



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

**EVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS MA-104 PARA EL AISLAMIENTO
DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO (*Distemper canino*).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :
ARIANNA ROMERO FLORES**

ASESORES:

**Dr. ANDRES ROMERO ROJAS.
Dra. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS:

Dr. Andrés Romeo: Gracias por transmitirme la paciencia que a veces se necesita tener para lograr nuestros objetivos; por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. Y por enseñarme que todo es a base de trabajo y esfuerzo.

Dra. Susana Mendoza: Por compartir su conocimiento conmigo y ser una pieza fundamental para que este proyecto pudiera realizarse.

M.C. Ana Hernández: Te agradezco la gran ayuda que me brindaste para poder lograr que esta tesis fuera posible, gracias por toda tu colaboración, consejos y por enseñarme muchas cosas nuevas y por compartir tu trabajo conmigo.

Laboratorio 8 Unidad de Progrado C-1: M.C Erick González, M.C Omar Asaf Ruíz, M.V.Z. Elizabeth Miranda, gracias a ustedes por los consejos, por compartir un poco de su experiencia conmigo y por ayudarme en mi proyecto.

Q.F.B. Ladislao Palomar: Profe le agradezco la dedicación, empeño, entusiasmo y sobre todo su tiempo en el presente trabajo, además de su buen humor y paciencia. Y por contribuir a este trabajo significativamente.

M.C. Ana Laura Vázquez: Por formar parte de ese grupo de académicos que contribuyeron en mi formación y por todo ese conocimiento que transmite día con día.

Gaby: Por escucharme y ser un apoyo muy importante para mí y un plus es que somos familia no lo crees así? Gracias por estar a mi lado en los momentos difíciles y compartir tantas cosas conmigo. Te lo agradezco infinitamente.

A mis enanos, Gabriel: Por recordarme la nobleza que como seres humanos tenemos, y que la vida esta llena de incógnitas por resolver pero que no todas tienen solución. **Leonardo:** Por recordarme que la vida es más simple de lo que nosotros creemos y que todos los días están llenos de sorpresas y de cosas maravillosas.

Michell: Por demostrar la fuerza y las ganas de vivir, eres una gran lección de vida para mí.

Gracias enanos por hacerme la vida más ligera con todas sus risas y cariño; los quiero mucho y sigan creciendo.



Hugo: Gracias por todo tu apoyo y entusiasmo, por estar a mi lado en los momentos difíciles, por tu nobleza, por ayudarme a que todo esto sea posible, y por los proyectos nuevos que hemos comenzado. Por enseñarme que las oportunidades las tenemos que buscar nosotros para que puedan ser posibles. Siempre lo recordaré y te estaré agradecida.

A mis amigos: Jeni, Liliana, Julia, Quetzalcoatl, L. Alberto, Mauricio, Oscar, Edgar, Joel, Mónica, Daniel, Jaimie, gracias por formar parte de mi vida y lograr que mi estancia en la FESC fuera más divertida y agradable.

Erick y Alfredo: Por darme lecciones de vida día a día y hacerme entender que nos hacemos más fuertes cuando logramos vencer nuestros miedos y aprender de nuestros fracasos. Por todo lo que hemos pasado juntos porque sin su presencia no hubiese logrado nada.



DEDICATORIAS:

A MI FAMILIA:

A mi mamá: Por demostrarme la fortaleza que un ser humano puede tener frente a las adversidades, que a veces parecen ser más grandes que nosotros mismos. Por todo tu cariño, por ser uno de los apoyos más importantes en mi vida y por estar conmigo en todo momento. Este pequeño paso espero que también lo sientas tuyo por que eres algo fundamental para que pudiera realizarse. Eres muy especial para mí. GRACIAS!!!!!!

Abuela: Te agradezco tu apoyo en los momentos más difíciles, tus regaños y los buenos ratos. Espero que esto te haga feliz por que también eres parte de este ciclo.

A mi papá y abuelo (t): Porque yo sé que en algún momento volveremos a estar juntos. Le doy gracias a la vida por darme la oportunidad de haber podido conocer y convivir con seres tan maravillosos, gracias por todas sus enseñanzas y su amor. Siempre están en mi corazón



INDICE

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE CUADROS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCION	
1.1 VIRUS DE MOQUILLO CANINO.....	1
1.1.1 Antecedentes del virus de moquillo canino.....	1
1.1.2 Generalidades.....	2
1.1.3 Epidemiología.....	4
1.1.4 Patogenia.....	6
1.1.5 Signos clínicos.....	9
1.1.6 Respuesta inmune frente al virus de moquillo canino.....	10
1.1.7 Diagnóstico.....	11
1.1.8 Tratamiento y control de la enfermedad.....	13
1.2 CULTIVO CELULAR.....	15
1.2.1 Antecedentes e historia del cultivo celular.....	16
1.2.2 Tipos de cultivo celular.....	18
1.2.3 Preparación de medios de cultivo celular.....	21
1.2.4 Tipos de medio y suplementos para el cultivo celular.....	21
1.2.5 Usos y aplicaciones del cultivo celular.....	34
1.2.6 Curva de crecimiento.....	36
1.2.7 Células MA-104.....	37



