID₅₀ = 10^{2.92}

Infección

Para la infección se utilizó 10^{3.92} TCID₅₀/ml del aislado viral sobre dos cultivo con un 80% de confluencia, se dejó adsorber por una hora y posteriormente se agregaron otros 7 ml de medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Los cultivos fueron mantenidos en la incubadora hasta que el efecto citopático (ECP) fue evidente. Los cultivos infectados fueron observados diariamente al microscopio invertido y se hizo un registro detallado de los hallazgos con el fin de reportar la aparición y las características del ECP, así como el tiempo transcurrido. Una vez que el ECP fue detectado se realizó el registro fotográfico de los cultivos infectados y de los cultivos control. Para asegurar que los efectos vistos eran causados por el virus se repitió tres veces más la infección de los cultivos comparados con sus respectivos controles.

Inmunofluorescencia directa

Para realizar la inmunofluorescencia directa se usó cajas de cultivo infectadas con su respectivo control negativo y se añadió un anticuerpo de ratón anti-virus de DC conjugado con fluoresceína (VMRD, cat. 210-05-CDV) y DAPI 4'6'-Diamino -2-phenyldole. (colorante que se une al ADN y al exponerse a la luz se observan los nucleos color azul). Para ello, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos colocados dentro de una caja de cultivo de 10 cm de diámetro. Una vez que el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, algunos cultivos fueron infectados y otros no (cultivo control). En el momento en que el efecto citopático fue evidente, ambos grupos de cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) por 10 min a temperatura ambiente (TA), después de lo cual fueron lavados con PBS y bloqueados con una solución de albúmina (BSA) al 1%. Fueron permeabilizados con Triton-X-100 al 0.5% en PBS durante 15 minutos. Para la inmunofluorescencia directa, se colocaron 50 µl del anticuerpo conjugado con fluoresceína sobre los cultivos durante 30 min a

temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de lavar con PBS, se enjuagó con un amortiguador recomendado por el fabricante del anticuerpo (carbonato de sodio 107.5mm, bicarbonato de sodio 400mm, cloruro de sodio 145.5 mm en 100 ml de agua destilada estéril). Al final, los cubreobjetos fueron montados sobre un portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Sc 24941 (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se hizo la observación al microscopio de fluorescencia y se tomó el registro fotográfico.

Cultivo de las células de linfoma

La característica primordial de esta línea celular es su crecimiento en suspensión, por lo que el manejo de los cultivos y la preparación con el anticuerpo se hizo de manera distinta a las otras líneas celulares. Para fijar tanto a las células infectadas como a los cultivos control, se hizo la centrifugación de las células (4500 rpm por 5 min), se eliminó el sobrenadante y las células fueron fijadas en suspensión con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, fueron lavadas con PBS y debieron ser centrifugadas durante cada lavado, enseguida se dejaron con tritón al 0.5% durante 10 minutos y se lavaron con PBS, fueron expuestas a la albumina 1% por 20 min y se lavaron con PBS. Finalmente se colocaron 500µl sobre un portaobjetos y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia Sc24941 (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se hizo la observación al microscopio de fluorescencia y se tomó el registro fotográfico. Es importante señalar que estas células fueron amablemente proporcionadas por el Dr. J. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

RESULTADOS

1. Replicación del virus de Distemper Canino en células VERO

Con el fin de determinar el ECP y el tiempo transcurrido para su aparición, se inoculó un cultivo de células VERO con este virus y se permitió que se desarrollara el ciclo. Para documentar la progresión de la infección, los cultivos infectados fueron mantenidos en observación hasta que el ECP se hizo evidente. El primer efecto notable lo registramos al cuarto día postinfección (P.I.) y fue la presencia de una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma de estas células. Al séptimo día P.I. notamos la presencia de grandes sincitios celulares (Figura 1), resultado de la fusión de las membranas plasmáticas de células vecinas. Al noveno día se observó la presencia de células con forma estrellada o dendrítica (Figura 2). Asimismo encontramos una gran cantidad de células con diferentes grados de afectación por el mismo tipo de ECP. Por su parte, la monocapa que no fue inoculada con el virus no mostró ningún efecto a la revisión microscópica (Figura 3).



Figura 1. Cultivo de células VERO infectado con el VDC al noveno día P.I. Se aprecia la formación de múltiples sincitios que en conjunto dan una apariencia estrellada . Microscopio invertido, 40×.

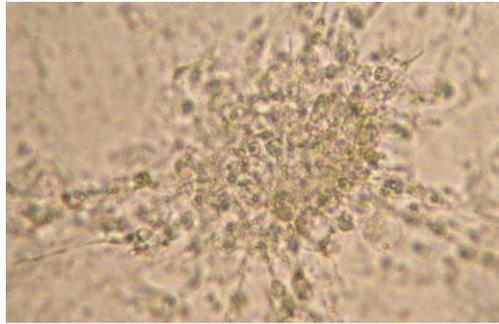


Figura 2. Células VERO infectadas con VCD al séptimo día PI. Las células se encuentran formando grandes cúmulos celulares donde es evidente la fusión de las membranas plasmáticas. Microscopio invertido, 250×.



