



Universidad Nacional Autónoma de México

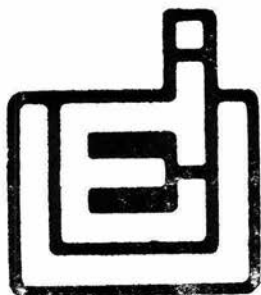
Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

Análisis de las Propiedades Físicoquímicas y Moleculares del Virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
FRANCISCO DOMINGUEZ CANGAS

Los Reyes Iztacala, Estado de Méx.

1993





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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 23 DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL BAJO LA DIRECCION DEL DOCTOR JOSE I. TAPIA RAMIREZ A QUIEN AGRADEZCO SU INTERES Y APOYO CONSTANTE.

A MIS PADRES:

POR EL CARIÑO Y LOS SABIOS CONSEJOS QUE SON
EL NUCLEO QUE FORMA MI HUMANIDAD.

A MI MADRE:

MAGDALENA: GRACIAS POR IMPULSARME EN MIS MOMENTOS DE DEBILIDAD
TRANSMITIENDOME LA CUALIDAD DE TEMPLANZA.

A LA MEMORIA DE MI PADRE:

FRANCISCO

A MIS HERMANOS:

ROSA ELIA, MANUEL, ARMANDO, JOSEFINA Y MARGARITA

AGRADEZCO:

EN FORMA MUY ESPECIAL AL DOCTOR JOSE I. TAPIA RAMIREZ
POR EL INTERES QUE HA MOSTRADO EN MI FORMACION CIENTIFICA
DURANTE LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO Y A LOS DETALLES
PERSONALES QUE HICIERON AGRADABLE MI ESTANCIA EN SU
LABORATORIO.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO:

CARLOS, MONICA, ROBERTO, ELENA, ERICKA, SALVADOR Y FERNANDO.

A LA COMPAÑIA LAPISA.

A MIS PROFESORES.

A MIS AMIGOS.

INDICE.

INDICE DE FIGURAS _____	6
INTRODUCCION _____	8
Antecedentes generales _____	8
Replicacion viral _____	9
Adsorción _____	9
Penetración y liberación del genoma viral _____	9
Periodo de eclipse _____	10
Liberación _____	10
Clasificación de los virus animales _____	10
Métodos de análisis de los virus _____	11
Centrifugación _____	11
Microscopía electrónica _____	13
Cultivo de celulas animales _____	14
Antecedentes directos _____	16
Enfermedades virales que afectan al cerdo _____	17
OBJETIVOS _____	23
MATERIALES Y METODOS _____	24
Material biologico _____	24
Medios de cultivo _____	24
Soluciones _____	24
Solución de tripsina-EDTA _____	24
Solución de agar para plaqueo _____	24
Solución de PEG-6000 _____	25
Amortiguador TNE _____	25
Amortiguador RSB _____	25
Solucion de TCA (para fijar monocapas) _____	25
Solucion de cristal violeta _____	25
Soluciones para electroforesis (PAGE) _____	25
Solución RGB _____	25
Solución SGB _____	25
Solucion de APS _____	25
Amortiguador de corrida _____	26
Solución de acrilamida-bis acrilamida _____	26
Amortiguador para muestras _____	26
Solución para tinción de geles _____	26

Solución para desteñir _____	26
Soluciones usadas en la electroforesis en geles de agarosa _____	26
Amortiguador TBE _____	26
Gel de agarosa _____	27
Amortiguador para muestras _____	27
Mezcla de centelleo líquido _____	27
Material radioactivo _____	27
Soluciones empleadas en la fluorografía de geles de poliacrilamida _____	27
Soluciones para formar gradientes de sacarosa _____	27
Solución A _____	27
Solución B _____	28
Soluciones utilizadas en los inmunoblots _____	28
Solución de negro de amido _____	28
Amortiguador TBST _____	28
Amortiguador AP _____	28
Aislamiento de virus a partir de cerebros de cerdo _____	29
Cultivo de células PK-15 y CV-1P _____	29
Infección de células con virus _____	29
Titulación de virus _____	30
Purificación de viriones marcados con radioactividad _____	30
Gradientes de sacarosa _____	31
Análisis de infectividad de fracciones del gradiente de sacarosa _____	31
Tinción de viriones para microscopía electrónica _____	32
Geles de poliacrilamida al 10% _____	32
Fluorografía de geles de poliacrilamida _____	33
Análisis de ácidos nucleicos citoplasmáticos en células infectadas con VSOA _____	33
Geles de agarosa _____	34
Obtención de sueros hiperinmunes contra el VSOA _____	34
Inmunoblots _____	35
RESULTADOS _____	36
DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS _____	59
BIBLIOGRAFIA. _____	67

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA	TITULO	PAGINA
A	Familias de virus animales -----	12
1	Estrategia utilizada en el aislamiento, purificación y caracterización del virus del Síndrome del Ojo Azul -----	37
2	Esquema del procesamiento de muestras de cerebro para el aislamiento del VSOA _____	38
3	Efecto citopático del VSOA sobre células CV-1P -----	40
3a	Efecto citopático del VSOA sobre células CV-1P -----	41
4	Determinación de unidades formadoras de placa del VSOA -----	42
5	Esquema de purificación de viriones del VSOA marcados con [³ H]-uridina y [³⁵ S]-metionina -----	44
6	Perfil de distribución de incorporación de [³ H]-uridina y [³⁵ S]-metionina a lo largo del gradiente de sacarosa -----	45
7	Distribución de infectividad de los viriones del VSOA a lo largo del gradiente de sacarosa -----	46
8	Microscopía electrónica de partículas virales del virus del Síndrome del Ojo Azul _____	47
9	Microscopía electrónica de las partículas virales -----	48
10	Microscopía electrónica de nucleocapsides y cubiertas -----	49
11	Fluorografía de las proteínas del virus purificado por gradientes de sacarosa -----	51

12	Purificación del virus de Síndrome del Ojo Azul -----	52
13	Electroforesis de las proteínas estructurales del VSOA -----	53
14	Diagrama de flujo para el analisis de RNA citoplasmático de celulas CV-1P infectadas con VSOA -----	54
15	Electroforesis en gel de agarosa de RNA citoplasmático de celulas CV-1P infectadas con el VSOA -----	55
16	Ensayo de neutralización para 3 sueros hiperinmunes a viriones del VSOA _____	57
17	Immunoblots -----	58

INTRODUCCION

ANTECEDENTES GENERALES.

Los virus constituyen el grupo de agentes patógenos más importante para el humano y, además para una gran cantidad de organismos de interes económico para el hombre. En las primeras etapas del estudio de los virus, llamaron la atención por su tamaño relativamente pequeño, además de ser parásitos intracelulares obligados. Dentro de las características distintivas de los virus podemos mencionar su organización y composición así como los mecanismos de replicación usados por este.

En cuanto a su composición, en la actualidad se acepta que una partícula viral completa o virión contiene un solo tipo de ácido nucleico DNA ó RNA y una cubierta proteica (cápside), que rodea el material genético. Aunque, por otra parte, existen virus que se encuentran rodeados por una envoltura o membrana, la cual está constituida por lípidos, carbohidratos y glicoproteínas. Los viriones carecen además de la maquinaria necesaria para su multiplicación, como son; ribosomas, sistemas enzimáticos necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, y sistemas generadores de ATP. Aunque algunos virus contienen dentro de su cápside enzimas implicadas en la replicación de su genoma (la transcriptasa reversa en retrovirus), está no es una característica general de todos los virus (1).

El tamaño de los virus es variable; sin embargo, la mayor parte de ellos son más pequeños que las bacterias, aunque existen algunos virus de mayor tamaño que ciertas bacterias como son mycoplasmas, rickettsias y clamidias; las cuales fueron consideradas durante algún tiempo, como virus, debido principalmente a su tamaño y parasitismo intracelular. El tamaño y las características estructurales de un virus pueden determinarse por técnicas de filtración, con el uso de polímeros ó membranas de celulosa y, por microscopía electrónica. Esta última permite obtener valores más precisos de las dimensiones y características

morfológicas del virus (ver más adelante).

A diferencia de lo que ocurre con células y bacterias, el tamaño de los virus no aumenta, ni llevan a cabo su reproducción por mecanismos típicos como son, fisión binaria, gemación o mitosis. Los virus más bien se multiplican por síntesis y ensamble de sus componentes, ello explica por que no varían de tamaño (2).

REPLICACION VIRAL.

ADSORCION.

La primera etapa de una infección viral es el contacto entre la partícula viral y la célula huésped, dicho evento ocurre por colisiones al azar, sin embargo la adhesión o adsorción del virus a la superficie celular depende de la presencia de receptores específicos para el virus en la membrana celular y su contraparte de receptores de adhesión en la superficie del virus. Si los receptores celulares son destruidos por agentes enzimáticos o químicos, el virus no se adsorbe a la célula y no se lleva a cabo la infección viral. Cabe mencionar que bajo ciertas condiciones "in vitro", es posible iniciar una infección viral con el ácido nucleico purificado de ciertos virus. La infección de este tipo salva las barreras de los receptores celulares.

PENETRACION Y LIBERACION DEL GENOMA VIRAL.

La siguiente etapa es conocida como penetración y en ella el virus se dirige hacia el interior de la célula huésped (en algunos casos por un mecanismo similar a la fagocitosis), entonces la partícula viral sufre cambios conformacionales que determinan que el material genético se descubra o libere en el citoplasma. Las fases de penetración y liberación son variables para cada tipo de virus, y a pesar de que han sido extensamente estudiadas, aún faltan elementos por conocer (3). Por ejemplo para el virus vaccinia (virus complejo, con envoltura), la cubierta exterior es removida, mientras la partícula está en el interior de la vacuola fagocítica, y el core interno es entonces liberado hacia el citoplasma, donde una enzima específica del virus, desnuda y libera

el DNA viral.

PERIODO DE ECLIPSE.

El período de infección en que el virus deja de existir como partícula viral es conocido como período de eclipse, y finaliza cuando nuevos virus son formados y liberados al espacio extracelular. En esta etapa el virus comienza a sintetizar sus RNAs y proteínas necesarias para llevar a cabo su replicación. Posteriormente se inicia la traducción de las proteínas que formaran la cápside del virus, para finalmente ensamblar cada uno de sus componentes, los cuales se asocian al ácido nucleico viral, y producen partículas virales maduras que posteriormente son liberadas

Cabe mencionar que durante el período de eclipse la mayoría de los virus modifican de manera significativa el metabolismo de la célula huésped, y que también, dependiendo del tipo de virus varía la ruta de síntesis de sus macromoléculas (RNA, Proteínas, DNA) (2,4).

LIBERACION:

En la etapa final de la infección, las nuevas partículas virales son liberadas al medio exterior. El camino que siguen los diferentes tipos de virus varía, y depende en gran medida de la naturaleza de su material genético y de la estructura y composición del virión, por ejemplo los virus con envoltura generalmente salen llevándose segmentos de la membrana plasmática. Existen otros tipos de virus en los que la liberación se da por el rompimiento de la célula huésped (lisis celular) (4).

CLASIFICACION DE LOS VIRUS ANIMALES

Los virus animales se han agrupado con base en sus relaciones evolutivas y esto ha dado como resultado la organización en familias con una gran diversidad de estrategias de replicación y expresión. Es claro que aunque el modo de replicación varía ampliamente entre las familias, todos los virus tienen necesidades comunes en lo que respecta a la maquinaria celular para la síntesis

de proteínas codificadas por el virus. Una de las características comunes en cualquier virus es la presencia de RNAm para la síntesis de proteínas virales. Es importante hacer notar el papel central del RNAm como criterio para la clasificación biológica y molecular de los virus animales basados en la relación que se establece entre el genoma viral y el RNAm y también sobre el modo de replicación del genoma.

La nomenclatura y clasificación de los virus plantea un fuerte problema para la Virología. El propósito de la clasificación es agrupar dentro de una categorías aquellos elementos que están cercanamente relacionados, usando criterios morfológicos y fisiológicos (ver figura A).

METODOS DE ANALISIS DE VIRUS.

En el estudio de un virus en particular es indispensable hacer determinaciones físico-químicas y moleculares acerca de la estructura y composición del virus, para lo cual se requieren preparaciones de virus altamente purificadas, todo esto con el fin de obtener parámetros de referencia y comparación.

Una primera fase de la purificación consiste en liberar las partículas virales de los restos celulares, lo cual puede efectuarse por varios métodos, como; ciclos de congelación descongelación, ultrasonido, homogeneización, tratamiento con detergentes suaves, uso de agentes abrasivos, etc.

CENTRIFUGACION.

La centrifugación y ultracentrifugación en sus diferentes modalidades ha sido importante en el aislamiento y caracterización de los virus (6). La separación de contaminantes insolubles y organelos celulares de la preparación viral, se lleva a cabo utilizando centrifugación diferencial; con ciclos alternados de baja y alta velocidad las partículas de mayor tamaño logran separarse de las menores. Posteriormente el virus puede purificarse por centrifugación zonal (gradiente de velocidad), ó

FAMILIAS DE VIRUS QUE INFECTAN VERTEBRADOS

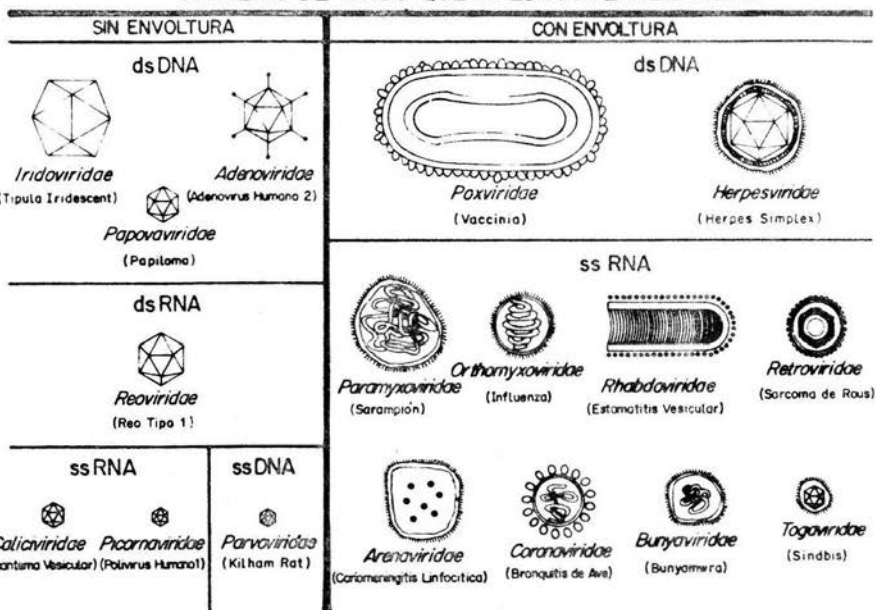


Figura A. Esquema de las familias de virus que infectan vertebrados. Tomado de Matthews 1982 (5).

bien por centrifugación en gradientes al equilibrio (isopícnico). En el primero, la centrifugación se realiza a través de un gradiente preformado de una solución densa, como glicerol, ficol o sacarosa. Las partículas virales migran a través del gradiente, y son separadas en base a su coeficiente de sedimentación, el cual depende principalmente del tamaño y forma de la partícula, y en menor grado de su densidad. La sedimentación zonal permite separar partículas virales y macromoléculas que poseen constantes de sedimentación muy similares. La centrifugación en gradientes al equilibrio ó isopícnicos es una técnica en la que el gradiente se forma durante la centrifugación. Al formarse el gradiente de concentración se forma también un gradiente de densidad, las partículas migran entonces hacia la zona donde la densidad de flotación es igual a la suya. Este tipo de centrifugación permite separar macromoléculas con igual coeficiente de sedimentación pero distinta densidad de flotación y generalmente se realiza utilizando sales densas como CsCl, metrizamida ó Cs SO₄.

