

00346 13

2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**OBTENCION DE MACROFAGOS MURINOS
PERSISTENTEMENTE INFECTADOS POR
EL VIRUS DE RUBEOLA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 realizó en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por: Dirección General de Apoyo al Personal Académico, dentro del proyecto IN200991. "Participación in vitro del anticuerpo antiviral en la infección persistente por el virus de rubéola".

Programa Universitario de Investigación en Salud, dentro del proyecto 2211.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, dentro del proyecto P228CCoX891511. "Efecto del complejo virus-anticuerpo en la multiplicación del virus de rubéola".

Al Dr. Jorge Mariné González a quien dedico muy especialmente este trabajo.

A mis padres Margarita y Rosalio por el apoyo y amor que siempre me han brindado.

A la Sra. Evita por el apoyo que me ha brindado.

A mis hermanos y cuñados: Sergio, Rubén, José, Verónica, Hilda, Jesús, Beatriz y Hector.

A mis sobrinos: Wendy, Sally, José y Alex.

A mi hermana y gran amiga Carolina por el apoyo y cariño que siempre me ha brindado.

A mi amiga Rocio por tantos años de trabajo juntas y por su gran amistad.

A mi amiga Mónica por su gran amistad.

A Augusto por su comprensión, apoyo y por estar presente.

AGRADECIMIENTOS :

A la Dra. Beatriz Gómez García por su asesoría y apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto y por la amistad brindada.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Beatriz Gómez García, Dra. Ingebor Becker Fausser y al Dr. Enrique Ortega Soto por el apoyo y sugerencias hechas durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Cecilia Jiménez García, M. en C. Jaime Bustos Martínez, M. en C. Carmen Soler Claudin y al Dr. Abraham Landu Piedra por la revisión y puntos de vista críticos de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Angel Ravizé Chávez, Ma. Antonieta Guerrero Plata, Enrique Hernández Hernández, Ignacio Palacios Fuentes, Jesus Nuñez Ramírez y Mirza Romero Valdovinos.

A la Q.F.B. Rocio G. Tirado Mendoza por el apoyo brindado en la revisión de la escritura del mismo.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico por haberme otorgado beca para los estudios de maestría.

**“OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS MURINOS
PERSISTENTEMENTE INFECTADOS POR EL
VIRUS DE RUBÉOLA”**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. Características del virus de Rubéola	3
Proteínas estructurales	3
Glicoproteína E₁	4
Glicoproteína E₂	4
Proteína C	4
Multiplicación	4
2. Infección en humanos	5
3. Persistencia viral	8
Regulación del potencial lítico	8
Mecanismos de evasión del sistema inmune	9
4. Persistencia por el virus de Rubéola	10
OBJETIVOS	12
HIPÓTESIS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	33
APENDICE	34
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUCCIÓN

1. Características del virus de Rubéola.

El virus de rubéola es un miembro de la familia Togaviridae, la cual consta de virus envueltos, que contienen RNA de una sola cadena, de polaridad positiva y está constituida por cuatro géneros: Alfavirus, Flavivirus, Rubivirus y Pestivirus (1, 2).

El virus de rubéola es el único miembro del género Rubivirus. Se diferencia de otros Togavirus, por no tener un hospedero invertebrado y el único reservorio natural conocido es el hombre (1).

Poco se conoce de la estructura del virus de rubéola, excepto su tamaño y forma. Como otros Togavirus, parece ser una partícula esférica. Mediante microscopía electrónica se ha demostrado que el virión tiene un tamaño de 60 nm y el core entre 30-35 nm (3,4). El virus de rubéola es lábil al calor, se inactiva rápidamente a 56 °C, pero a 37 °C tiene un decaimiento más lento en su actividad (2). Este virus se inactiva por iones hidrógeno fuera del rango considerado como fisiológico. El virus de rubéola puede ser mantenido por varios días a 4 °C y por periodos prolongados a -70 °C (5).

El genoma del virus contiene 9757 nucleótidos y está organizado de manera similar a los Alfavirus, contiene dos marcos de lectura abierta largos, uno de 6615 nucleótidos en el extremo 5' terminal (dos terceras partes del genoma), el cual codifica para las proteínas no estructurales y otro de 3189 nucleótidos en el extremo 3' terminal (una tercera parte del genoma) que codifica para las proteínas estructurales (6).

El genoma del virus tiene un alto contenido de G/C (69.5%) (38.7% C y 30.8% G) (7), lo cual genera una mayor estabilidad en la estructura secundaria del RNA, esto provoca que la energía requerida en el ciclo de replicación del virus para el desenrollamiento de la estructura secundaria, durante la transcripción y la traducción sea muy alta. Una mayor estabilidad puede ser benéfica para la estructura del virión o para la regulación de la expresión génica (8).

Proteínas estructurales

El virión contiene 3 proteínas estructurales: la proteína de la cápside C (33 kDa) y dos glicoproteínas de envoltura E₁ (58 kDa) y E₂ la cual se encuentra en dos formas E_{2a} (47 kDa) y E_{2b} (42 kDa), éstas difieren en la secuencia de sus cadenas de oligosacáridos (6, 9, 10).

El genoma del virus de rubéola está constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de 40S (11). La transcripción del extremo 3' del RNA genómico produce un RNA_m subgenómico de 24S (12, 13). Este RNA_m subgenómico tiene 3383 nucleótidos de longitud, en el que en el extremo 5', se encuentra un marco de lectura de 2978 nucleótidos excluyendo la región 3' terminal que codifica para un precursor de 110 kDa (p110). La suma de los pesos moleculares de las formas no glicosiladas de las proteínas E₁, E₂ y C es 116 kDa, y se ha encontrado que p110 es el precursor de las tres proteínas estructurales; NH₂-C-E₂-E₁-COOH. Se ha reportado que la cantidad relativa de las proteínas estructurales en los aislados virales que es 5:1:5 para E₁:E₂:C respectivamente (14).

Glicoproteína E₁.

E₁ está presente en el virus maduro en forma monomérica o en forma de homodímero de 105 kDa. Forma heterodímeros al asociarse con la glicoproteína E₂; esta oligomerización parece ser necesaria para que se realice el transporte eficiente de E₂ y E₁ del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi (3, 15). La molécula E₁ madura contiene dominios que han sido definidos con anticuerpos monoclonales y que están involucrados en la adhesión del virus a la superficie de los eritrocitos y en el inicio de la infección (15, 16, 17). Puesto que los anticuerpos con actividad neutralizante y de inhibición de la hemaglutinación están dirigidos contra E₁, se ha sugerido que esta proteína induce la respuesta de células B, por lo tanto puede ser un candidato para la obtención de vacunas (18, 19, 20).

Glicoproteína E₂.

E₂ se deriva de un precursor no glicosilado de 30-34 kDa (21). La función de E₂ aun no se conoce. Al menos una porción de E₂ parece estar expuesta en la superficie del virus. Un dominio de la proteína E₂ parece estar asociado con la infectividad del virus y otro con la hemaglutinación y probablemente algunos antígenos específicos de cada cepa parecen residir en esta molécula (22, 23, 24, 25). La proteína E₂ tiene una longitud de 282 aminoácidos y contiene cuatro dominios potenciales de glicosilación y un dominio transmembranal cerca de su extremo COOH-terminal (8, 24).

Proteína C.

Se ha encontrado que la proteína C forma homodímeros espontáneamente aun si se expresa en ausencia de otras proteínas. Estos dímeros están unidos por puentes disulfuro y aparecen después de que el virus emerge de la célula o si se expone a condiciones oxidantes del ambiente. La presencia de uniones covalentes entre las subunidades de un dímero de proteína C confieren estabilidad en la conformación de la estructura del virus (11, 21, 26).

Se ha propuesto que la proteína C tiene 300 aminoácidos y que la mitad de su extremo NH₂-terminal es de naturaleza hidrofóbica la cual interactúa con el RNA del virión. En el extremo COOH-terminal de la proteína C hay una región de 20 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica la cual funciona como la secuencia señal para E₂, indicando que el rompimiento del precursor poliprotéico puede ser catalizado en el lumen del retículo endoplásmico.

Multiplicación.

Las etapas iniciales de la infección por el virus de rubéola (adhesión y entrada) aún no están bien definidas. Aun cuando no se han identificados receptores específicos, se ha documentado ampliamente la entrada de estos virus a macrófagos en cultivo en presencia de anticuerpos. En estos casos se cree que la entrada del virus está mediada por la presencia de los receptores Fc presentes en el macrófago (27). Una vez dentro de las células, el RNA genómico es utilizado como molde para la traducción de proteínas, produciendo las proteínas no estructurales necesarias para la replicación del virus (2). Actualmente hay poca información acerca de las proteínas no estructurales del virus de rubéola. Por analogía con los Alfavirus estudiados, estas proteínas no estructurales probablemente incluyen moléculas involucradas en la replicación del virus (2, 28).

Durante la replicación del virus de rubéola se producen varias especies de RNA. Estas incluyen el RNA genómico 40S, el RNAm 24S, un RNA de doble cadena 19-20S e intermediarios 21S.

Usando el ensayo de inmunofluorescencia para detectar las especies de doble cadena del RNA, se han observado zonas citoplásmicas fluorescentes en las células infectadas, esto comprueba que la replicación se lleva a cabo en el citoplasma (29, 30, 31).

Mauracher y col. (1991) proponen que el virus se une a las células a través de un receptor y posteriormente es internalizado en una vesícula lisosomal. El pH bajo presente en los lisosomas induce a la proteína E₁ a participar en la fusión del virus a la membrana lisosomal. La actividad fusogénica de E₁ se presenta a un pH más bajo que el que necesitan otros Togavirus. Al mismo tiempo, el pH bajo (aproximadamente 5) induce un cambio en la solubilidad de la proteína C permitiendo la asociación de la cápside con la membrana lisosomal, provocando el desnudamiento intralisosomal. Finalmente se libera el RNA viral al citoplasma (7, 32).

La maduración del virus de rubéola ocurre cuando el RNA se une a la membrana celular, en donde adquiere las proteínas virales de la envoltura E₂ y E₁ y lípidos de la célula hospedera. El proceso de gemación puede comenzar en las membranas intracelulares (Golgi, mitocondria y retículo endoplásmico) o en la membrana plasmática. La capacidad del virus de rubéola para madurar dentro de las vacuolas intracelulares y por lo tanto evadir el sistema inmune, es considerada un factor importante para el establecimiento de infecciones persistentes en el humano (2, 33).

2. Infección en humanos.

Desde mediados del siglo XIX la rubéola se consideró como un exantema benigno de la infancia, y fue hasta 1941 cuando el oftalmólogo, Norman Gregg describió la asociación de la infección intrauterina por rubéola con la catarata congénita. Posteriormente se encontró que la sordera, cardiopatías congénitas y otras malformaciones eran el resultado de rubéola materna durante los 4 primeros meses del embarazo (34, 35).

La rubéola es una enfermedad eruptiva leve, que ocurre principalmente en la infancia pero que se puede presentar en la vida adulta. La vía de entrada de la infección es el aparato respiratorio con diseminación hacia tejidos linfáticos y posteriormente al torrente circulatorio. El periodo de incubación es de aproximadamente 16 a 18 días, con signos o síntomas prodrómicos mínimos. Frecuentemente, la enfermedad comienza con fiebre leve y signos respiratorios que preceden en forma inmediata a la erupción. En niños es común observar la erupción, pero en el adulto la infección puede ser oculta o presentarse sólo como una faringitis en hasta un tercio de los pacientes. La erupción habitualmente desaparece hacia el tercer día. Aunque las complicaciones mayores son raras (púrpura trombocitopénica y encefalitis), la incidencia de artralgia y artritis es mucho mayor de lo que generalmente se aprecia. La frecuencia del compromiso articular se correlaciona directamente con la edad y parece ser más común en mujeres. En algunos pacientes, la persistencia del virus en células sinoviales se ha asociado con poliartritis y artralgia de larga duración (36).

La infección congénita con rubéola puede dar como resultado una amplia variedad de anomalías incluyendo, sordera, cardiopatías congénitas, defectos oculares (cataratas, glaucoma, retinitis y microftalmia), retardo del crecimiento, púrpura trombocitopénica, osteitis, hepatitis, neumonía, encefalitis y lesión cerebral con retardo mental. Además de las malformaciones compatibles con la vida, la infección intrauterina por rubéola puede producir muerte del feto, aborto y muerte neonatal (37, 38). Estudios recientes también indican un aumento significativo de diabetes mellitus, neumonía crónica, tiroiditis y encefalitis degenerativa entre los sobrevivientes de infección intrauterina (39, 40, 41).

Desafortunadamente el mecanismo preciso de la teratogénesis causada por el virus de rubéola aún no se conoce, pero probablemente este sea multifactorial. Una de las hipótesis que se han generado para explicar los mecanismos de teratogénesis, es que el efecto de la replicación del virus durante estados críticos de la ontogenia de órganos fetales, incrementa el amplio rango de anomalías que comprenden el síndrome de rubéola congénita (SRC) (42).