Figura 3. Células VERO al noveno día de cultivo control negativo. No es posible observar la presencia de ningún tipo de efecto citopático. Microscopio invertido, 40×.

Con el fin de corroborar que los cambios celulares que se habían observado en estas células eran producto de la replicación del virus, se realizó su detección por inmunofluorescencia directa empleando un anticuerpo conjugado con fluoresceína. A la observación al microscopio de epifluorescencia se comprobó la presencia del virus en los cultivos infectados mediante la observación de áreas que emitían una señal de color verde (Figura 4), mientras que los controles negativos no mostraron dicha señal (Figura 5).



Figura 4. Cultivo de células VERO infectado con el VDC. Se demuestra la presencia del virus por zonas fluorescentes. Microscopio de epifluorescencia, 400 \times .

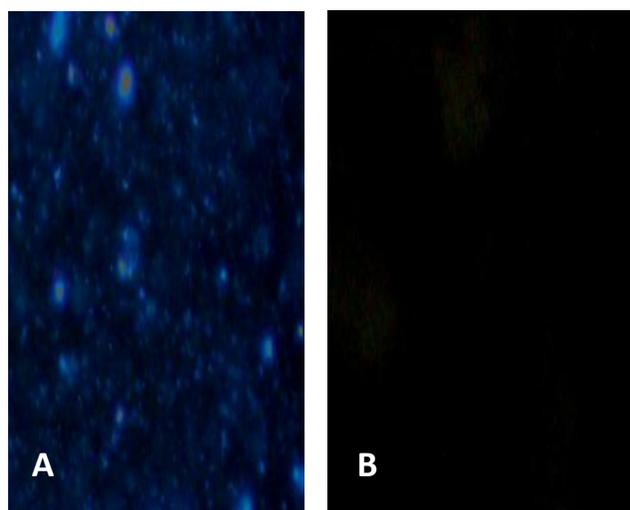


Figura 5. Cultivo de células VERO no infectado con el VDC. **A.** Se muestra la presencia de células ya que se aprecian los núcleos teñidos con DAPI. **B.** Hubo una ausencia total de la señal fluorescente. Microscopio de epifluorescencia, 400 \times .

2. Replicación del virus de Distemper Canino en células MDCK.

Las células MDCK infectadas apreciamos al sexto día P.I. una gran cantidad de vesículas en el citoplasma. Posteriormente, entre los días 10 y 13 P.I., se presentaron los cambios más importantes como fueron la fusión de membranas entre células vecinas y la consecuente formación de sincitios celulares y la observación de células multinucleadas (Figura 6A). Después de los cambios descritos sobrevino la muerte celular y el desprendimiento de dichas células del sustrato. Por el contrario las células del cultivo control conservaron hasta el final de las observaciones la misma disposición morfológica (Figura 6.B).

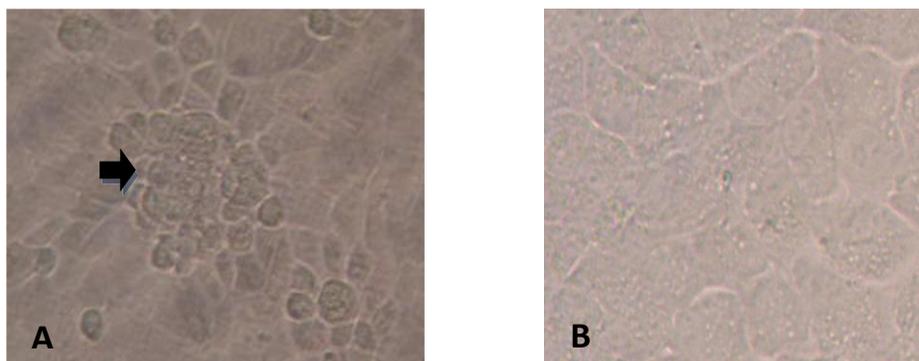


Figura 6. Cultivo de células MDCK. A. Cultivo infectado con el VDC al día 11 P.I., en el cual se aprecian los sitios donde las células están fusionadas (sincitios). Microscopio invertido, 100×. **B.** Cultivo no infectado. Microscopio invertido, 250×.

Para eliminar la posibilidad de que los efectos observados pudieran estar siendo provocados por otros factores y no necesariamente por el virus, se procedió a realizar la detección del virus por inmunofluorescencia directa. A la observación al microscopio de epifluorescencia, se pudieron apreciar áreas definidas que emitían la señal fluorescente dentro del cultivo infectado (Figura 7). Mientras que en las células no expuestas al VDC no fue posible apreciar dicha señal.