Debe tenerse en cuenta que determinadas preparaciones víricas pueden contener virus contaminantes además de los inoculados, y que los primeros pueden ser enriquecidos preferencialmente durante la purificación vírica. Este riesgo puede reducirse comprobando que las partículas obtenidas durante los diferentes pasos de la purificación viral, tengan las mismas propiedades físicas, inmunológicas y biológicas.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Con el uso de la microscopía electrónica se han determinado las características estructurales de los virus, que tienen considerable importancia para comprender su función (5).

Una de estas técnicas es el cálculo de sombras en la que se proyecta un vapor metálico con un ángulo sobre la membrana a la cual están adheridas las partículas virales, cubriéndolas con una capa de solución electrodensa. La deposición del metal es más gruesa en el lado de las partículas expuestas al vapor que refuerza sus límites; lo cual está ausente en el lado opuesto donde se forma una << sombra >>. El tamaño y forma de las partículas pueden

deducirse del estudio de las partes perfiladas y de las sombras.

Para la coloración negativa las partículas virales se mezclan con una solución de fosfotungstato sódico altamente opaca a los electrones. La mezcla se extiende seguidamente en una capa fina sobre una membrana de carbón y se seca.

Las partículas que no son penetradas por la sal permanecen como áreas claras sobre un fondo opaco. Este método permite un estudio de los detalles de las estructuras de la superficie, debido a que la sal penetra entre las partes prominentes y las hace visibles. El lado de las partículas contra la membrana de carbón ayuda a menudo a resaltar los detalles.

Otra aplicación de la microscopía electrónica es la observación de ácidos nucleicos, de tal forma que es posible analizar características genéticas de determinados virus. Por ejemplo, se ha podido examinar la longitud, tipo de cadena ya sea sencilla ó doble, flexibilidad, superenrollamiento y circularidad

CULTIVOS DE CELULAS ANIMALES.

El desarrollo de nuevos métodos para el cultivo de células animales in "vitro" ha contribuido de forma extraordinaria al progreso de la virología animal. Además ha permitido el análisis y estudio de funciones implicadas en regulación genética (1,4,7).

Para reproducir células animales, en primer lugar se separa un fragmento de tejido en sus componentes celulares; generalmente con ayuda mecánica o enzimas proteolíticas como tripsina. Después esta suspensión celular se transfiere a un recipiente o caja de vidrio ó plástico, y se le adiciona medio de cultivo líquido, el cual contiene los iones requeridos por la célula, a concentraciones isosmóticas, aminoácidos y vitaminas, suero animal en una proporción que varía entre un escaso porcentaje y un 50%. El bicarbonato en el medio de cultivo suele emplearse como un tampón en equilibrio con el bióxido de carbono del aire o de la incubadora. Después de un tiempo variable de latencia, las células empiezan a dividirse por mitosis, de esta manera se obtiene un cultivo primario. Las células de cultivos primarios pueden separarse de las paredes de la caja de cultivo mediante tripsina y

el agente quelante EDTA y luego pueden emplearse para iniciar los cultivos secundarios. Cuando las células son resemebradas se dice que se inicia un "pase" celular, cabe mencionar que las células transformadas suelen resistir un número mayor de pases que las normales. Por otra parte también las células secretan al medio factores de crecimiento que permiten un mejor desarrollo celular.

Las células procedentes de cultivos primarios pueden transferirse determinado número de veces, aunque este proceso suele provocar la selección de un tipo celular, que se convierte en predominante. Las células pueden continuar luego la multiplicación a una proporción constante de pases sucesivos, y del cultivo primario se dice que se ha originado una cepa celular (denominada a menudo cepa celular diploide), cuyas células no presentan alteraciones morfológicas ni de crecimiento. Para iniciar un nuevo cultivo, las células deben ser transferidas en densidades relativamente elevadas. A pesar de ello las posibilidades de transferencia de las cepas celulares es limitada; por ejemplo en el caso de células animales el ritmo de crecimiento y las características genotípicas se modifica al cabo de 50 duplicaciones, terminando así el ciclo vital de la cepa.

Durante la multiplicación de una cepa celular, algunas células empiezan a alterarse: adquieren una morfología distinta, crecen más rápidamente y permiten iniciar un cultivo a partir de un inóculo menor. La clona derivada de estas células, a diferencia de la cepa celular que la ha originado, posee un período vital prácticamente ilimitado y recibe el nombre de línea celular. Las líneas celulares obtenidas a partir de células normales presentan escasa densidad de saturación en condiciones estandar (por ejemplo, en presencia de un 10 % de suero y con cambios de medio de dos a tres veces por semana). Dichas células crecen rápidamente para formar una monocapa; sin embargo, después de múltiples pases (50 a 60), el ritmo de crecimiento disminuye, y empiezan a ocurrir cambios cromosómicos (aumento en el número de cromosomas, translocaciones, etc.).

ANTECEDENTES DIRECTOS.

Además de los productos para la alimentación humana la industria porcícola es capaz de ofrecer subproductos farmacéuticos, así como derivados industriales y de investigación científica .

La porcicultura moderna se inicia en México en la década de los años treintas, cuando viene el cambio de usos y costumbres y hacen su aparición los aceites vegetales; esto marca una evolución en la porcicultura y empiezan los porcicultores a hacer importaciones de las razas Duroc y Yorkshire que son con las que básicamente cuenta el país en la actualidad, además de la Hamshire y Landrace.

Después de transcurridos otros treinta años, en México se inicia un crecimiento paulatino pero constante lográndose cambios en el aprovechamiento del cerdo, acentuándose éstos hacia las partes magras. Se crea el compromiso de una mayor alimentación de esta especie. También durante esta época el país empieza a mejorar en el sector agrícola y surgen las demandas de granos y el aprovechamiento de sus esquilmos (trigo , maíz y sorgo).

La importancia de la industria porcícola a nivel nacional es amplia, ya que representa una fuente de empleos e ingresos para un importante sector de la población. Se ha dicho en ocasiones que esta especie compite con la población humana por los granos, pero en este sentido el cerdo es un animal eficiente para convertir la energía del alimento en energía corporal, siendo superado en este renglon por las aves y los peces.

A pesar de que la alimentación del porcino es primordialmente de granos, este omnívoro puede consumir una gran cantidad de productos y subproductos agrícolas que difícilmente podrían ser consumidos por el hombre (8).

Enfermedades virales que afectan al cerdo.

Los síndromes nerviosos básicos a partir de los cuales se puede dar una guía general de diagnóstico, son seis :

- I. Convulsiones
- II. Incoordinación general (ataxia)
- III. Temblores
- IV. Patas abiertas
- V. Parálisis
- VI. Opistotonos .

Las enfermedades que deben ser consideradas dentro de los signos básicos de convulsiones, fiebre y ausencia de salivación (9,10), son :

- a) Teschen
- b) Fiebre porcina clásica
- c) Fiebre porcina Africana
- d) Encefalitis por *Haemophilus*
- e) Encefalitis estreptococcica
- g) Encefalitis por virus hemaglutinante

De éstas, la fiebre porcina africana no está diagnosticada en México, aunque produciría manifestaciones similares a las del cólera porcino. La listeriosis es una enfermedad que rara vez se ha diagnosticado. Se ha sospechado la presencia de Teschen en México, pero a la fecha no se ha confirmado. En cuanto a la encefalitis por virus hemaglutinante su signología es bastante similar a la de Teschen.

Las enfermedades que afectan al sistema nervioso central de los cerdos han estado presentes desde que se inició la porcicultura, cobrando importancia en los últimos años ya que han producido hasta un 30 % de mortalidad en algunas granjas.

En el año de 1980 apareció en México una nueva enfermedad de los cerdos que además de causar encefalitis y falla reproductiva produce opacidad de la córnea, razón por la cual se le denominó Síndrome del Ojo Azul (SOA) (11).

Los intentos iniciales por reconocer la causa del síndrome revelaron que los cambios observados indicaban una infección viral; sin embargo, los estudios realizados no coincidían con las

enfermedades virales de los cerdos reconocidas en México , tales como: Cólera porcino, tremor congénito, Aujeszky y rabia (12).

Inicialmente algunos clínicos consideraron la opacidad como una lesión aislada y al realizar necropsias y exámenes histopatológicos enfocados a ojo e hígado observaron en éste último cambios de color y textura denominándosele hígado atigrado y esto llevó erróneamente a la conclusión de que existía un tóxico en la dieta, diagnosticando queratitis por deficiencia de riboflavina debido a que el tóxico afectaba hígado e interfería con el metabolismo de la síntesis de vitamina B2 manifestándose como una opacidad corneal (13,14,15,16). Esta hipótesis confusa se aceptó por clínicos y productores aplicando un tratamiento con vitamina B2 y complejo B. Es importante señalar que la deficiencia de vitamina B2 causa opacidad del cristalino (17), pero no de la córnea y que en el cerdo no se sintetiza en el hígado, sino que es absorbida y utilizada por todas las células del organismo.

Sin embargo los primeros reportes que de la enfermedad datan de 1981 cuando Campos habla del fenómeno en una convención acerca de la posible causa (13).

Cuando aparecieron los primeros casos de cerdos zarcos ó con síndrome del ojo azul se pensó que estos correspondían a una deficiencia de vitamina "B" y/o intoxicación por metionina y/o una queratitis bacteriana y/o una queratitis viral (18).

Un brote de encefalitis, observado en lechones de una granja comercial de 2500 vientres localizada en la Piedad Michoacán, se prolongó durante 9 semanas con un total de 600 cerdos muertos, siendo las únicas lesiones macroscópicas neumonía en lóbulos apical y cardíaco, conjuntivitis y opacidad de la córnea uni ó bilateral; microscópicamente había meningoencefalitis no supurativa y neumonía intersticial (19 y 20). No fué posible determinar como fué el brote inicial ni el origen del mismo, ya que como es sabido en La Piedad Michoacán entran cerdos procedentes de otras zonas porcícolas del país así como de Estados Unidos y Canadá; además de introducirse numerosos biológicos y semen de Estados Unidos (21).

Como resultado de las necropsias y estudios histopatológicos

que se practicaron a los lechones durante los primeros casos del síndrome, se pensó que la enfermedad podría ser de origen viral (22).

En 1980 y 1981 se inocularon embriones de pollo de 6 días de edad, vía cámara alantoidea; ratones de 21 días de edad por varias vías y conejos adultos por vía subcutánea e intranasal. Los ratones inoculados vía intracerebral y algunos vía nasal, presentaron, al 7o día, incoordinación, rigidez de miembros posteriores, dorso arqueado, pelo erizado, conjuntivitis, ojos pegados y muerte. En éstos se observó además una encefalitis no supurativa y se aisló el virus de diferentes órganos. Los embriones murieron y hubo crecimiento abundante del virus en ellos. Los conejos no mostraron síntomas clínicos, pero desarrollaron altos títulos de anticuerpos contra el virus (23). Por otra parte tres camadas de cerdos lactantes de 1 día de edad fueron inoculados por vía nasal, intratraqueal, e intracerebral, los cuales desarrollaron síntomas nerviosos y murieron 6 días después, recuperándose el virus de diferentes órganos.

Dos cerdas de 34 y 95 días de gestación inoculadas vía intratraqueal parieron fetos momificados ó muertos. Las cerdas desarrollaron anticuerpos y sus lechones viables fueron inoculados 24 horas después de tomar calostro, resistiendo la infección y no desarrollando la enfermedad; demostrando así inmunidad pasiva por la presencia de anticuerpos contra el virus en el calostro (16,24,25).

En 1985 se inocularon vía intratraqueal 11 lechones de 1 día de edad, lográndose por primera vez reproducir la opacidad unilateral en uno de ellos (12). En el mismo año se aisló una nueva cepa de un lote de campo en La Piedad, Michoacán (26,27)

En 1986 se estudiaron cepas recuperadas de 12 brotes ocurridos de 1980 a 1985. De éstas, 7 fueron de granjas de ciclo completo y 5 de engordadoras y se concluyó que hay diferencias en virulencia de la cepa inicial con respecto a una aislada de brotes de granjas engordadoras en 1984, y causa incoordinación y conjuntivitis en animales inoculados (28). Ese mismo año un estudio reveló que en

sueros colectados en 1972 ya había anticuerpos circulantes contra el virus (29).

El cerdo es el único animal detectado hasta el momento que puede ser afectado por el SOA (30). No obstante se han detectado anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación tanto en cerdas reproductoras como en ratas capturadas dentro de las mismas granjas, con títulos de 1:20 para las ratas en muestras procedentes de Coacalco, Edo. de México.

Al infectar experimentalmente ratones adultos con el virus por vía intracerebral, se observó temblor y excitación. La muerte ocurrió entre los tres y cinco días después de la inoculación; el virus se pudo reaislar de cerebro, hígado, pulmón y bazo, al inocular macerados de estos órganos en células PK-15. El virus fué altamente infeccioso y letal para ratones y cerdos muy jóvenes, con tropismo hacia el sistema nervioso central y el tracto respiratorio (31).

En un experimento donde se inocularon 18 ratones de aproximadamente seis semanas de edad por vía intracerebral, se observó muerte desde las 48 horas postinoculación, presentando postración con respiración abdominal, arqueamiento del dorso, caminar en círculos con la cabeza ladeada, pérdida del equilibrio, parálisis de los miembros anteriores y se enterraban entre el material de la cama antes de morir; al término de la observación, que fué de ocho días, quedaron 11 ratones vivos, los cuales aparentemente se recuperaron (32).