Dentro de los defectos oculares presentados en el SRC las cataratas presentes contienen células picnóticas características en el núcleo del cristalino y necrosis no inflamatoria de las células pigmentadas del epitelio de la retina, así como zonas más o menos pigmentadas de la retina. Aun cuando existen datos que sugieren fuertemente que el daño *in utero* está directa o indirectamente relacionado con la replicación del virus en el tejido de la célula hospedera, hay una evidencia considerable que sugiere que el daño perinatal y particularmente el postnatal está en parte mediado por el sistema inmune. Los cambios patológicos en niños que murieron después del nacimiento usualmente incluyen cambios inflamatorios en uno o más órganos, particularmente en el pulmón y cerebro. Los complejos inmunes que contienen antígenos del virus de rubéola pueden tener algún significado inmunopatogénico en esta fase, estos complejos se han encontrado en casi la mitad de los infantes con el SRC, por lo tanto, esto sugiere que los complejos inmunes pueden ser un marcador continuo de antigenemia (43, 44).

El síndrome de rubéola congénita provoca defectos específicos en la respuesta inmune mediada por células. La severidad de los defectos varía con la edad gestacional y con el tiempo de infección. Cuando la rubéola materna ocurre durante los 2 primeros meses del embarazo, los linfocitos de sangre periférica del niño con rubéola congénita no son capaces de responder a los antígenos del virus de rubéola, lo cual se ha medido por estimulación de linfocitos, producción de interferón o de factores de migración o inhibición de linfocitos. En los niños que han tenido rubéola durante el tercero o cuarto mes gestacional, esta respuesta es parcialmente suprimida y el efecto es menos severo que para los niños con rubéola en el quinto o sexto mes de gestación (45).

La persistencia prolongada del virus de rubéola en tejidos extraídos de fetos sugiere que ni las IgG transferidas por la madre ni el desarrollo del sistema inmune del feto pueden eliminar al virus *in utero*, aun cuando las IgG maternas y las IgM fetales puedan neutralizar al virus *in vitro*. Los infantes infectados durante los primeros meses de gestación frecuentemente muestran alteración en la citotoxicidad específica contra el virus de rubéola, en la respuesta celular y en la secreción de linfocinas, aun cuando puedan producir anticuerpos específicos anti-rubéola IgM, IgA e IgG (43).

La reinfección en presencia de anticuerpos específicos anti-rubéola naturalmente adquirida, es muy rara, aun cuando el nivel de anticuerpos sea bajo. Usualmente tales reinfecciones no resultan en viremia, aunque se han reportado en raras ocasiones. Los anticuerpos inducidos por vacunación generalmente son más bajos que los inducidos por infección natural, pero aun estos niveles parecen ser suficientes para proteger contra infecciones subsecuentes (46).

Las enfermedades crónicas asociadas con la persistencia del virus de rubéola en pacientes con SRC incluyen panencefalitis progresiva, diabetes aguda y tiroiditis. La panencefalitis progresiva por rubéola es un trastorno lento del sistema nervioso central el cual se manifiesta después de más de 10 años de presentarse el SRC (Wolinsky 1978). El virus de rubéola se aísla por cocultivo de células mononucleares de sangre circulante o de biopsias de cerebro, sobre líneas celulares como indicadores de efecto citopático. La presencia del virus de rubéola en complejos inmunes circulantes demuestra la relación del virus con la enfermedad. Una característica importante de la panencefalitis progresiva por rubéola es la presencia de altas concentraciones de IgG dentro del

fluido cerebroespinal. Finalmente se observa una pérdida selectiva de mielina y oligodendroglia, así como una completa destrucción de las células de Purkinje, lo que puede sugerir: a) algún grado de tropismo del virus dentro del sistema nervioso central o b) un profundo y letal efecto sobre el metabolismo de estas células cuando son invadidas por el virus (47, 48).

La diabetes mellitus en animales y humanos se ha relacionado con infección viral desde 1864, cuando J. Stang describió un caso de diabetes después de haberse presentado sarampión. El primer reporte de la asociación del síndrome de rubéola congénita y diabetes apareció en 1942, cuando se mencionó un caso de diabetes en un niño con SRC. La capacidad del virus de rubéola para replicarse y causar lesiones en el páncreas puede estar relacionada con el desarrollo de diabetes. La diabetes mellitus se presenta en alrededor del 20 % de los adultos jóvenes con SRC. Una proporción de pacientes con diabetes mellitus y con SRC han demostrado tener autoanticuerpos que reaccionan con antígenos no identificados de células de los islotes de Langerhans. Entre el 20-30% de los niños con SRC desarrollan una diabetes franca y el virus es capaz de infectar las células de los islotes de Langerhans. Las células de los islotes de estos pacientes se conservan morfológicamente normales y no hay infiltración celular. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la producción de la diabetes insulino dependiente por los virus, aparentemente la producción de autoanticuerpos parece ser un factor importante. Además es probable que el páncreas sea un órgano blanco en dónde se lleva a cabo la replicación del virus de rubéola *in utero* (49).

En pacientes infectados después del nacimiento la persistencia del virus se ha asociado con varias formas de artritis crónica. La artritis crónica también se ha asociado con frecuencia a reinfecciones después de vacunación contra el virus de rubéola, principalmente con la vacuna atenuada de las cepas RA27/3, HPV77DE5 y HYV77-DK12 (50, 51). La persistencia viral en linfocitos periféricos y en macrófagos parece estar relacionada con la patogénesis de la artritis asociada con rubéola. Aunque este mecanismo no es claro, la reactivación periódica del virus de rubéola de linfocitos periféricos infectados persistentemente podría resultar en la formación de complejos inmunes virus-anticuerpo, los cuales pueden iniciar una reacción inflamatoria localizada en las articulaciones. Otra posibilidad es que el principal sitio de persistencia viral puedan ser las articulaciones por sí mismas, de tal manera que al momento de reactivarse el virus pueda pasar a la circulación (52).

En muchas comunidades urbanas, la infección por rubéola se adquiere tempranamente en la niñez, principalmente en edad escolar. Sin embargo, dado que no es una enfermedad altamente contagiosa como el sarampión o la varicela, hasta un 15-20% de las mujeres llegan a la edad adulta sin haber adquirido inmunidad natural. En los Estados Unidos han ocurrido grandes epidemias con intervalos de 6 a 9 años, con menor número de casos en los años intermedios. Este ciclo se interrumpió en 1969 cuando comenzaron los programas de vacunación y en los Estados Unidos no han habido grandes epidemias desde la pandemia de 1964-65. En 1983 se reportaron sólo 954 casos de rubéola. La epidemiología de la rubéola ha sido estudiada fundamentalmente por encuestas serológicas retrospectivas, las cuales revelan la frecuencia y distribución de anticuerpos específicos como índice de la infección, ya que la enfermedad frecuentemente es subclínica o de difícil diagnóstico (2, 53).

En la ciudad de México, las encuestas serológicas entre 1968-1969 demostraron que la infección por rubéola es muy frecuente en la infancia, que se inicia desde el primer año de vida, alcanzando su máxima incidencia durante la edad escolar, en tal forma que más del 95% de los adultos tienen anticuerpos. En México se han reportado entre 1993 y marzo de 1996 143,033 casos (Boletín semanal de la Dirección General de Epidemiología, S.S.A. 1993-1996). La transmisión habitual

es por vía respiratoria, pero la prolongada viruria de los niños congénitamente infectados puede ser de gran importancia en la diseminación a sus contactos cercanos. Se ha encontrado una correlación estadística entre la presencia de ciertos antígenos MHC (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y la prevalencia de seropositividad en una población geográfica restringida, pero aún no está claro si esta asociación contribuye de manera importante a las variaciones regionales en la expresión de la enfermedad o si están asociadas con la magnitud de la respuesta inmune para el virus de rubéola o con la persistencia del virus (53).

3. Persistencia viral.

Las infecciones virales persistentes tradicionalmente se han dividido en 2 categorías: a) infección crónica (productiva), en la cual el virus infeccioso está presente y puede ser aislado por métodos convencionales, durante todo el tiempo aunque la sintomatología no sea aparente y b) infecciones latentes, en las cuales el genoma viral está presente pero generalmente no se produce virus infeccioso excepto durante episodios de reactivación que por lo general son intermitentes (2).

Para que un virus pueda persistir en el organismo es necesario que exista una regulación del potencial lítico y que el virus no mate a las células, así como evitar la detección y eliminación por el sistema inmune del hospedero (54).

Regulación del potencial lítico.

Las características histopatológicas comunes de una infección viral aguda son: destrucción de tejido, necrosis celular e infiltración celular, las cuales se utilizan como señales para la confirmación de la infección. Sin embargo, la infiltración celular y la destrucción de las células infectadas no se presentan en una infección persistente. En una infección persistente el virus debe permanecer en el organismo sin matar a la célula hospedera ni afectar sus funciones vitales (55). Existen varios mecanismos propuestos del establecimiento de una infección persistente por virus de RNA. Oldstone 1991, propone que la infección persistente se establece por la reducción o control de la transcripción de los genes virales específicos o bien de sus transcritos. También se ha propuesto que las mutantes virales presentes en los cultivos persistentes desempeñan un papel importante en el establecimiento de una infección persistente. Estas mutantes van desde las partículas defectuosas hasta la presencia de mutantes termosensibles (55).

Los estudios de las infecciones virales persistentes en células en cultivo han mostrado que las mutantes virales pueden modular el potencial lítico de las cepas virales normalmente citocidas. Se han encontrado varios tipos de mutantes virales que pueden establecer infecciones persistentes, tales como mutantes temperatura sensibles o partículas defectuosas, las cuales en cultivos celulares generan placas pequeñas, probablemente debido a que la producción viral es menor o bien a que la capacidad de fusión disminuye (56).

La influencia de los tejidos del hospedero y tipos celulares en la selección de las variantes virales durante una infección crónica se propuso como un mecanismo evolutivo en la interacción virus-hospedero. La variedad de órganos y tipos celulares presentes en el cuerpo proveen un medio ideal para la selección de variantes virales. Dada la alta tasa de mutación de los virus, es probable que la selección tejido-célula específica sea un aspecto importante para la evolución de los virus, lo cual se aplica en particular a los virus que causan infecciones crónicas (57, 58).

Mecanismos de evasión del sistema inmune.

Otro requisito para que el virus persista en el organismo es que el virus pueda evadir el sistema inmune. La principal función del sistema inmune del hospedero es el reconocimiento y la eliminación de materiales extraños. Los virus han desarrollado varias estrategias para evadir al sistema inmune (59).

La variación antigénica del virus es el mecanismo más efectivo de escape de los anticuerpos neutralizantes. Los cambios en la estructura o en la expresión de las proteínas virales, ya sea de proteínas de la cápside o las glicoproteínas de la envoltura, son un mecanismo importante mediante el cual los virus pueden evitar su eliminación por el sistema inmune. Los anticuerpos neutralizantes seleccionan las variantes antigénicas, sin embargo, éstos son incapaces de eliminar completamente al virus original y de esta manera tanto las variantes antigénicas como la cepa silvestre coexisten en el hospedero persistentemente infectado. Otra manera de evadir a los anticuerpos neutralizantes, es la presencia de anticuerpos no neutralizantes en exceso (56, 60).

Las células T reconocen los fragmentos proteolíticos de las proteínas virales, que son presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los virus pueden reducir la expresión del MHC en las células infectadas y por lo tanto, logran evadir el sistema inmune (61).

Los antígenos clase I del MHC se encuentran en todas las células excepto en las neuronas, la unión del polipéptido es lineal y ocurre como consecuencia de la fragmentación proteolítica, de una proteína viral, usualmente sintetizada dentro de la célula. Los virus pueden reducir la expresión del MHC en las células infectadas y por lo tanto, disminuir la presentación de antígenos virales a linfocitos T. Por ejemplo, la proteína E19 de Adenovirus forma un complejo con las moléculas nascentes del MHC en el retículo endoplásmico y evita que emigren hacia la superficie. Otro ejemplo se presenta en la infección por Citomegalovirus en donde se ha encontrado que en la secuencia de nucleótidos del virus, está presente un marco de lectura abierta cuyo producto de traducción tiene homología con la cadena pesada del MHC-I. De esta manera el virión se une a la beta 2-microglobulina y las células infectadas son incapaces de sintetizar moléculas maduras del MHC-I (62, 63).

Los virus pueden infectar selectivamente células del sistema inmune. En un gran número de estudios se ha encontrado que en infecciones persistentes, tanto de virus de RNA como de DNA, los virus pueden interferir con las funciones especializadas de las células sin alterar las funciones vitales. Se ha demostrado que virus que infectan tanto al hombre así como a los animales alteran las funciones especializadas de células como neuronas, glia y linfocitos sin destruirlas (64).

La habilidad de los virus para infectar linfocitos y macrófagos tiene importantes implicaciones y probablemente juega un papel importante en la diseminación de la infección, en el mecanismo de latencia y persistencia viral. Es probable que los linfocitos y los macrófagos sean unas de las células donde la replicación y persistencia es mayor en humanos. Puesto que muchos virus pueden replicarse en linfocitos y pueden de ese modo inhabilitar la respuesta inmune específica, el linfotropismo puede ser un mecanismo común para iniciar la persistencia viral (65, 66). En algunos casos el defecto en los linfocitos puede desencadenar una inmunosupresión generalizada. La persistencia producida por el virus de sarampión se ha estudiado para explicar los mecanismos de inmunosupresión, en este modelo se ha observado que el virus suprime la función de linfocitos T y B, manteniendo cada tipo celular en la fase G₁ tardía del ciclo celular. La replicación del virus requiere de factores no determinados que evidentemente no están presentes en los linfocitos en la

fase G₀. Si el virus mantiene a los linfocitos en la fase G₁, satisface sus requerimientos de replicación y una vez activados los linfocitos infectados son metabólicamente permisivos para la replicación viral. Además el virus del sarampión suprime algunas funciones del linfocito requeridas para la diferenciación terminal (63, 67).

