

27
2-y.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

" Z A R A G O Z A "



**DETERMINACION DEL EFECTO CITOPATICO DE BACTERIOFAGOS
AISLADOS DE SUECOS DE BOVINOS SOBRE CULTIVOS DE
DIFERENTES CELULAS EUKARIOTICAS**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

PEDRO JUAREZ PALAFOX

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



México, D. F.

Julio de 1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS

BACTERIOFAGO	FAGO
MEDIO LURIA	L
MEDIO 199	M-199
SUERO DE TERNERA	ST
SOLUCION DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA	PES
MEDIO MINIMO ESENCIAL	MEM
SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS	PBS
DIMETIL SULFOXIDO	DMSO
SOLUCION TRIS-EDTA	TE
POLIETILENGLICOL 6000	PEG
MULTIPLICIDAD DE INFECCION	mo1
UNIDADES FORMADORAS DE PLACA POR MILI-LITRO	UPF/ml
EFECTO CITOPATICO	EC

INDICE

TITULO	PAG.
I.-INTRODUCCION.	6
A.-Cultivos celulares.	6
B.-Tipos de cultivos para tejidos.	8
C.-Caracteristicas de algunos cultivos celulares.	9
D.-Caracteristicas generales de los virus.	11
II.-FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.	15
III.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	17
IV.-OBJETIVOS.	17
V.-HIPOTESIS.	17
VI.-MATERIALES Y METODOS.	18
A.-Materiales biológicos.	18
B.-Medios de cultivos.	19
C.-Soluciones.	26
D.-Métodos.	30
E.- Cultivos celulares.	33
VII.-RESULTADOS.	35
A.-Caracterización de los bacteriófagos.	35
B.-Efecto biológico producido por bacteriófagos.	37
C.-Multiplicación de los bacteriófagos en células eucarióticas	47
VIII.-DISCUSIONES	55
IX.-CONCLUSIONES	59
X.-PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	60
XI.-BIBLIOGRAFIA	61

I.-INTRODUCCION.

Actualmente la protección de la población contra las infecciones virales se realiza mediante la aplicación de vacunas que van a proporcionar inmunidad. Para la preparación de vacunas se requiere de grandes poblaciones de virus que se pueden obtener mediante su propagación en animales o en cultivos celulares. Uno de los principales problemas, en el primer caso, es el costo que representa para el laboratorio los animales así como su cuidado. Por esta razón se han desarrollado metodologías para la obtención de cultivos celulares, los cuales pueden disminuir el problema de costos.

A.-CULTIVOS CELULARES.

Los estudios que se han realizado sobre cultivos celulares han propiciado que se les clasifique de acuerdo al número de pases a los que se sujetan, en: CULTIVOS PRIMARIOS, CEPAS y LINEAS CELULARES ; CELULAS TRANSFORMADAS.

CULTIVOS PRIMARIOS .- Proviene directamente de los tejidos de un animal o un embrión. Las células disociadas (en general se consigue mediante el tratamiento del tejido con Tripsina) se suspende en medio de cultivo líquido y se espera que sedimenten sobre la superficie sólida del recipiente. Las células se fijan a la pared y se dividen por mitosis hasta producir una capa única de células, que constituyen el cultivo primario; este cultivo confluyente puede subdividirse para iniciar un número limitado de cultivos secundarios ya que habitualmente las células degeneran y dejan de dividirse después de un tiempo prolongado o de subcultivos repetidos, tanto los cultivos primarios como secundarios conservan el número diploide de cromosomas, característico del tejido inicial; las células son delgadas y elongadas (seudofibroblastos) o poligonales y tendientes a formar monocapas (seudoeptelilio), además algunas células tienen borde redondeados, semejantes a las células epiteliales, pero no forman monocapas (células epiteloides). Si las células son alargadas se orientan regularmente una a otra, los poligonales y epiteliales no se orientan de manera regular. Los cultivos primarios obtenidos a partir de tejidos cancerosos difieren de los cultivos de células normales por su orientación, que es al azar (15).

CEPAS.-Son células que no presentan alteraciones morfológicas ni de crecimiento, parten de un cultivo primario y a menudo se llaman CEPAS CELULARES DIPOIDES, el ritmo de crecimiento disminuye al cabo de unas cincuenta duplicaciones o pases, terminándose el ciclo vital de la cepa. Para iniciar un nuevo cultivo o pase, las células deben ser transferidas en densidades relativamente elevadas. Durante los cultivos de cepas celulares pueden surgir líneas celulares continuas (15).

LINEAS CELULARES .- Se trata de células que adaptaron características propias de células malignas o pre malignas. Estas líneas celulares se desarrollan más rápidamente que los cultivos primarios o que las cepas celulares y siempre son aneuploides, es decir, el número de cromosomas que contienen no es el normal del tejido de donde provienen. También se pueden obtener directamente líneas celulares continuas a partir de cultivos primarios de tejidos malignos. Para iniciar un cultivo de líneas se requiere de un inóculo menor. Presentan escasa densidad de saturación y se considera que son inmortales.

CELULAS TRANSFORMADAS.-Las líneas celulares presentan cambios considerables debido a la aparición y selección de variantes, la densidad de saturación aumenta y las células se superponen orientándose irregularmente con respecto a las demás. Estas líneas celulares transformadas son generalmente neoplásicas, producen cáncer; se pueden obtener a través de la infección con virus oncogénicos en células normales de cultivos primarios o en cepas celulares. Muchas líneas celulares transformadas, procedentes tanto de células normales como de tejidos malignos dan lugar a tumores cuando se trasplantan a animales sensibles (9).

Para realizar el crecimiento "In vitro" de las células animales se ha requerido de la elaboración de medios líquidos específicos que contienen los iones requeridos a concentraciones isosmóticas (semejantes a las del organismo) y para ello se utilizan soluciones salinas balanceadas, sales inorgánicas y amortiguadores de fosfatos. Para que el crecimiento de las células se efectúe se adicionan al medio salino: aminoácidos, vitaminas y otros productos biológicos que permiten tanto el desarrollo como el mantenimiento de las células.

Los productos biológicos empleados han sido: plasma, suero sanguíneo, líquidos corporales y extractos de embrión de pollo.

En las primeras técnicas se embebían los fragmentos de tejidos en medio de un coágulo de plasma, actualmente este método es poco empleado, se utiliza solo como técnica de investigación particularmente en embriología. Se prefiere el plasma de pollo, ya que éste produce un coágulo firme.

En relación al suero sanguíneo se usan sueros de muchas especies, pero los más comunes son: el humano, el de ternera, el fetal bovino y el de conejo.

Entre los líquidos corporales empleados están: líquidos amniótico, ascítico y pleural que se han usado con éxito, pero su provisión es algo errática y no tienen aceptación general.

Los extractos de embrión se usan con frecuencia para incrementar el desarrollo celular, en especial de las células recién

aisladas. Puede substituir al suero en algunos casos, especialmente en el cultivo de tejidos diferenciados.

Para evitar las contaminaciones en estos medios que son altamente ricos en nutrientes se ha requerido del uso de antibióticos. En general, se agrega a los medios de cultivo penicilina a 100 U/ml y estreptomomicina a 100 µg/ml.

En amnios se puede usar la polimixina y la neomicina a 10 µg/ml. Para evitar la contaminación por levaduras y hongos se emplea la nistatina (Mycostatin) a razón de 100 µg/ml y la anfotericina B (Fungizona) en la proporción de 5 µg/ml, pero ambas tienden a ser acumulativamente citotóxicas después de unos cuantos subcultivos celulares. El problema más difícil es la contaminación con micoplasma, pero hay informes que indican que el tratamiento con Kanamicina a razón de 50 µg/ml, los puede suprimir durante varios meses.

Durante muchos años se ha buscado un medio completamente sintético para el mantenimiento celular, se ha logrado cierto éxito pero todos los medios deben ser reforzados con la adición de suplementos biológicos, particularmente el suero sanguíneo, para lograr el desarrollo y la división celular.

El medio 199 de Morgan, Morton y Parker es el más complejo, contiene casi todos los aminoácidos, vitaminas, varios constituyentes del ácido nucleico y metabolitos intermedarios; el medio mínimo esencial de Eagle (MEM) es otro de los medios más usados.

Todos los medios definidos son preparados en una solución salina balanceada y para la mayoría se usa la base salina de Hank.

B.- TIPO DE CULTIVO PARA TEJIDOS.

Son de suma importancia porque dependiendo de las necesidades de experimentación y de los medios requeridos se va a obtener un buen cultivo celular. Existen diferentes tipos de cultivos que utilizan técnicas especiales, algunos de los cuales se mencionan a continuación.

CULTIVOS EN COAGULOS. - En la actualidad se utilizan especialmente para estudios citológicos, usando excrecencia de un pedazo de tejido y se presta para la observación continua de zonas selectivas.

CULTIVOS MONOESTRATO. - Si una suspensión de células tisulares, incluida en un medio estimulante de desarrollo, se deja sedimentar sobre la superficie interna de un recipiente adecuado, por ejemplo una botella plana, las células se aplanarán y se

dividirán para formar una capa de células que cubrirán toda la superficie.

Este tipo de cultivo se emplea comúnmente para estudios virológicos, así como para propagación de virus.

CULTIVOS EN SUSPENSION.— Algunos tipos de células pueden desarrollarse en suspensión, permitiendo recoger muestras representativas de la población celular durante un periodo de tiempo. Se han diseñado varias técnicas, que van desde el uso de tubos en rotación hasta matraces en agitación y aun sistemas continuos en los cuales el medio entra por un extremo del sistema y las células son cosechadas continuamente por el otro. (4) Las altas densidades celulares que se obtienen por estos métodos presentan problemas de regulación del pH. Las células que se producen por estos sistemas pueden usarse para ciclos de desarrollo o para pruebas bioquímicas y para producir suspensiones concentradas de virus.