Stephano en 1984 describe el efecto del virus responsable del Síndrome del Ojo Azul en cerdas gestantes que fueron inoculadas experimentalmente. Cuando la infección ocurre al inicio de la gestación, se produce muerte embrionaria, reabsorción y retorno al estro, bajando la fertilidad. Cuando ocurre a mediados de la gestación se produce muerte fetal con momificación ó infección de los lechones después del nacimiento. Cuando la cerda se infecta con tiempo suficiente para desarrollar anticuerpos, confiere inmunidad pasiva a los lechones con el calostro (24).

Campos, R. y Carbajal, M. reportaron que en los sementales afectados por un brote del SOA (30 % de la población total en una

granja) aparecía un deterioro en la calidad del semen que provocó infertilidad en las hembras cubiertas por estos sementales. También pudieron aislar el virus a partir del semen de estos cerdos, propagando el virus en embriones de pollo.

En cerdos la ruta natural de infección es la nasofaringe, el sitio inicial de replicación es la mucosa nasal, pasando de ahí al sistema nervioso central en un estado temprano. El pulmón queda indudablemente afectado en cerdos de diferentes edades, incluso en aquellos sacrificados en estado temprano de la infección .

El virus fué aislado de lechones infectados en condiciones de campo en una granja de ciclo completo, localizada en el rumbo del Lago Guadalupe, Edo. de México. Los órganos en los que se encontro el virus fueron: riñón, cerebelo, pulmón, médula espinal cervical, cerebro e hígado (33).

Martinez L.,A y Correa G., P. (27) instilaron 2 cerdas (con 132 días de gestación), por las vías del saco conjuntival, orificio nasal y oral con una suspensión del virus, y concluyeron que las cerdas adultas permanecieron clínicamente sanas. Durante la gestación, el virus cruzó la barrera placentaria e infectó a 3 de 17 fetos en útero; aparentemente ocasionó mortinatos y nacidos débiles al exponer cerdas en el tercer tercio de gestación. Aparentemente los lechones no afectados en útero, al nacer e ingerir calostro, se protegen y no presentan la enfermedad. Por otra parte se encuentra opacidad bilateral en lechones infectados congénitamente.

En lechones inoculados experimentalmente el virus se recupera de la sangre y de los diferentes tejidos como riñón, bazo, hígado y ganglios mesentéricos, pero en estos tejidos no se observaron cambios macroscópicos ó histológicos (33).

El virus del SOA se replica con facilidad en cultivos primarios de células de riñón de cerdo, tiroides de bovino y líneas celulares tales como: riñón y testículo de cerdo (PK-15 y ST), riñón de gato (CK) y Hamster (BHK 21), dermis equina (ED), etc.

Los primeros intentos de caracterización del virus fueron hechos por Moreno Lopez, J. y Correa Girón, P. en 1986 (26) quienes

encontraron que el virus es morfológicamente parecido a la familia de los Paramixoviridae, sin embargo en estudios serológicos no encontraron una reacción cruzada con diferentes sueros dirigidos contra virus de esta familia de virus.

OBJETIVO GENERAL:

Análisis de las propiedades físico-químicas y moleculares del virus del Síndrome del Ojo Azul.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Aislar y purificar el virus del Síndrome del Ojo Azul.
- 2) Análisis de los componentes (proteínas y ácido nucleico) y morfología del virus.
- 3) Obtención de anticuerpos policlonales neutralizantes dirigidos contra el VSOA y análisis por immuno-blot de las proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de los sueros neutralizantes.

MATERIAL Y METODOS:

1.0 Material biológico.

1.1 Células. Para la realización de este trabajo se utilizaron células PK15 (derivadas de riñón de cerdo) y CV-1P (de riñón de mono) crecidas en monocapa a confluencia.

2.0 Medios de cultivo.

2.1 Medio Dulbecco 1X. El contenido de un paquete comercial fué disuelto en 890 ml de agua bidestilada estéril, se le adicionó 3.7 gr. de bicarbonato de sodio y 3.5 gr. de dextrosa, se ajustó el pH a 7.4 con CO_2 y fué esterilizado por filtración. Para preparar el medio completo a cada 100 ml de medio se adicionó 10 ml de suero fetal de ternera (para células PK15) y suero de neonato (para células CV-1P) y en cada uno de los casos se añadió 1 ml de solución de antibióticos 100 X.

2.2 Medio Dulbecco 2X. Para preparar este medio se realiza la misma operación pero esta vez con la mitad de volumen de agua.

2.3 Solución de antibióticos Penicilina-Estreptomicina (100 X). 5×10^6 unidades de penicilina G sodica y 5 gr. de estreptomicina se disolvieron en agua bidestilada estéril, se aforó a un litro y se filtró por membranas Millipore de 0.22μ y la solución fué almacenada a -20°C hasta su uso.

3.0 Soluciones.

3.1 Solución de tripsina 0.05 % EDTA 0.02 % . Para preparar 1 litro, se disuelven 8 gr. de NaCl; 0.4 gr. de KCl; 1 gr. de dextrosa; 0.58 gr. de NaHCO_3 ; 0.5 gr. de Tripsina; 0.2 gr. de EDTA; 0.5 ml de rojo de fenol al 0.5 % . Después de disolver los reactivos se ajustó el pH a 7.4 con HCl 0.1 N. Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C .

3.2 Solución de agar al 1.8 % para plaqueo. se pesan 1.8 gramos de agar noble, se añaden a 100 ml de agua bidestilada y se

esteriliza por 20 minutos a 120 °C en autoclave.

3.3 Solución de PEG-6000 36% .Pesar 36 gr. de Polietilen-glicol 6000 y disolver lentamente, aforar a 100 ml y esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

3.4 Amortiguador TNE.

TRIZMA (Tris[hydroximetil]-aminometano hidrocloreuro) 10 mM
pH 8.0

NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM

3.5 Amortiguador RSB.

TRIZMA 10 mM pH 7.5

NaCl 10 mM,

MgCl₂ 1.5 mM

3.6 Solución de TCA. (Para fijar monocapas en el plaqueo) Se disuelven 12.5 gr. de ácido tricloroacético en agua y se afora a 100 ml.

3.7 Solución de cristal-violeta. (para teñir monocapas en el plaqueo). Se prepara un stock de cristal-violeta como sigue: disolver 1 gr. de cristal-violeta en 99 ml de una solución de etanol al 20 % . A partir de esta solución de trabajo:

Stock de cristal-violeta ----- 20 ml

Etanol al 95 % ----- 40 ml

Agua ----- 150 ml.

4.0 Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

4.1 Solución RGB 5X.

Tris pH 8.8----- 2 M

SDS ----- 25 %

4.2 Solución SGB 8X.

Tris pH 6.8 ----- 2 M

SDS ----- 25 %

4.3 Solución de APS.

Se prepara una solución al 10 % de persulfato de amonio la cual debe utilizarse inmediatamente.

- 4.4 Amortiguador de corrida 10X.
- | | |
|-------------------|---------|
| Trizma-base ----- | 30.28 g |
| Glicina ----- | 144.1 g |
| SDS ----- | 10.0 g |
- aforar a 1000 ml.
- 4.5 Solución de Acrilamida-Bis acrilamida.
- | | |
|----------------------|--------|
| Acrilamida ----- | 60.0 g |
| Bis-Acrilamida ----- | 1.6 g |
- aforar a 200 ml.
- 4.6 Amortiguador para muestras.
- Para preparar 10 ml de amortiguador :
- | | |
|-------------------------------|-------------|
| Tris-base pH 6.8----- | 1 ml |
| SDS 10 % ----- | 2 ml |
| β -mercaptoetanol ----- | 100 μ l |
| Glicerol ----- | 6 ml |
- Añadir agua bidestilada para completar el volumen de 10 ml.
- 4.7 Solución para tinción de geles.
- | | |
|-------------------------|------|
| Azul de Coomassie ----- | 0.2% |
| Metanol ----- | 50% |
| Acido acético ----- | 7% |
- 4.8 Solución para desteñir.
- | | |
|---------------------|-----|
| Metanol ----- | 30% |
| Acido acético ----- | 7% |
- 5.0 Soluciones usadas en la electroforesis en geles de agarosa.
- 5.1 Amortiguador TBE (10X) para preparar 1 litro
- | | |
|--------------------|-------|
| Tris ----- | 108 g |
| Acido bórico ----- | 55 g |
| EDTA ----- | 9.3 g |
- disolver en agua y aforar a 1 litro, por último esterilizar en autoclave
- 5.2 Gel de agarosa

- Agarosa ----- 1 % en TBE 1X.
- 5.3 Amortiguador para muestras.
- Sacarosa ----- 12.5 gr.
- TBE 10X ----- 12.5 ml.
- SDS 10 % ----- 2.5 ml.
- Azul de bromofenol ----- 125 mg.
- Xilen-xianol ----- 125 mg.
- 6.0 Mezcla de centelleo líquido (coctail D)
- PPO ----- 40 gr.
- Naftaleno ----- 800 gr.
- Los reactivos se disolvieron en 4 litros de p-dioxano y se aforo a 8 litros.
- 7.0 Material radioactivo.
- L-Metionina [³⁵S] que fue obtenido de la casa comercial Amersham, Co. Inglaterra.
- Uridina [5,6-³H] que fue obtenida de la casa comercial Amersham.
- 8.0 Soluciones empleadas en la fluorografía de geles de poliacrilamida.
- 8.1 PPO ----- 22.5 %
- Se utiliza como solvente DMSO
- 8.2 Glicerol ----- 1 %
- 9.0 Soluciones para formar gradientes de sacarosa.
- 9.1 Solucion A
- Sacarosa ----- 15 %
- NaCl ----- 0.01 M
- Tris pH 7.5 ----- 0.01 M
- MgCl₂ ----- 0.0015 M

9.2 Solucion B

Sacarosa -----	60 %
NaCl -----	0.01 M
Tris pH 7.5 -----	0.01 M
MgCl ₂ -----	0.0015 M

10.0 Soluciones utilizadas en los immunoblots.

10.1 Solución de negro de amido

Acido acético -----	10%
Metanol -----	10%
Negro de amido -----	0.1%

10.2 Amortiguador TBST

Tris-HCl pH7.9 -----	10 mM
NaCl -----	150 mM
Tween 20 -----	0.05%

10.3 Amotiguador AP

Tris HCl pH 9.5 -----	100 mM
NaCl -----	100 mM
MgCl ₂ -----	5 mM

MÉTODOS.

Aislamiento de virus a partir de cerebros de cerdo.

Los cerebros de cerdo utilizados en el presente estudio se obtuvieron de lechones infectados que presentaron el cuadro clínico típico descrito (ver introducción) además de la opalescencia color turquesa de la córnea. Los cerebros se descongelaron y se cortaron en fragmentos pequeños que se maceraron suavemente en un mortero. La suspensión resultante se maceró en un homogenizador Dounce metálico añadiendo cantidades pequeñas de medio MEM Joklik. Una vez obtenida una buena homogenización se centrifugó a 5000 rpm, 20 min en un rotor GSA. Se colectó el sobrenadante (sobrenadante I) y se centrifugó a 10 000 rpm, 15 min y se colectó el sobrenadante (sobrenadante II) el cual fue filtrado a través de membranas Millipore de 0.45 μm y se inocularon 5, 10 y 100 μl en monocapas semiconfluentes de células CV1-P

Cultivo de células PK15 y CV1-P.

Células PK15 fueron cultivadas en monocapas con medio mínimo esencial (MEM) Eagle Joklik, suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (SFT) y Penicilina-Estreptomocina, en cajas P-100 de 55.4 cm^2 , en cada uno de los pases se lavaron las monocapas dos veces con 5 ml de medio Joklik sin suero y después se añadió 1 ml de la solución de tripsina-EDTA. Las células desprendidas de esta forma fueron resuspendidas en MEM-SFT y depositadas en cajas estériles. Para las células CV1-P se utilizó medio Dulbecco suplementado con 10 % de suero de neonato.

Infección de células con virus.

Monocapas confluentes (en cajas P-100) fueron lavadas dos veces con medio Dulbecco sin suero y se infectó con 1 ml (volumen total) de virus a una multiplicidad de infección de 0.1 PFU/célula. Se incubó a 37 °C por una hora, después se añadió 5 ml

de medio Dulbecco suplementado con suero de neonato al 5 % .

Titulación de virus.

Se hicieron diluciones sucesivas del stock de virus de 10^1 , 10^2 , 10^{-3} , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 con medio Dulbecco. Se utilizaron cajas P-60 para el cultivo de monocapas crecidas a confluencia y se lavaron 2 veces con medio Dulbecco sin suero, se depositaron 500 μ l de la dilución requerida y se incubó por una hora a 37 °C en incubadora con CO₂, permitiendo de esta manera la adsorción del virus. Pasado el tiempo se retiró por succión la solución de virus y se depositaron lentamente 5 ml de la mezcla de medio con agar (ver materiales) previamente calentado a 37 °C en baño María. Se le permitió gelificar a temperatura ambiente aproximadamente 30 min y posteriormente se incubó de 3 a 4 días a 37 °C en incubadora con CO₂. Todos los días posteriores a la infección se examinaron las monocapas y en el momento en que fueron claros y evidentes los focos de lisis se vertió 4 ml de una solución de ácido tricloroacético al 10 %, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y la capa de agar fué retirada, se agregó 2 ml de la solución de cristal violeta para teñir las monocapas por 5 minutos. Se retiró la solución y se retiró el excedente de colorante, lavando las cajas cuidadosamente en el chorro del agua. Se contaron los focos de lisis.

Purificación de viriones marcados con radioactividad.

Se utilizaron 24 cajas P-100 en las que se crecieron células PK-15 a confluencia y las monocapas fueron lavadas 2 veces con medio sin suero y se infectaron con el virus a una multiplicidad de infección de 0.1 PFU/célula, con un volumen de infección total de 1 ml. Las monocapas se incubaron por 1 hora a 37 °C en incubadora con CO₂ y posteriormente se añadieron 5 ml por caja de medio suplementado con 5 % de suero de neonato.

Una vez que fué evidente el efecto citopático, el lisado celular fue colectado bajo el siguiente procedimiento:
Se centrifugó a 10000 rpm en un rotor SS34, 15 min, 4 °C. El

sobrenadante (sobrenadante I) se almacenó para ser analizado posteriormente, mientras que a la pastilla se le añadió 1 ml de medio Dulbecco sin suero y se resuspendió, se congeló el tubo de centrífuga que la contenía sumergiéndola un baño de etanol/hielo seco, para después descongelarla sumergiéndola en baño María a 37 °C. Esta operación se hizo tres veces. Se centrifugó de nuevo como al principio. El sobrenadante (sobrenadante II) se juntó con el sobrenadante I, se añadió lentamente y con agitación una solución fría (4 °C) de polietilén-glicol al 36 % hasta una concentración final del 6 %. Se le dejó en reposo a 4 °C por 8 horas para precipitar. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 min, 4 °C en un rotor SS34 . El sobrenadante fué descartado y la pastilla se lavó con 2 ml de un amortiguador estéril frío (tris 10 mM pH 8.0), se resuspendió en 1 ml de amortiguador TNE (ver materiales) y se almacenó (suspensión PEG) a 4 °C hasta la centrifugación a través de gradientes de sacarosa.