4. Persistencia por el virus de Rubéola.

El virus de rubéola se ha aislado de tejido linfoide después de una infección natural, de individuos infectados después de vacunación y también de infección persistente en el caso del SRC (68). En 1980, Van der Logt y col. demostraron que el virus de rubéola es capaz de multiplicarse en células mononucleares y se encontró que el macrófago es la célula que principalmente se infecta, lo cual permite la diseminación del virus en el organismo. La capacidad del virus de rubéola para replicarse en los macrófagos se incrementa durante su cultivo *in vitro* (49).

La infección persistente con el virus de rubéola puede existir en células humanas sin evidencia de efecto citopático o destrucción celular, con una débil interferencia en la síntesis de algunas proteínas celulares. El virus de rubéola establece infección persistente *in vitro* en líneas celulares, de diferentes estirpes, en la cual se ha ensayado (43, 69, 70, 71). Como ya se ha mencionado, en una infección persistente pueden estar alteradas las funciones no vitales de la célula. En el caso del virus de rubéola se ha observado que en células embrionarias hay una marcada reducción en su capacidad normal para sintetizar colágena, probablemente como resultado de una profunda deficiencia en la internalización y en el metabolismo de los factores de crecimiento. En infección de células pancreáticas con el virus de rubéola se reduce significativamente su capacidad para secretar insulina. Las manifestaciones severas y continuos efectos de la persistencia del virus de rubéola después de la infección fetal en humanos sobre los órganos auditivo, ocular y glandular se ha documentado ampliamente y se ha observado, que en el caso del daño ocular, se reduce la fagocitosis, la cual es una función secundaria de las células epiteliales de la retina (72, 73, 74).

La presencia de partículas defectuosas y mutantes termosensibles se ha observado en una línea celular de fibroblastos de riñón de mono (células Vero) infectadas persistentemente (43, 50 56), lo cual sugiere que jueguen un papel importante en la replicación lenta y no citopática del virus de rubéola (73, 75). La infección con rubéola y la inmunización con el virus atenuado se ha asociado con el desarrollo de la artritis crónica (52). Se ha demostrado que el virus de rubéola es capaz de establecer infecciones persistentes tanto en individuos infectados congénitamente como en individuos infectados después del nacimiento. Las enfermedades crónicas asociadas con la persistencia del virus de rubéola en pacientes con SRC incluyen tiroiditis, diabetes aguda y panencefalitis progresiva (49). La enfermedad de Still's es una enfermedad cuyas características sugieren una infección viral, ya que presenta fiebres altas, artralgia o artritis, eritema maculopapular y leucocitosis, y se ha asociado con varios posibles agentes etiológicos entre los que destacan rubéola, sarampión, parainfluenza, Epstein Barr y citomegalovirus. En algunos pacientes con esta enfermedad se ha aislado el virus de rubéola de macrófagos.

Se ha reportado ampliamente que los virus pueden infectar células del sistema inmune evadiendo el ataque del propio sistema inmune y estableciendo infecciones persistentes siendo el macrófago es una célula del sistema inmune cuya finalidad es destruir agentes extraños y puesto que se ha reportado la presencia del virus en macrófagos aislados de pacientes con la enfermedad de Still's (76), nosotros consideramos importante el establecimiento de un modelo *in vitro* que nos permita estudiar la persistencia viral en este tipo de células. La persistencia del virus de rubéola puede tener un papel importante en la patogenia de la infección y en los efectos secundarios originados

por vacunación y reinfección. Debido a que es difícil estudiar las interacciones virus-célula en un sistema *in vivo*, decidimos establecer la infección persistente en un modelo *in vitro* y para ello seleccionamos una línea celular de origen murino (P388D1), la cual tiene características de macrófagos.

OBJETIVOS.

1. Establecer con el virus de **rubéola** una infección persistente en una línea celular similar a macrófagos de origen murino (P388D1).
2. Analizar las características del cultivo persistente midiendo:
 - a) Producción de virus extracelular e intracelular durante los subcultivos
 - b) Expresión de antígeno viral en las células infectadas
3. Estudiar el efecto de la superinfección, con el virus original en las células persistentemente infectadas.

HIPÓTESIS.

El virus de **rubéola** puede persistir en una línea celular similar a macrófagos (P388D1) y por medio de la superinfección con el virus homólogo se incrementa el porcentaje de células persistentemente infectadas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

VIRUS.

Virus de rubéola cepa Therien proporcionada originalmente por el M.D. Olli Meurman del Departamento de Virología de la Universidad de Turku, Finlandia y propagada en el laboratorio apartir de 1983.

CÉLULAS.

Células Vero, adquiridas originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection), se crecieron en botellas para cultivo de 75 cm² y se mantuvieron en D-MEM suplementado con 5-10% de suero de neonato de ternera, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2. g/lit de bicarbonato de sodio, 1000 unidades internacionales/lit de penicilina G, 100 mg/lit de sulfato de estreptomina y 100 mg/lit de nistatina.

Línea celular de riñón de conejo RK13, fué donada por la Dra. Shirley Gillam del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Columbia, Canadá. Esta línea se adquirió originalmente del ATCC. Las células se crecieron en cajas de 75 cm² y se mantuvieron en medio 199 suplementado con 6-10% de suero fetal de ternera, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2. g/lit de bicarbonato de sodio, 100,000 unidades internacionales/lit de penicilina G, 100 mg/lit de sulfato de estreptomina y 100 mg/lit de nistatina.

Línea celular de origen murino (P388D1), fue donada por el Dr. A. Tingle el cual la adquirió originalmente del ATCC. Esta línea se aisló de un neoplasma linfoide (P388) de ratón DBA/2 y presenta características similares a macrófagos (en lo sucesivo se denominarán macrófagos). Estas células se mantuvieron en cajas petri para cultivo celular de 60 cm², crecidas en medio RPMI 1640 y suplementado con 2-10% de suero fetal, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2 g/lit. de bicarbonato de sodio, 100,000 unidades internacionales/lit de penicilina G y 100 mg/lit. de sulfato de estreptomina.

TITULACIÓN DEL ANTIGENO VIRAL POR HEMAGLUTINACIÓN.

La titulación del antígeno viral se hizo por hemaglutinación de acuerdo a la técnica del CDC (77). En una microplaca con fondo en "V" se colocaron, a partir del segundo pozo, 25 µl de una solución de Auletta (9 g de NaCl, 1g de CaCl₂ anhidro y 1g de Na₂SO₄·7H₂O en 1000 ml de agua destilada, pH 6.4) adicionado de Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 0.4%. Se añadieron 50 µl de la suspensión viral al primer pozo, con un microdilutor se transfirieron 25 µl al segundo pozo, se mezcló y se repitió la operación hasta el pozo #8 del cual se desecharon 25 µl. Se agregó a cada pozo 25 µl de una suspensión de eritrocitos de pollo de un día de nacido al 0.05%, en Auletta. Se agitó cuidadosamente y se dejó reposar durante 60 min a temperatura ambiente (TA). El título se tomó como el recíproco de la última dilución que presenta aglutinación de los eritrocitos y se expresó en unidades hemaglutinantes por mililitro (HA/ml) (77).

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA RUBÉOLA POR INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.

Titulación de los sueros policlonales anti-rubéola obtenidos de voluntarios. Se tomó una muestra de 10 ml de sangre y se colocó en tubos de centrifuga (sin anticoagulante). Se dejó coagular, se separó el coágulo y se centrifugó 15 min a 1500 rpm, se separó el suero y se guardó a -20°C .

Eliminación de los inhibidores inespecíficos de los sueros:

Se mezclaron 0.2 ml de suero con 0.3 ml de amortiguador hepes salino albúmina gelatina (HSAG hepes 200 ml (29.8 g de hepes, 49.9 g de NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=6.5$ y aforar a 1 litro), ASB 500 ml (ASB 2%), gelatina 100 ml (25 mg de gelatina a $\text{pH}=6.2$ y aforar a 1 litro)). Se añadieron 0.2 ml de heparina/ MnCl_2 (heparina 5000 Unidades/ml y MnCl_2 1 M se mezclaron en cantidades iguales) y se añadió una suspensión de eritrocitos de pollo al 50% y se incubó por una hora a 4°C . Posteriormente se añadieron 0.8 ml de HSAG y se centrifugó por 15 min a 4°C a 2000 rpm. El sobrenadante recuperado se utilizó para la determinación de anticuerpos anti-rubéola por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (77).

Titulación por inhibición de la hemaglutinación:

Se colocaron 25 μl de Auleta en los pozos de la microplaca con fondo en "V" a partir del segundo pozo. En el primer pozo se adicionaron 50 μl de suero, con un dilutor se tomaron 25 μl y se pasaron al segundo pozo, se mezcló cuidadosamente y se repitió la operación hasta el pozo #8 desechando los últimos 25 μl . Se añadieron 25 μl del antígeno con un título de 4 unidades HA/ml. La placa se incubó por 60 min a TA. Se añadieron 25 μl de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.05% y se agitó cuidadosamente. Se dejó reposar durante 60 min a TA. El título se determinó como la máxima dilución en la cual la hemaglutinación se inhibió y se expresó en unidades internacionales (UI/ml).

El título obtenido de los sueros fue de 250 y 500 Unidades Internacionales/ml (UI/ml). La equivalencia de las UI se obtuvo de acuerdo a lo reportado por Forsgren M. 1985, por la relación con un suero de referencia del laboratorio de salud pública de Quebec, Canadá. Las equivalencias en UI/ml con respecto a las diluciones de los sueros son las siguientes:

DILUCIÓN	EQUIVALENCIAS EN UI/ml
< 1:8	< 3.9
1:8	4.0 - 7.7
1:16	7.8 - 15.5
1:32	31.2 - 62.4
1:64	62.5 - 124.9
1:128	125 - 249.9
1:256	250 - 499.9
1:512	> 500

ANTICUERPOS.

Anticuerpos policlonales anti-rubéola de origen humano, los cuales se obtuvieron de voluntarios y los títulos fluctuaron entre 250 y 500 UI/ml.

Anticuerpos monoclonales contra la proteína E₁, del virus de rubéola los cuales fueron donados por la Dra. Shirley Gillam del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Columbia, Canadá (20).

PROPAGACIÓN DEL VIRUS.

El virus de rubéola se propagó en células Vero. Monocapas de células Vero crecidas en cajas de petri para cultivo celular de 100 mm con un 80% de confluencia, se infectaron con 1 ml de la suspensión viral en presencia de medio D-MEM adicionado de 1% de suero de neonato de ternera y 0.4% de ASB. Se dejó adsorber 1 hora a 35 °C en una cámara húmeda en presencia de CO₂, se retiró el medio y se completó con medio fresco. Se incubó a 35 °C hasta la observación de efecto citopático. Posteriormente se cosechó el sobrenadante y se centrifugó a 1500 rpm. Se tituló la infectividad del sobrenadante en células RK13 y se expresó en TCID50/ml.

TITULACIÓN DE VIRUS.

La infectividad del virus de rubéola se tituló en monocapas de células RK13 semiconfluentes, crecidas en placas de 96 pozos en medio 199 con 10% de suero fetal de ternera, los pozos se infectaron con diluciones seriadas de la suspensión viral 1:3, hasta una dilución final de 1.2×10^{-6} en medio RPMI 1640 con 1% de suero fetal de ternera, se incubó una hora para permitir la adsorción del virus. Cada ensayo se realizó por cuatruplicado. Las placas se incubaron hasta la observación de efecto citopático (3-6) días. El título viral se expresó en TCID50/ml y se determinó utilizando la fórmula de Kärber (77).

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS A MULTIPLICIDADES DE INFECCIÓN (MOI) DE 0.5 Y 10.

La infección aguda de los macrófagos se hizo a dos diferentes multiplicidades. Se infectaron con el virus de rubéola cepa Therien a MOI de 0.5 y 10 en presencia de medio RPMI 1640 suplementado con 1% de suero fetal de ternera, 1×10^5 macrófagos P388D1 crecidos en cajas petri para cultivo celular de 60 mm. Se incubó una hora a 35 °C, después de este tiempo se retiró el medio y se cambió por 3 ml medio fresco (RPMI 1640 con 3% de suero fetal de ternera). Se determinó el número de células viables por exclusión de azul tripano a las 24, 48, 72 y 96 horas postinfección (p.i.). Simultáneamente se determinó el título del virus extracelular en el sobrenadante de estas células. Paralelamente se realizó un control de macrófagos no infectados el cual recibió el mismo tratamiento.

ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCION PERSISTENTE.

Monocapas de macrófagos P388D1, se infectaron con el virus de rubéola a MOI de 0.5 y 10 de acuerdo a lo descrito anteriormente. Los macrófagos infectados se mantuvieron durante 6 días, cambiando diariamente el medio por medio fresco. Las células sobrevivientes se subcultivaron por un periodo de 2 años, realizando aproximadamente subcultivos 1 a 2 veces a la semana. La persistencia viral en estos cultivos se ha comprobado a través de la producción de virus intracelular (por sonicación) y extracelular (en los sobrenadantes), centros de infección, detección del antígeno viral por inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y resistencia a la superinfección con el virus original.