CULTIVOS DE ORGANOS.— Correctamente llamado cultivos de fragmentos de órganos, tienen el propósito de hacer crecer a las células en una forma organizada y diferenciada. Estas técnicas han sido usadas extensamente por los embriólogos, y más recientemente por los virólogos, quienes detectan a los virus por sus efectos sobre los epitelios ciliados. Se pueden usar medios de cultivos normales para su desarrollo. (12)

C.- CARACTERISTICAS DE ALGUNOS CULTIVOS CELULARES

WI-38

Son fibroblastos con un cariotipo $2n=46$ igual al de células diploides normal. Se aisló a partir de un tejido pulmonar normal de un embrión de mujer, tiene una vida media de 50 pases seriados como promedio y su población se duplica en un tiempo de 24 hrs., tiene una amplia susceptibilidad a virus humanos pero es especialmente útil para aislamiento de rinovirus, no forma tumores cuando se inocula a pacientes con cancer terminal, presenta un cariotipo diploide excepto en pases muy altos, es utilizada para la preparación de diferentes vacunas virales. Su crecimiento y mantenimiento se realiza empleando medio basal Eagle-Diploide al 95%, y suero fetal bovino no inactivado al 10%, sin antibióticos.

MRC-5

Son fibroblastos con un cariotipo $2n=46$ que corresponde al de un tejido humano normal. se aisló a partir de un feto humano de 14 semanas de edad, a partir del tejido pulmonar.

Estas células son capaces de soportar de 42 a 46 pasajes seriados antes de que disminuya su proliferación, estudios comparativos muestran que las células MRC-5 se replican más rápidamente y son menos sensibles a factores adversos del medio ambiente. En comparación con las células WI-38, esta cepa es susceptible a un amplio rango de virus humanos y es muy utilizada en la preparación de vacunas virales.

Para su producción se usa generalmente medio mínimo basal de Eagle en base HanKs al 95%, suero de bovino fetal no inactivado al 10% y no se adicionan antibióticos.

Hep-2

Son células epiteliales con un cariotipo $2n=46$ con poliploidias ocasionales. Fue aislada a partir de un tumor de laringe, ha sido usada para estudios experimentales en producción de tumores en ratas, hamsters, ratón, embriones de pollo y en pacientes con cáncer terminal. Se cultivan usando medio basal Eagle con base HanKs al 85%, suero de ternera al 15% y sin antibióticos. Es susceptible a poliovirus tipo I virulento y avirulento, Adenovirus tipo III y virus de la estomatitis vesicular.

HeLa

Células de morfología epitelial con un cariotipo $2n=46$ con un pequeño cromosoma telocéntrico en el 98% de las células y 100% de aneuploidias. Fue aislada a partir de un carcinoma de cervix.

Para el crecimiento celular se emplea medio mínimo esencial Eagle con aminoácidos no esenciales al 95%, suero humano al 10% y sin antibióticos.

Es susceptible a poliovirus tipo I y adenovirus tipo III.

VERO

Son fibroblastos con un cariotipo $2n=66$, fue inicialmente aislado de tejido de riñón de mono verde africano, la línea celular a sido empleada extensivamente en estudios de replicación viral, así como también para el estudio de los virus SV40, SV5 y sarcomión.

Para su preparación se emplea medio 199 al 95% y suero fetal de bovino al 5% sin antibiótico.

Es susceptible a poliovirus tipo III, Arbovirus, Para-

maribo, Kokobera, Morutucu, Guaraa, pero no es susceptible a los Arbovirus, Apeu, Caroparu.

RD

Son células en forma de uso y células largas multinucleadas con un cariotipo de $2n=46$, el cual es inestable con hiperdiploidia bimodal, el número de cromosomas puede variar de 46 hasta 15.

Fue aislada a partir de un rhabdomyosarcoma maligno embrional de la pelvis de una mujer de 7 años de edad de origen Caucásico. El cultivo consiste de dos tipos citológicos que recuerdan a las células largas multinucleadas. No se observan miofibrillas por microscopia de luz o electrónica, ni tampoco partículas virales.

Se cultiva en medio mínimo esencial con el doble de las concentraciones normales de aminoácidos y vitaminas de la base HanKs al 88%, suero bovino fetal no inactivado al 10%, sin antibióticos.

Es susceptible a poliovirus tipo I, virus de la Estomatitis vesicular, Herpes virus simple y virus de vacuna.

Algunos de los métodos empleados para el cultivo de estas células son: Método del capilar, método de la microgota, así como el cultivo en tubo de ensayo, cultivo en cubreobjetos, cultivo en caja de petri y cultivo en botellas (4).

D.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS VIRUS.

Se considera que una partícula viral o virión es un bloque de material genético rodeado por una cubierta protéica que sirve de vehículo para su transmisión de una célula a otra (10).

De acuerdo al tipo de células que infectan, los virus se clasifican en general en tres clases: Virus animales, virus de plantas y virus bacterianos o Bacteriófagos. Esta especialidad de infección se debe a la presencia de receptores específicos que se localizan en el virión y en la célula huésped (10).

En los bacteriófagos los pasos generales para un proceso infeccioso son: Adsorción, Penetración, Multiplicación y Lisis.

ADSORCION. - El primer paso consiste en la unión del fago a receptores específicos de la célula bacteriana. Este proceso incluye la formación de puentes iónicos entre cargas complementarias en el punto de unión del virión, fibras caudales o espículas de la placa basal y los receptores celulares, que pueden estar localizados en diferentes zonas de las envolturas

celulares y en cuanto a su composición pueden estar constituidos por proteínas o lipopolisacáridos; algunos fagos se adsorben a los apéndices superficiales como el pili sexual y los flagelos. El fenómeno de adsorción puede ser inhibido por cambios en el pH, la concentración iónica o por la falta de cofactores que ayudan a la adsorción, como el triptofano.

PENETRACION.- Una vez que se ha adsorbido el fago, el ácido nucléico que constituye su material genético penetra a la célula bacteriana, en la mayoría de los casos por un fenómeno muy parecido a una inyección, hay una contracción de la cubierta del tallo, en los fagos que la poseen, que permite la penetración a través de la pared celular para alcanzar la superficie de la membrana y puede estar expuesto a la acción de nucleasas asociadas a las membranas citoplásmicas.

MULTIPLICACION.- En muchas ocasiones una vez que penetra el ácido nucléico se detiene la síntesis macromolecular de la célula huésped y comienza la síntesis de proteínas fágicas y la replicación del ácido nucléico viral; una vez que están todos los componentes del virus se presenta el fenómeno de ensamble o morfogénesis del bacteriófago, que puede ser más o menos complicado dependiendo del fago de que se trate.

LISIS.- La última etapa del proceso de infección es la lisis de la célula huésped. Este proceso no es del todo conocido pero parece que algunas de las proteínas fágicas causan en primer lugar una alteración de la membrana plasmática y en segundo lugar, mediante la acción de enzimas que actúan sobre la pared se propicia la desintegración de la célula.

No todos los fagos ocasionan la lisis de la célula (1,10) hay algunos fagos como en los que se presenta un fenómeno llamado lisogenia donde el ácido nucléico del fago persiste en la célula huésped durante muchas generaciones celulares, e incluso en forma indefinida ya sea porque se integra al cromosoma celular o porque se circulariza comportándose entonces como un plásmido.

Los virus animales en algunos casos presentan el mismo mecanismo para entrar a las células y los efectos que se producen sobre ellos debido a su multiplicación puede oscilar desde una infección asintomática hasta una enfermedad aguda o la inducción de un cáncer.

Para estudiar a nivel de laboratorio estos efectos se emplean cultivos celulares que se mantienen sin variación mediante la adición de medio de cultivo sin suero sanguíneo con objeto de mantener un ambiente relativamente estable para el virus.

Se ha encontrado que los diferentes virus producen diferentes efectos sobre las células (efecto citopático), los cuales permiten identificar un virus dado. Así el virus de la poliomielitis hace que las células se redondeen, se encojan y se vuelvan picnóticas; los adenovirus producen efectos de "ENCAJE VIEJO" con aglomerados de células unidas por hilos citoplásmicos, los virus de la parotiditis epidérmica provocan la unión de las células en un sincisio multinuclear y los herpesvirus hinchan las células en focos sobre la capa celular (12).

Además del efecto citopático se han diseñado otras metodologías para establecer la existencia de una infección viral como la hemadsorción; parece ser que algunos virus hacen que las superficies celulares del huésped, sean capaces de adsorber a los eritrócitos de algunas especies. Los virus de esta categoría no son liberados por la ruptura de la célula, sino que se liberan continuamente durante un período de días. En realidad, los eritrócitos son adsorbidos por los virus de la superficie celular. El fenómeno de la hemadsorción puede ocurrir con o sin la presencia del efecto citopático.

Para saber el grado de infectividad se ha utilizado el método de la placa, el cual ha sido fundamental en la virología básica y tiene también gran importancia para fines diagnósticos; se realiza colocando una capa celular infectada que se cubre con medio de cultivo para mantenimiento, los virus son liberados por las células infectadas y se diseminan a través del medio líquido para infectar otras células. Sin embargo, si el medio se solidifica con agar, no puede ocurrir la diseminación de los virus y la extensión de la infección se limita a aquellas células que se hallan inmediatamente adyacentes a las células infectadas inicialmente. Empleando colorantes adecuados, las áreas de células muertas aparecen como zonas claras y se pueden contar para calcular el número de unidades formadoras de placas (UFP) contenidas en la suspensión viral. Las placas se desarrollan después de un día a tres semanas de incubación, según el virus. Las placas se revelan de varias formas además de la tinción mencionada:

1.- Por hemadsorción; con ciertos virus, las células en las placas no se destruyen, pero adquieren la propiedad de adsorber hematies.

2.- Por detención microscópica de policariocitos las células infectadas pueden fundirse con las no infectadas vecinas, para formar policariocitos (células multinucleadas), detectables microscópicamente.

3.- Por inmunofluorescencia; debido a que las células de las placas contienen grandes cantidades de antígenos que pueden detectarse por pruebas inmunológicas.

El título de la preparación vírica se calcula directamente por el número de placas y la dilución de la muestra, la exactitud del estudio depende del número de placas contadas.

Los efectos de los virus se pueden inhibir con antisueros específicos si el virus entra en contacto con anticuerpos homologos. De esto se deduce que los virus se pueden detectar y cuantificar usando anticuerpos producidos a su vez por virus conocidos. Como en todos los métodos cuantitativos, los agentes reaccionantes deben ser normalizados. Las titulaciones de anticuerpos mediante los métodos de inhibición de la hemoadsorción no son de uso general, como las pruebas de neutralización, las cuales se realizan para comprobar los efectos citopáticos.

En los cultivos celulares el pH es muy importante ya que las células al realizar sus procesos metabólicos van a originar un cambio en el medio, el cual queda demostrado por el indicador rojo de fenol que se adiciona al medio y que va a virar de rojo a amarillo.