Gradientes de sacarosa.

En una cámara formadora de gradientes se depositó en uno de los orificios la solución de sacarosa al 10 % y en el otro orificio la solución de sacarosa al 60 %, se mezclaron por agitación al mismo tiempo que se depositaba en un tubo. Una vez que se terminaron de depositar las soluciones, se depositó lentamente en el tope del tubo la suspensión viral con PEG y se centrifugó a 35000 rpm por 120 min 4 °C en un rotor SW40 en una ultracentrífuga L-55 Beckman. El gradiente fué fraccionado colectándolo desde el tope del tubo en fracciones de 400 µl en tubos estériles de plástico Eppendorff.

Análisis de infectividad de fracciones del gradiente de sacarosa.

Se analizó la infectividad de las fracciones resultantes del fraccionamiento de los gradientes de sacarosa de la siguiente manera: En una caja de cultivo "multiplaca" se infectaron monocapas de células CV-1P con 200 µl de volumen total de infección (20 µl de

la muestra más 180 μ l de medio Dulbecco), todo esto por cada pozo. La cajas fueron incubadas a 37 °C por 5 días y fueron revisadas diariamente para monitorear la evolución del efecto citopático.

Tinción de viriones para microscopía electrónica.

Se utilizaron 5 μ l de cada una de las muestras para depositarlas en una rejilla, se le permitió adsorberse a la película por 5 minutos y luego se retiró el material acercando una punta de papel Whatman 1. Las muestras se tiñeron con una gota de acetato de uranilo al 5 % por 10 minutos y después se retiró el exceso de colorante con papel Whatman 1. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmitancia modelo TEM-JEOL LTD 2000 EX

Geles de Poliacrilamida al 10 % .

En una cámara para electroforesis BioRad se preparó el gel de la siguiente manera:

En un vaso de precipitados se depositaron 5.4 ml de la solución RGB 5X, 13 ml de agua bidestilada estéril, 8.4 ml de la solución de acrilamida-bisacrilamida, 20 μ l de TEMED y 150 μ l de la solución de APS al 10 %. Inmediatamente después de agregar el APS se mezclaron todos los componentes y se vertió sobre las placas de vidrio que componen la cámara, por una de las orillas de la cámara se vertió lentamente una capa de isopropanol para emparejar el tope del gel, se permitió polimerizar por espacio de 2 horas y se retiró el isopropanol, se lavó dos veces con agua y se secó el espacio restante con papel Whatman 1. De esta manera quedó listo el gel separador. Por otra parte el gel concentrador se preparó en un vaso de precipitados con 1 ml de la solución SGB 8X, 1.3 ml de la solución de acrilamida, 6.95 ml de agua bidestilada, 4 μ l de TEMED y 50 μ l de APS al 10 %. Se mezclaron los componentes y se agregaron al tope del gel separador, después se colocó el peine para formar los carriles. La determinación de proteína se llevo a cabo conforme al método descrito por Bradford (48). Las muestras fueron mezcladas con el amortiguador de muestra y se incubaron a 100 °C por 1 min,

se enfriaron y se depositaron en los carriles del gel previamente montado en la cámara. Se aplicó voltaje constante de 30 mV por espacio de 20 horas, esta metodología fue descrita por Laemmli (47).

Fluorografía de geles de poliacrilamida.

Esta metodología se desarrolló de acuerdo a las condiciones montadas por Laskey y Mells en 1975 (34). Los geles fueron deshidratados con 36 ml de DMSO (2 volúmenes) por 45 minutos (todos los pasos se realizaron en agitación). El DMSO se retiró y se añadieron al gel 4 volúmenes de la solución F (ver materiales) incubándose por 4 horas a temperatura ambiente. Se transfirió a 100 ml de la solución G, se incubó por 30 min y después se secó el gel entre dos capas de papel celofán dulce a temperatura ambiente por 2 días. El gel se expuso a una película Kodak por 20 días en un cassette Kodak.

Análisis de ácidos nucleicos citoplasmáticos en células infectadas con VSOA.

Se infectaron monocapas de células PK15 (cajas P-100) a una multiplicidad de infección de 0.1 PFU/célula. Después de el tiempo fijado previamente se retiró el medio de cultivo, se agregó 1 ml de medio frío sin suero y se colectaron las células con un gendarme de plástico. La suspensión se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos en una microfuga Beckman-12. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de células fue resuspendida en amortiguador I (ver Materiales), se incubó por 5 min en hielo y se agitó vigorosamente en un mezclador vortex. En este paso se disuelve la membrana celular pero no la membrana nuclear. Se separaron los núcleos centrifugando a 8000 rpm 1 min, se colectó el sobrenadante y se le añadió inmediatamente 200 μ l de amortiguador II. Se adicionaron 400 μ l de fenol saturado con tris-HCl pH 7.5, se agitó vigorosamente para después centrifugar a 10,000 rpm, 10 min. Se colectó la fase acuosa (fase superior) y se adicionó un volumen de cloroformo (400 μ l), posteriormente se agitó y centrifugó 3 min a 10,000 rpm. Se colectó la fase acuosa y se

adicionó 1 ml de etanol frío (-20 °C), la mezcla se incubó a -20 °C por 8 horas para precipitar los ácidos nucleicos para posteriormente centrifugarlos 30 min a 10,000 rpm a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se permitió la evaporación del etanol remanente a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 20 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato y las muestras resultantes fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa.

Geles de Agarosa.

Se sellaron los extremos del contenedor para el gel con cinta adhesiva y se colocó el peine adecuado, se agregó la agarosa fundida en amortiguador TBE 1X, a una concentración del 1%, teniendo cuidado de cubrir los dientes del peine. Se le permitió gelificar y se sumergió en una cámara para electroforesis que contenía amortiguador TBE 0.5X. El voltage que se utilizó para correr los geles fué de 80 a 100 volts por un tiempo de 45 a 60 minutos.

Durante ó después de la corrida de la electroforesis se añadieron de 4 a 5 μ l de un stock de bromuro de etidio (10 mg/ml). Las bandas de DNA ó RNA se observaron por irradiación con luz ultravioleta de preferencia de onda larga en un transiluminador.

Obtención de sueros hiperinmunes contra el VSOA

Se inyectaron 50 μ g del virus purificado por gradientes de sacarosa 4 veces con una diferencia de 15 días cada una a ratones que al inicio del esquema de inmunización tenían 8 semanas de edad. Después de este período los ratones fueron sangrados (aproximadamente 300 μ l) por la cola, haciendo un corte en el extremo de ésta. La sangre se incubó a 4 °C por 8 horas y después se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos para separar el cuáguulo del suero.

Los sueros fueron diluidos con medio MEM y se esterilizaron por filtración en membranas de 0.22 μ m. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Ensayos de Inmunodetección por "western blot".

El virus purificado fue sometido a electroforesis a través de geles de poliacrilamida al 10% y terminada la corrida las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa en una cámara de electrotransferencia Bio-Rad. El método consiste en hacer un "sandwich" con una pieza de papel Whatman 3 mm y sobre ésta una película de papel de nitrocelulosa (previamente equilibrada con buffer de corrida*), después el gel y por último otra capa de papel Whatman 3mm. El sandwich es colocado entre dos capas de fibra y todo esto se mete entre un cassette el cual está sumergido en la cámara de electrotransferencia. La corrida se llevó a cabo por 90 min a corriente constante de 0.7 mA. Las bases teóricas de este método han sido publicadas en una revisión hecha por Gershoni y Palade (46).

Una vez transferidas las proteínas al papel de nitrocelulosa, éste se equilibró en amortiguador TBST por 30 minutos. Los carriles que contenían a los marcadores de peso molecular y uno de los carriles con el virus purificado fueron cortados y se tiñeron con la solución de negro de amido por 90 segundos, la membrana se enjuagó con agua bidestilada y se secó. La otra parte de los carriles con proteínas transferidas se procesaron como sigue: Para bloquear los sitios de unión inespecífica, se decantó el TBST y la membrana fue incubada por 45 minutos en TBST con 1% de BSA. Se reemplazó la solución bloqueadora con TBST conteniendo una dilución de 1:1000 de los sueros hiperinmunes y control en su caso y se incubó por 30 minutos. Para remover el anticuerpo no unido se lavó la membrana en TBST por 5 min 3 veces. La membrana se incubó por 30 minutos en TBST conteniendo una dilución de 1:7500 de un conjugado comercial de anticuerpos anti-IgG de conejo contra ratón. Se lavó el papel 10 minutos con TBST 3 veces y una vez con amortiguador AP. Se secó la membrana sobre un papel filtro y se transfirió a la solución reveladora* (esta reacción se lleva a cabo en la obscuridad) por espacio de 15 minutos. La reacción fué detenida enjuagando el papel con agua bidestilada varias veces.

*El kit utilizado para la detección fue de Promega.

RESULTADOS.

Dado que el Virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA) afecta el sistema nervioso central y de acuerdo a reportes anteriores (ver Antecedentes) en los que se indica que el virus se encuentra en el cerebro de animales afectados por la enfermedad, se decidió plantear y seguir el esquema de trabajo mostrado en la figura 1. Dicho plan contempló en una primera etapa el aislamiento del virus a partir de tejidos de cerebro infectados y después la purificación del mismo a través de gradientes de sacarosa, a partir de la preparación de virus purificados se analizaron las proteínas estructurales de los viriones en geles de poliacrilamida-SDS, además de la morfología por microscopía electrónica y el RNA en geles de agarosa.

Aislamiento de virus.

Siguiendo el esquema de trabajo mostrado en la figura 2. Los animales fueron sacrificados y se les extrajo el cerebro, el cual fué sumergido en MEM 1X, utilizando como crioprotector glicerol al 10 %, la muestra de tejido fué congelada hasta su utilización, posteriormente los cerebros fueron descongelados y cortados en pequeños fragmentos para macerarlos en un mortero estéril. El macerado resultante fué homogenizado en un dounce metálico (ver Métodos), de esta manera se obtuvo una suspensión blanquecina de aspecto viscoso la cual fue clarificada por centrifugación, la pastilla fue descartada y el sobrenadante centrifugado nuevamente a 10000 rpm, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se filtró a través de una membrana con poro de 0.45 μm , y con esta solución viral se infectaron monocapas de células CV-1P. Las monocapas fueron observadas continuamente para poder observar efecto citopático sobre las células. A las 68 horas post-infección se observaron cambios en la morfología celular; que comenzaron con una ligera tendencia de las células a redondearse, poco a poco fué

PURIFICACION DEL VIRUS DEL SINDROME
DEL OJO AZUL



Figura 1. Esquema de la estrategia general utilizada en el aislamiento y caracterización del virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA).

**AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL
 SINDROME DEL OJO AZUL**



figura 2. Esquema de procesamiento de muestras de cerebro de cerdo para el aislamiento del VSOA.

notoria la agregación ó fusión de dos ó más células formando lo que se conoce como cuerpos sincitiales; por último, algunas de éstas se desprendieron de la monocapa, sin embargo la mayoría de ellas permanecieron pegadas a la caja de cultivo, ver figura 3.

Infección de cultivos celulares (CV-1P y PK15).

Una vez que se aisló el virus fue necesario montar el sistema que permitiera detectar la presencia del mismo en cultivo de células y además identificar las características del efecto citopático ejercido por el virus sobre las ellas. Es importante destacar que a pesar de que ya se había reportado el efecto citopático en las líneas celulares PK15, ST, CK, BHK 21, ED, etc. (33), decidimos utilizar otra línea celular con la idea de optimizar el sistema. La línea celular derivada de riñón de mono CV-1P resultó útil pues cuando se infectan monocapas confluentes de esta línea con el virus a una multiplicidad de 0.1, las células se redondean después de 36 horas postinfección y es posible identificar el efecto del virus sobre la monocapa de células como ya se mencionó anteriormente (ver figuras 3B y 3C).

Plaqueo en células PK15 y células CV-1P.

Por otra parte se desarrolló un método que nos permitió cuantificar las partículas virales infectivas.

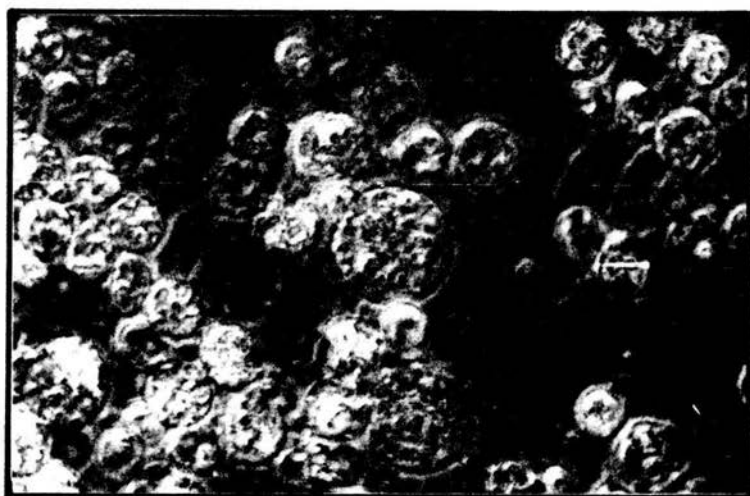
La metodología que se utilizó se menciona en la sección de métodos. Las monocapas con las placas de lisis se observan a simple vista, sin embargo se procedió a teñirlas con cristal violeta para una mejor cuantificación (figura 4).

Purificación de virus.

Para la purificación del virus se hizo un stock de virus el cual se utilizó para infectar 15 cajas confluentes de células CV-1P a una multiplicidad de infección de 0.1 PFU/célula y al medio de cultivo se le agregó [³H]-Uridina para marcar radiactivamente el RNA (el virus puede replicarse en presencia de actinomicina D, sugiriendo que el genoma del virus es de RNA) (11,35). También se añadió al medio [³⁵S]-metionina para marcar las



A



B

figura 3. Efecto citopático del VSOA sobre células CV-1P. Monocapas de células CV-1P fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0.1 partículas infectivas por célula. El curso de la infección fué seguido por 72 horas. En el panel A se muestran células sin infectar y en el B las células infectadas.