OBTENCIÓN DE UN CULTIVO HOMOGÉNEO POR DILUCIÓN LÍMITE.

Se realizaron diluciones 1:10 de algunos pases de los cultivos persistentemente infectados con medio RPMI con 5% de suero fetal de ternera y se contó el número de células en cada dilución

por exclusión de azul tripano. Se subcultivaron aquellas diluciones con el menor número de células (el mínimo recuperado fue de 5 células/ml) y posteriormente se determinó la presencia de virus extracelular por titulación de la infectividad en células RK13, como ya se describió previamente.

RESISTENCIA A LA SUPERINFECCIÓN.

Un fenómeno observado frecuentemente en infecciones virales persistentes en líneas celulares, es la resistencia a la superinfección con el virus original con el que se estableció la persistencia, no así a la superinfección con un virus heterólogo. El fenómeno de resistencia al virus homólogo se ha definido como interferencia de homólogos y se ha reportado en infecciones causadas por algunos virus (43, 78, 79, 80). Nosotros pensamos que el fenómeno de resistencia a la superinfección podríamos considerarlo como un parámetro para la confirmación del cultivo persistente.

El pase 38 del cultivo de macrófagos infectados persistentemente, se superinfectó a MOI de 40, con medio RPMI suplementado con 1% de suero fetal y antibióticos. Se incubó durante 1 hora a 35 °C. Posteriormente se cambió el medio por RPMI suplementado con 3% de suero fetal. Se determinó la viabilidad celular a las 24 y 48 horas, por exclusión de azul tripano. Paralelamente se infectaron macrófagos normales, con una multiplicidad de infección de 40, determinando el número de células vivas a las 24, 48, 72 y 96 horas p.i..

CENTROS DE INFECCIÓN.

Monocapas de células RK13 semiconfluentes crecidas en placa de 6 pozos se infectaron con diluciones seriadas 1:3, de macrófagos persistentemente infectados hasta una dilución final de 1.2×10^{-6} , en medio RPMI 1640 con 1% de suero fetal de ternera y antibióticos. Para eliminar el virus extracelular, los macrófagos se lavaron previamente 20 veces con el medio utilizado para las diluciones, se añadieron a las células RK13 y se incubaron una hora a 35°C en atmósfera de CO₂, posteriormente se añadió medio RPMI 1640 adicionado de 2% de agar. Las placas se incubaron a 35 °C hasta la observación de efecto citopático (3-6 días).

DETECCIÓN DEL ANTIGENO VIRAL EN LAS CÉLULAS INFECTADAS.

1. INMUNOFLORESCENCIA.

Los portaobjetos para cultivo celular de 8 pozos que se utilizaron para los ensayos de inmunofluorescencia y peroxidasa de los macrófagos persistentemente infectados, se trataron previamente con polilisina con el objeto de favorecer la unión de las células a la superficie del portaobjetos. Brevemente, se preparó una solución de polilisina a una concentración de 10 µg/ml, se esterilizó por filtración (utilizando una membrana de .22 µ), se añadieron 300 µl por pozo se dejó adsorber durante 20 min y posteriormente se lavó con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril y se dejó secar.

En los portaobjetos previamente tratados con polilisina se adhirieron por 10 min a 35 °C, aproximadamente 1×10^4 células de los cultivos de macrófagos persistentemente infectados. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se fijaron las células introduciendo el portaobjetos en metanol a -20 °C por 5 min y sin dejar secar se introdujo en acetona a -20 °C por 30 seg, y se

dejó secar al aire. Se bloqueó toda la noche con PBS adicionado de 1% de albúmina sérica bovina y suero de cabra 1:200. Se añadió el anticuerpo policlonal anti-rubéola, diluido 1:25 en PBS adicionado de 0.5 % de ASB y se incubó durante 30 min a TA. Se añadió anti-IgG humana obtenido en cabra conjugado con fluoresceína preparado en el laboratorio de acuerdo al método de J.W. Goding, 1983 y se incubó durante 30 min a TA. Se observó en el microscopio invertido Nikon Diaphot. Paralelamente se realizó en las mismas condiciones un control con macrófagos no infectados. La detección del antígeno viral en macrófagos con anticuerpos monoclonales (diluidos 1:25 en PBS adicionado de ASB al 0.5%) se ensayó en la forma descrita para el anticuerpo policlonal.

2. INMUNOPEROXIDASA.

Los macrófagos persistentemente infectados y los controles no infectados se adsorbieron 10 min a 35 °C, en los portaobjetos previamente tratados con polilisina. Se retiró el sobrenadante y se fijaron las células, como ya se mencionó anteriormente. Se inactivó la peroxidasa endógena con metanol adicionado de 3% de H₂O₂ durante 45 min a TA. Se bloqueó toda la noche con 1% de ASB en PBS con suero de cabra diluido 1:200. Se añadió el anticuerpo anti-rubéola policlonal diluido 1:50 en PBS con ASB al 0.5% y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se añadió el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, obtenido en cabra y se incubó 1 hora a 37°C. Se agregó 3,3' Diamino benzidina 0.5 mg/ml en amortiguador Tris pH=7.6 adicionado de 0.02% de H₂O₂ y se incubó durante 30 min a TA. y se observó en el microscopio invertido Nikon Diaphot.

DETERMINACIÓN DE VIRUS INFECCIOSO INTRACELULAR .

EL virus intracelular se determinó después de lavar los cultivos de macrófagos persistentes, 20 veces, con RPMI suplementado con 1% de suero fetal y antibióticos, para eliminar el virus extracelular, posteriormente se sonicaron (sonicador Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner modelo 8846-50) durante 5, 10 y 15 min. Se tomaron alícuotas del sobrenadante en los tiempos mencionados y se les determinó la infectividad de acuerdo al método descrito anteriormente.

CONGELACIÓN DE CÉLULAS.

Con la finalidad de preservar las células persistentemente infectadas se congelaron con 10 % dimetilsulfóxido en suero fetal de ternera (medio para congelar). Aproximadamente 1×10^6 células se congelaron en 0.4 ml. de medio para congelar y se mantuvieron a -70 °C.

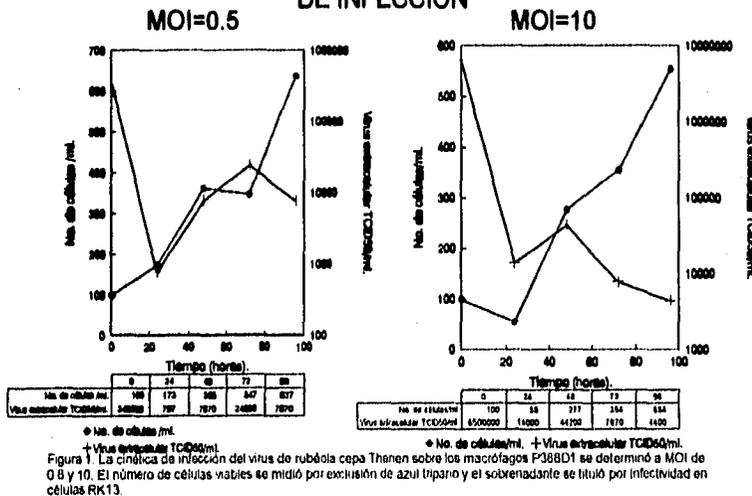
RESULTADOS

CINÉTICA DE INFECCIÓN A MOI DE 0.5 Y 10

La cinética de infección del virus de rubéola en la línea celular de macrófagos se determinó a las multiplicidades de 0.5 y 10 hasta 96 horas p.i. Los parámetros que se utilizaron para hacer el seguimiento de la infección fueron: la viabilidad celular y la producción de virus extracelular.

En el cultivo infectado con una $moi=0.5$ se observó que en los diferentes puntos de la cinética el número de células viables fue mayor al número de células en el tiempo cero y la mayor producción de virus extracelular se detectó a las 72 horas p.i. (2.48×10^4 TCID₅₀/ml). En cambio a la multiplicidad de 10, a las 24 horas hubo una reducción en el número de células del 44.6% y fue hasta las 48 horas p.i. que el número de células viables se incrementó. Con respecto a la producción de virus extracelular, se encontró que la mayor producción ocurrió a las 48 horas p.i. alcanzando un título de 4.42×10^4 TCID₅₀/ml. Estos resultados se muestran en la figura 1.

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS A DIFERENTES MULTIPLICIDADES DE INFECCIÓN



Apartir de estas cinéticas observamos que los macrófagos P388D1 son células susceptibles y permisivas a la infección con el virus de rubéola y además que el virus no tiene un efecto citocida importante en las células, ya que encontramos que hubo crecimiento celular y que incluso el número de células a las 96 horas p.i. en ambos cultivos fue mayor al número de células en el tiempo cero. Otro dato importante fue que también encontramos virus extracelular en los sobrenadantes de estos cultivos durante las 96 horas que se hizo el seguimiento.

OBTENCIÓN DEL CULTIVO PERSISTENTE

Con base en los resultados anteriores decidimos entonces establecer la infección persistente. La obtención del cultivo persistente se realizó empleando dos diferentes multiplicidades de infección: 0.5 y 10. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.

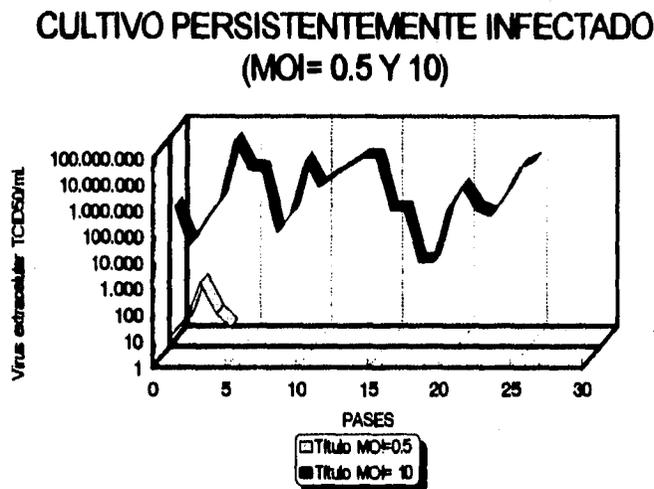


Figura 2. Producción de virus extracelular durante diferentes pases de los macrófagos infectados a diferentes multiplicidades. El sobrenadante se tituló por infectividad en células RK13.

El virus extracelular producido por los macrófagos infectados, se determinó por TCID₅₀/ml. Para la multiplicidad de 0.5 la producción del virus extracelular, en el pase 3 alcanzó un título de 1×10^3 TCID₅₀/ml. A partir de este pase los títulos fueron disminuyendo. Este cultivo sólo se continuó hasta el pase 5 puesto que el título de virus extracelular fue disminuyendo hasta que ya no se encontró virus en el sobrenadante. Como se observa en la figura 2 los macrófagos infectados a una multiplicidad de infección de 10 presentaron títulos de virus extracelular que fluctuaron entre 1×10^3 - 1×10^7 TCID₅₀/ml desde del pase 1 hasta el pase 26.

Otro parámetro que se utilizó para realizar el seguimiento del cultivo persistente fue la determinación de centros de infección. La figura 3 muestra el resultado de centros de infección del pase 17. El número de células que produjo virus fue muy bajo, en la tabla 1 se muestran los resultados de centros de infección para los pases 17, 17.1 y 17.2, en estos pases el porcentaje de células que producen virus fluctuó entre 0.1 y 0.4%.

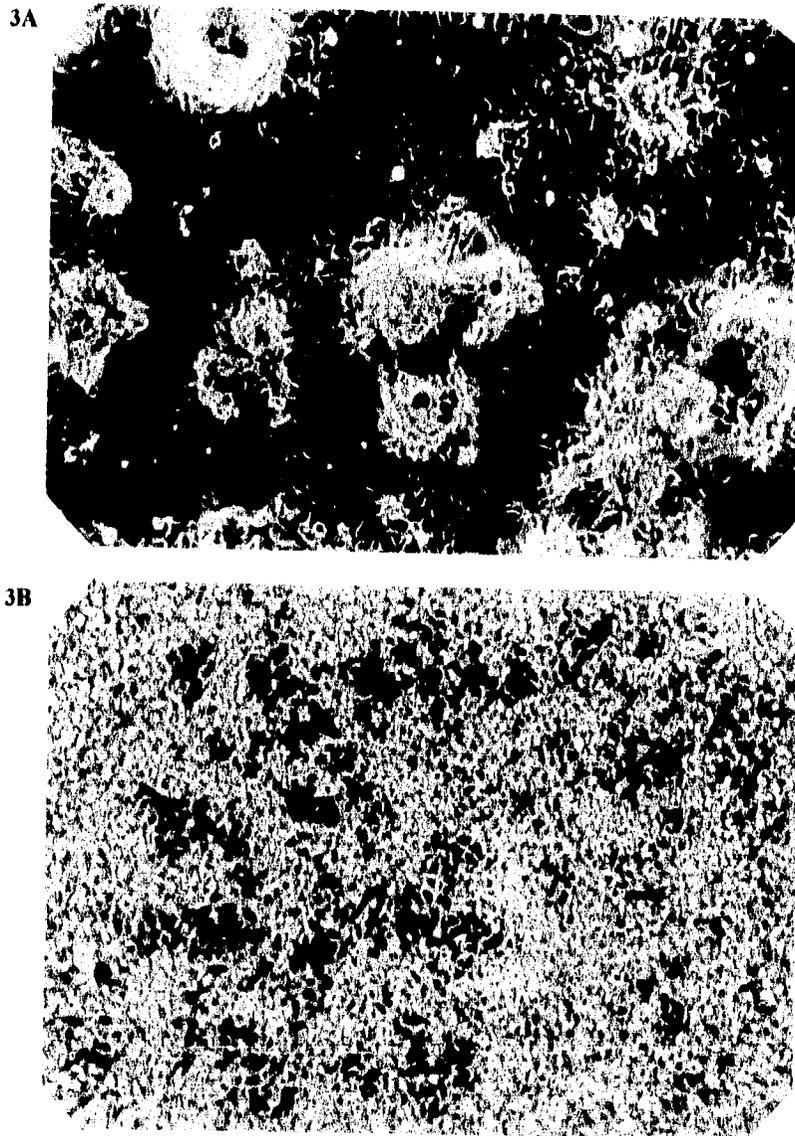


Figura 3. Centros de infección de macrófagos persistentemente infectados con el virus de rubéola. Monocapas de células RK13 semiconfluentes se infectaron con diluciones seriadas 1:3 de los macrófagos infectados persistentemente. Se incubaron hasta la observación de efecto citopático. El título se expresó en TCID50/ml. En 3A se observa el efecto citopático sobre las células RK13 que fueron crecidas en presencia de macrófagos infectados persistentemente y en 3B se muestra el control de células RK13 crecidas en presencia de macrófagos no infectados.