Las células infectadas, sin embargo, mueren cesando el metabolismo y el pH del medio permanece inalterado. Usando los cambios del pH como medio de determinación de la infección celular, se puede realizar análisis voluminosos con un grado razonable de exactitud, eliminándose la necesidad del examen microscópico para cada cultivo. Las pruebas se podran realizar en tubos de ensayo o en charolas de plástico.

II.-FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA:

El organismo presenta diferentes formas de defensa ante la presencia de partículas extrañas, en el caso de infecciones virales produce una proteína llamada interferón, después de un tiempo se producen anticuerpos específicos contra el virus, originando protección al organismo. Este papel protector ha sido confirmado por la acción profiláctica del suero inmune (18).

Como se menciona anteriormente, el suero es un suplemento de gran importancia en la proliferación de células eucarióticas, sin embargo en muchas ocasiones estos se encuentran contaminados con fagos.

Merril y Col. (19) reportaron que el suero fetal de ternera utilizado para enriquecer el medio nutritivo en la propagación de virus, se encontraba contaminado con bacteriófagos; esto fue posteriormente confirmado por Chu en 1973 (7). Tomando en cuenta estas observaciones Petriccioni (20) estudió vacunas que estaban ya autorizadas para su aplicación, en relación a su posible contaminación con fagos, encontrando que el 18% de ellas presentaban fagos y sugirió que estos provenían del suero fetal de ternera empleado para la elaboración del cultivo celular en el que se propagaba el virus.

La presencia de los fagos en las vacunas causó preocupación ya que existen reportes como el de Merril (18) donde se informa que los fagos transductores alteran el metabolismo de fibroblastos de pacientes galactosémicos; al transferirles los genes para la utilización de lactosa se corrige el error congénito de las células.

Doy (11) observó algo similar al emplear los fagos λ y ϕ 89 para transferir genes de *E.coli* a líneas celulares de las plantas *Lycopersicon esculatum* y *Arabidopsis thaliana*.

Wenger en 1978 (28) demostró que un fago aislado de suero bovino causaba una disminución en la síntesis de DNA en Linfocitos humanos.

De acuerdo a la información existente es posible citar tres posible efectos producidos por fagos sobre células de mamíferos (2)

1.-Transgenosis.-El fenómeno completo de transferencia, transcripción y función de genes de bacterias en células eucarióticas.

2.-Conversión lisogénica.-Fenómeno en el cual mediante la lisogenización de bacteria se cambian las características fenotípicas de la misma: como la observada en *Corinebacterium diphtheriae*, agente etiológico de la difteria que solo produce la toxina si se encuentra lisogenizada por un fago (13).

3.-Replicación del fago en células eucarióticas.-Este fenómeno fue reportado por Paul Ts'o and John Leavitt de la universidad de Baltimore (26) quienes demostraron que ciertos fagos pueden replicarse en células de Hamster.

Aunque las implicaciones de este descubrimiento son desconocidas, Merrill piensa que los fagos pueden rutinariamente infectar células humanas y causar enfermedades.

En el laboratorio de Genética Microbiana de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se realizó un trabajo de investigación, en el cual se aislaron once bacteriófagos diferentes a partir de sueros bovinos, estudios preliminares mostraron que algunos causaban efectos citopático sobre una línea celular (Hep-2). (25). Posteriormente se trabajó con tres tipos celulares diferentes, dos líneas celulares (Hep-2 y Vero) y una cepa celular (WI-38) y con los bacteriófagos 2,9 y 11 aislados anteriormente en el laboratorio; observándose que las líneas celulares Hep-2 y Vero son susceptibles al ataque de los bacteriófago aunque en diferente grado, en tanto que WI-38 permaneció sin alteraciones durante todo el tiempo del experimento.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los datos obtenidos en un trabajo anterior. (17) indican que hay cierta especificidad celular de los bacteriófagos y también se encontró que parece haber diferente susceptibilidad de las células a la acción de los virus.

De acuerdo a estos datos en el presente trabajo se trata de establecer si los fagos presentan especificidad sobre las células eucarióticas y si realmente las células presentan diferentes susceptibilidades.

IV.- OBJETIVOS:

- 1.- Determinar la sensibilidad de diferentes cultivos celulares eucarióticos a los bacteriófagos.
- 2.- Determinar la posible diferencia de susceptibilidad al ataque de los virus entre cepas y líneas celulares.
- 3.- Determinar si el efecto citopático es producido por multiplicación fágica.

V.- HIPOTESIS:

Si la especificidad de ataque por los bacteriófagos está dada por la presencia de receptores específicos de unión entre los bacteriófagos y su huésped, será posible que estos virus ataquen a células eucarióticas si estas presentan dichos receptores en su membrana.

VI.- MATERIAL Y METODOS.

A.- Material Biológico

1.-Bacterias.

Escherichia coli W3350.-Esta cepa contiene las siguientes características fenotípicas:

Gal⁻ , Su⁻ , Sm^s , F⁻.

2.-Células.

Líneas celulares Hep-2c.-Es una clona de la línea celular Hep-2 (obtenido en la universidad de Cincinnati), aislada a partir de un tumor de laringo. Fue donada por el departamento de Virología del Instituto de Enfermedades Tropicales.

Vero.-Aislada de tejidos de riñón de mono verde, fue donada por el departamento de Virología del Instituto de Enfermedades Tropicales.

Me1a.-Aislada de un carcinoma de cervix, donada por el laboratorio de Diagnóstico y Referencia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

RD.- Aislada a partir de un rhabdomyosarcoma maligno embrional de la pelvis de una mujer, donada por el laboratorio de Virología del Instituto de Enfermedades Tropicales.

MRC-5.-Es una cepa celular, aislada a partir del tejido pulmonar de un feto humano; donada por el Instituto de Enfermedades Tropicales.

3.-Bacteriófagos.

Fagos 2 , 9 y 11

Estos fagos fueron aislados en el laboratorio de Genética Microbiana de la ENCB apartir de suero bovino comercial.

B.- Medios de Cultivo

1.- Medio Sólido Luria (L).

Se empleó para el crecimiento de la cepa indicadora (E. coli W3358), en la titulación de los bacteriófagos.

Peptona de caseina purificada	10.0g
Extracto de levadura	5.0g
Cloruro de sodio	10.0g
Agua destilada	1000 ml
Agar bacteriológico	15.0g

Se mezclaron todos los componentes, se ajustó el pH a 7.0 con una solución saturada de NaOH y posteriormente se agregaron 15g de agar bacteriológico, se esterilizó en autoclave a 15 lb durante 15min. El medio estéril se vació en cajas de Petri estériles, en condiciones de esterilidad.

2.- Medio líquido Luria.

Tiene la misma composición y se prepara de la misma manera que el medio sólido excepto que no contiene agar.

3.- Agar blando.

Se empleó para homogenizar la mezcla del fago y la bacteria durante la titulación .

Agar bacteriológico	0.7g
Agua destilado	100 ml

Se mezcló con el agua, se calentó a ebullición, se envasaron volúmenes de 3ml en tubos de 13 X 100mm y se esterilizó a 15 lb por 15 min.

4.- Medio 199 de crecimiento con 10% de suero de ternera (ST).

Este medio se utilizó para el crecimiento y congelamiento de las líneas celulares.

M-199 10 X ("In vitro")	50.0ml
Agua bidestilada estéril	411.5ml
NaHCO ₃ estéril	12.5ml
PES estéril	1.0ml
Suero de ternera (ST)	50.0ml

Cada uno de los componentes se agregó cuidadosamente en el orden anterior y en condiciones de esterilidad, se agitó hasta que todos los componentes se mezclaron perfectamente.

Medio 199 (composición)

Componentes	Base EARLE mg/L	Componentes	Base EARLE mg/L
NaCl	6800.0	DL-Fenilalanina	50.000
KCL	400.0	DL-Metionina	30.000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200.0	DL-Serina	50.000
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140.0	DL-Treonina	60.000
Glucosa	1000.0	DL-Leucina	120.000
Rojo de fenol	20.0	DL-Isoleucina	40.000
CaCl (anhidro)	200.0	DL-Valina	50.000
NaHCO ₃	2200.0	Ac.DL-Glutámico	150.000
Tween 80	20.0	Ac.DL-Aspúrtico	60.000
Piridoxal HCL	0.025	DL-Alanina	50.000
Niacina	0.025	L-Prolina	40.000
Niacinamida	0.025	L-Hidroxiprolina	10.000
Pantotenato de Ca	0.010	Glicina	50.000
1-Inositol	0.050	L-Glutamina	100.000
Ac. ascórbico	0.050	Acetato de Na	50.000
Ac. fólico	0.010	L-Cistina	20.000
Ac. p-Aminobenzoico	0.050	L-Tirosina	40.000
Nitrato férrico	0.100	L-Cisteina HCl	0.100
d- Biotina	0.010	Sulfato de adenina	10.000
Menadiona	0.010	Guanina HCL	0.300
Glutati6n	0.050	Xantina	0.300
Vitamina A	0.100	Hipoxantina	0.300
Calciferol	0.100	Timina	0.300
Colesterol	0.200	Tiamina HCL	0.010

Componentes	Base EARLE mg/L	Componentes	Base EARLE mg/L
Ac. Adenilico	0.200	Piridoxina HCL	0.025
Desoxirribosa	0.500	Riboflavina	0.010
Ribosa	0.500	Fosfato de alfa	
Colina CL	0.500	Tocoferol disó-	
Uracilo	0.300	dico	0.010
Trifosfato de adenosina	1.000		

5.- Medio 199 de crecimiento con 5% de ST.

Se empleó para el crecimiento de las líneas celulares.

M-199 1% X ("In vitro")	50.0ml
Agua bidestilada estéril	411.5ml
NaHCO ₃ estéril	12.5ml
PES estéril	1.0ml
Suero de ternera (ST)	25.0ml

Se preparó de la misma forma que el anterior.

6.- Medio 199 de mantenimiento.

Se utilizó para mantener viva la monocapa sin que hubiera división celular.

M-199 1% X ("In vitro")	50.0ml
Agua bidestilada estéril	436.5ml
NaHCO ₃ estéril	12.5ml
PES estéril	1.0ml

Se preparó de la misma manera que el anterior.

7.-Medio Leiboviz con 30% de suero de ternera (ST).