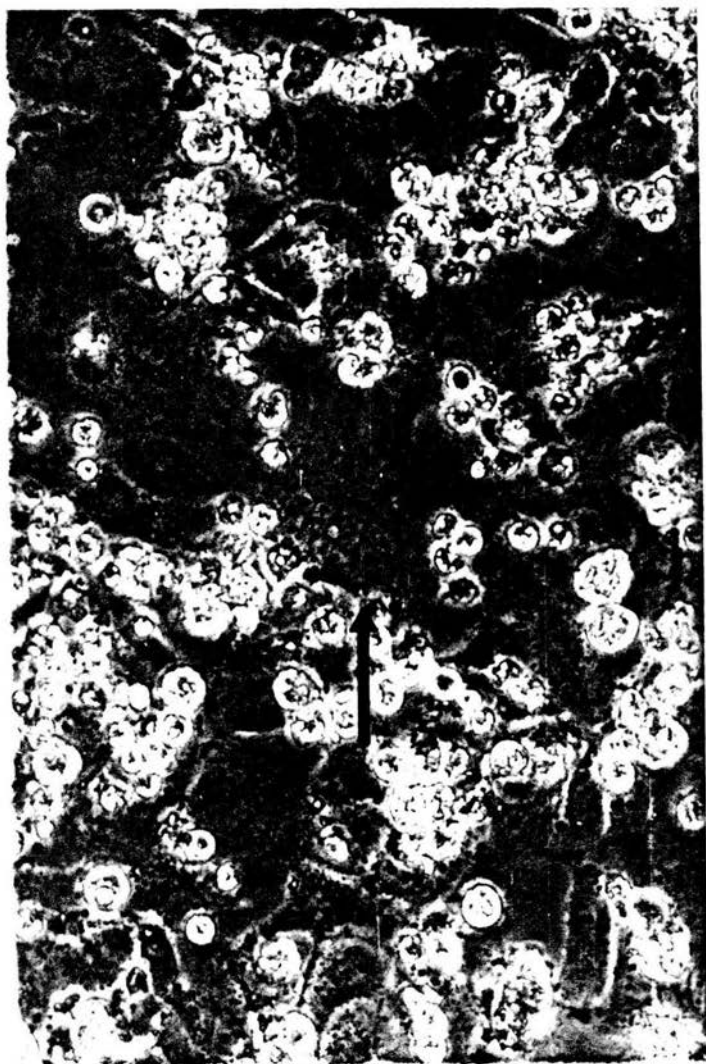


Figura 3a. Efecto citopatico del VSOA sobre celulas CV-1P y la formación de cuerpos sincitiales (un ejemplo es indicado con la flecha sobre la figura).

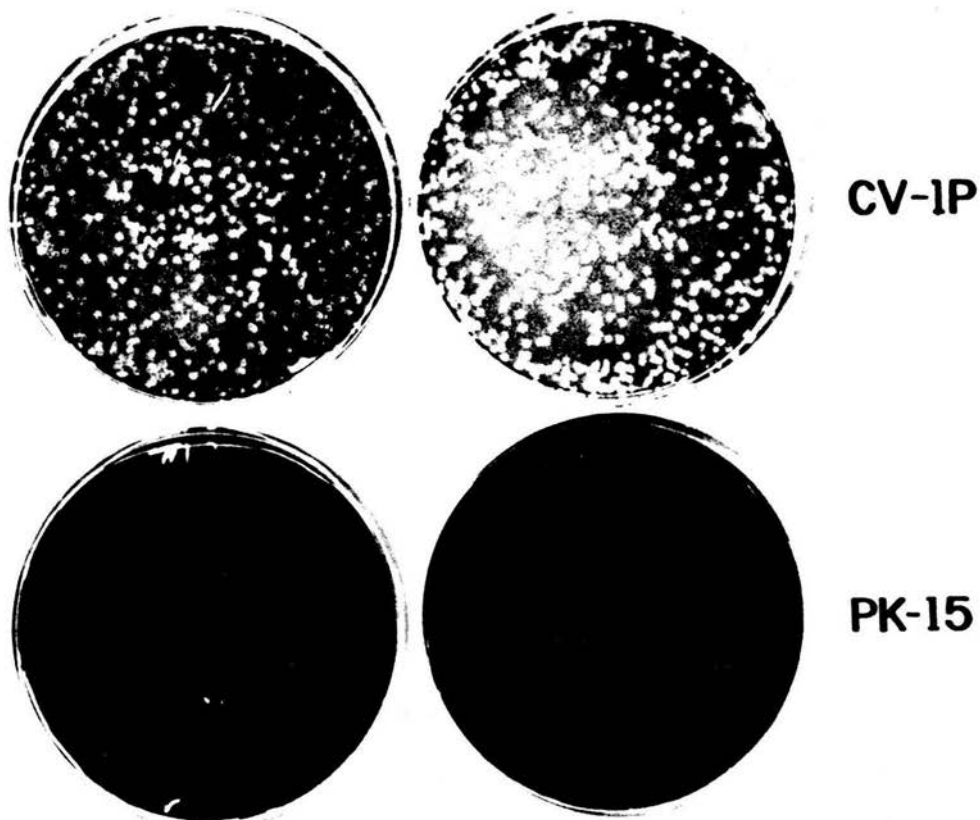


Figura 4. Determinación de unidades formadoras de placa del VSOA. Monocapas de células CV-1P y PK-15 infectadas con el VSOA, se tiñen con cristal violeta a los cuatro días postinfección y se determinan las UFP del virus. Esta metodología fue utilizada para la titulación. (ver material y métodos).

proteínas y se siguió el plan de trabajo marcado en la figura 5. La purificación está basada en sucesivas centrifugaciones, concentración por polietilenglicol y la centrifugación a través de un gradiente de sacarosa como puntos clave.

Análisis de infectividad de fracciones provenientes de gradientes de sacarosa.

Después de centrifugar el virus a través del gradiente de sacarosa fue colectado en fracciones, las cuales se analizaron para seguir la distribución de la incorporación de los radioisotopos a lo largo del gradiente (ver figura 6). Por otra parte se rastreó la distribución de las partículas infectivas en el gradiente, esto se hizo tomando 10 μ l de las fracciones para infectar monocapas de células CV-1P, siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente, (ver figura 7). Como era de esperarse, se puede apreciar en la figura una amplia distribución de partículas infectivas a lo largo del gradiente, debido al caracter pleomórfico de los virus, sin embargo destacaron algunas poblaciones que mostraron un efecto citopático más definido. En la figura 6 se indican estas regiones con flechas.

Microscopía electrónica.

Las fracciones colectadas del gradiente también fueron analizadas en el microscopio electrónico (ver figuras 8, 9 y 10). En las imágenes se puede observar una amplia diversidad de tamaño de los viriones ya que estos oscilan entre 120 y 200 nm, es decir, son pleomórficos. También puede observarse una cubierta (de forma irregular semiesférica que en ocasiones es alargada) que probablemente esté hecha en parte por una bicapa lipídica, puesto que se sabe que el virus es lábil a solventes orgánicos (33). Otra de las estructuras que pueden verse son aquellas espículas pequeñas ó "spikes" adheridas sobre toda la superficie de la cubierta. En algunos de los viriones es notoria la presencia de estructuras alargadas que salen de la cubierta debido probablemente a la manipulación durante la purificación y la preparación de la muestra sobre la rejilla. Una característica de estas estructuras

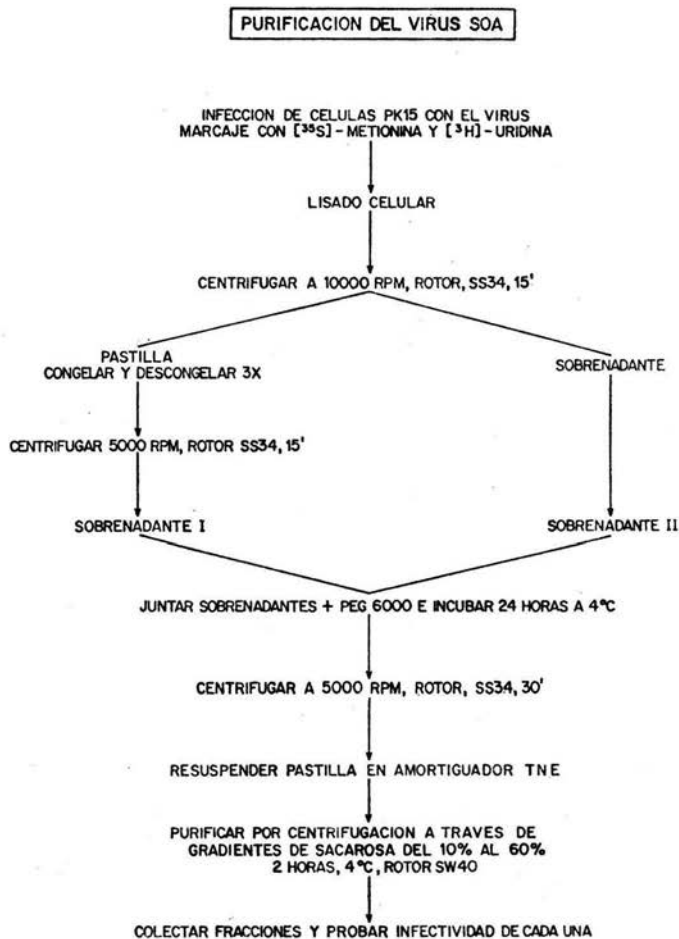


Figura 5. Esquema de purificación de viriones del VSOA marcados con $[^3\text{H}]$ -uridina y $[^{35}\text{S}]$ -metionina.

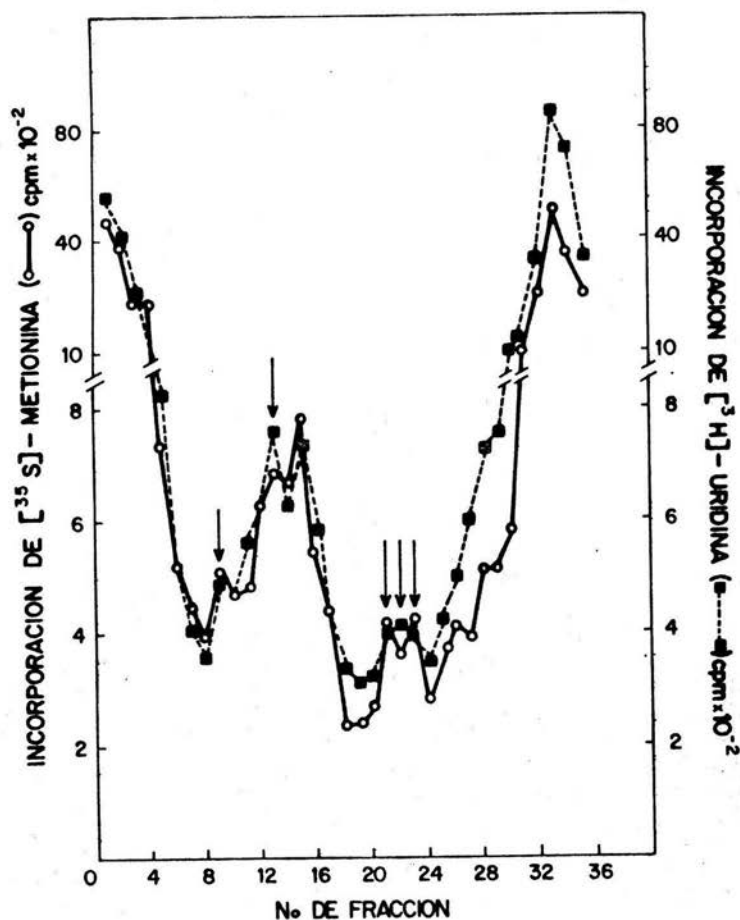


Figura 6. Perfil de distribución del virus SOA en gradientes de sacarosa.

A las 5 horas postinfección (moi de 0.1 PFU/célula) las células infectadas se marcaron con $[^3\text{H}]$ -uridina y $[^{35}\text{S}]$ -metionina, continuando el marcaje por un período de 48 a 72 horas postinfección. Las partículas virales del sobrenadante fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos y se colocaron sobre un gradiente preformado de sacarosa del 10% al 60%. El gradiente se centrifugó a 35000 rpm por 120 min 4°C (rotor SW40 en una centrífuga Beckman LB-55). Posteriormente se fraccionó y determinó la incorporación de cada uno de los isótopos.

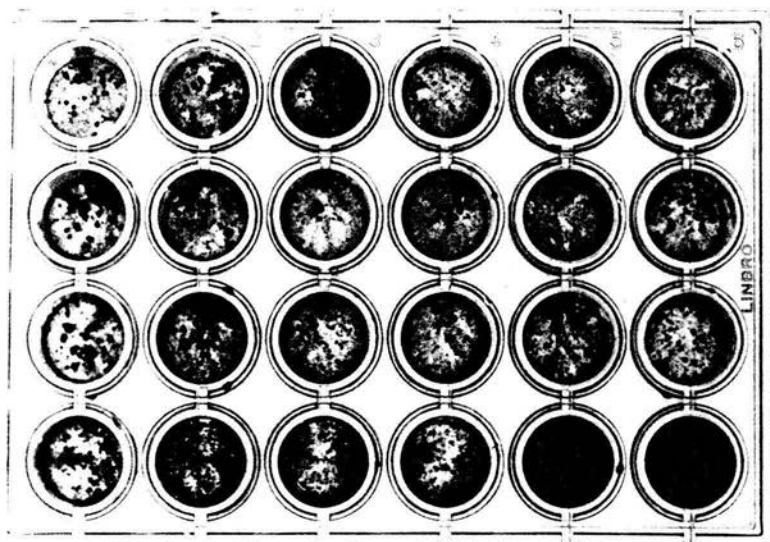


Figura 7. Distribución de la infectividad de los viriones del VSOA a lo largo del gradiente de sacarosa. Se infectaron monocapas con las fracciones señaladas en la figura 6 para determinar la infectividad de cada una de ellas.