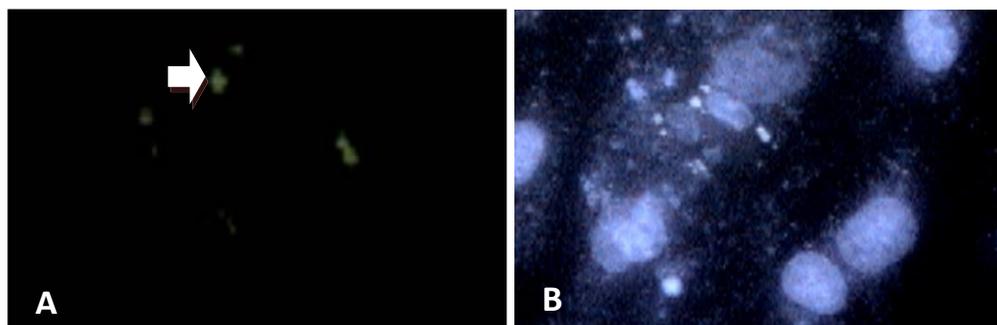


Figura 7. Cultivo de células MDCK infectado con el virus de Distemper Canino. A. Se muestran células con señal fluorescente. Microscopio de epifluorescencia, 100×. **B.** Se aprecian los núcleos de estas mismas células teñidos con DAPI. Microscopio de epifluorescencia, 100×.

3. Replicación del virus de Distemper Canino en células de Linfoma de Ratón

El linfoma nunca ha sido utilizado para realizar estudios sobre el ciclo de infección de este virus. Estas células fueron consideradas debido a que son linfocitos y estas células suelen ser un blanco primario durante la infección natural. Al día 13 P.I. se encontró que estas células estaban formando grandes cúmulos que se mantenían en suspensión, formando conjuntos de células que daban la apariencia de racimos de uvas (Figura 8A), al hacer una observación con mayor detalle fue posible apreciar la formación de sincitios celulares. La muerte de estas células ocurrió en el día 20 P.I., por lo que ya no fue posible apreciar ningún otro tipo de ECP.

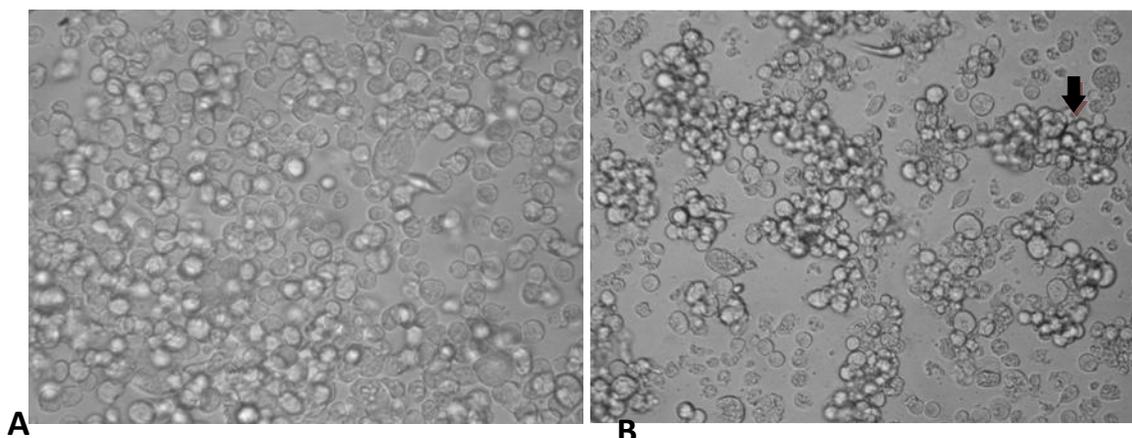


Figura 8. Cultivo de células de linfoma de ratón. **A.** Células no infectadas por lo que no encontramos ningún tipo de ECP. Microscopio invertido, 100×. **B.** Células de linfoma de ratón infectadas con VDC en el día 13 P.I., se muestran cúmulos de células que en conjunto toman la apariencia de racimos de uvas, algunas células que no parecen aglutinarse son más grandes de lo normal (flecha). Microscopio invertido, 100×.

Al análisis de inmunofluorescencia directa se encontró una fuerte señal fluorescente (Figura 9), mientras que no se encontró en las células que no estuvieron expuestas al VDC.