Se empleó para el crecimiento de la línea RD.

Leiboviz ("Microlab")	349.0ml
PES estéril	1.0ml
Suero de ternera (ST)	150.0ml

Se prepara igual que los anteriores.

8.- Medio de mantenimiento leiboviz.

Se utilizó para mantener viva la monocapa sin que hubiera división celular.

Leiboviz ("Microlab")	499.0ml
PES estéril	1.0ml

Se preparó de la misma manera que el anterior.

9.- Medio mínimo esencial (MEM) al 10% de S.T.

Se empleó para el crecimiento de la cepa celular MRC-5

MEM 10 X ("In vitro")	50.0ml
Agua bidestilada estéril	386.5ml
NaHCO ₃ estéril	12.5ml
PES estéril	1.0ml
Suero de ternera (ST)	50.0ml

Cada uno de los componentes se agregó cuidadosamente en el orden anterior y en condiciones de esterilidad, se agitó hasta que todo los componentes se mezclaron perfectamente.

10.- Medio mínimo esencial (MEM) al 15% de S.T.

Se empleó para el congelamiento de la cepa celular MRC-5

MEM 10 X ("In vitro")	50.0ml
Agua bidestilada estéril	361.5ml
NaHCO ₃ estéril	12.5ml
PES estéril	1.0ml
Suero de ternera (ST)	75.0ml

Se preparó de la misma manera que el anterior.

11.- Medio Leiboviz

La composición química no se encontro en la literatura, solo se tiene información que contiene el doble de la concentración del medio 199.

**Medio Mínimo Esencial (MEM)
Composición**

Componentes	Base Earle mg/L
Clorhidrato de L-arginina	17.4
L-Cistina	6
L-Glutamina	146
Clorhidrato de L-Histidina	3.2
L-Isoleucina	26.2
L-Leucina	13.1
Clorhidrato de D-Lisina	18.2
L-Metionina	7.5
L-Fenilalanina	8.3
L-Treonina	11.9
L-Triptófano	2
L-Tirosina	18
L-Valina	11.7
Biotina	1
Pantotenato de calcio	1
Cloruro de colina	1
Acido fólico	1
Inositol	1
Acido nicotínico	1
Clorhidrato de piridoxal	1
Riboflavina	8.1
Clorhidrato de tiamina	1

C.- Soluciones

1).-Solución de 56/2

Se empleó como diluyente de los bacteriófagos durante la titulación.

KH_2PO_4	1.3g
Sol. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 20%	1.0ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0g
Sol. de CaCl_2 al 1%	1.0ml
Sol. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 0.1%	0.5ml

Se agregaron todos los componentes en 500ml de agua, se ajustó el pH a 7.2 con KOH, se completó el volumen a 1000ml y se esterilizó en autoclave 15lb por 15min.

2).-Solución A de PBS (solución reguladora de fosfatos) 20 X.

Se utilizó para preparar el verseno y la tripsina.

NaCl	160.0g
KCl	4.0g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28.8g
KH_2PO_4	4.0g

Agua destilada para aforar a 1000ml.

Las sales se disolvieron en el orden señalado y se aforaron a 1000ml con agua destilada, se esterilizó a 15lb por 15min.

3).-Solución B de PBS.

Se utilizó para hervir el material de vidrio y para dializar la suspensión de los bacteriófagos después de su purificación en gradientes de CaCl_2 .

NaCl	8.8g
KCl	8.2g
Na_2HPO_4	1.1g
KH_2PO_4	8.2g

Se disolvieron todos los componentes en 500ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH y se aforsó a 1000ml con agua destilada.

4).-Solución de tripsina al 5%.

Se utilizó para tripsinizar las células.

Sol. A de PBS (2X)	50.0ml
Agua destilada	950.0ml
Tripsina 1:250	50.0g
Rojo de fenol al 1%	8.5ml
NaOH 1N para ajustar el pH a	7.8

En un frasco limpio y seco se mezcló el PBS y el agua destilada, se agregó la tripsina y se agitó hasta que se disolvió totalmente. Se agregó rojo de fenol y se ajustó a un pH de 7.8 con NaOH 1N. Se agitó a temperatura ambiente durante una hora y se filtró a través de una membrana millipore de 0.4µ de diámetro; distribuyéndose posteriormente en frascos limpios y estériles, en volúmenes de 2.0ml. Cada frasco se tapó y se selló con cinta adhesiva, esto se realizó en condiciones de esterilidad.

5).-Solución de verseno al 0.05%.

Se empleó para diluir la tripsina.

Sol. A de PBS (2X)	50.0ml
EDTA	0.5g
Agua destilada	950.0ml
NaOH 1N para ajustar el pH a	7.5

En un frasco limpio, se mezcló el PBS con el agua destilada. Se agregó el EDTA, se agitó hasta que se disolvió por completo, se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1N. Se esterilizó a 15Lb por 15min

6).-Solución de penicilina- Estreptomicina (PES).

Se empleó para conservar los medios de cultivo.

Sulfato de estreptomina (dihidratada)	1.0g
Penicilina G(sal sódica)	1,000,000 UI
Agua destilada	10.0ml

Se disolvieron los antibióticos por separado en 5ml de agua destilada cada uno. Se agitó hasta que los componentes se disolvieron completamente; se mezclaron las dos soluciones en un frasco estéril. Se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.45µ de diámetro del poro. Se envasó en volúmenes de 2ml en viales estériles que se sellaron con tela adhesiva. La concentración final de penicilina es de 100,000 UI/ml y de estreptomina 100,000µg/ml.

7).-Solución de bicarbonato de sodio al 4.4%.

Se empleó como tampon de CO₂

NaHCO ₃	44.0g
Rojo de fenol al 1%	0.5ml
Agua destilada	1000 ml
Dióxido de carbono sólido (Hielo seco)	10.0g

En un frasco limpio se colocaron 550ml de agua destilada, se le agregó lentamente el NaHCO_3 y se agitó hasta que se disolvió por completo. Se agregó el rojo de fenol y se aforó a 1000ml con agua destilada. Se añadió el hielo-seco en 2 cubos de 2cm aproximadamente y se agitó constantemente hasta que el indicador viró a color canela pálido (pH 7.1-7.3). Se esterilizó en autoclave a 11lb por 20min.

8).-Solución TRIS-EDTA (TE).

Se empleó para resuspender la pastilla de los bacteriófagos precipitados con polietilenglicol, así como para disolver el CaCl_2 .

TRIS	0.01M
EDTA	0.01M

La solución se esterilizó a 15lb por 15min.

9).-Dimetil Sulfoxido (DMSO)

Se empleó para proteger las células en la congelación se tomaron directamente 0.2ml del reactivo y se agregaron a cada criotubo que contenía las células.

10).-Solución de Fenol al 10%.

Se empleó para desinfectar el área de trabajo.

Fenol	100g
Agua destilada	1000ml

Se disolvió el fenol en el agua destilada.

11).-Solución rojo de fenol al 1%.

Se empleó como indicador del pH en las soluciones de Bicarbonato y Tripsina.

Rojo de fenol	10.0g
NaOH 1N	30.0ml
Agua destilada	1000.0ml

Depositar el rojo de fenol en un matraz aforado de 1000.0ml, agregar agua destilada y NaOH. Agitar durante 1 hrs. y aforar, se filtro y se esterilizo a 115°C por 15min.

D.- Métodos

1.- Conservación de la cepa indicadora.

La cepa E.coli W3359 fue empleada como indicadora, y la cual se mantuvo en tubos de tapón de rosca que contenían medio Luria sólido inclinado, los cuales eran sembrados por estria e incubados a 37°C por 24 horas y mantenidos posteriormente en refrigeración. Se hicieron resiembras de la cepa cada 3 meses.

2.- Titulación de Bacteriófagos

Se hicieron cultivos de toda la noche con la cepa indicadora (E.coli W 3 3 5 9), colocando 8ml de medio L líquido y una azada de la cepa bacteriana en un tubo de ensayo de 16X150 mm estéril, e incubando a 37°C durante 18 horas aproximadamente. Se adicionaron en una matraz nefelométrico estéril 15ml de medio L líquido y 0.2 ml del cultivo anterior. Se incubó con agitación y a 37°C hasta obtener una lectura de 70UK en el fotocolorímetro Klett Summerson con filtro rojo. Se hicieron diluciones decimales de los bacteriófagos hasta 10⁻⁸ en medio mínimo 56/2. A un tubo con agar blando fundido y mantenido a 45 °C se le adicionaron 0.2ml de la cepa indicadora crecida como se indicó en el párrafo anterior y 0.1ml de una de las diluciones del bacteriófago. se agitó hasta homogenizar y luego se sembró por vaciado en una caja de petri con medio L sólido. Cada una de las diluciones se sembró por duplicado. Las cajas una vez solidificados se incubaron a 37 °C durante 24 horas aproximadamente. El título se calculó contando el número de placas líticas y relacionandolos con la dilución que se sembró.

3.- Propagación del Bacteriófago a partir de un placa litica.

Se hizo un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora (descrito anteriormente). Se colocaron 0.2ml del cultivo y 10ml de medio L líquido en un matraz nefelométrico estéril, se incubó a 37°C en un baño con agitación hasta obtener una lectura de 70 UK. Se tomó una placa litica de una caja de medio L sólido en donde había una gran separación de placas y se colocó en un tubo estéril con 0.1ml de medio L líquido. Se homogenizó cuidadosamente y se pasó al matraz nefelométrico con el cultivo ya crecido. La mezcla se incubó a 37°C en agitación durante 4 horas y al cabo de este tiempo se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante al que se le añadieron unas gotas de cloroformo. Se realizó la titulación del lisado anterior verificando previamente la ausencia de bacterias.

4.- Propagación de los Bacteriófagos en medio L líquido.

Se hizo un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora. Se colocaron 0.2ml del cultivo y 10ml de medio L líquido en un matraz nefelométrico estéril, se incubó a 37°C en un baño con agitación hasta obtener una lectura de 70 UK. Se inocularon este cultivo con una MULTIPLICIDAD DE INFECCION (moi) adecuada y nuevamente se incubó a 37°C con agitación durante 4 horas. Se agregaron 0.1ml de cloroformo y se agitó vigorosamente, se vació en un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo de tapón de rosca estéril, se agregó un poco de cloroformo y posteriormente se tituló el lisado obtenido.