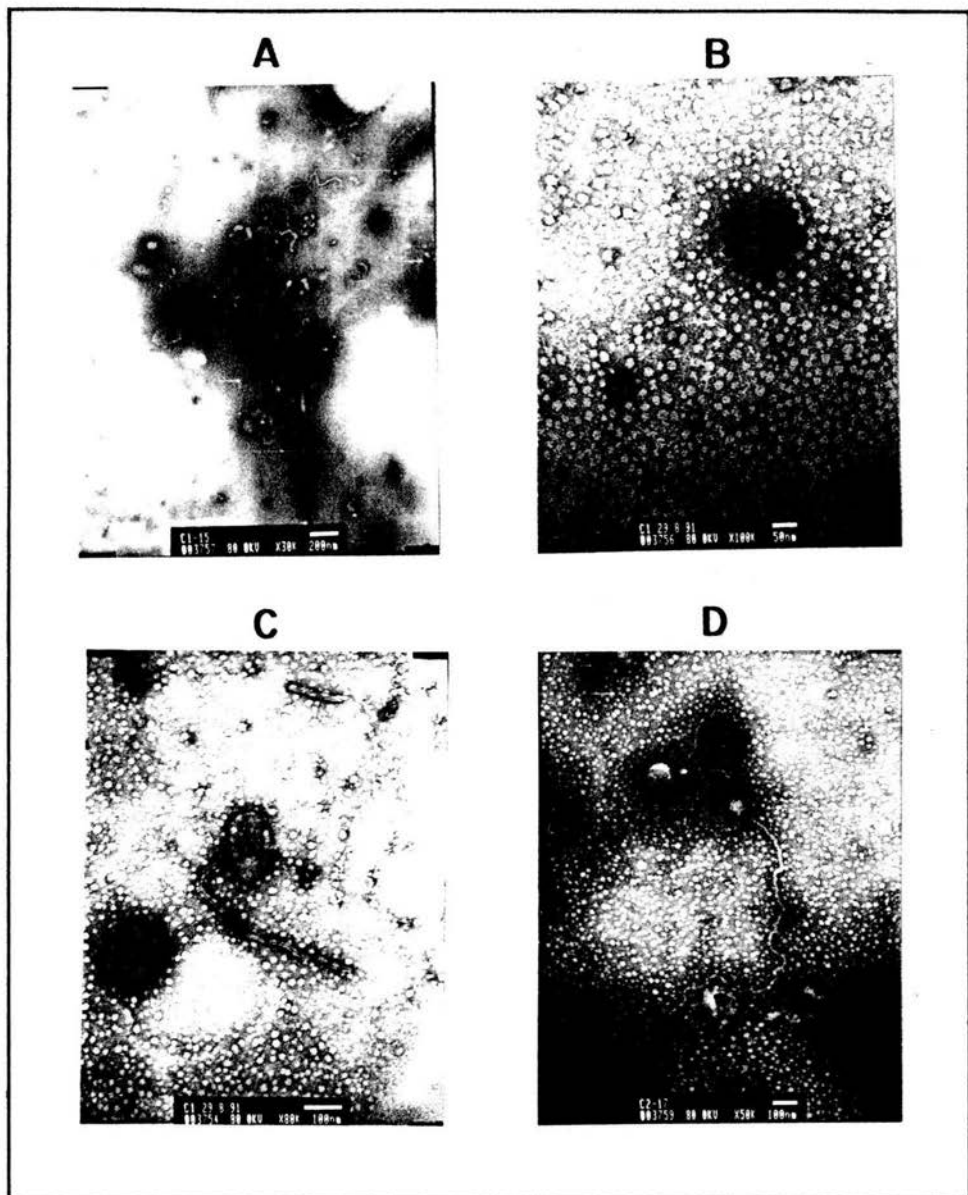


Figura 8. Microscopía electrónica de partículas del virus del Síndrome del Ojo Azul purificadas por gradientes de sacarosa.

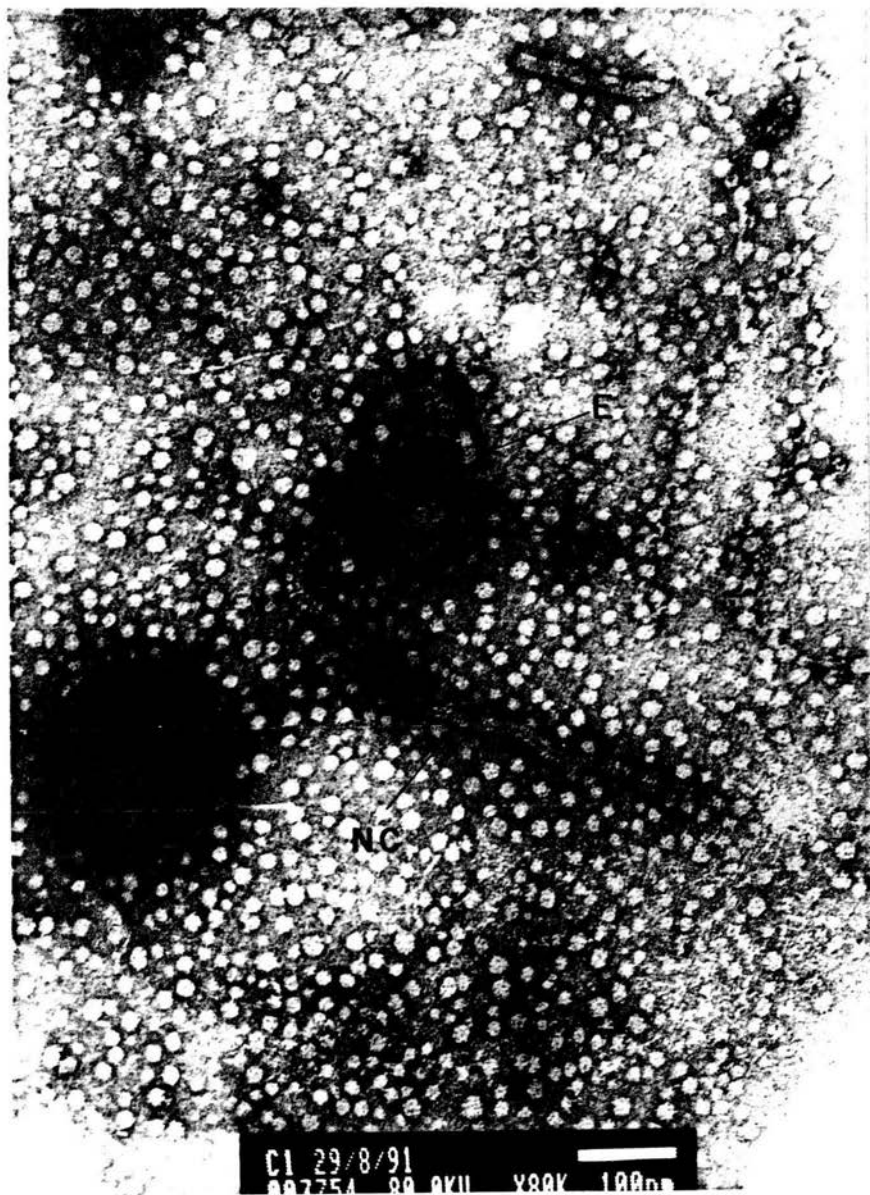


Figura 9. Microscopia electrónica de las partículas virales (amplificación de la fig 8-c). Se pueden apreciar partículas virales que van de 75 a 200 nm. Algunas cubiertas (indicada en la figura con una "E" son maltratadas durante la tinción y liberan las nucleocápsides (NC).



Figura 10. Microscopía electrónica de nucleocápsides y cubiertas (nucleocápsides) es la presencia de subunidades (protómeros) dispuestas en forma ordenada que muestran una frecuencia bien definida en su arreglo a lo largo de la nucleocápside (ver figura 9).

Análisis de Proteínas del VSOA.

También pudo identificarse el patrón de proteínas estructurales que componen al virión. Esto se llevó a cabo por la separación de las proteínas (contenidas en las fracciones que mostraron mayor infectividad) en un gel de poliacrilamida al 10% para después hacer una fluorografía del mismo, ver figura 11. Una de las proteínas tiene un peso molecular alto de alrededor de 200000 daltones. También se detectaron otras dos proteínas que tienen un peso molecular de alrededor de 65000 daltones. En la zona de migración de entre 45000 y 25000 daltones aparece una banda prominente.

Una vez purificado el virus, se propagó en células PK-15 y se siguió un protocolo similar al de la figura 5, pero con algunas modificaciones (ver figura 12). Las proteínas del virus purificado en esta ocasión fueron identificadas por tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomasie, y corresponden a pesos que van desde los 205 kd a los 29 kd, destacando las proteínas de aproximadamente 66,50 y 40 Kd, las cuales podrían corresponder a las proteínas HN, NP y M respectivamente (ver figura 18).

Análisis de RNA citoplasmático en geles de agarosa.

Monocapas de células CV-1P fueron infectadas con el virus y se hizo una extracción de los ácidos nucleicos citoplasmáticos de acuerdo a la metodología utilizada por Gough (39). En la figura 14 se muestra el esquema de extracción.

Por otra parte las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa (ver figura 15). Como puede observarse aparece una población de alto peso molecular que migra por arriba de los 23130 pb. que corresponden al fragmento más pesado de los marcadores de peso molecular del genoma del bacteriofago Lambda digerido con la enzima Hind III.

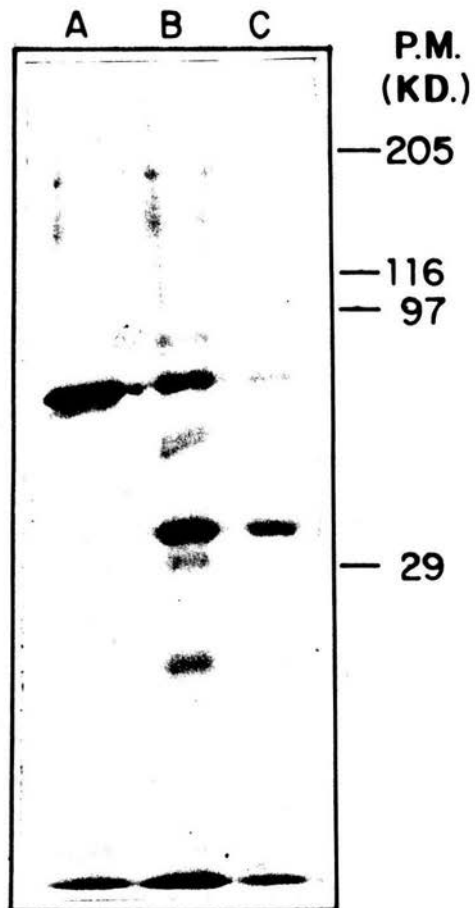


Figura 11. Fluorografía de las proteínas del virus purificado por gradientes de sacarosa. En los carriles A,B y C se colocaron 50 μ l de las fracciones 11, 15 y 20 respectivamente, provenientes del gradiente descrito en la figura 6.

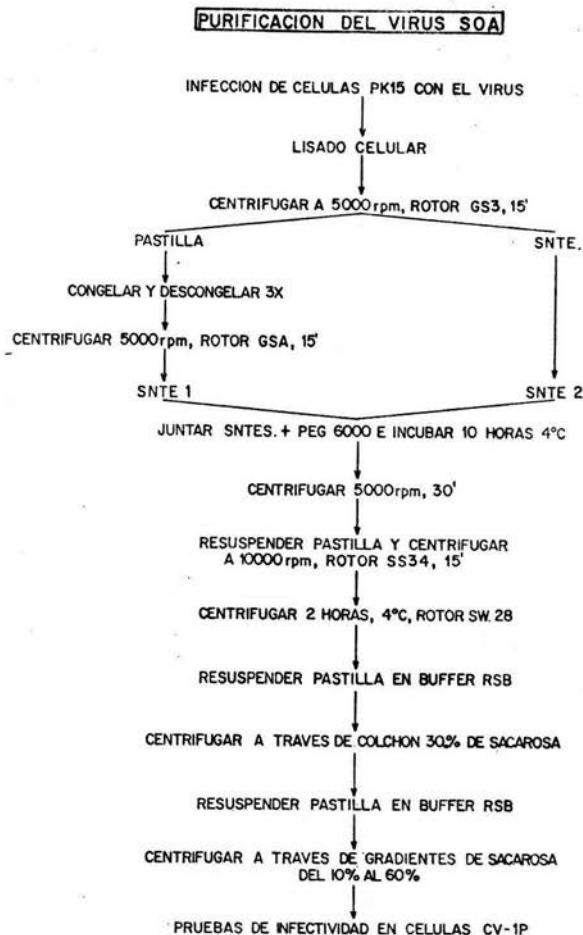


Figura 12. Purificación del virus del Síndrome del Ojo Azul. Este diagrama de flujo contempla una estrategia similar a la mostrada en la figura 5 pero en este caso los viriones no se marcaron con isótopos radioactivos. Los viriones purificados de esta manera fueron utilizados para identificar las proteínas estructurales del virus por tinción con azul de Coomassie (ver figura 13).

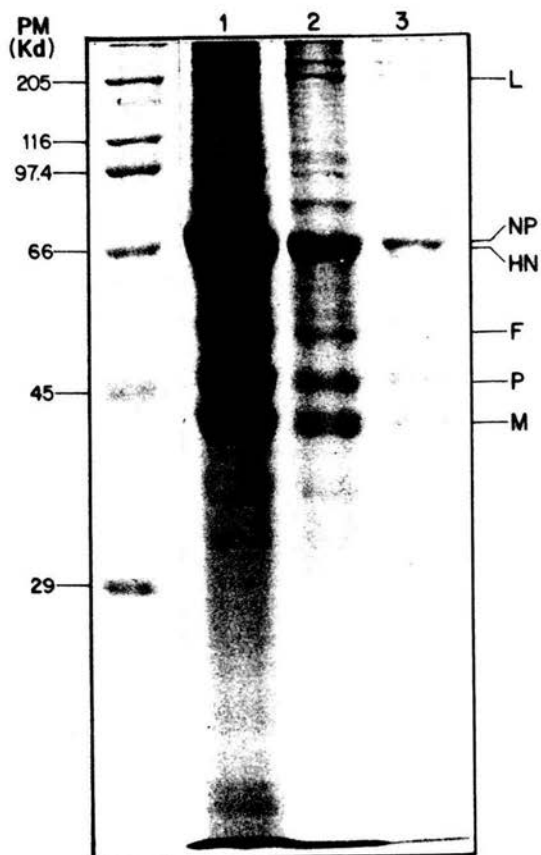


Figura 13. Análisis por electroforesis de las proteínas estructurales del VSOA.

Los viriones purificados por gradientes de sacarosa fueron sometidos a electroforesis en un gel al 10% de poliacrilamida-SDS y después se tiñó con azul de Coomasie. En el carril de la izquierda aparecen los marcadores de peso molecular, en los carriles 1,2 y 3 se pusieron 60, 20 y 5 μg de proteína respectivamente.