CULTIVO PERSISTENTE	CÉLULAS QUE PRODUCEN VIRUS (Centros de Infección)	PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE PRODUCEN VIRUS	TITULO DE VIRUS EXTRACELULAR (TCID50/ml)
pase 17	1×10^6/ml	0.2%	1×10^7
pase 17.1	1.13×10^6/ml	0.1 %	1×10^7
pase 17.2	4.42×10^5/ml	0.4%	1×10^7

Tabla 1. El número de células que producen virus infeccioso se determinó por centros de infección en células RK13. La densidad celular de los cultivos utilizados para determinar los centros de infección fue de 1×10^6 células/ml.

DETECCIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL EN LAS CÉLULAS INFECTADAS POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA

A. INMUNOFLUORESCENCIA.

La expresión de antígenos virales en las células infectadas persistentemente fue analizada a través del ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando tanto suero policlonal humano anti-rubéola (título por IHA 500 UI/ml) como anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epitope hemaglutinante y neutralizante de la proteína E1. En este ensayo se observó que con el suero policlonal, alrededor del 50% de las células se detectó presencia de antígeno, en los cultivos obtenidos hasta el pase 17. Cuando se usaron los anticuerpos monoclonales 3D5D y 21 B9H el porcentaje de células que mostraron antígeno fue entre el 20% y 30%, es decir 20% menor a los resultados obtenidos con el suero policlonal.

B. INMUNOPEROXIDASA.

En este ensayo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-rubéola de humano, el resultado obtenido fue similar al de inmunofluorescencia en donde alrededor del 50% de las células expresaron antígeno. Estos resultados se muestran en la figura 4.

En los resultados obtenidos en la titulación de virus extracelular se observó una gran fluctuación y al realizar la detección de antígeno por inmunoperoxidasa se encontró que algunas células expresaron antígeno y otras no. Esto fue sugestivo de la presencia de un cultivo heterogéneo. Por lo tanto se intentó obtener un cultivo homogéneo de células infectadas persistentemente.

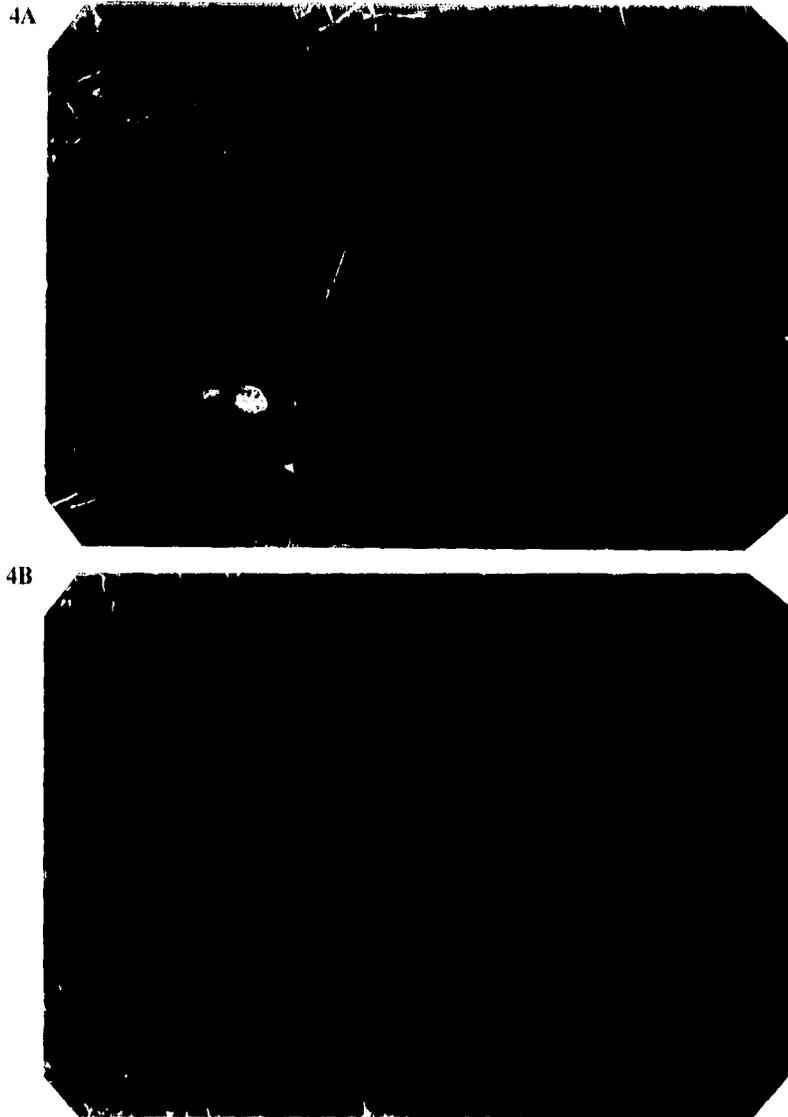


Fig. 4. Immunoperoxidasa de macrófagos infectados con el virus de rubéola. Los macrófagos se adsorbieron en portaobjetos para cultivo (previamente tratados con polisilina). Se fijaron con metanol-acetona y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-rubéola. Los complejos inmunes se revelaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa se incubó y se añadió el sustrato. En 4A se muestran los resultados obtenidos en los cultivos infectados persistentemente y en 4B se muestra el control negativo

OBTENCIÓN DE UN CULTIVO HOMOGÉNEO PERSISTENTEMENTE INFECTADO

Dilución Límite

Inicialmente se trató de obtener un cultivo homogéneo por dilución límite, es decir a partir del menor número de células que pudieran propagarse. Puesto que no fue posible tener un cultivo a partir de una célula, del pase 18 se recuperó un cultivo con un mínimo de 5 células. La confluencia en este cultivo se alcanzó en 15 días. Posteriormente se siguieron dando pases y se determinó la producción de virus extracelular en cada uno.

El cultivo obtenido de la clonación por dilución mostró títulos entre 2.4×10^5 TCID₅₀/ml y 7.8×10^7 TCID₅₀/ml (figura 5).

CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS: OBTENIDO POR DILUCIÓN LÍMITE

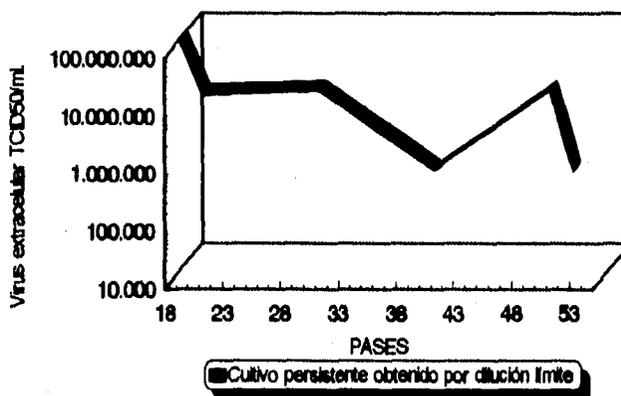


Figura 5. Producción de virus extracelular durante diferentes pases de los macrófagos infectados persistentemente obtenidos por dilución límite. Los puntos expresan la infectividad, la cual se determinó en células RK13.

En la figura 5 se observa una disminución en las fluctuaciones del título del virus extracelular, mientras que antes de la dilución los valores del título de virus infeccioso extracelular variaban entre 1×10^3 y 1×10^7 TCID₅₀/ml, después de la dilución las variaciones fueron entre 1×10^5 y 1×10^7 TCID₅₀/ml, esta diferencia se puede explicar con base en la disminución de la población de macrófagos no infectados y por lo tanto al enriquecimiento de la población de macrófagos infectados persistentemente. La disminución en el título probablemente se debió que en los cultivos antes de la clonación el virus que salió de las células persistentemente infectadas

pudo haber infectado a los macrófagos no infectados, por lo tanto en el momento de titular el virus infeccioso, en realidad estábamos titulado el virus de una infección persistente más el virus de una infección aguda; en el momento de eliminar a los macrófagos no infectados se eliminó el virus proveniente de la infección aguda y únicamente permaneció el virus de las células persistentemente infectadas.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por centros de infección para el cultivo persistente después de diluir. Encontramos que alrededor del 1.12% de las células producían virus, lo que representó un 0.9% de incremento con respecto al pase 17 del cultivo persistente antes de dilución. El incremento en el porcentaje en estos cultivos varió entre el 0.9 y 2%.

CULTIVO PERSISTENTE obtenido después de dilución límite	CÉLULAS POR CENTRO DE INFECCIÓN	PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE PRODUCEN VIRUS	TITULO DE VIRUS EXTRACELULAR (TCID₅₀/ml)
pase 17	1.0 X 10⁶	1.12%	1 X 10 ⁷
pase 18	1.0 X 10⁶	1.8%	7 X 10 ⁵
pase 19	1.0 X 10⁶	2.2%	7.7 X 10 ⁵

Tabla 2. En los cultivos obtenidos después de dilución límite se determinó el número de células que producen virus infeccioso por centros de infección en células RK13. La densidad celular de los cultivos utilizados para determinar los centros de infección fue de 1×10^6 células/ml.

El antígeno viral en los cultivos persistentemente infectados obtenidos después de dilución se determinó por inmunofluorescencia, los resultados se muestran en la figura 6. En estos cultivos alrededor del 60% de las células presentaron antígeno, es decir se mostró un incremento aproximado del 10% con respecto al cultivo antes de la dilución.

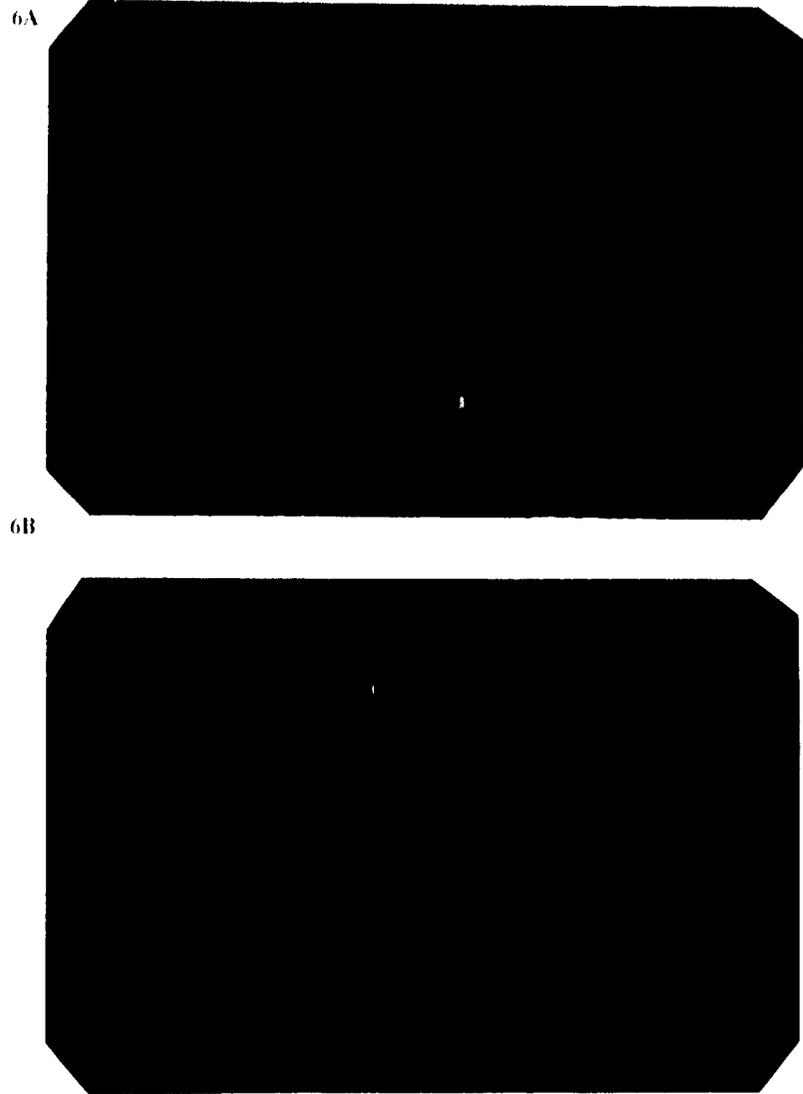


Fig. 6. Inmunofluorescencia de macrófagos infectados con el virus de rubéola. Los macrófagos se adsorbieron en portaobjetos para cultivo (previamente tratados con polihisina). Se fijaron con metanol-acetona y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-rubéola. Los complejos inmunes se revelaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fluoresceína. En 6A se muestra la fluorescencia obtenida en los cultivos obtenidos después de la clonación por dilución y en 6B el control negativo.