5.- Propagación de los Bacteriófagos en medio L líquido para obtener mayores volúmenes de lisado.

Se hizo un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora. Se suspendieron 0.2ml del cultivo y 10ml de medio L en un matraz nefelométrico estéril, se incubó a 37°C en un baño con agitación hasta obtener una lectura de 100 UK. El cultivo se diluyó 10 veces con medio L líquido. Se inocularon con el fago a una (moi) adecuada y se incubó a 37°C con agitación durante 3 a 4 horas. Se agregaron 0.1 ml de cloroformo por cada 10ml de solución, agitando vigorosamente, se vació a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo de tapón de rosca estéril y se agregó cloroformo, posteriormente se tituló el lisado obtenido.

6.- Concentración de Bacteriófagos
utilizando polietilenglicol
6000 (PEG).

Al lisado fúgico se le añadieron DNAsa y RNAsa pancreáticas a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ y se dejó incubar por una hora a 4°C . La suspensión obtenida se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se agregó al lisado fúgico la cantidad adecuada de PEG (W/V) se agitó vigorosamente hasta disolver el PEG totalmente, dejándose reposar una hora a 4°C y posteriormente se pasó a un tubo de centrifuga estéril, centrifugado a 9000 rpm por 20min. a 4°C , se colectó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en medio TE. Cuando la suspensión de fagos estaba muy turbia se le agregaba un volumen igual de cloroformo, se mezclaba perfectamente, se centrifugaba a 1000 rpm durante 15 min., con lo cual se formaba un precipitado blanco en la interfase, finalmente se separaba cuidadosamente la fase acuosa donde se localizaban los bacteriófagos (29).

7.- Purificación de los Bacteriófagos
en gradientes de CsCl.

Los bacteriófagos concentrados se mezclaron con CsCl en una concentración adecuada para cada bacteriófago, se colocaron en tubos de acetato de celulosa con una capacidad de 13.5ml, que se tararon perfectamente, se centrifugaron a $60,000\text{ rpm}$ 14hrs. a una temperatura de 17°C en una centrifuga Beckman equipada con el rotor 80-Ti. Una vez terminado el tiempo de centrifugación la banda en la que se localizaban los fagos se colectó con una jeringa.

8.- Eliminación del CsCl de los Bacteriófagos
con PBS tipo B

Las fracciones con los fagos purificados, se dializaron contra una solución de PBS para eliminar todo el CsCl, se hicieron 4 cambios de PBS cada 4 horas, ocupando un volumen de 750 ml en cada ocasión.

E.- Cultivos celulares

1.- Descongelación de Células.

Fue necesario en primer lugar descongelar las células ya que éstas se mantenían en un tanque de nitrógeno a -196°C . En un vaso de precipitados que contenía agua a 37°C , se colocaron las ampollitas extraídas del tanque de nitrógeno, manteniéndose ahí por algunos minutos hasta que se observó que la suspensión celular congelada se había despegado de las paredes de la ampollita, posteriormente éstas se desinfectaron perfectamente empleando alcohol al 70%, una vez que el alcohol se evaporó, se vació el contenido de cada ampollita en botellas de 25cm³, que contenían 2cm³ de medio 199 de crecimiento con 10% de ST, se incubaron por 15min. y después se agregaron 2ml del mismo medio, pasados 15min. se agregaron 10ml más de medio y se incubó 24hrs a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%.

Pasadas las 24 hrs se cambió el medio, retirándolo por la parte opuesta a la monocapa y se agregaron 10ml de medio de crecimiento al 10% de ST fresco y se incubó a 37°C hasta que se obtuvo una monocapa confluyente.

2.- Subcultivo de Células.

Cuando una botella presentaba 100% de confluencia era necesario que se realizara un pase para evitar que las células degeneraran, para esto se realizó el siguiente procedimiento:

Se eliminó el medio de crecimiento por el lado opuesto a la monocapa, se dejó actuar la solución de tripsina-verseno que se adicionó (0.2ml) hasta que se comenzó a disgregar la monocapa, en este momento se le dieron unos ligeros golpes con las palmas de las manos tomando la botella en posición horizontal, permitiendo el desprendimiento de todas las células, se adicionaron 6ml de Medio 199 de crecimiento al 15%, homogenizando la suspensión perfectamente por pipeteo.

Dependiendo del número de botellas que se iban a utilizar era la relación de pase empleada. La suspensión celular se distribuyó en todas las botellas en volúmenes iguales que se completaban a 8.5ml con Medio 199 de crecimiento al 5% y posteriormente se incubó a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%.

3.- Preparación de Microplacas.

Las células tripsinizadas de la manera ya descrita se resuspendieron en 5ml de medio 199 de crecimiento al 5% y se homogenizaron perfectamente (alrededor de 30 pipeteados). Se determinó el número de células por mililitro colocando una muestra de la suspensión en una cámara de Neubauer, usando el cuadrículado de los leucocitos para el conteo de las células.

La suspensión se ajustó a 50,000 células por mililitro y agregaron a cada pozo de la microplaca 0.05ml de esta suspensión y 0.1ml de Medio 199 de crecimiento al 5%. Estos cultivos se emplearon para determinar el efecto de los fagos; las microplacas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Los pasos anteriores se realizaron para el cultivo de las líneas celulares, en el caso de la cepa celular se empleó el medio MEM al 10% de ST y para la línea RD el medio Leiboviz al 30% de ST.

4.- Infección de las microplacas con los Bacteriófagos.

Se prepararon las microplacas de la manera ya descrita y se incubaron 48hrs, transcurrido este tiempo se eliminó el medio y se agregaron 0.05ml de una suspensión fágica a una concentración conocida (la dilución se preparó utilizando medio de mantenimiento), después se agregaron 0.1ml de medio de mantenimiento a cada pozo y se incubó por 12 días para ver el efecto.

5.- Congelación de Células.

A las botellas con crecimiento celular confluyente se les eliminó el medio de crecimiento por el lado opuesto a la monocapa celular, se disgregan las células del cultivo adicionando 3ml de una mezcla de tripsina-verseno que se dejó actuar de 5 a 10 segundos., en seguida se eliminó la tripsina por el lado opuesto a la capa celular y se golpeo la botella para que se desprendieran las células de la superficie, se adicionaron 2ml de M-199 al 10% de ST.

La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 10min., luego se resuspendió el paquete celular en 1.8ml del medio empleado en el crecimiento celular, se enfrió a 4°C durante 10min., se agregaron 0.2ml DMSO, se mezcló y los tubos se taparon rápidamente. Los tubos se rotularon, se congelaron a -70°C en congelador REVCO y posteriormente (4-5 días después) se pasaron a un congelador de nitrógeno líquido a -196°C.

VII.- RESULTADOS

A.- CARACTERIZACION DE LOS BACTERIOFAGOS.

1.- Titulación de los fagos en estudio.

Los bacteriófagos empleados en este trabajo, los cuales habían sido aislados de sueros bovinos en un trabajo anterior realizado por Romo, fueron proporcionados por el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Microbiología de la ENCB. (8).

En primer lugar se realizó la titulación de los lisados fágicos por la técnica ya descrita y se observó la morfología de las placas líticas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No.1

Como puede observarse los fagos son bastante estables en la solución que se encontraban (Regulador de fosfatos), ya que al titularlos se observó que sus concentraciones eran lo suficientemente altas para realizar su propagación en volúmenes mayores. Cabe señalar que la morfología de placa de cada uno de los fagos es igual a la informada anteriormente por Romo (23) y Martínez (17).

2.- Propagación de Bacteriófagos.

Dado que en trabajos anteriores se estableció que la multiplicidad de infección (moi) de los fagos para la infección de las células eucarióticas es alta, se procedió a propagar cada uno de los fagos para obtener lisados con concentraciones más altas. Durante la propagación es necesario agregar una cantidad adecuada de fagos por células (moi), como esta concentración estaba establecida (17) se tomaron esos datos y se procedió a hacer la propagación de acuerdo a la metodología que se describió en Material y Métodos. Una vez obtenidos volúmenes de 500 μ l con títulos de 8.9×10^8 para el fago 2, 2.5×10^9 para el fago 9 y 1.4×10^{10} para el fago 11 se procedió a concentrar, purificar y titular los lisados.

3.- Purificación de los lisados fágicos.

a.- Concentración de Bacteriófagos por Técnica de PEG.

Con objeto de tener los bacteriófagos en volúmenes pequeños para su posterior purificación se procedió a concentrarlos empleando polietilenglicol. La concentración de PEG 8000 utilizado para la recuperación de los fagos fue de 12% para el bacte

TABLA No.1

Titulos y morfología de la placa de los lisados fágicos originales.

BACTERIOFAGO	TITULO UFP/ml	MORFOLOGIA DE PLACA
2	4.3×10^9	Turbia de borde continuo y un diámetro de 4mm.
9	3.89×10^9	Clara, con un halo de hidrólisis de 2-3mm y un diámetro total de 4-7mm.
11	9.1×10^9	Transparentes de bordes continuos con un diámetro de 1-2mm.

UFP.- unidad formadora de placas.

riófago 2 y de 14% para los fagos 9 y 11. estos datos fueron tomados del trabajo de Martínez (17).

b.- Ultracentrifugación en gradientes de CsCl.

Para realizar la purificación de los lisados se empleó la técnica de centrifugación en gradientes de CsCl. La densidad y molaridad de las soluciones de CsCl utilizadas se muestran en la tabla No.2. Una vez preparadas las soluciones se agregó el fago y se procedió a centrifugar empleando las condiciones descritas en material y métodos. Después de la centrifugación no fue necesario realizar un fraccionamiento del gradiente porque se observaba perfectamente un pequeño halo blanco formando por los bacteriófagos en una determinada región del gradiente; este fracción se extrajo con una jeringa y se determinó posteriormente el índice de refracción y la densidad equivalente utilizando las tablas de Sober (26). De esta manera se determinó la densidad de flotación de cada fago. Los datos obtenidos se muestran en la tabla No.3.

Las fracciones con los fagos purificados se dializaron en una solución de PBS para eliminar el CsCl; para ello fue necesario hacer 4 cambios de PBS cada 4hrs. con un volumen de 75ml cada uno.

Después de dializar, los lisados se colectaron con sumo cuidado y se filtraron con objeto de eliminar cualquier contaminante, empleando membranas millipore con poro de 0.45 u. Posteriormente se comprobó la esterilidad de cada lisado mediante siembra en medio rico y se determinó el título de cada uno de ellos. Los datos obtenidos se muestran en la tabla No.4.