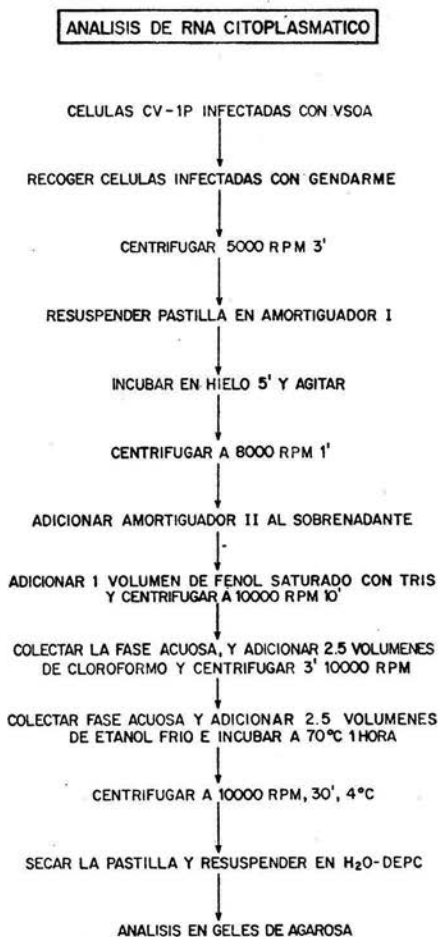
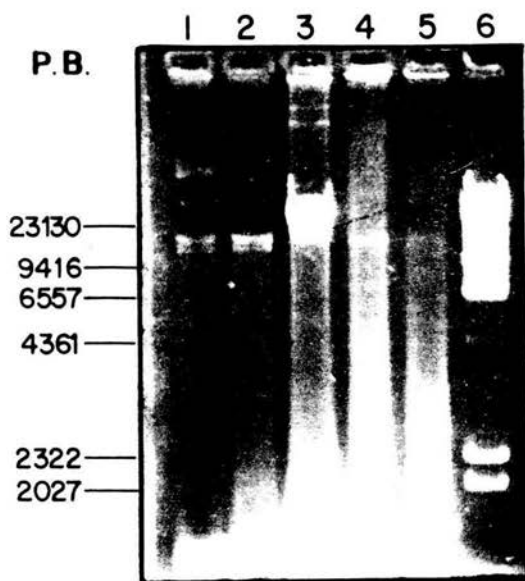


Figura 14. Diagrama de flujo para el análisis de RNA citoplasmático de células CV-1P infectadas con VSOA



- | | |
|-------------|-----------------------|
| 1) VSOA | 4) RNAs RIBOSOMALES |
| 2) VSOA | 5) RNAs RIBOSOMALES |
| 3) AUJESZKY | 6) λ Hind III |

Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de RNA citoplasmático de células CV-1P infectadas con el VSOA. La posición de las muestras se indica en la figura.

Con la idea de determinar si el virus era capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en ratones inoculados con virus, se procedió a inyectar por vía intraperitoneal el virus. Después de 2 meses se obtuvieron los sueros de ratones y se realizaron ensayos de neutralización como se describe abajo.

Prueba de neutralización

Las partículas virales fueron incubadas con diferentes diluciones de los sueros a 37 °C por 1 hora, con esta mezcla se infectaron monocapas (como se describe en la sección de Métodos) confluentes de células CV-1P crecidas en cajas multipozos. 4 días postinfección las monocapas fueron teñidas con cristal violeta.

Como puede observarse en la figura 16 los 3 ratones produjeron anticuerpos contra el virus y estos anticuerpos son capaces de neutralizar la infección hasta una dilución de 1:1000.

Para tratar de identificar aquellas proteínas del virus que eran reconocidas por estos anticuerpos se procedió a realizar un ensayo tipo "western blot". Para ello se procedió a correr muestras de virus purificado a través de gradientes de sacarosa en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS, posteriormente las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Para determinar el reconocimiento inmunoespecífico se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-VSOA y se revelaron con un conjugado de cabra anti-Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Como puede observarse en la figura 17, las proteínas preferentemente reconocidas por los anticuerpos policlonales corresponden a NP, HN, F y M del VSOA. Utilizando otros sueros neutralizantes anti-VSOA hemos determinado que el reconocimiento es preferentemente sobre las proteínas NP y HN. Lo cual sugiere que estas proteínas pudieran estar relacionadas con la capacidad de neutralización de los anticuerpos.

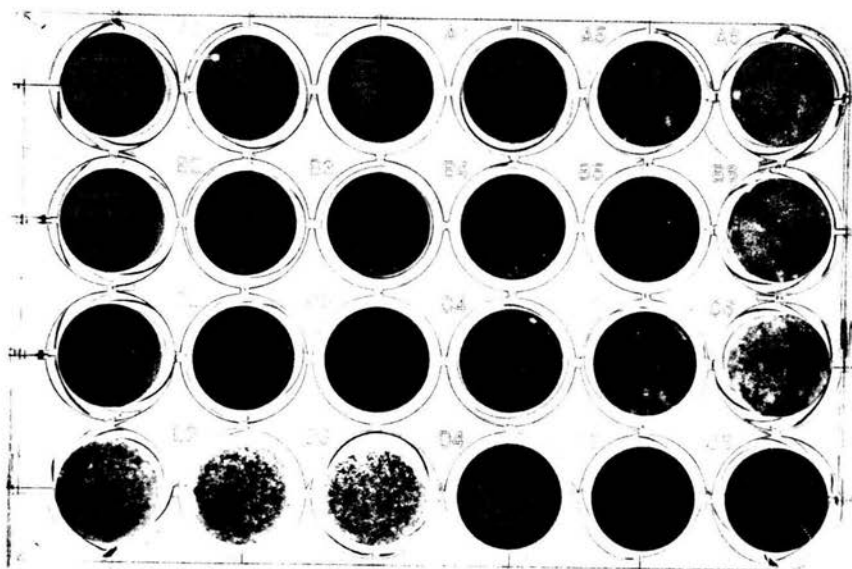


Figura 16. Ensayo de neutralización para 3 sueros hiperinmunes a viriones del VSOA.

En la figura los pozos con la letra A1-A6 muestran las diluciones para el suero del primer ratón, los pozos con letra B el suero del segundo ratón y la letra C corresponde al tercer ratón. Las diluciones de izquierda a derecha son: 1:50, 1:100, 1:150, 1:500, 1:1000 y 1:5000. Los pozos D1,D2 y D3 son controles para monocapas infectadas con virus que fué incubado con los sueros preinmunes. En los pozos D4 al D6 se muestran monocapas no infectadas.

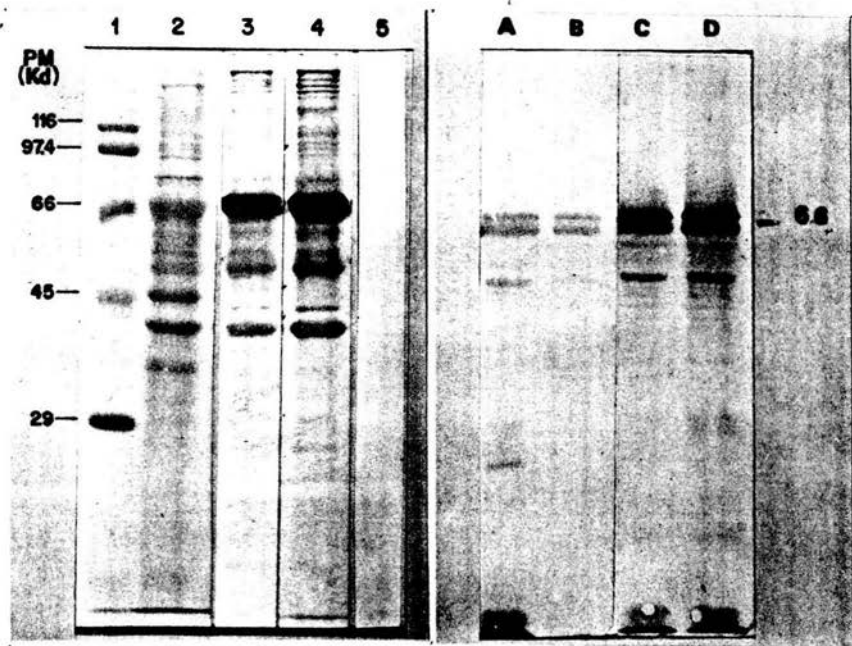


Figura 17. Immundetección de proteínas del virus SOA con anticuerpos policlonales.

En los carriles 1 y 2 se muestran las proteínas transferidas y teñidas con negro de amido, en el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular, en el carril 2: las proteínas del virus purificado en gradientes de sacarosa. En el carril 3 y 4 las proteínas reconocidas por dos sueros hiperinmunes al VSOA, en el carril 5 se muestran las mismas proteínas incubadas con un suero preinmune. En los carriles A, B, C y D las proteínas reconocidas por otros sueros que son más selectivos.

DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS.

El Síndrome del Ojo Azul ha cobrado importancia económica dentro de la porcicultura mexicana, especialmente en las zonas con mayor productividad (44,45). Es importante por esta razón realizar un estudio serio y preciso, pues en la literatura existe controversias en cuanto a su diagnóstico. Una de las metas por alcanzar, de diferentes grupos de investigación, es la obtención de una vacuna ya sea atenuada ó inactivada que permita un mejor control de la enfermedad. Además del desarrollo de tecnología que nos permita detectar al virus con mayor precisión y especificidad.

Los primeros reportes de brotes fueron hechos a principios de la década de los 80. (13,14,15,16,20,22,25), sin embargo es poco lo que se conoce acerca del virus, pues en un inicio el parecido de la signología de la enfermedad con otras enfermedades en México retrasó la adecuada atención y estudio de esta nueva enfermedad (13).

La enfermedad de Aujeszky, es una enfermedad de origen viral que afecta a los cerdos y que muestra una sintomatología similar a la producida por el VSOA. Se caracteriza por producir signos nerviosos, respiratorios y falla reproductiva. Ambos virus representan perdidas económicas importantes para la industria porcícola. Debido a las similitudes clínico-patológicas entre ambas es indispensable realizar un diagnóstico diferencial que permita llegar a un diagnóstico preciso con el objeto de dictar las medidas de control necesarias.

Debido al desconocimiento y mala información sobre el Síndrome del Ojo Azul se han tomado medidas inadecuadas para su control, tales como vacunaciones masivas contra la enfermedad de Aujeszky, medicaciones con vitamina B y antibióticos, también se ha practicado la "vacunación" con macerados de encéfalo de cerdos muertos por la enfermedad. Todas estas medidas lejos de ayudar han perjudicado a la economía ya que han elevado los costos de producción (43).

En este trabajo se aisló y purificó el virus a partir de

cerebros de cerdos infectados que presentaron la signología descrita por varios autores (42).

El virus es lábil a solventes orgánicos y esto, aunado a la morfología de los viriones que se observó en la microscopía electrónica sugiere que la cubierta esta constituida en parte por lípidos y por elementos proteicos o peplómeros que se aprecian como pequeñas espículas salientes que estan dispuestas en toda la superficie de la cubierta.

Como puede observarse en las figuras 8, 9, y 10, en donde se muestran las micrografias electrónicas de las partículas virales, una de las características más notorias es la heterogeneidad de las estructuras: En primer lugar se observan estructuras semiesféricas de tamaño variable (característica que es denominada pleomorfismo) que oscilan entre 75 y 200 nm que corresponden a viriones intactos, estas estructuras revelan la morfología de los viriones, indicando que éstos tienen una cubierta forrada en la superficie por espículas denominadas peplómeros. Por otra parte se observan estructuras filamentosas o nucleocápsides que poseen subunidades (protómeros) dispuestas a lo largo con una simetría helicoidal. También se observan cubiertas que han sido dañadas en una región y se puede observar que han liberado nucleocápsides. Se piensa que las cubiertas le dan una protección al virus para transportar las nucleocapsides desde una célula hasta otra pero éstas no soportan la tensión durante el secado sobre las rejillas para la microscopía electrónica. Estas características han sido observadas en los elementos que conforman a la familia de los Paramyxoviridae.

El virus presentó características que son compartidas por la familia de los Paramyxoviridae.

Las proteínas estructurales del virus, al ser separadas a través de electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, mostraron un patrón bien definido (ver figura 11). Destacan dos bandas correspondientes a un peso de alrededor de 60 a 70 kilodaltones y otra proteína de alrededor de 40 kilodaltones. Una vez que se obtuvo el virus purificado, a partir de éste se hizo un stock para posteriormente propagar el virus en células PK-15,

siguiendo el esquema de trabajo mostrado en la figura 12.

El virus purificado por gradientes de sacarosa fue concentrado en suficiente cantidad para poder apreciar las proteínas estructurales en un gel de poliacrilamida con la tinción azul de Coomasie (ver figura 13).

Las bandas identificadas en el gel muestran un patrón similar al reportado por otros autores, aunque con algunas pequeñas diferencias (ver Sundqvist) (36).

En la figura destacan las seis proteínas descritas por Sundqvist, aunque junto con las proteínas del virus también hay una serie de proteínas que pueden considerarse como proteínas celulares "contaminantes" que son arrastradas en la cubierta del virion al salir por gemación.

Los pesos moleculares de estas proteínas se encuentran dentro del intervalo de las proteínas de los paramyxovirus. Por ejemplo, para la proteína denominada L en el virus Sendai se calcula un peso molecular de 231,608 daltones, para el virus de Newcastle 248,822 daltones y para el VSOA hay una proteína correspondiente de un peso de alrededor de 200,000. Para la proteína HN: se calcula en el virus Newcastle 63,149, para el virus del Sarampión 69,250 daltones. Para la proteína N ó NP se calcula en el virus de Parainfluenza tipo 3 57,823 daltones, para el virus del Sarampión 58,111 daltones. Para estas dos últimas proteínas existen en el VSOA proteínas equivalentes y lo mismo ocurre con las proteínas F,P y M (36).

En cuanto al genoma del virus, éste fué identificado en geles de agarosa y tiene un peso molecular superior a los 23130 bases. Se han reportado pesos moleculares altos para los genomas de los elementos de la familia de los Paramyxoviridae que están alrededor de las 15,500 bases.

El virus está constituido por un genoma de RNA, ya que su replicación no es inhibida por actinomicina D (11,33,35). Este RNA es de alto peso molecular, cercano al descrito para los paramyxovirus (4,7,37,38).

En resumen, podríamos decir que los viriones están contruidos

por al menos 6 proteínas que tienen pesos moleculares muy cercanos a los descritos (37,38), ver tabla 2. Llamamos la atención las proteínas estructurales HN y F, las cuales son glicoproteínas según ha demostrado Sundqvist (36), y la proteína P, la cual es una fosfoproteína.

Se ha propuesto un modelo para la estructura de los viriones en la familia de virus Paramyxoviridae (37,38,40), en la que se muestra una cubierta forrada por las proteínas HN y F (ver figura 18), que están ancladas a una bicapa lipídica, en esta interacción auxilia una tercera proteína denominada M. En el interior de los viriones encontramos una estructura filamentosa alargada que contiene al RNA cubierto por una proteína mayoritaria (NP). Además de la NP, sobre la nucleocapside se encuentran dos proteínas que están íntimamente ligadas: una de alto peso molecular, L y la proteína P.

También se obtuvieron sueros hiperinmunes contra el VSOA de ratones y se hicieron los ensayos de neutralización (ver figura 16) los cuales mostraron un título de 1:1000. En la figura 17 se muestran los ensayos tipo "Western blot" de los sueros neutralizantes. Como puede observarse cada suero reconoce diferentes proteínas del virus. Es notable la respuesta que se observa en el carril B de la figura 17 pues las proteínas que son reconocidas exclusivamente son las proteínas NP y HN lo cual sugiere que al menos una de estas dos proteínas está implicada en la neutralización, ya que todos los sueros que se emplearon en los inmunoblots fueron neutralizantes.