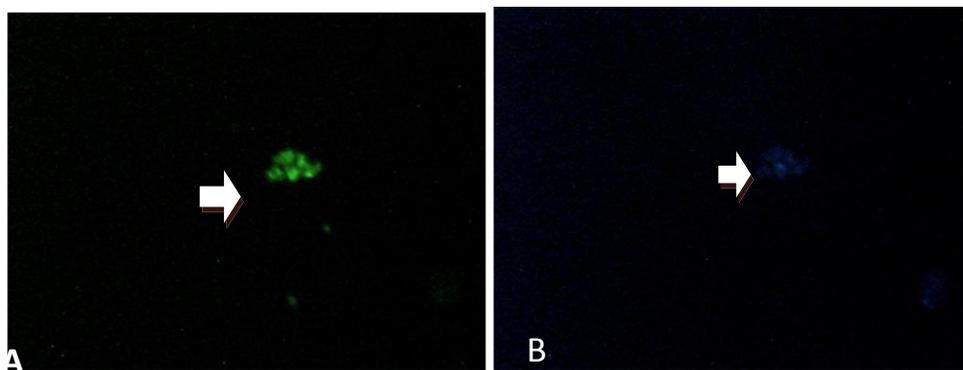


Figura 9. Cultivo de células de linfoma de ratón. **A.** La imagen muestra la señal fluorescente del anticuerpo para VDC. **B.** Muestra los núcleos de las mismas células teñidos con DAPI. Microscopio de epifluorescencia, 100×.

4. Replicación del virus de Distemper Canino en células PK15

Con las células PK15 se realizaron los mismos procedimientos utilizados en los otros cultivos celulares. En la monocapa infectada se observó al tercer día P.I. la presencia de una gran cantidad de vacuolas en el interior de la célula, por lo que el citoplasma mostraba una apariencia granular fina en la mayoría de las células. Para el cuarto día P.I. las células que habían mostrados estos cambios iniciales ya se encontraban fusionadas formando grandes sincitios dispersos por todo el cultivo (figura 10). Al mismo tiempo el resto de las células que aún no habían mostrado cambios aparentes empezaron a mostrar una apariencia similar a lo que se había notado al tercer día P.I. El ciclo viral transcurrió en estas células de manera más rápida pues ya para el día 5 P.I., todas las células se desprenden de la cajas.

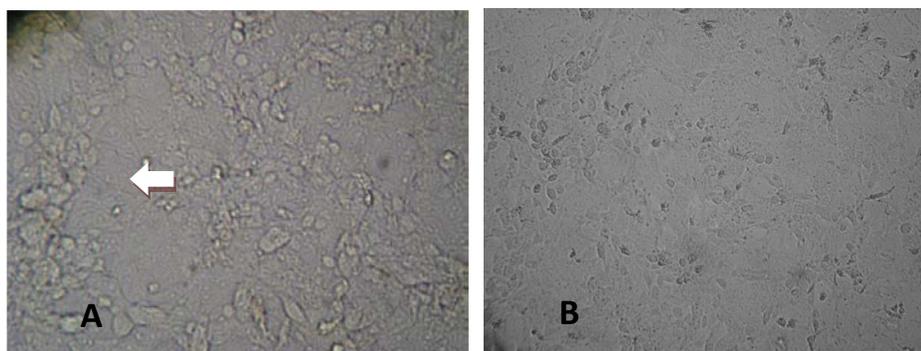


Figura 10. Cultivo de células PK15. **A.** Cultivo infectado con el VDC en el cual se muestra un grupo de células muy unidas y con apariencia de citomegalia en la monocapa(sincitio) en el resto de las células se aprecia un gran número de vacuolas en el citoplasma que le dan una apariencia granular fina. Microscopio invertido, 250×. **B.** Cultivo celular no infectado por lo que no se aprecia ningún cambio. Microscopio invertido, 100×.

Al observar las preparaciones al microscopio de epifluorescencia encontramos la presencia de una emisión fluorescente de color verde en las células infectadas (Figura 11), mientras que los cultivos que no fueron expuestos al VDC no se encontró dicha señal.

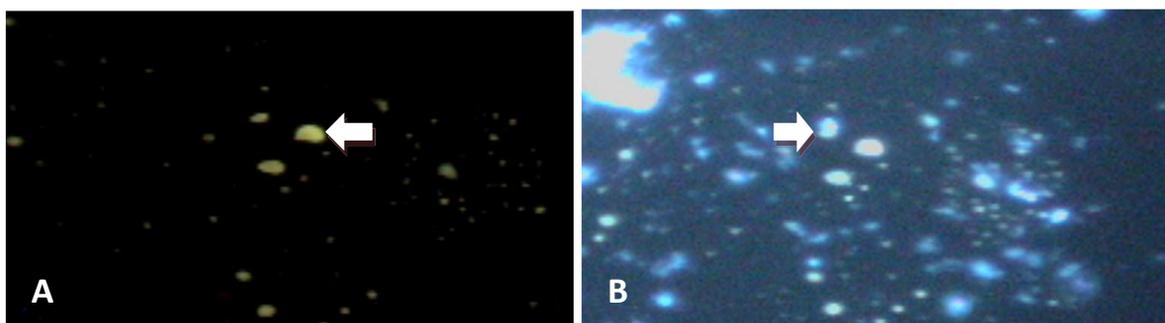


Figura 11. Cultivo de células PK15 infectado con el VDC. **A.** Cultivo infectado en el que se aprecia la señal fluorescente contra el VDC. **B.** Se observan los núcleos de las mismas células teñidos con DAPI. Microscopio de epifluorescencia, 400×.