B.-EFECTO BIOLÓGICO PRODUCIDO POR BACTERIOFAGOS

Estudios realizados anteriormente por Ramo (23) y posteriormente comprobados por Martínez (17) demostraron que los bacteriófagos aislados a partir de sueros bovinos, tienen la capacidad de producir efecto citopático en células eucarióticas. En estos trabajos se utilizaron dos líneas celulares (Hep-2 y Vero) y una cepa celular (WI-38), en el presente trabajo se aumentó en 3 el número de líneas celulares y en uno el de cepas celulares, para observar el efecto citopático en un mayor número de células eucarióticas de diferente origen y tratar de determinar si hay alguna especificidad de los bacteriófagos.

TABLA No. 2

Características de las soluciones de CsCl utilizadas para la purificación de cada bacteriófago.

BACTERIOFAGO	MOLARIDAD	DENSIDAD (g/ml)
2	3.92	1.498
9	4.48	1.558
11	4.96	1.628

TABLA No.3

Características físicoquímicas de los fagos en estudio.

BACTERIOFAGO	INDICE DE REFRACCION *	DENSIDAD DE FLOTACION
2	1.3858	1.53881
9	1.3835	1.52756
11	1.3865	1.56813

* Solución fágica purificada.

TABLA No. 4

Concentración de las suspensiones fúgicas purificadas.

BACTERIOFAGO TITULO (UFP/ml)*

2

¹¹
1.X10

9

¹¹
1.3X10

11

¹¹
3.5X10

* UFP unidad formadoras de placas.

1.- Efecto de los fagos en estudio sobre la línea celular Vero.

En primer lugar se verificó la susceptibilidad de la línea celular (Vero) al ataque de los fagos, la inoculación de la línea celular se realizó con la (moi) mínima necesaria para producir el efecto, que es de 12.4 para el fago 2, 62 para el fago 9 y 248 para el fago 11, (17).

Las microplacas se prepararon como se indica en la sección de Material y Métodos, se dejaron crecer las células hasta obtener un 37% de confluencia, se eliminó el medio de crecimiento y posteriormente se inocularon 12 pozos por fago; después de la infección se agregó medio de mantenimiento, el testigo negativo empleado fueron células sin infectar a las cuales se les agregó también medio de mantenimiento, se utilizaron 36 pozos como testigos negativos. El testigo positivo empleado fue el virus de la poliomeilitis tipo I, que se empleó a una (moi) adecuada, en este caso se utilizaron 24 pozos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 5

Como puede observarse los bacteriófagos producen efecto citopático sobre las células Vero a la (moi) anteriormente informada. Los cambios observados en las células fueron la condensación del núcleo hasta observarse negro (picnosis), la lisis celular que se presentaba al quinto día y que no se confundió con la degeneración natural que se presentaba al octavo día. Las observaciones se realizaban por doce días porque en este tiempo se degeneran las células no infectadas en medio de mantenimiento.

Este resultado nos permitió proceder a probar si el efecto citopático también se obtenía en otras líneas y cepas celulares.

Las líneas celulares empleadas fueron Hep-2c, Hela, RD y una cepa celular MRC-5, el origen y características de cada tipo celular fueron mencionadas con anterioridad.

2.- Estudio del efecto de los fagos sobre la línea Hep-2c

Se conoce que Hep-2c es una clona de la línea celular Hep-2 (aislada en la universidad de Cincinnati); con datos informados por Martínez (17) y suponiendo que la susceptibilidad de Hep-2c era similar a la de la línea que le dió origen, se infectaron los cultivos de Hep-2c con moi ligeramente mayores y menores a las reportadas para Hep-2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 6. El número de pozos empleados para cada determinación fue de 12.

TABLA No. 5

Efectos de los bacteriófagos en estudio sobre células Vero.

BACTERIOFAGO	moi	EFECTOS CITOPATICOS (DIAS DESPUES DE LA INFECCION)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	12.4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	62.8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	24.8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Virus de poliomieltitis *		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testigo de células **		-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)

* Testigo positivo

** Testigo negativo

(+) Degeneración natural de las células.

TABLA No.6

Efecto de los bacteriófagos 2, 9 y 11 sobre la línea celular Hep-2c

BACTERIOFAGO	moi	EFECTOS CITOPATICO (DIA DESPUES DE LA INFECCION)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	8	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	10	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	15	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	20	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	40	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	40	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	50	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	70	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	80	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	150	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	170	-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		
	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	250	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Virus de poliomielititis *		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testigo de células **		-	-	-	-	-	-	(+)(+)(+)	(+)	(+)	(+)		

* Testigo positivo

** Testigo negativo

(+) degeneración natural de las células.

La susceptibilidad de la línea celular Hep-2c es mayor que la de Hep-2 para los bacteriófagos 2 y 9, y menor para el fago 11. En el caso de Hep-2 las (moi) mínimas para producir efecto citopático fueron 92, 88 y 98 para los fagos 2, 9 y 11 respectivamente (14). Los cambios observados en los cultivos fueron la presencia de pincos y lisis celular, otra observación fué que la degeneración natural de las células ocurre en menos tiempo que en la línea celular Hep-2.

3.-Efecto de los fagos en estudio sobre la línea celular HeLa

Como se desconocían las (moi) para producir el efecto citopático se eligieron 4 moi diferentes para realizar las pruebas, basándose en los datos que se habían obtenido con las otras líneas celulares, las cuales fueron 58, 188, 158 y 288. Se utilizó un número de 12 pozos para probar cada (moi) y para cada fago, en el caso del testigo positivo y el testigo negativo fue igual al anterior, se emplearon 24 pozos. Los resultados obtenidos en la infección de la línea celular HeLa, se muestra en la tabla No 7.

Como puede observarse el efecto citopático se produjo con una (moi) de 288 para el fago 2; en el caso de los fagos 9 y 11 la (moi) mínima fue de 158 y el tiempo para que se iniciara el efecto citopático en los tres casos fue de 4 días.

4.- Estudio del efecto de los fagos sobre la línea celular RD

Con respecto a esta línea celular las (moi) empleadas fueron de 58, 188, 158 y 288 ya que no se tenía reportada la (moi) mínima, se inocularon 12 pozos para cada (moi) y para cada fago, se tomaron 24 pozos para el testigo negativo y 12 para el testigo positivo; las observaciones se realizaron diariamente hasta cumplir 12 días que es cuando las células degeneraron por naturaleza. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No 8. Los resultados mostrados indican que la moi para producir el efecto citopático fue de 58 para los fagos 2 y 11, y para el fago 9 se requirió una (moi) de 288. En el caso del fago 2, se consideró la (moi) de 58 como la mínima infección porque al 4o. día ya se veía el efecto aunque este era mas evidente con la (moi) de 158.

En el caso del fago 9 se consideró la (moi) de 288 por presentarse el efecto citopático al 4o. día a diferencia de las moi menores con las que el efecto se presentó bien marcado hasta el 6o. día.

TABLA No. 7

Efecto de los fagos 2, 9 y 11 sobre la línea celular HeLa.

BACTERIOFAGO	mo1	EFECTO CITOPATICO (DIAS DESPUES DE LA INFECCION)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	50	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	50	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	50	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Virus de poliomielititis *		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testigo de células **		-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

* Testigo positivo

** Testigo negativo

(+) Degeneración natural de las células.

TABLA No. 8

Efectos de los Bacteriófagos 2, 9 y 11 sobre la línea celular RD.

BACTERIOFAGO	moi	EFECTO CITOPATICO (DIAS DESPUES DE LA INFECCION)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	50	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Virus de poliomielitis * - - - + + + + + + + + + + +

Testigo de células** - - - - - - - (+)(+)(+) (+) (+)

* Testigo positivo

** Testigo negativo

(+) Degeneración natural de las células

En el caso de esta línea el efecto citopático observado fué muy diferente al producido en las líneas celulares Hep-2c, Vero y HeLa; ya que el núcleo sufrió picnosis muy similar a la producida por el virus de la poliomielitis pero desde el 4o. día se observó una vacuolización muy marcada que no fué observada en las otras líneas y finalmente se produjo lisis celular.

5.- Estudio del efecto de los bacteriófagos sobre la cepa celular MRC -5

La cepa se creció en una microplaca hasta obtener un 75% de confluencia, se inocularon 24 pozos para cada fago a diferentes (moi) de infección 5#, 10#, 15# y 20# y se les agregó medio de mantenimiento; se incubaron 24 pozos para el testigo negativo y 12 pozos para el testigo positivo. Las observaciones se realizaron diariamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No 9.

Como puede observarse los bacteriófagos a las (moi) provadas no producen efecto citopático, también es importante hacer notar que la degeneración natural del tejido es más tardía en comparación con las líneas celulares estudiadas.

En la tabla No 1# se resumen los resultados obtenidos y se incluyen los obtenidos por Martínez (17) con objeto de compararlos.

Como puede observarse en la tabla No 1# la línea celular más susceptible a los fagos 2 y 9 fue Vero y para el fago 11 la línea celular más susceptible fue RD con una (moi) de 5#; el efecto citopático se presentó entre el 4o y 5o día después de la infección; también puede observarse que las líneas celulares son susceptibles al ataque de los fagos, esto no sucede en el caso de las cepas donde el efecto citopático no se presenta.

C.- MULTIPLICACION DE LOS BACTERIOFAGOS EN CELULAS EUKARIOTICAS

Por último se determinó si el efecto citopático era producido por la propagación de los fagos dentro de las células eucarióticas. El estudio se realizó en las líneas celulares Hep-2c, HeLa y RD, así como la cepa MRC-5 de la siguiente manera.

TABLA No. 9

Efecto de los bacteriófagos 2 , 9 y 11 sobre la cepa celular MRC-5

BACTERIOFAGOS	moi	EFECTOS CITOPATICO (DIAS DESPUES DE LA INFECCION)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	50	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
9	50	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
11	50	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)	(+)	(+)

Virus de la poliomiелitis * - - + + + + + + + + + + + +

Testigo de células ** - - - - - - - - + + + +

* Testigo positivo

** Testigo negativo

(+) Degeneración natural de las células.