En cuanto a la proteína HN, sabemos que para los paramyxovirus la unión de anticuerpos a ella está relacionada con la neutralización, como ha sido reportado para algunos virus (37) (ver figura 17). En la figura se aprecian dos bandas que son reconocidas exclusivamente por el suero de este ratón en particular, lo que sugiere que alguna de estas dos, ó ambas están involucradas en la neutralización.

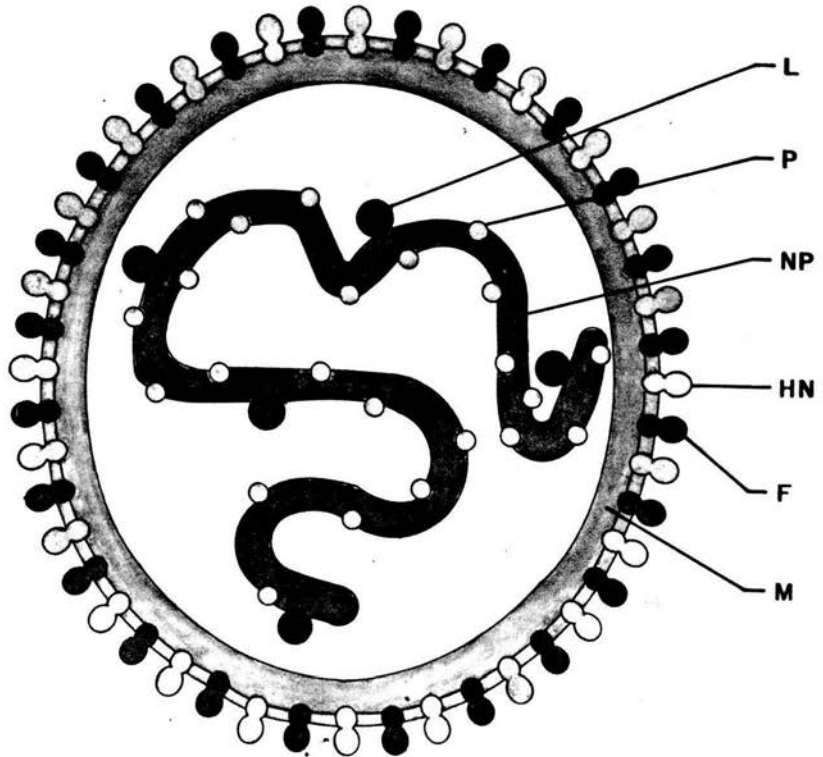


Figura 18. Modelo propuesto para la estructura de los viriones de la familia Paramyxoviridae. Los viriones están compuestos fundamentalmente por 6 proteínas estructurales que conforman la nucleocápside y la envoltura. La nucleocápside contiene una molécula de RNA que está "forrada" por la proteína NP y 2 proteínas que están unidas a la superficie en forma débil; la proteína P que es una fosfoproteína, la proteína L que es de alto peso molecular. La cubierta es una bicapa lipídica que tiene ancladas las glicoproteínas HN, F y M.

A pesar de encontrar en el VSOA muchas características compartidas por los paramyxovirus, no se ha encontrado una reacción con el VSOA de sueros hiperinmunes contra algunos paramyxovirus (parainfluenza tipos 1,2 y 3, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio ni Newcastle) (26).

El efecto citopático que ejerce el virus sobre las células durante la infección es la formación de cuerpos sincitiales y una característica que también se comparte es la capacidad de hemadsorción a eritrocitos de varias especies.

Estudiar la complejidad de la estructura del virión es importante para determinar qué proteínas estructurales del virus pueden estar involucradas en la neutralización de la infectividad del virión "in vitro".

A pesar de que se han realizado varios estudios acerca de las propiedades serológicas, patología y morfología del VSOA existen pocos trabajos relacionados con sus características moleculares y estructurales, por ello se hacen necesarios estudios más profundos para entender de manera más precisa la naturaleza de este agente viral, así como de sus propiedades antigénicas y la determinación de las posibles variantes del virus (serotipos), que pudieran existir en la naturaleza.

Sin el conocimiento de la naturaleza del virus es muy difícil pretender la elaboración de una vacuna que pudiera ayudar a controlar y erradicar la enfermedad.

La atenuación de cepas virales y su posible uso como cepas vacunales es hoy en día uno de los objetivos primordiales de la virología molecular. Anteriormente la atenuación de las cepas se llevaba a cabo de una manera empírica y utilizando diferentes vías como son: a) propagando el virus repetidamente en un huésped diferente del original, b) por adaptación de virus a crecer a temperaturas sub-óptimas, propagando en un solo huésped de manera repetida y d) por eventos de recombinación para obtener una cepa no virulenta. Uno de los requisitos para poder evaluar el carácter virulento ó atenuado de cualquier cepa viral es que posea marcadores genéticos definidos, que nos permitan diferenciar las

características entre ambas.

Algunas de las ventajas de la administración de vacunas atenuadas son las siguientes: a) simula la infección natural, produciendo inmunidad de larga duración, b) induce la síntesis y excreción de inmunoglobulina A en el intestino, generando resistencia a la reinfección (cuando se trata de virus que se propagan en tracto digestivo, c) confiere inmunidad de grupo al repartirse espontáneamente el virus vacunal en la comunidad d) en muchas ocasiones su eficacia es cercana al 100%, e) es de fácil administración, y es menos costosa que la inactivada.

Uno de los objetivos de este trabajo es contribuir al conocimiento de la naturaleza de este virus, con la idea de poder entender sus mecanismos de patogenia y eventualmente aportar resultados que puedan ayudar en un futuro a elaborar un biológico o vacuna que nos permita el control de la enfermedad.

Dentro de las perspectivas de estudio del virus está la clonación del genoma viral, que junto con la tecnología que se ha generado en los últimos años dentro del terreno de la ingeniería genética podría contribuir en forma decisiva para una mejor comprensión de la enfermedad. Una de las aplicaciones que podríamos encontrar en un futuro no muy lejano, es la elaboración de una vacuna sintética.

Tabla 2. Comparación de los pesos moleculares (en kilodaltones) de proteínas estructurales del VSOA con proteínas de algunos paramyxovirus.

Proteína	VIRUS				
	VSOA	PIV-3*	Sendai	NDV**	Sarampión
L	200	200	200	200	200
HN	66	68	71	72	79
NP	68	65	58	53	72
F	59	54	49	53	61
P	52	79	79	53	45
M	40	39	38	37	40

* virus de Parainfluenza tipo 3

** virus de la enfermedad de Newcastle

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. (1980) Microbiology. Third Edition. Harper and Row, Publishers U.S.A.
- (2) Goodheart, C. (1969) An Introduction to Virology. W. B. Saunders Company. U.S.A.
- (3) Marsh, M. y Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. En : Advances in Virus Research 36 : 107-151.
- (4) Luria, S. (1978). General Virology. John Wiley and Sons, Inc.. U.S.A.
- (5) Matthews, R.E.F. (1982). Classification and Nomenclature of Viruses. Third Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology, vol 17, No 1-3.
- (6) Lauffer, A. (1981) Biophysical Methods in Virus Research En: Comprehensive Virology editado por Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R., U.S.A.
- (7) Fields, B.N. (1990). Virology, second edition, Ed. Raven Press, Ltd.. New York. U.S.A.
- (8) García Gutierrez, Timoteo (1984). Comercialización e industrialización de la carne de cerdo en México. UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis de licenciatura.
- (9) Necochea, R.R. y Pijoan, C.A. (1982). Diagnóstico de las Enfermedades del cerdo. Editado por Ramiro Ramírez Necochea y Carlos Pijoan Aguadé. México

- (10) García, R.O. y Lobo, G.M. (1989). Enfermedades de los cerdos Ed. Trillas. México, D.F.
- (11) Carreón, R., (1990). Más sobre la enfermedad del Ojo Azul. Síntesis Porcina. Enero, Facultad de Veterinaria U.N.A.M.
- (12) Stephano, H.A. (1986) El síndrome del Ojo Azul y la investigación. Síntesis Porcina. 5, (12): 14-24.
- (13) Campos, M. E. (1981). Síndrome del Ojo Azul ó cerdos zarcos. Memorias del XVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. Ixtapa, Gro. 1981.22-24. AMVEC. México, D. F.
- (14) Campos, M. E. (1982). Síndrome del Ojo Azul. Porcira 8 (88), 32-34.
- (15) Campos, M. E.; Calderon, E. and Solorio, E. (1982). The Blue Eye Syndrome. Proceeding of International Pig Veterinary Society Congress. México 1982. 171 IPVS, México, D. F.
- (16) Stephano, H. A. y Gay, G. M. (1986). Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la córnea en cerdos (Síndrome del Ojo Azul) asociados a un paramyxovirus. Estudio cronológico. Med. Vet. 3 (7-8): 359-362.
- (17) Leman, A. D., Straw, B., Glock, R. D., Merling, W. L. ; Penny, R. H. C. and Scholl, E. (1986). Diseases of Swine; Sixth Edition, Iowa State University Press, Iowa, U.S.A.
- (18) Campos, E. Síndrome del "Ojo Azul" o cerdos zarcos. Memorias del XVII Congreso de la Asociación Mexicana de veterinarios especialistas en cerdos . Ixtapa, Gro. 1981. 22-24 AMVEC. (1981).

- (19) Stefano, H.A., Gay, G.M. and Ramirez, T.C. (1988) :
Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal
opacity (blue eye) in pigs, associated with a
paramyxovirus infection. Veterinary Record. 122: 6-10 .
- (20) Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramirez, T.C. and Maqueda, A.J.
(1982) An outbreak of encephalomyelitis in piglets produced
by an hemagglutinating virus. Proceeding of International
Pig Veterinary Society Congress. México 1982, 153 IPVS
México.
- (21) Stephano , H.A., Ramirez, T.C. y Flores, A.H. ; (1988)
Situación actual del Síndrome de Encefalitis y Opacidad de
la córnea conocido como Ojo Azul. Memorias del XXIII
Congreso de la asociación Mexicana de Veterinarios
especialistas en cerdos. León Gto. 1988 90-92 AMVEC México,
D.F.
- (22) Stephano, H.A.(1986) : El Síndrome del ojo azul y la
investigación. Síntesis porcina. 5 (12) : 12-14 .
- (23) Stephano, H. A. y Gay, G. M. (1982). El síndrome del Ojo
Azul. Estudio Experimental. Memorias de la Reunion de
Investigación Pecuaria en México. 523-528. UNAM-SARH,
México, D. F.
- (24) Stephano, H. A. y Gay, G. M. (1984). Efecto del virus del
Ojo Azul en la reproducción de la cerda. Memorias del
II Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios
Especialistas en cerdos. Mazatlán, Sinaloa 1984. 83 AMVEC.
- (25) Stephano, H. A. y Gay, G. M. (1984). Experimental studies on
a new viral syndrome in pigs called Blue Eye,
characterized by encephalitis and corneal opacity.
Proceedings of International pig Veterinary Society Congress

Ghent. Belgium. 8th IPVS.

- (26) Moreno, J., Correa, P., Martínez, A., (1986). Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a Piglet in Mexico. Arch. Virol. 91: 221-231.
- (27) Martínez, L. A., Correa, G. P., Fajardo, M. R., Garibay, M. y Moreno-López, J. (1985). Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramyxovirus. Memorias de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. Mérida, Yuc. 75-78 AMVEC México, D. F.
- (28) Stephano, H. A. and Gay, G. M. (1986). Análisis de cepas de un nuevo paramyxovirus aislado de 12 brotes de encefalitis y opacidad de la cornea en cerdos (Síndrome del Ojo Azul). Memorias del XXIII Congreso de Veterinaria. Montreal. Quebec, Canada, 161. World Veterinary Association. Canada.
- (29) Ramírez, N. R., Martínez, L. A., Correa, G. P. y Colinas, I. A. (1987). Un brote de Paramyxovirosis Encefalítica en cerdos de una granja del Estado de México. Memorias de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. Acapulco, Gro. 64-66. AMVEC.
- (30) Guillén, H. y Barba, R. (1984). Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada síndrome del ojo azul de los porcinos. II Congreso Nacional AMVEC.
- (31) Correa, G.P., Martínez, L.A., Erickson, A. and Moreno-López, J. (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of piglet in México, Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona, Spain, July 15-18, :205 .
- (32) Rosales, F.E., Correa, P.G. (1989). El síndrome del ojo

- (33) Carreón, N. R. (1989). Frecuencia de anticuerpos contra el paramyxovirus del Ojo Azul en cerdos del altiplano y norte de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Tesis de licenciatura.
- (34) Laskey, R. A. and Mells, A. D. (1975). Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrilamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335-341.
- (35) Bader, John P., (1965). The requirement for DNA Synthesis in the Growth of Rous Sarcoma and Rous-Associated Viruses. Virology 26: 256-261.
- (36) Sundqvist, A., Berg, M., Hernandez-Jauregui, P., Linné, T., Moreno-Lopez, J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPM). J. of Gen. Virol., 71: 609-613
- (37) Vainionpaa, R.; Marusyk, R.; Salmi, A. (198). The paramyxoviridae : Aspects of molecular structure, pathogenesis, and immunity. Advances in virus research, vol 37, 211-242.
- (38) Galinski, M.S. (1991). Paramyxoviridae: transcription and replication. Advances in virus research, vol 39, 129-162.
- (39) Gough, Nicholas M. (1988). Rapid and Quantitative Preparation of Cytoplasmic RNA from Small number of Cells. Analytical Biochemistry, 173, 93-95.
- (40) Chopin, P. W. y Compans, R. W. (1975). Reproduction of paramixovirions. en : Comprehensive Virology. Vol. IV (eds. H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner). Plenum Press, New

York, pp. 95-178

- (42) Martínez, A. L., Correa, P., Colinas, A. (1991). Síndrome del Ojo Azul producido por el paramixovirus porcino. Porcivama 12-177: 35-52.
- (43) Stephano, A., (1986). Diagnóstico Diferencial entre Aujeszky y Síndrome de Ojo Azul. Síntesis Porcina. vol 5 (12): 41-48.
- (44) Stephano, H., Ramírez, T., Flores, A. (1983). Situación actual de encefalitis y opacidad de la cornea, conocido como "ojo azul". Congreso Nacional AMVEC.
- (45) Stephano, H., Gay, M. (1985). Síndrome del ojo azul en cerdos. Memorias del encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. editado por P. Correa y A. Morrilla, AMVEC, Centro Médico Nacional del IMSS.
- (46) Gershoni, J. M. and Palade, G. E. (1983). Protein Blotting: Principles and applications. Anal. Biochem. 131: 1-15.
- (47) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. Nature, London 227: 680-685.
- (48) Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-258.