RESISTENCIA A LA SUPERINFECCIÓN.

La resistencia a la superinfección con el virus original se determinó empleando células del pase 39 y macrófagos P388D1 utilizados como control (infección aguda). Ambos cultivos se infectaron a una multiplicidad de infección de 40.

Como se observa en la tabla 3 a las 24 horas p.i. en los macrófagos control hubo una muerte celular del 46.39%, mientras que en este mismo tiempo el cultivo persistente mostró un 27% de muerte celular. Apartir de las 48 horas p.i. el cultivo persistente tuvo un incremento en el número de células viables superando el número de células en el tiempo cero y el título de virus extracelular fluctuó entre 7.8×10^2 a 7.8×10^3 TCID₅₀/ml. Sin embargo, en los macrófagos control aún cuando a las 48 horas p.i. aparentemente hubo un incremento en el número de células viables a las 72 horas p.i., la muerte celular alcanzó el 52.12%, en el último punto de la cinética en el cultivo control se alcanzó una muerte celular del 85%. Estos resultados concuerdan con lo citado previamente en la literatura, acerca del comportamiento del cultivo persistente frente a la superinfección, el cual es capaz de resistir a la superinfección por el virus homólogo.

SUPERINFECCIÓN DEL CULTIVO PERSISTENTE

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS P388D1 MOI=40 (Infección Aguda)				SUPERINFECCIÓN DE MACRÓFAGOS P388D1 INFECTADOS PERSISTENTEMENTE MOI=40 (Pase 39)			
TIEMPO (Horas)	TÍTULO (TCID ₅₀ /ml)	No. de células viables/ml	% muerte celular	TIEMPO (Horas)	TÍTULO (TCID ₅₀ /ml)	No. de células viables/ml	% muerte celular
0	5.6×10^7	1.4×10^6		0	2.1×10^2	5.19×10^5	
24	1.4×10^4	1.2×10^6	46.39	24	7.8×10^2	3.8×10^5	26.7
48	3.5×10^6	8.1×10^6	36.88	48	1.2×10^3	5.5×10^5	**
72	1.3×10^5	4.7×10^6	52.12	72	7.8×10^2	6×10^5	**
96	1.3×10^5	1.1×10^6	85	96	N.D.	N.D.	**

Tabla 3. Cinética de superinfección MOI=40 en una infección aguda y en células infectadas persistentemente. Se realizó la superinfección con el virus de rubéola cepa Therien (virus con el cual se obtuvo el cultivo persistente) y se determinó el virus extracelular y el número de células viables por exclusión de azul tripano. ND= No se determinó. ** En estos puntos de la cinética el número de células viables fue mayor al del tiempo cero.

El cultivo que se obtuvo después de la superinfección se continuó subcultivando. La producción de virus extracelular se redujo de 1×10^3 TCID₅₀/ml antes de la superinfección a 1×10^2 TCID₅₀/ml después de la superinfección (figura 7), mostrando a lo largo de 16 pases pequeñas variaciones en el título de virus extracelular entre 1×10^2 TCID₅₀/ml y 1×10^3 TCID₅₀/ml.

CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS Y SUPERINFECTADOS

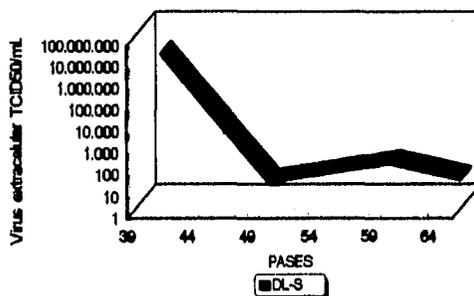


Figura 7. Producción de virus extracelular durante diferentes pases de los macrófagos infectados obtenidos por dilución límite y superinfectados (DL-S). El sobrenadante de éstos cultivos se tituló por infectividad en células RK13.

Para determinar el número de células que producían virus en el cultivo persistente después de la superinfección se realizó el ensayo de centros de infección. En este ensayo partimos de un cultivo de 1×10^6 células/ml y en el pase 39 encontramos que sólo $3,5 \times 10^5$ células/ml, lo que representó un 34,8% de incremento con respecto al número de células que producían virus del cultivo persistente del pase 17 (cultivo persistente antes de haber realizado la dilución límite) y con respecto al cultivo obtenido por dilución límite (pase 18) representó un incremento del 33,8% (tabla 4).

EFEECTO DE LA SUPERINFECCIÓN SOBRE EL CULTIVO PERSISTENTE

	INMUNOFLUORESCENCIA % DE CÉLULAS QUE PRESENTARON ANTIGENO		PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE PRODUCEN VIRUS	TÍTULO DE VIRUS EXTRACELULAR (TCID ₅₀ /ml)
	85-95%		35%	7×10^1
	80-90%		30%	$7,87 \times 10^1$
	85-95%		33%	$1,2 \times 10^2$

Tabla 4. Superinfección del cultivo persistente a una multiplicidad de infección de 40. Comparación del porcentaje de células que expresan antígeno por inmunofluorescencia y las células que producen virus infeccioso determinado por centros de infección en células RK13. La densidad celular de los cultivos utilizados para determinar los centros de infección fue de 1×10^6 células/ml.

El ensayo de inmunofluorescencia del pase 39 determinado después de la superinfección mostró un porcentaje de células positivas entre 85-95% (figura 8).

8A



8B

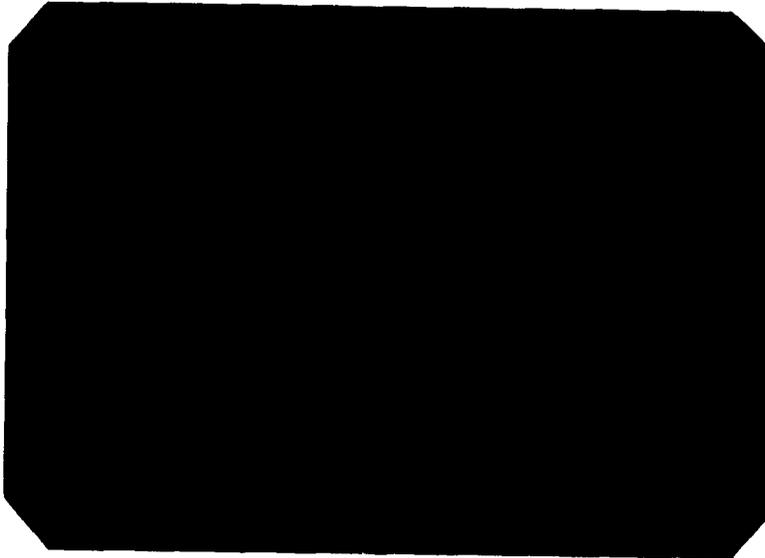


Fig. 8. Inmunofluorescencia de macrófagos infectados con el virus de rubéola. Los macrófagos se adsorbieron en portaobjetos para cultivo (previamente tratados con polilisina). Se fijaron con metanol-acetona y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-rubéola. Los complejos inmunes se revelaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fluoresceína. En 8A se muestra la fluorescencia obtenida en los cultivos obtenidos después de la clonación por dilución y además superinfectados y en 8B el control negativo.

PRESENCIA DE VIRUS INTRACELULAR EN CULTIVOS PERSISTENTES.

Para determinar la presencia del virus intracelular se realizó sonicación de los cultivos obtenidos por clonación por dilución límite y superinfección. Ambos cultivos después de 5 min de sonicación presentaron virus en el sobrenadante, lo cual indicó la liberación del virus intracelular (figura 9).

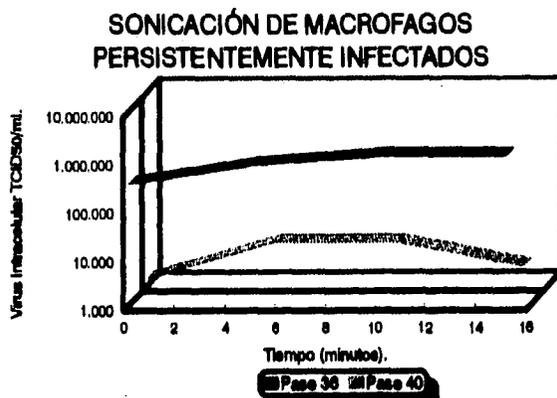


Figura 9. Determinación de virus infeccioso intracelular, en cultivos persistentemente infectados. Paso 36 obtenido por dilución límite y paso 40 obtenido por dilución límite y superinfectado. Los cultivos se lavaron, hasta eliminar el virus extracelular, se sonicaron a diferentes tiempos y los sobrenadantes se titularon por infectividad en células RK13.

CONGELACIÓN DE MACRÓFAGOS INFECTADOS PERSISTENTEMENTE.

Los macrófagos infectados persistentemente que se congelaron con suero fetal en presencia del 10% de DMSO se matuvieron viables hasta después de 1 año 6 meses aproximadamente y una vez descongelados los cultivos producían virus extracelular.

DISCUSIÓN

Para el establecimiento de la infección persistente se infectaron macrófagos a dos diferentes multiplicidades, una baja (0.5) y otra alta (10). En el sistema en el que trabajamos no fue posible establecer un cultivo persistente productivo a bajas multiplicidades por un periodo mayor de un mes (pase 7). Sin embargo, con nuestros resultados no podemos descartar la posibilidad de infección persistente en macrófagos a bajas multiplicidades como se ha reportado en otras estirpes celulares. En cambio trabajando a altas multiplicidades el cultivo obtenido de las células que sobrevivieron a la infección se ha mantenido por más de 26 pases y durante todo ese tiempo se ha detectado virus extracelular infeccioso.

En el cultivo obtenido a $moi=0.5$ el % de muerte celular fue similar al control de macrófagos no infectados y a partir del pase 1 se detectó la presencia de virus extracelular (figura 1). Probablemente el virus extracelular detectado en el primer pase se haya debido al remanente del virus original. En cambio las partículas virales detectadas durante los pases 2 al 5 podrían ser producidas por células infectadas en forma aguda. Nuestros resultados discrepan de los resultados obtenidos en otros trabajos hechos sobre persistencia con el virus de rubéola obtenidos en células Vero, células sinoviales y en células HEp-2 (obtenidas de carcinoma de laringe humano). En estos trabajos se reporta el establecimiento de la infección persistente a $moi= 0.01, 0.03, 0.02$ y 2 (43, 72 y 74). En el trabajo publicado por Abernathy y cols. (1990), se describe una infección persistente con el virus de rubéola en células Vero, a una $moi= 0.01$, en este cultivo se detectó la presencia de virus extracelular a lo largo de 173 pases, el cual en ningún momento dejó de producir virus, los títulos fluctuaron entre 10^3 - 10^7 unidades formadoras de placa/ml. El hecho de que en el cultivo infectado a $moi=0.5$ a partir del pase 5 no se haya detectado virus extracelular, pudo haberse debido a que el número de células infectadas era bajo y en vista de que la población no infectada era mucho mayor, es posible que se haya diluido la población infectada a lo largo de los subcultivos. Además, cabe mencionar que el seguimiento de la infección persistente se hizo originalmente determinando únicamente la presencia de virus extracelular por infectividad, por lo que al no detectar virus extracelular en los cultivos infectados a $moi=0.5$ no se continuaron subcultivando.

Por el contrario, cuando se infectaron los macrófagos a $moi=10$, a las 24 horas p.i. se observó que alrededor del 50% de las células murió y el título de virus extracelular fue de 1×10^4 TCID₅₀/ml. Sin embargo, a las 48 horas p.i. el número de células viables se incrementó hasta en un factor de 10, a partir de ese momento se continuaron dando pases de este cultivo. Como ya se mencionó este cultivo continuó produciendo virus extracelular a lo largo de 26 pases. Es posible que como en el caso anterior, el virus que se detectó en los primeros pases haya sido el remanente del virus original o bien que las células que inicialmente no se infectaron se estuvieran infectando de manera aguda y debido a esto se produjera virus extracelular infeccioso. Sin embargo, por el hecho de que el título se mantuviera, consideramos que había una mayor cantidad de células infectadas. Los subcultivos obtenidos a esta multiplicidad produjeron virus extracelular durante todos los pases y observamos una fluctuación entre 10^3 y 10^7 TCID₅₀/ml en los títulos (figura 2).

Además del seguimiento a través de la producción de virus extracelular se determinó la presencia del antígeno viral por inmunoperoxidasa. Los resultados mostraron que una gran cantidad de células no presentaron antígeno. Es probable que las células en el momento de la determinación o

bien no expresaban antígenos virales o se encontraban en cantidades inferiores a la sensibilidad de la técnica que utilizamos (figura 4).