TABLA No. 10

Cuadro comparativo del efecto de bacteriófagos sobre células eucarióticas

TIPO CELULAR	EFECTOS DE LOS FAGOS								
	BACTERIOFAGOS 2			BACTERIOFAGOS 9			BACTERIOFAGOS 11		
LINEAS	moi* (UFP/ml)	EC	DIA	moi* (UFP/ml)	EC	DIA	moi* (UFP/ml)	EC	DIA
Vero**	12.4	+	5	62	+	5	240	+	5
Hep-2**	92	+	5	88	+	5	90	+	5
Hep-2c	40	+	4	80	+	4	200	+	4
HeLa	200	+	5	150	+	5	150	+	5
RD	50	+	4	200	+	4	50	+	4
CEPA WI-38**	100	-		100	-		100	-	
MRC-5	200	-		200	-		200	-	

La degeneración natural de las células se inició al octavo día en todos los casos.

* moi.-Multiplicidad de infección necesaria para producir el efecto citopático.

** Datos reportados por Martínez.

E.C.-Efecto citopático.

Una botella que contenía las células se tripsinizó y se agitó a la concentración de 5×10^6 células/ml, se sembraron 0.05ml de esta suspensión por pozo, en una microplaca y se incubó hasta obtener un 75% de confluencia, se inoculó cada pozo con las (moi) adecuadas para producir el efecto citopático, determinados en el experimento anterior, la microplaca se incubó a 37°C durante 12 días en atmósfera parcial de CO_2 ; a los tiempos 5, 8 y 12 días, se tomaron los sobrenadantes de 6 pozos por fago y se efectuó la titulación de los fagos. Los tiempos se eligieron tomando en cuenta el día en el que se inicia el efecto citopático, el día en el que empieza la destrucción natural de la monocapa y el día en el que destrucción es total. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No 11 (Hep-2c), No 12 (HeLa) y No 13 (RD).

Como la cepa celular no presentó efecto citopático a lo largo del experimento se titularon los sobrenadantes de las moi 5×10^6 y 2×10^6 del 12o. día. Los resultados se muestran en la tabla No 14.

Como puede observarse en las tabla 11, 12 y 13; hay disminución gradual de los títulos fágicos conforme transcurre el tiempo de incubación. Con respecto a la tabla No 14 se observó que en la cepa celular también hay una disminución de los títulos con respecto al tiempo de incubación, aunque no se presentó el efecto citopático.

TABLA No.11

Determinación de la capacidad de multiplicación de los fagos en estudio sobre las células Hep-2c

BACTERIOFAGOS	INOCULO ufp/ml	TIEMPO DE INCUBACION					
		5días ufp/ml	EC	8días ufp/ml	EC	12días* ufp/ml	EC
2	8.9×10^6	1.5×10^5	+	1.2×10^5	+	1.2×10^5	+
9	3.3×10^6	2.6×10^5	+	2.5×10^5	+	1.1×10^5	+
11	5.4×10^5	1.6×10^2	+	1.6×10^2	+	1.2×10^2	+

E.C.-efecto citopático

* El 95% de la monocapa esta destruido.

TABLA No. 12

Determinación de la capacidad de multiplicación de los fagos en estudio sobre la línea celular HeLa.

TIEMPO DE INCUBACION

BACTERIO- FAGOS	INOCULO ufp/ml	5 DIAS ufp/ml	EC	8 DIAS ufp/ml	EC	12 DIAS* ufp/ml	EC
2	1.3×10^7	8.3×10^5	+	3.8×10^5	+	3.8×10^3	+
9	4.7×10^6	6.1×10^5	+	3.1×10^5	+	3.8×10^3	+
11	2.8×10^3	2.8×10^2	+	2.8×10^2	+	2×10^1	+

E.C. Efecto citopático

* El 95% de la monocapa esta destruida

TABLA No. 13

Determinación de la capacidad de multiplicación de los fagos en estudio sobre la línea celular RD

BACTERIO- FAGO	INOCULO ufp/ml	TIEMPO DE INCUBACION					
		5 DIAS ufp/ml	EC	8 DIAS ufp/ml	EC	12 DIAS* ufp/ml	EC
2	⁷ 1.3X10 ⁸	⁵ 8.3X10 ⁸	+	⁵ 3.8X10 ⁸	+	³ 3.0X10 ⁸	+
9	⁶ 4.7X10 ⁸	⁵ 6.1X10 ⁸	+	⁵ 3.1X10 ⁸	+	³ 3.0X10 ⁸	+
11	³ 2.0X10 ⁸	² 2.0X10 ⁸	+	² 2.0X10 ⁸	+	¹ 1X10 ⁸	+

E.C. Efecto citopático

* El 99% de la monocapa esta destruida

TABLA No. 14

Determinación de la capacidad de multiplicación de los fagos en estudio sobre la cepa celular MRC-5

BACTERIOFAGOS	moi	TIEMPO DE INCUBACION		E.C.
		TITULO INICIAL*	12 DIAS TITULO*	
2	50	1.1X10 ⁶	1.6X10 ⁵	-
	200	1.7X10 ⁷	8.5X10 ⁵	-
9	50	3.7X10 ⁶	3.0X10 ⁴	-
	200	5.8X10 ⁶	2.7X10 ⁵	-
11	50	6.0X10 ³	7.0X10 ²	-
	200	1.9X10 ⁴	5.0X10 ²	-

E.C. Efecto citopático

* UFP/ml

VIII.- DISCUSION

Podemos considerar que las condiciones de almacenamiento empleadas son las adecuadas para la conservación de los fagos ya que los títulos se mantuvieron constantes durante dos años. Este comportamiento puede atribuirse a la gran estabilidad de la estructura protéica de la cápsida.

Los datos presentados en las tablas 6, 7 y 8, indican que las líneas celulares son susceptibles al ataque por bacteriófagos.

En el sistema fago-bacteria y en general en el sistema virus-célula eucariótica, el primer requerimiento para que la infección viral se presente, es la interacción entre un receptor celular y su contrareceptor viral. Se conoce para el caso de bacteriófagos y de virus que los receptores celulares pueden ser de naturaleza polisacárida o protéica. Por otro lado la membrana de la célula eucariótica está constituida en su cara externa por proteínas y glicoproteínas. Las situaciones anteriores y los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir la existencia en las células eucarióticas de receptores para los fagos que se estudiaron.

Aunque las diferentes líneas celulares probadas son sensibles a los tres fagos, la multiplicidad de infección (moi) mínima que produce el efecto es diferente para cada fago; esto nos lleva a suponer que los receptores son específicos para cada fago y quizá que su número es diferente. La interacción entre el receptor de la célula y el contrareceptor viral es un fenómeno que no es catalizado enzimáticamente, se presenta por choques al azar entre el virus y la célula hasta que la interacción específica receptor-contrareceptor se lleva a cabo. Es claro que en cuanto mayor es el número de elementos que chocan la infección específica se presenta con mayor facilidad. En el caso de bacteriófagos se ha establecido que multiplicidades de infección tan bajas como 0.01 pueden permitir esta unión específica porque en la células bacterianas existen un gran número de receptores para cada fago; en el caso de virus animales la dosis infectiva para cultivo de tejidos al 50% (DICT 50%) es de 10^6 a 10^7 de cada tipo para polio.

En nuestro caso como puede observarse en los resultados obtenidos (tablas 6, 7 y 8) las (moi) necesarias para obtener el efecto citopático varían para cada fago y cada línea celular. El número de células en todos los experimentos es el mismo, es decir, uno de los elementos que pueden interaccionar (receptor celular) es constante y además está fijo, sin embargo el otro elemento de choque (contrareceptor fágico) varía, así en el caso de las células RD la cantidad de fago 9 necesario para

que el efecto se presente este entre 15 μ y 20 μ , lo cual nos permitiría sugerir que el número de receptores específicos para el fago 9 en estas células es bajo, en tanto que en el caso de los fagos 2 y 11 el número de receptores es mayor ya que requieren de una (moi) de 5 μ , este mismo comportamiento puede sugerirse para las otras líneas celulares empleadas. En relación a la especificidad de los receptores consideramos que puede existir, nuevamente tomando en cuenta las (moi) de cada fago para producir el efecto en una línea celular dada, si no hubiese especificidad la (moi) tendría que ser la misma para los diferentes fagos y esto como puede constarse en los resultados no fue así. Otra observación que reforzaría estas suposiciones (receptor específico y número de receptor) es la diferencia que se observa entre la susceptibilidad de las células Hep-2 y Hep-2c a los diferentes fagos como se puede constatar en la tabla 18, las células Hep-2c son más sensibles al ataque de los fagos que las Hep-2. Se ha establecido que las células Hep-2c son más sensibles al virus de la polio que las células Hep-2 (25). Como se indicó el comportamiento de estas dos líneas frente a los fagos también es diferente, pero contrario a la reportada para polio lo cual apoya la sugerencia de la existencia de receptores específicos para los fagos en las células eucarióticas y sugiere además que son diferentes a los que requiere el virus de la polio.

Otra observación importante es el hecho de que las cepas celulares probadas fueron resistentes a los fagos en estudio. La diferencia fundamental entre ambos tipos celulares esto en el material genético, es decir, en las líneas celulares la información genética está alterada, mientras que las cepas celulares conservan la información del tejido que les dió origen. Se ha informado que las células cancerosas sufren modificación en su metabolismo, superficie y antígenos de membrana (27). La aparición de nuevos antígenos u otras proteínas o arreglos de proteínas en la membrana de estas células que probablemente sean afines a los contrareceptores fágicos podrían permitir que haya un reconocimiento por los fagos originando que se produzca el efecto citopático. En el caso de las cepas no existen cambios en los antígenos de superficie y esta podría ser una razón que explique el porque los fagos no producen ningún efecto sobre las cepas celulares, ya que no hay reconocimiento del fago.

Posiblemente otra explicación a este comportamiento es que las cepas celulares y no las líneas tienen la capacidad de producir interferón que es una sustancia de excreción que evita la infección viral; y que podría evitar la acción de los fagos aunque hasta el momento no se tienen datos del efecto de esta sustancia sobre bacteriófagos.