5. Replicación del virus de Distemper Canino en células RK13

Para las células RK13 no existen reportes de estudios *in vitro* con el VDC y se exploró si este virus era capaz de desarrollar su ciclo en este tipo de células. Para las células RK13 se realizó el mismo procedimiento de infección que en el resto de los cultivos. Así encontramos que el ciclo viral en estas células se realizó de una manera más rápida ya que el primer efecto citopático se encontró a sólo 72 horas P.I.. El efecto consistió en un crecimiento citoplasmático, acompañado por la formación de vacuolas y la fusión de membranas plasmáticas de células vecinas dando como resultado la formación de sincitios celulares (figura 11), también se apreció la presencia de grupos de células desprendidas en el medio.

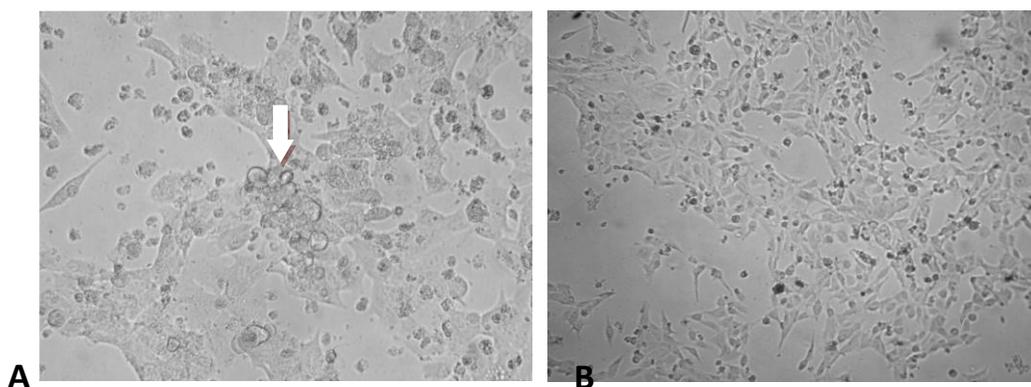


Figura 12. Cultivo de células RK13. A. Cultivo infectado en el que se aprecia un sincitio celular (flecha blanca) y la mayoría de las células están vacuoladas. B. Cultivo no infectado en el que no se aprecian cambios. Microscopio invertido, 40 \times .

Con el fin de comprobar la presencia del VDC, los cultivos de las células RK13 fueron sometidos a una inmunofluorescencia directa y el resultado obtenido fue positivo, esto es, se evidenció la presencia del virus en las células que habían sido expuestas, mientras que en los cultivos control negativo no observamos ninguna señal fluorescente. Es importante resaltar que a la inmunofluorescencia directa fue la línea que mejores resultados mostró, ya que se encontró una señal brillante y definida en toda la extensión de la preparación (figura 12).

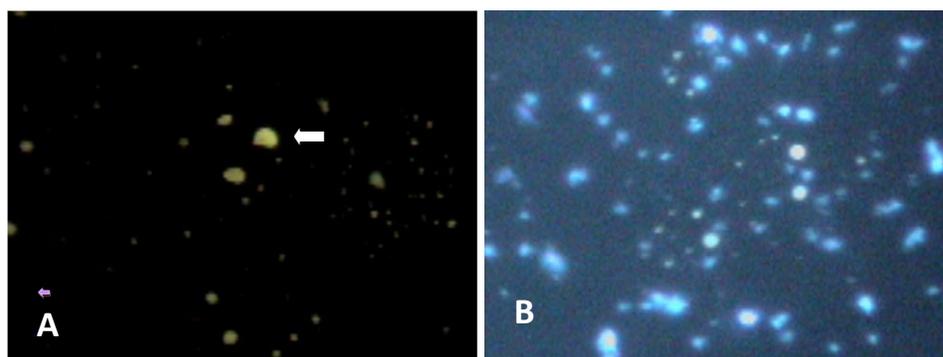


Figura 13. Células RK13 infectadas con el VDC. A. Se muestra la presencia de fluorescencia específica de las células infectadas con VDC. B. Se aprecia a las mismas células con sus núcleos teñidos con DAPI. Microscopio de epifluorescencia, 400 \times .

Tabla 1. Resumen de los hallazgos encontrados en los cultivos celulares infectados con el virus de distemper canino.

Línea Celular	Efectos citopáticos	Día postinfección en el que se observó
VERO	Formación de sincitios que adquieren una forma estrellada y vacuolización intracitoplasmática.	9
MDCK	Células multinucleadas con fusión de membranas celulares y formación de sincitios.	6-13
LINFOMA DE RATON	Formación de cúmulos de células que daban la apariencia de un racimo de uvas y se apreciaron sincitios aislados.	13
PK15	Gran cantidad de vacuolas de tal forma que el citoplasma mostró una apariencia granular fina y formación de sincitios.	4
RK13	Presencia de vacuolas, formación de sincitios y citoplasma de apariencia granular.	3

DISCUSIÓN

Las líneas celulares más usadas en los laboratorios de investigación para realizar estudios *in vitro* con el virus de distemper canino, generalmente son VERO y MDCK (27). Por este motivo se decidió utilizar líneas celulares no utilizadas para este fin (PK15, RK13 y linfoma de ratón) y reportar los hallazgos obtenidos al desarrollar cultivos bajo las mismas condiciones e inoculándolos con el mismo tipo y cantidad de virus que en VERO Y MDCK .