Para determinar el número de células que producen virus se realizó el ensayo de centros de infección. Mediante esta técnica determinamos que el 0.2% de las células produjo virus infeccioso. Esto contrasta con los resultados obtenidos por inmunoperoxidasa en donde se reportó que alrededor de un 50% de las células presentaron antígeno. Probablemente esto se deba a que en el cultivo la mayor parte de las células positivas por inmunocitoquímica no fueron capaces de producir partículas virales infecciosas.

Debido a que el título de virus extracelular fluctuaba entre 1×10^3 y 1×10^7 TCID₅₀/ml (figura 2) consideramos que existía un gran número de células no infectadas que pudieran ser susceptibles a la infección por el virus que se estaba produciendo en los cultivos, es decir que estuvieramos trabajando con una infección mixta, tanto aguda como persistente. Por lo que intentamos obtener un cultivo persistente a partir de una célula, dilución límite. Sin embargo, el mínimo de células que se requirieron para propagar los macrófagos fue 5, ya sean células control o infectadas.

Este cultivo obtenido por dilución límite mostró una gran disminución en las fluctuaciones del virus extracelular, esto probablemente se debió a que se enriqueció la población de células infectadas ya que al realizar el ensayo de inmunofluorescencia se observó un incremento del 10% en las células que presentaron antígeno después de la "clonación". Por el ensayo de centros de infección también fue posible observar un incremento en la población de células que produjeron virus infeccioso (tabla 2). Estos resultados mostraron que a partir de los experimentos de "clonación" por dilución límite no fue posible la obtención de un cultivo homogéneo persistentemente infectado.

Con la finalidad de obtener un cultivo persistente con mayor proporción de células infectadas sobre no infectadas se superinfectó el cultivo a una multiplicidad tal que el porcentaje de sobrevivencia fuese muy bajo. Se infectaron a $moi=40$ macrófagos obtenidos del cultivo persistente y macrófagos control. El comportamiento de una infección aguda y de una infección persistente ante la superinfección fue significativamente diferente. Mientras que en la infección aguda hubo un alto porcentaje en la muerte celular, en la infección persistente solo hubo muerte celular de alrededor del 30% y el número de células a las 48 horas fue mayor que el número de células en el tiempo cero (tabla 3), lo que indica que la mayor cantidad de células persistentemente infectadas sobrevivieron a la infección con el virus original. Este fenómeno de resistencia a la superinfección con el virus homólogo se ha reportado en otros sistemas.

Consideramos que en el cultivo obtenido después de superinfección se obtuvo una población celular más homogénea, como se muestra en la tabla 4, así mismo la producción de virus extracelular después de superinfección mostró una variación menor en los cultivos de un solo Log (10^2-10^3), como se puede observar en la figura 7. Las células que sobrevivieron a la superinfección se continuaron subcultivando y aquellas células que no estaban persistentemente infectadas murieron al ser infectadas a tan alta multiplicidad. Estos datos se confirman con los obtenidos por inmunocitoquímica en donde se observó que entre el 85-95% de las células en los cultivos persistentemente infectados presentaron antígeno, comparando estos resultados con el cultivo antes de superinfección podemos decir que hubo un incremento de alrededor del 40% (figura 8).

Los títulos de virus extracelular obtenidos en los cultivos superinfectados fueron bajos con respecto a los cultivos iniciales (1×10^3 TCID₅₀/ml contra 1×10^7 /TCID₅₀/ml), por lo que se procedió a determinar la presencia de virus intracelular por sonicación. Para confirmar que el virus encontrado después de la sonicación era virus intracelular, los cultivos se lavaron 20 veces antes de realizar la sonicación y del último lavado se tomó el sobrenadante, al cual se le determinó la presencia de virus titulado por TCID₅₀/ml. Como en este sobrenadante no se encontró virus, se concluyó que efectivamente el virus obtenido después de sonicación era virus intracelular. Este dato confirmó la presencia del virus de rubéola en las células persistentemente infectadas en cultivos obtenidos después de 36 meses de infección.

Como se observa en la figura 10 el cultivo al inicio del cultivo persistente el porcentaje de células infectadas fue bajo y la "clonación" por dilución límite permitió incrementar el alrededor del 10% a la población persistentemente infectada. Sin embargo, la superinfección con el virus homólogo enriqueció de manera importante, alcanzado hasta un 95%. En esta figura se muestran de manera comparativa los resultados obtenidos durante la obtención del cultivo persistente.

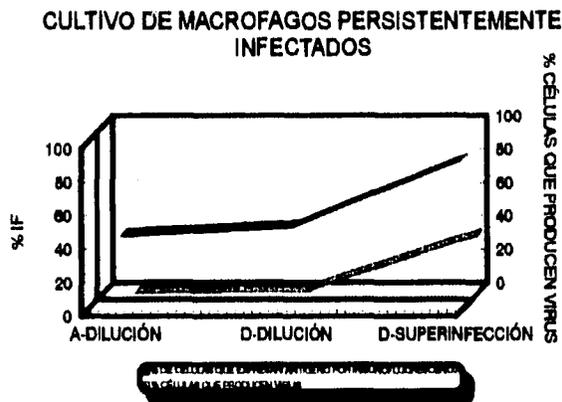


Figura 10. Cultivo persistente comparando el % de células que expresaron antígeno y el % de células que produjeron virus infeccioso en los diferentes tratamientos. A-DILUCIÓN (antes de dilución), D-DILUCIÓN (después de dilución), D-SUPERINFECCIÓN (después de superinfección).

El establecimiento de la infección persistente en el huésped puede ser debido a su incapacidad para eliminar al virus. Puesto que la eliminación del virus depende de la interacción virus-huésped, un defecto a cualquier nivel en la interacción sistema inmune-virus puede permitir el establecimiento de la infección persistente. El macrófago puede ser un reservorio viral, en donde el virus puede alterar algunas de las funciones principales de la célula como puede ser la liberación y producción de citocinas necesarias en la regulación de los mecanismos inmunológicos involucrados en la eliminación del virus, como puede ser el abatimiento de la respuesta inmune celular. Además es probable que exista un bloqueo en la expresión del MHC-I y de las proteínas virales, y por lo tanto las células del sistema inmune no reconozcan a las células infectadas y por tal motivo el virus pueda establecerse dentro de la célula hospedera tal como sucede en otros modelos (81).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se estableció un cultivo persistentemente infectado, en una línea celular de origen murino similar a macrófagos, con el virus de rubéola. La confirmación y el seguimiento de la persistencia viral se hizo titulando virus infeccioso extra e intracelular y determinando por inmunocitoquímica la presencia de antígenos virales. Por superinfección se logró incrementar la proporción de células infectadas respecto a las no infectadas.

Cabe mencionar la importancia del establecimiento de la infección persistente en una línea celular de defensa del organismo, ya que en los trabajos existentes de persistencia ningún autor menciona el establecimiento de la persistencia en células de defensa. Como ya se mencionó anteriormente, para que el virus pueda persistir en el organismo es necesario evitar la detección y eliminación por el sistema inmune del hospedero, por lo tanto si el virus es capaz de establecer infección persistente en células de defensa, puede eficazmente evadir al sistema inmune.

El cultivo persistentemente infectado en ningún momento dejó de producir virus extracelular y la población celular persistentemente infectada fue mayor a lo que reportan otros autores (50%), mientras que Abernathy y cols (1990) reporta entre un 10-30% de células que expresan antígeno y en cuanto al número de células que producen virus infeccioso aproximadamente se reporta la misma cantidad entre 0.2 y 0.3%.

El cultivo persistente que se obtuvo fue heterogéneo, es decir teníamos la presencia de células infectadas y no infectadas. Se trató de homogeneizar el cultivo realizando dilución limitante. Sin embargo, este procedimiento no favoreció la selección de células infectadas en el cultivo.

Otra información importante fue el fenómeno de resistencia a la superinfección por el virus homólogo. Este fenómeno se ha reportado para otros virus y en nuestro cultivo con el virus de rubéola pudimos observar que a las 24 horas p.i. hubo una reducción significativa en el número de células viables y las células que sobrevivieron a la infección posteriormente se siguieron cultivando. Es importante mencionar que mientras que antes de realizar la superinfección los cultivos producían virus extracelular entre 10^3 - 10^7 TCID₅₀/ml, y después de la superinfección el virus extracelular detectado fluctuó entre 10^2 - 10^3 TCID₅₀/ml. Con base en los resultados anteriores se sonicaron los cultivos persistentes y encontramos títulos de virus infeccioso intracelular entre 10^3 - 10^4 TCID₅₀/ml.

Este trabajo permite abrir un panorama amplio de estudio de los mecanismos relacionados con el establecimiento de las infecciones persistentes ya que podemos continuar con el estudio de las características del virus que persiste así como las alteraciones que sufre la célula infectada. En nuestro modelo establecido en el laboratorio con macrófagos de origen murino, consideramos importante continuar con el estudio del efecto de la persistencia sobre las propiedades inmunes del macrófago.

APENDICE.

MATERIAL Y REACTIVOS.

Células:

Células Vero, adquiridas originalmente del ATCC (Cat. CCL 81)
Células RK13, adquiridas originalmente del ATCC (Cat. CCL 37)
Células P3888D1, adquiridas originalmente del ATCC (Cat. TIB 63)

Material para cultivo:

Botellas para cultivo de 75 cm² (COSTAR Cat. 3055)
Caja petri para cultivo celular de 60 cm² (COSTAR Cat. 3060)
Microplaca de 96 pozos con fondo en "V" (Costar Cat. 3894)
Microplaca de 96 pozos para cultivo con fondo plano (Costar Cat. 3599)
Microplaca para cultivo de 6 pozos (COSTAR Cat. 3406)
Portaobjetos para cultivo (COSTAR Cat. 4818)

Medios y suplementos para cultivo:

MEM (GIBCO Cat. 12100-046)
Medio 199 (GIBCO Cat. 31100-035)
RPMI 1640 (GIBCO Cat. 31800-022)
Suero de neonato de ternera (BIOEXPORT Cat. 201)
Suero fetal de ternera (BIOEXPORT Cat. 201)
Hepes (SIGMA Cat. H-0763)
Bicarbonato de sodio (Productos quimicos Monterrey Cat. 1290)
Penicilina G (SIGMA Cat. P-3032)
Sulfato de estreptomicina (SIGMA Cat. S-6501)
Nistatina (SQUIBB Cat. 550).

Reactivos:

NaCl (MERCK Cat. 6404)
CaCl₂ anhidro (QUIMICA DINÁMICA Cat. C3200)
NaSO₄·7H₂O (MERCK Cat. 6649)
Albúmina Sérica Bovina (SIGMA Cat. A-3350)
Gelatina (SIGMA Cat. G 1890)
Heparina 5000 Unidades/ml. (SIGMA Cat. H-3125)
MnCl₂. (J.T: Baker Cat. 2500)
Polilisina (SIGMA Cat. P-1399)
Metanol (MERCK Cat. 3705B21583)
Acetona (QUIMICA DINÁMICA Cat. A0500)
Anti-IgG humana (SIGMA Cat. I9891)
Isotiocianato de fluoresceína (SIGMA Cat. F1628)
H₂O₂ (PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY Cat. 5600)

Anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, obtenido en cabra (Amersham NA 933)
3,-3' Diamino benzidina (SIGMA Cat. D-5637)
Dimetilsulfóxido (DMSO J.T. Baker Cat. 9224)

BIBLIOGRAFIA.

1. Fenner F. & White D. (1994) *Medical Virology*, 4a Ed. pp 427-432. Academic Press. San Diego, California.
2. Fields B.N., Knipe D.M. Chanock R.M., Hirsh M.S., Melnick J.L. Monath T.P. & Roizman B., eds. (1985). *Virology*. Cap. 14, 39 y 42 Raven, New York.
3. Baron M: & Forsell K. Oligomerisation of the structural proteins of rubella virus. *Virology* **185**, 811-819 (1991).
4. Bardeletta G., Kessler N. & Aymard-Henry N. Morphology, biochemical analysis and neuraminidase activity of rubella virus. *Archives Virology* **49**, 175-186 (1979).
5. Parkman P.D., Buescher E.L., Artenstein M.S., Mc Cown J.M. et al. Studies of rubella. Properties of the virus. *Journal of Immunology* **93**, 595-607 (1964).
6. Oker-Blom C., Kalkkinen N., Kääriäinen L. & Petterson R.F. Rubella virus contains one capsid protein and 3 envelope glycoproteins E₁, E_{2a} y E_{2b}. *Journal of Virology* **46**, 964-973 (1983).
7. Wang Ch-Y., Domínguez G. & Frey T. Construction of rubella virus genome-length cDNA clones and synthesis of infectious RNA transcripts. *Journal of Virology*, **48** (6), 3550-3557 (1994).
8. Frey T. & Marr L.D. Sequence of the region coding for virion proteins C and E and the carboxy terminus of the nonstructural proteins of rubella virus comparison with alphavirus. *Gene* **62**, 85-99 (1988).
9. Alstyn D.V., Krystal G., Kettys D. & Bohn E. The purification of rubella virus and determination of its polypeptide composition. *Virology* **108**, 491-498 (1981).
10. Waxham M.N. & Wolinsky J.S. Immunochemical identification of rubella virus hemagglutinin. *Virology* **126**, 194-203 (1983).
11. Oker-Blom C. The gene order for the rubella virus structural proteins in NH₂-C-E₂-E₁-COOH. *Journal of Virology* **51**, 354-358 (1984).
12. Clarke D.M., Loo T.w., Mc Donald H. & Gillam S. Expression of rubella virus cDNA coding for the structural proteins. *Gene* **62**, 85-99 (1988).
13. Kalkkinen N., Oker-Blom C. & Petterson R.F. Three genes code for rubella virus structural proteins E₁, E_{2a}, E_{2b} and C. *Journal of General Virology* **65**, 1549-1557 (1984).
14. Clarke D. M., Loo T.W., Chong P. & Gillam S. Nucleotide sequence and in vitro expression of rubella virus 24S subgenomic messenger RNA encoding the structural proteins E₁, E₂ y C. *Nucleic Acids Reserch* **15** (7), 3041-3057 (1987).
15. Waxham M.N. & Wolinsky J.S. Immunochemical identification of rubella virus hemagglutinin. *Virology* **126**, 194-203 (1983).
16. Ho-Terry L. & Cohen A. Rubella virus hemagglutinin: association with a single virion glycoprotein. *Archives in Virology* **84**, 207-215 (1985).
17. Trudel M., Nadon F., Sequin C., Amaouch A., Payment P. & Gillam S. E glycoprotein of rubella virus carries an epitope that binds a neutralizing antibody. *Journal of Virological Methods* **12**, 243-250 (1985).
18. Ho-Terry L., Cohen A. & Tedder R. Immunological characterisation of rubella virion polipeptides. *Juornal of Medical Microbiology* **17**, 105-109 (1984).
19. Hobman T.C., Seto N & Gillam S. Expression of soluble forms of rubella virus glycoproteins in mammalian cells. *Virus Research* **31**, 277-289 (1994).