Se observó que el efecto citopático que producen los fagos sobre las células de las líneas Hep-2, Vero y HeLa es semejante al producido por el virus de la polio. En la línea RD el efecto citopático fue diferente, se presentó una gran vacuolización. Se ha informado (22) que virus pequeños de RNA sin envoltura produ-

con pycnosis con desplazamiento del núcleo y una vacuolización muy marcada. Cabe señalar que fagos en estudio tienen RNA como materiales genéticos aunque no se encontró literatura que indique el porque de este efecto, sugerimos que la vacuolización producida por los fagos en estudio en estas células pueda deberse a un cambio en la permeabilidad celular, inducida por los fagos, que evite la salida de desechos metabólicos ó excreciones celulares que al acumularse hacen que las células monten una respuesta de defensa consistente en el englobamiento de estos compuestos en membranas (6). Esta sugerencia puede apoyarse en el trabajo de Jong (22) quien encontró que al infectar la cepa de Malpighio con poxvirus, estos se multiplicaban en unas cuantas células, dando lugar a vacuolización, condensación del núcleo y posteriormente desaparición de este; a medida que este proceso degenerativo se propaga a la células vecinas, se forman vesículas.

Se observó (tablas 11, 12, 13 y 14) que los fagos a pesar de producir efecto citopático no se multiplicaron en las células en ninguno de los casos; este resultado podría ser explicado en primer lugar tomando en cuenta el fenómeno ya descrito de infección abortiva (18). Se sabe que algunas células permisivas dan lugar a alteración de algunas fases de la replicación viral, así las células HeLa que son sensibles al virus de la influenza son capaces de evitar la replicación de ciertas cepas de este virus, lo mismo sucede en el caso de las células L que evitan la replicación del virus de la enfermedad del Newcastle. Es posible que esto este sucediendo en el caso de los fagos en estudio, se requeriría realizar un estudio marcando el ácido nucleico fágico y buscando la marca después de la infección en los cultivos celulares, para poder discernir si efectivamente los fagos están dando lugar a una infección abortiva.

Otra explicación a este resultado sería que el ácido nucleico del fago pudiera expresarse dando lugar a la síntesis de algunos compuestos que alteran el metabolismo celular y conduzcan finalmente a la muerte de la célula. Se tienen evidencias de la expresión de genomas fágicos en células eucarióticas y también se conoce que tanto los bacteriófagos como los virus animales dan lugar a proteínas que alteran el metabolismo del huésped (3, 11 y 18). El tercer lugar puede pensarse que las células respondieron a la presencia del fago o del RNA fágico en su interior como a cualquier elemento extraño sintetizando algún producto que conduzca a su autodestrucción y a la no multiplicación del fago (8).

También se sugiere que el efecto citopático producido por los fagos se deba a que estos no penetren a la célula eucariótica y que el efecto obtenido pueda deberse simplemente a una alteración de la superficie celular debido a la unión del bacteriófago a ella. Se ha establecido en el caso de algunos virus animales como poliovirus (5) que la unión de la cápsida a la superficie celular da lugar a cambios de permeabilidad de la membrana, que condicionan la entrada de grandes cantidades de

sodio (Na^+) con la concomitante salida de potasio (K^+) que trae como resultado una inhibición en la síntesis de proteínas celulares y la muerte de la célula. Por otro lado en adenovirus se ha establecido que la presencia de las fibras caudales (proteínas) en la superficie celular ocasiona una interrupción de la síntesis de proteínas celulares que finalmente daría lugar a la muerte celular (18, 16, 21 y 24). Aunque en el caso del sistema bacteriófago-bacteria este fenómeno no ha sido descrito, creemos que esto podría ser una explicación al efecto observado dado que se está trabajando con un sistema diferente.

Se ha establecido en los sistemas fago-bacteria y virus-célula el fenómeno denominado lisis desde afuera en el que se presenta la lisis de las células sin que el fago se propague cuando las MOI son altas; consideramos que este fenómeno no explica los resultados encontrados (efecto citopático sin propagación del fago) ya que el efecto sería inmediato y en el caso de los sistemas estudiados el efecto citopático se presentó hasta el 5 día después de la infección.

El análisis de los resultados no fue sometido a estudios estadísticos, debido a que el trabajo realizado fue de tipo cualitativo, basándose fundamentalmente en la observación de la presencia o ausencia del efecto citopático; la comparación se hizo con un testigo negativo y un testigo positivo.

IX.-CONCLUSIONES.

- 1.- Los bacteriófagos infectan líneas celulares.
- 2.- Los bacteriófagos no infectan cepas celulares.
- 3.- No hay multiplicación fágica en los diferentes tipos celulares probados.
- 4.- Los bacteriófagos pueden producir diferentes efectos citopáticos dependiendo del tipo celular.
- 5.- La sensibilidad de las células a los fagos depende de su tejido de origen.
- 6.- Los bacteriófagos empleados son muy estables.
- 7.- Sugerimos que las células eucarióticas pueden poseer receptores específicos para los fagos.
- 8.- Proponemos que el efecto citopático pueda ser producido por:
 - a) Alteración de la superficie celular.
 - b) Penetración y expresión del fago o de su ácido nucléico dando metabolitos que destruyen a la célula.
 - c) Modificación del metabolismo celular por la presencia del fago o su ácido nucléico en el interior de la célula.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

X.- PROPUESTAS y/o RECOMENDACIONES

1.- Se sugiere que se trabaje con cultivos primarios para tener un panorama más amplio del efecto citopático ya que se trabajo solamente con líneas y cepas celulares.

2.- Se recomienda que se trabaje un mayor número de cepas y líneas celulares para conocer más sobre los efectos que producen los bacteriófagos y poder darles un empleo mejor, en el futuro.

3.- Se recomienda realizar pruebas bioquímicas para conocer la naturaleza del material que se localiza en las vacuolas de la línea celular RD para tener conocimiento sobre su origen.

4.- Se sugiere realizar un sondeo del material genético fúgico durante la infección para tratar de establecer si este presenta a la célula y si existe o no una replicación dentro de la mismo.

5.- Otra sugerencia es probar fantasmas fúgicos para observar si se produce el efecto citopático.

6.-Se sugiere que los sobrenadantes obtenidos después de la infección con fagos, terminada la lisis celular sean utilizados para reinfectar células y nuevamente titularlos para ver si hay propagación (14).

XI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Ed Interscience Publishers.
- 2.- Bari G. 1975. Phage in live virus vaccines: Are they harmful to people? Science, 187: 522-523.
- 3.- Birge, A. E. 1981. Bacterial and Bacteriophage Genetics. Ed. Springer-Verlag. pp 67-95, 99-121.
- 4.- Bottenstein, J.E. 1988 Cell culture, fusion, manipulation and tissue culture advances in vertebrate cell culture Methods. Science. Vol. 239: 4841, part 2 page G42.
- 5.- Carrasco, J.S. 1976. Sodium ions and the shut off host cell protein synthesis by picornaviruses. Nature, 264: 857.
- 6.- Charlotte J.A. 1983 Biología celular. Ed. Grupo editorial Iberoamericana, México D.F. pp 21-32.
- 7.- Chu, F.C., J.B. Johnson, H.C. Orr, P.G. Probst, and J.C. Petriciani. 1973. Bacterial virus contamination of fetal bovine sera. In vitro 9: 31-34.
- 8.- Correa, P.T. 1975. Texto de patología Ed La prensa médica mexicana pp 97-125.
- 9.- Cumming, H. 1975 Virología. Cultivo de tejidos Ed. El Manual moderno, S.A., México.
- 10.- Davis, B.D., R. Dulbecco, H.S. Ginsberg, W.B. Wood. 1978. Tratado de Microbiología Ed. Salvat. pp
- 11.- Doy, C.H., P.M. Gresshoff, and B.G. Bolfe. 1973. Biological and Molecular evidence for the transgenesis of genes from bacteria to plant cells. Proc. Nat. Acad. 70: 723-726.
- 12.- Fenner F., D.O. White, 1973 Virología Médica Ed. La prensa médica mexicana, México, pp 61-70.
- 13.- Hayes, W.T. 1968. The genetics of bacteria and their viruses Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. pp 179-200.
- 14.- Hoskins, J.M. 1959 Host controlled variation in animal viruses. In virus growth and variation Ed. Isaacs and Lacey. B.W. Cambridge, pp 122-141.
- 15.- Jean D. Acton, Louis S. Kucera, Quentin N. Myrvik Russell, S. Werser. Virología. Ed Wile pp 399-404.

- 16.- Luria, S.E. 1977 General Virology. Ed. Wiley pp 399-404
- 17.- Martínez, R.M.L. 1985 Caracterización de bacteriófagos aislados de sueros bovinos y del efecto citopático que producen sobre cultivos celulares. Tesis profesional ENCB-IPN.
- 18.- Merril, C.R., M.R. Geier, and J.C. Patriciani. 1971. Bacterial virus gene expression in human cells. Nature (London) 233: 398-400.
- 19.- Merril, C.R., T.B. Friedman, A.F. ATTallah, M.R. Geier, k. Krell, and R.VarKin. 1978 Isolation of bacteriophages from commercial sera. In Vitro B:91-93
- 20.- Patriciani, J.C., F.C. Chu, and J.B. Jhson 1973. Bacteriophages in live vaccines. Procc. Soc. Exp. Biol. Med. 144: 789-793
- 21.- RifKin, D.B., and J.P.. Quigley 1974. Virus induced modification of cellular membranes related to viral structure. Ann. Rev. Microbiol. 28: 325
- 22.- Roch, U.E. 1964 Bacteriología y Virología Médica. 2a. edición Ed Porrúa, México pp 365.
- 23.- Romo, Q.M. 1978. Aislamiento y Caracterización de Bacteriófagos de suero empleados para obter cultivos celulares. Tesis profesional ENCB-IPN.
- 24.- Rowe, W.P., J.W. Hartley, B. Roizman, and H.B. Levy 1958. Characterization of a factor formed in the course of Adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass. J. Exp. Med. 108:713.
- 25.- Shannon J.E and M.M.M. The american type collection, Catalogue of strains II First Edition, Managing Editor .pp 21-22. 40-41, 50-51, 74-75, 104-107.
- 26.- Sober, H.A. 1970. Hand book of biochemistry selected data for molecular biology. The chemical Ruber Co. N.Y. pp J 292-298.
- 27.- Stanley L.R. 1975 Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana, S.A. de C.V. México pp 135-136.
- 28.- Wenger, S.L., et al 1978. The cytogenetic proliferative and viability effects of four bacteriophages on human lymphocytes. In vitro 14: 543-549.
- 29.- Yamamoto, K.R. et al 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethyleneglycol and its application to large-scale virus purification. Virology 40:734-744.