Cualquier estudio *in vitro* realizado con cultivos celulares requiere de un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar y de materiales y reactivos estériles con el fin de eliminar la posibilidad de que los cambios que se observen en el cultivo pudieran ser inducidos por la presencia de algún agente contaminante, por esta razón se hizo particular énfasis en el adecuado manejo de los cultivos siguiendo al pie de la letra las indicaciones pertinentes (22).

Este trabajo se realizó para explorar si el virus de distemper canino era capaz de realizar su ciclo viral en diferentes líneas celulares, con el fin de aumentar la probabilidad de replicación del VDC se buscó que las líneas celulares utilizadas tuvieran un linaje u origen similar, por esta razón se decidió utilizar a las células RK13, PK15 y VERO, en el sentido de que todas ellas provienen del riñón y poseen un linaje epitelial (RK-13 y PK-15) o mesenquimatoso (VERO), siendo la especie de origen la única diferencia.

El primer cambio observado en las células VERO fue la presencia de vacuolas en todo el citoplasma, lo cual no llamó nuestra atención ya que aún no se presentaban los cambios notorios que se mencionan en la literatura (28, 29,30), sin embargo al final del día 9 P.I. fueron evidentes los cambios microscópicos reportados, como son; la fusión de membranas entre células vecinas de tal manera que dio lugar a la formación de sincitios dispuestos en forma de estrella (28). Estas células tienen una buena tasa de crecimiento, por lo que no existen mayores dificultades para trabajar con ellas puesto que su mantenimiento no requiere grandes exigencias, sino sólo las condiciones idóneas de cultivo, los efectos citopáticos aparecieron en los tiempos reportados (30, 31,32) y los daños celulares se apreciaron fácilmente. Tal vez todos estos factores son los que han determinado que las células VERO sean el cultivo más utilizado para realizar estudios *in vitro* con VDC.

El ECP en las células MDCK se caracterizó por la presencia de vacuolas en el citoplasma, sin embargo los cambios más importantes aparecieron entre los días 10 y 13 P.I., dichos cambios involucran la fusión de membranas entre células vecinas dando la apariencia de células multinucleadas y la formación de sincitios celulares, no fue posible detectar ningún otro cambio a excepción de su desprendimiento posterior. Además de que el ciclo viral se desarrolló de manera más lenta que en las células VERO, también fue más difícil apreciar los cambios inducidos en las células, adicionalmente es necesario señalar la ausencia de reportes en la literatura y en algunos artículos señalan que los efectos citopáticos de las células MDCK son iguales a los que se desarrollan en las células VERO (27,28, 30, 31, 32,33,), lo cual no es completamente cierto como lo demuestran los resultados obtenidos en este estudio.

Las células de linfoma de ratón fueron las más difíciles de manejar y una de las líneas celulares que nunca había sido empleada para realizar estudios *in vitro* con el VDC. El

principal inconveniente en este trabajo en particular se debe a que estas células en forma normal crecen en suspensión, asimismo tomaron mucho tiempo para alcanzar la densidad adecuada y obtener los cultivos necesarios para este estudio ya que no se usaron los medios adecuados para su adecuado crecimiento (cultivo control e infectado). Los cambios fueron evidentes alrededor del día 13 PI y se observó una intensa aglutinación que provocó que las células mostraran la apariencia de racimos de uvas flotando en el medio. Para comprobar la presencia del VDC por IFD se tuvo que invertir una gran cantidad de tiempo y trabajo ya que como se trata de un cultivo que crece en suspensión, hubo que centrifugar las células a cada paso. Por lo tanto, si bien con esta línea celular se logró alcanzar los objetivos planteados, se puede señalar que no es muy recomendable para realizar trabajos *in vitro* debido a la cantidad de tiempo que es necesario invertir con el fin de alcanzar los resultados esperados. Se puede concluir que en esta línea celular el desarrollo del ciclo viral fue lento y se tuvieron que dedicar demasiadas horas para obtener los resultados finales.

En la línea celular PK15 los ECP se desarrollaron de manera más rápida que en las células VERO y MDCK, alrededor del cuarto día P.I. se observaron vesículas intracitoplasmáticas con células a punto de desprenderse que se unían por medio de la fusión de sus membranas celulares, de tal manera que se apreciaron sincitios, así como células gigantes y multinucleadas. Las células PK15 muestran una adecuada tasa de crecimiento y se obtuvieron buenos resultados en la inmunofluorescencia.