20. Hobman T.C., Shukin R. & Gillam S. Translocation of the rubella virus glycoprotein E₁ into the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **62**, 4259-4264 (1988).
21. Bowden D.S., Westaway E.G. Rubella virus: structural and non-structural proteins. *Journal of General Virology* **65**, 933-943 (1984).
22. Lundström M., Mauracher C.A. & Tingle J. Characterization of carbohydrates linked to rubella virus glycoprotein E₂. *Virology* **72**, 1-7 (1991).
23. Oker-Blom C., Jarvis D.L. & Summers M.D. Translocation and cleavage of rubella virus envelope glycoproteins: identification and role of E₂ signal sequence. *Journal of General Virology* **71**, 3047-3053 (1990).
24. Hobman T.C. & Gillam S. In vitro and in vivo expression of rubella virus glycoprotein E₂: the signal peptide is contained in the C-terminal region of capsid protein. *Virology* **173**, 241-250 (1989).
25. Qiu Z., McDonald H., Chen J., Hobman T. & Gillam S. Mutational analysis of the Arginine residues in the E₂-E₁ junction region of the proteolytic processing of the polyprotein precursor of rubella virus. *Virology* **200**, 821-825 (1994).
26. Alpert G. & Schlesinger M.J. Evidence for an utoprotease of Sindbis virus capsid protein. *Virology* **90**, 336-339 (1978).
25. Domínguez G., Wang Ch-Y & Frey T. Sequence of the Genome RNA of rubella virus: Evidence for the genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology* **177**, 225-238 (1990).
27. Fields B.N., & Knipe D.M. Chanock R.M., Hirsh M.S., Melnick J.L. Monath T.P. & Roizman B., eds. (1990). *Fundamental Virology*, 2a Ed. Cap. 11 y 17 Raven, New York.
28. Marr L.D., Wang Ch-Y & Frey T. Expression of the rubella virus nonstructural proteins ORF and demonstration of proteolytic processing. *Virology* **198**, 586-592 (1994).
29. Lee J-Y., Marshall J.A. & Bowden D.S. Characterization of rubella virus replication complex using antibodies to double-stranded RNA. *Virology* **200**, 307-312 (1994).
30. Oker-Blom C., Ulmanen I., Kääriäinen L. & Pettersson R.F. Rubella virus 40S genome RNA specifies a 24as subgenomic mRNA that codes for a precursor to structural proteins. *Journal of Virology* **49**, 403-408 (1984).
31. Bowden D.S. & Westaway E.G. Changes in glycosylation of rubella virus envelope proteins during maturation. *Journal of General Virology* **66**: 201-206 (1985).
32. Mauracher Ch-Y., Gillam S., Shukin R. & Tingle A. PH dependent solubility shift of rubella virus capsid protein. *Virology* **181**, 773-777 (1991).
33. Baron M., Ebel T. & Soumalainen. Intracellular transport of rubella virus structural proteins expressed from cloned cDNA. *Journal of General Virology*. **73**, 1073-1086 (1992).
34. Miller C.L. Rubella in the developing world. *Epidemiol. Infect.* **107** :63-68 (1991).
35. Cooper L.Z. The history and medical consequences of rubella. *Reviews of Infectious Disease* **7**(1):S2-S10 (1985).
36. Rossier E. Persistence of naturally acquired cell-mediated immunity to rubella virus during the first of pregnancy. *Can J. Microbiology*. **29**:1680-1682 (1983).
37. Miller E., Cradock-Watson J.E. & Pollock T. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *The Lancet*. 781-784 (1982).
38. Mazazour A., Waxham M.N., Nicolas J.C. & Wolinsky J.S. Antibody response to the rubella virus structural proteins in infants with the congenital rubella syndrome. *Journal of Medical Virology* **19**:111-122 (1986).
39. Mims C., Playfair J., Roitt Y., Wakelin P., Williams R. & Anderson R. *Medical Microbiology*. Mosby Europe. Hong Kong (1993).

40. Gilden D.H. Slow virus diseases of the CNS. I. Subacute sclerosing panencephalitis progressive rubella panencephalitis, and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Postgraduate medicine* 73(1): 99-108 (1983).
41. Ginsberg-Feller F., Witt M.E., Fedun B., Taub F., Dobersen M., Mc Evoy R.C., Cooper L.Z., Notkins A.L. and Rubinstein P. Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome. *Reviews of Infectious Disease*. 7(1):s170-s176 (1985).
42. Rawls W.E. & Melnick J. Rubella virus carrier cultures derived from congenitally infected infants. *J. Exp. Med.* 123 (5): 795-816 (1966).
43. Abernathy E., Wang Ch-Y & Frey T. Effect of antiviral antibody on maintenance of long-term Rubella virus persistent infection in vero cells. *Journal of Virology*. 64 (10): 5183-5187 (1990).
44. Mauracher C.A., Mitchell L.A. & Tingle A.J. Selective tolerance to the E₁ protein of rubella virus in congenital rubella syndrome. *The Journal of Immunology* 151 (4):2041-2049 (1993).
45. Tingle A. J., Chantler J.K., Kettys G.D., Larke R.P. & Schulzer M. Failed rubella immunization in adults: association with immunologic and virological abnormalities. *The Journal of Infectious Disease* 151 (2) :330-337 (1985).
46. Mitchell L.A., Tingle A. J., Shukin R., Mc Cune J.M. & Braun D. Chronic Rubella vaccine: Associated arthropathy. *Archives in Intern Medicine* 153: 2268-2273 (1993).
47. Cremer N.E., Oshiro L.S., Weil M.L. Lenette E.H., Itabashi H-H. & Carnay L. Isolation of rubella virus from brain in chronic progressive panencephalitis. *Journal of General Virology* 29:143-153 (1975).
48. Wolinsky J.S., Maxham M.N., Hess J.L., Townsend J.J. & Baringer J.R. Immunochemical features of a case of progressive rubella panencephalitis. *Clinical Experimental Immunology* 48:359-366 (1982).
49. Van der Logt J., Van Loon A. & Van der Veen J. Replication of Rubella virus in human mononuclear blood cells. *Infect Immunology*. 27 (2): 309-314 (1980).
50. Chantler J., Ford D. & Tingle A. Persistent rubella infection and rubella-associated arthritis. *The Lancet* 12: 1323-1325 (1982).
51. Chantler J., Tingle A. & Petty R. Persistent rubella virus infection associated with chronic arthritis in children. *The New England Journal of Medicine* 313 (18): 1117-1123 (1985).
52. Ford D.K., Reid G.D., Tingle A.J., Mitchell L.A. & Schulzer M. Sequential follow up observations of a patient with rubella associated persistent arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51:407-410 (1992).
53. Guitiérrez J. *Manual de Infectología* 10a. ed. Ed Fco. Mendez. p 247-253. 1984
54. de la Torre J.C., Borrow P. & Oldstone M. Viral persistence and disease: Cytopathology in the absence of cytolysis. *British Medical Bulletin*. 47: 838- 851 (1991).
55. Oldstone M. Molecular anatomy of viral persistence. *Journal of Virology*. 65 (12): 6381-6386 (1991).
56. Hemphill M.L., Forng R. Abernathy E. & Frey T. Time Course of virus-specific macromolecular synthesis during Rubella virus infection in vero cells. *Virology*. 162: 65-75 (1988).
57. Ahmed R. & Oldstone M. Organ specific selection of viral variants during chronic infection. *Journal of Experimental Medicine*. 167: 1719-1724 (1988).
58. Matloubian M., Somasundaram T., Kolherkar S., Selvakumar R. & Ahmed R. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *Journal of Experimental Medicine*. 172: 1043-1048 (1990).
59. Southern P & Oldstone M. Medical consequences of persistent viral infection. *The New England Journal of Medicine*. 314 (6): 359-367 (1986).

60. Buchmeir M.J., Welsh R.M., Dutko F.J. & Oldstone M. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Advances in Immunology*. **30**: 275-331 (1980).
61. Oldstone M., Ahmed R. Virus and immune responses: Lymphocytic Choriomeningitis virus as a prototype model of viral pathogenesis. *British Medical Bulletin*. **41** (1): 70-74 (1985).
62. Borrow P., Tishon A. & Oldstone M. Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establish persistent infection. *Journal of Experimental Medicine*. **174**: 203-212 (1991).
63. Oldstone M. Viral persistence and immune dysfunction. *Hospital Practice*. Mayo **15**: 81-98 (1990).
64. Fazakerley J.K., Southern P., Bloom F. & Buchmeier M.J. High resolution in situ hybridization to determine the cellular distribution of lymphocytic choriomeningitis virus RNA in the tissues of persistently infected mice: relevance to arena virus disease and mechanisms of viral persistence. *Journal of General Virology*. **72**: 1611-1625 (1991).
65. Oldstone M. Viral persistence. *Cell*. **56**: 517-520 (1989).
66. Roberts Jr. & Norbert J. Different effects of Influenza virus, Respiratory Syncytial virus and Sendai virus on human lymphocytes and macrophages. *Infection and Immunity*. **35**(3): 1142-1146 (1982).
67. Joseph B.S., Lampert P.W. & Oldstone M. Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes. *Journal of Virology*. **16** (6): 1638-1649 (1975).
68. Chantler J. & Tingle A. Replication and expression of rubella virus in human lymphocyte populations. *Journal of General Virology*. **50**: 317-328 (1980).
69. Stanwick T. & Hallum J. Role of interferon in six cell lines persistently infected with rubella virus. *Infection and Immunity* **10**(4): 810-815 (1974).
70. Maassab H. & Veronelli J. Characteristics of serially propagated monkey kidney cell cultures with persistent rubella infection. *Journal of Bacteriology* **91**(1):436-441 (1966).
71. Chantler J. & Davies M. The effect of antibody on rubella virus infection in human lymphoid cells. *Journal of General Virology* **68**:1277-1288 (1987).
72. Cunningham A. & Fraser J. Persistent rubella virus infection of synovial cells cultured in vitro. *The journal of infectious diseases*. **151** (4): 638-645 (1985).
73. Norval M. Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK₂ cells. *Journal of General Virology* **43**:289-298 (1979).
74. Boriskin Yu, Desgatskova R., Bogomolova N. & Gorbolev V. Stability of rubella virus after long-term persistence in human cell line. *Microbiológica* **9**:235-242 (1986).
75. Williams M.P. Brawnwr T.A., Riggs H.G. and Roehring J.T. Characteristics of a persistent rubella infection in a human cell line. *Journal of General Virology* **52**: 321-328 (1981).
76. Newkirk M.M, Lemmo A. Commerford K., Esdaile J.M. & Brandwein S. Aberrant cellular localization of rubella viral genome in patients with adult Still's disease- A pilot study. *Autoimmunity* **16**:39-43 (1993).
77. Payment P., & Trudel M. *Methods and Techniques in Virology*. MARCEL DEKKER, INC. N.Y. 309 p (1993).
78. Lee J-Ch., Chen H-H., Wei H-L. & Chao Yu-Ch. Superinfection - induced apoptosis and its correlation with the reduction of viral progeny in cells persistently infected with Hz-1 Baculovirus. *Journal of Virology* **67**(12):6989-6994 (1993).
79. Laurent-Crawford A.G. & Hovanessian A.G. The cytopathic effect of human immunodeficiency virus is independent of high levels of unintegrated viral DNA accumulate in response to superinfections of cells. *Journal of General Virology* **74**:2619-2628 (1993).
80. Chen B.K., Saksela K., Andino R. & Baltimore D. Distinct models of human immunodeficiency virus type 1 proviral latency revealed by superinfection of non productively

infected cell lines with recombinant luciferase-encoding viruses. *Journal of Virology* **68**(2):654-660 (1994).

81. Hill A., Jugovic P., York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J., Ploegh H. & Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375** (1):411-41 (1995).