Los efectos observados en las células RK13 fueron muy similares a los descritos en las células PK15, a saber; formación de sincitios a punto de desprenderse del sustrato, células mostrando citomegalia y multinucleación. Sin embargo los resultados obtenidos en esta línea celular fueron los mejores ya que además de que su tasa de crecimiento es excelente, los efectos se pudieron apreciar desde el tercer día P.I. y el desarrollo de la inmunofluorescencia directa no requirió de grandes cuidados y la señal emitida era intensa y distribuida en toda la preparación.

Los resultados obtenidos refrendan el hecho de que los cultivos utilizados conforman un modelo adecuado en el cual estudiar detalles finos de las interacciones entre el virus de distemper canino y las células durante su replicación, ya que aún no se conocen muchos detalles de los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo del ciclo del virus de distemper canino.

Se encontraron diferencias evidentes con respecto al tiempo empleado por el virus para completar su ciclo viral según la línea celular utilizada. En el caso de las células VERO se pudo observar que resultaron ser las de cambios más evidentes a la infección del virus (Tabla 1, Fig 1), mientras que, por su parte, las células RK-13 fueron las más permisivas (Tabla 1, Fig 11A.). Existen trabajos previos en los que se reportan hallazgos similares aunque utilizando otros tipos celulares, así tenemos que las células MDCK son extraordinariamente refractarias a la infección en comparación con las células VERO o HEp-2 (34).

Está bien documentado que el desarrollo del ciclo viral depende del tipo celular (35,36). Asimismo se reporta que durante la interacción del virus con las células intervienen una gran cantidad de proteínas tanto celulares como virales (28). Aunque a la fecha aún no se conocen los factores que probablemente estén provocando esta variación en el tiempo empleado por el virus para desarrollar su ciclo replicativo de acuerdo con el tipo celular empleado (28). Así, se

reconoce que la eficiencia de fusión puede estar determinada por la estructura de la proteína de fusión (F) viral, aunado a su interacción con otras proteínas estructurales del virus de distemper (28). Esto fue estudiado por una combinación de genes derivados de cepas persistentes y no persistentes de CDV en experimentos de transfección transitoria. Se encontró que la eficiencia de fusión fue notablemente disminuida por la estructura de la proteína de fusión. Además, demuestran que la interacción de las glicoproteínas de superficie con la proteína M de la cepa persistente influyó grandemente la actividad de fusión. Así, este estudio sugiere que la fusogenicidad limitada favorece la persistencia del VDC al limitar la destrucción celular e involucra complejas interacciones entre todas las proteínas estructurales virales (29).

CONCLUSIONES

- Se logró obtener y mantener las líneas celulares (VERO, MDCK, RK13, PK15 y Linfoma de ratón) en las cuales se indujo la infección viral de DC.
- Se observaron y fotografiaron los efectos causados en las líneas celulares por el VDC.
- El tiempo empleado por el VDC para completar su ciclo fue diferente en cada uno de los cultivos utilizados en este estudio.
- Se corroboró la presencia del virus de DC mediante inmunofluorescencia directa en los cultivos infectados, con lo que se comprobó que los efectos observados son específicos al reconocimiento del VDC.
- Se determinó que las líneas RK13, PK15 y Linfoma de ratón son útiles para el crecimiento *in vitro* del virus de distemper canino.
- Se determinó que la línea celular RK13 es la que más favorece el crecimiento del VDC ya que se observó el ECP en alrededor de 72 horas P.I. .

BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez D S, Iturbide R R, Zaldivar Z E. Caracterización del virus de Distemper Canino (Moquillo Canino) en cultivos celulares aislado de animales clínicamente enfermos. VET MEX 24 1993. 24(1)15-19.
2. Lednick JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerfor LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CH. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in sub genomic sections of the fusion and phosphoprotein genes. Journal Virology Methods 2004; 118: 147-157.
3. Hudson L, Hay FC. Practical immunology. 2nd. edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1980 . 11-14.
4. Mohanty SB, Dutta SK. Virología Veterinaria. 1ª. edición, Interamericana, México 1988 . 235-238.
5. Appel MJG. Moquillo canino. En: Barlough JE (Editor). Manual de las enfermedades infecciosas en pequeños animales. Editorial Panamericana, Argentina. 1992. 166-175.
6. Mascaro LA. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos: Epizootiología, inmunología, profilaxis y terapéutica. 1ª. edición, Albatros, Buenos Aires. 1975. 162-175.
7. Appel M, Summers B. Distemper canine: Present State. In: Carmichael L (editor). Recent advances in canine infectious diseases. International Veterinary Information Service, USA, 1999. http://www.IVIS.org/advances/Infect_Dis.Carmichael/appel/chapter_frm.asp?LA=1
8. V Martella , Cirone F, G Elia, Lorusso E, Decaro M, Carmichael LE, Buonavoglia C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. Elsevier B.V. 2006 116: 301-309. Italia Francia.
9. Greene C. Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. 2ª. edición, McGraw-Hill Interamericana, México, 2000 . 11-23.
10. Nelson R. Medicina interna de animales pequeños. 2a. edición, Intermédica, Buenos Aires Argentina. 2000 . 1373-1376.
11. Murphy F. Veterinary virology. 3rd edition, Academic Press, Argentina, 1999 . 411-416.
12. Birchard S, Sharding R. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies, Vol. 1. 2a. edición, McGraw-Hill Interamericana, México, 2002 . 123-126.
13. Horst-Joachim CL. Clínica de las enfermedades del perro. 1ª. edición, Acribia, Zaragoza, 1981 . 783-803.
14. Niemand HG. Prácticas de clínica canina. 2ª. edición, Continental, México, 1989. 589-591.

15. DL Mauro . Diagnóstico de distemper canino. Artículos agro y Veterinaria, marzo 2004
URL: http://www.vet-uy.com/articulos/artic_can/100/0059/can0059.htm EUNED 1984 pp. 382.
16. Yong H, Kyu W C, Hwa Y. Detection of canine distemper virus through one step RT-PCR combined with nested PCR. Journal of Veterinary Science 2001 2: 59-63.
17. Schaer M. Clinical medicine of the dog and cat , 2ed. London : Manson/Veterinary Press, 2003. 80-81.
18. Ettinger S, Feldman E. Textbook of veterinary internal medicine. Vol. 1. 6th. edition, Elsevier Saunders, USA Philadelphia, 2005 . 649-650.
19. Guzmán Sáenz Francisco M.. Alternativa del tratamiento del moquillo .Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. www.campusveterinariosenweb.com/.../Alternativa_de_tratamiento_para_el_moquillo_canino.doc
20. Appel MJG, Summers JA. Distemper canino estado actual. Baker Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. International Veterinary Information Service, 1999.1-5
- 21.. Mahy BWJ and Kangro HO. Virology methods manual .Academia Press, San Diego, 1996. 3-24.
- 22 .Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of Basic technique, 5th edition, Wiley-Liss, 2005, New Jersey. 1-9
23. Flint SJ ,Enquist LW,Racaniello VR,Shalka AM.Principles of virology ,2nd edition,ASM Press ,Washington ,2004 26-45.
24. M Reina. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 2. Introducción al cultivo celular. 2003. Universidad de Barcelona, España. 10:01:18
<http://www.ub.es/biocelwbc/tecnicas/cap1.htm>
25. Pérez A, Rodríguez N, Gil J, Ramírez G.. Tamaño de la muestra. Programa sistemático para el cálculo del tamaño de la muestra y el poder en diseños de investigación. Ver 1:1(Bogotá) Unidad de epidemiología clínica y bioestadística. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Javeriana.
- 26.Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios Zootecnistas Revista Veterinaria. 1999.Evolución de los cultivos celulares.http://www.encolombia.com/acovez24_evolucion15
27. Voyles BA. The biology of viruses. 2nd ed, McGraw-Hill, 2002, New York, pp. 19-24, 50-61, 115-145, 215-226

- 28.. Knipe DM, Howley PM (editors). Fields Virology 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Philadelphia, 1305-1334.
29. Durán R, Valle A, Viña X, Mujica B. Importancia biológica en la multiplicación de las líneas celulares estables: III. Tipos y líneas. Revista digital CENIAP HOY, número 9, 2005. Maracay, Aragua, Venezuela. www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n9/arti/duran_r/arti/duran_r.htm#Introducción
30. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine slam (cd150) and their adaptability to marmoset B95a cells. Journal Virology Methods 2003 77 : 9943-9950.
32. Castillo S M. , Clinica C J. Estrategias de replicación de los virus ARN. virologia.capitulo4 Rep.Dominicana .<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter4.htm>
33. Wiener D, Plattet P, Cherpillod P, Zipperle L, Doherr MG, Vandeveldel M, Zurbriggen A. Synergistic inhibition in cell–cell fusion mediated by the matrix and nucleocapsid protein of canine distemper virus. Elsevier 2007.129:145-154
33. Nishi T, Tsukiyama-Kohara, Togashi K, Kohriyama N. and Kai C. Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus . Tokyo Japan 2004 27: 445-455.
34. Demmin GL, Clase AC, Randall JA, Enquist LW, Banfield BW. Insertion in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. Journal of Virology 2001 75: 10853-10869.
35. Brunner JM , Plattet P, Majcherczyk P, Zurbriggen A, Riccardo W R, Hirling . Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induces increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. 11 2007. J Neurochemistry .Switzerland 103:3 :1184 – 1195.11
36. Lincoln J A., Hankiewicz K ,Cook SD. Could Epstein-Barr Virus or Canine Distemper Virus Cause Multiple Sclerosis?. Barcelona, Spain. 26: 699-715-2008.