1.3	AISLAMIENTO VIRAL	38
1.3.1	Generalidades del aislamiento viral.....	38
1.3.2	Infección de células.....	38
1.3.3	Aislamiento del virus de moquillo canino.....	39
1.3.4	Replicación del Virus de Moquillo Canino.....	41
1.3.5	Titulación de virus.....	45
2.0	JUSTIFICACION	46
3.0	OBJETIVOS	47
3.1	General.....	47
3.2	Particulares.....	47
4.0	MATERIAL Y METODOS	48
5.0	DESARROLLO EXPERIMENTAL	49
6.0	RESULTADOS	52
7.0	DISCUSION	57
8.0	CONCLUSIONES	61
9.0	REFERENCIAS	62



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Estructura del VMC.....	3
Fig. 2 Patogenia del VMC.	8
Fig. 3 Escala de pH del rojo de fenol.....	25
Fig. 4 Curva de crecimiento celular.....	37
Fig. 5 Curva de ciclo infeccioso de virus.....	39
Fig. 6 Replicación del VMC.....	44
Fig. 7 Medio RPMI 1640 pH de 7.0.....	52
Fig. 8a Suspensión de células MA-104.....	52
Fig. 8b Vista al microscopio de la suspensión de células MA-104.....	52
Fig. 9a Suspensión de células pH 7.0.....	53
Fig. 9b Suspensión de células pH ácido.....	53
Fig. 10a Monoestrato celular.....	54
Fig. 10b Morfología del monoestrato.....	54
Fig. 11a Células MA-104 48 h post-infección.....	54
Fig. 11b Células MA-104 48 h post-infección.....	54
Fig. 12a Células MA-104 a las 72 h pos-infección.....	55
Fig. 12 b Células MA-104 a las 72 h pos-infección.....	55
Fig. 13a Células MA-104 a las 96 h pos-infección.....	55
Fig. 13b Células MA-104 a las 96 h pos-infección.....	55
Fig. 13c Células MA-104 a las 96 h pos-infección.....	55
Fig. 14 Lisis de células MA-104 5 días post-infección.....	56
Fig. 15 Lisis de células MA-104 7 días post-infección.....	56



ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Historia del virus de moquillo canino.....	1
Cuadro 2	Historia del cultivo celular.....	16
Cuadro 3	Tipos de cultivo celular.....	20
Cuadro 4	Composición del medio RPMI 1640 y medio MEM.....	23
Cuadro 5	Composición del suero fetal bovino.....	29
Cuadro 6	Antibióticos y antimicóticos utilizados en el cultivo celular.....	32
Cuadro 7	Sugerencia para soluciones de lavado y concentración de tripsina.....	33



LISTA DE AREVIATURAS.

ATCC	Colección americana de cepas celulares. (<i>American Type Culture Collection</i>).
B95a	Células de líneas linfoides de marmota.
BHK 21	Células de riñón de hámster dorado.
BME	Medio Basal de Eagle.
CRP o MDCK	Madín-Darby células epiteliales de riñón canino.
CDV	Virus de moquillo canino. <i>Canine Distemper Virus</i> .
DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbelco.
DICT	Dosis infecciosa de tejido cultivado.
ECP	Efecto citopático.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo ligado a enzima. (<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
F	Proteína de fusión.
H	Hemaglutinina.
HAT	Hipoxantina Aminopterina y Timidina
HBBS	Solución salina balanceada de Hank. (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>).
HeLa	Células de carcinoma de cervix humano.
Hep-2	Células de carcinoma de laringe humano.
Hepes	Acido N-2-hidroxiethylpiperazín-n´-2-etansulfónico.
IF	Inmunofluorescencia.
L	Transcriptasa.
LCR	Líquido Cefalorraquídeo.
DL 50	Dosis letal 50.
M	Proteína de matriz
MA 104	Células de riñón del embrión de mono verde africano
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle.



NP	Nucleocápside.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
P	Polimerasa.
PBS	Solución Buffer de Fosfatos.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PI	Post-Infección.
RNA	Acido Ribonucléico
RPMI 1640	Medio de cultivo llamado así del Instituto Parque Memorial Roswell. (<i>Del Roswell Park Memorial Institute</i>).
SFB	Suero Fetal Bovino.
SLAM	Molécula de señal de activación de linfocitos. (<i>Signaling Lymphocyte Activation Molecule CD150</i>).
SNC	Sistema Nervioso Central
SPF	Libre de patógeno específico. (<i>Specific Pathogen Free</i>).
TCID ₅₀	50% de dosis infecciosa de tejido cultivado.
TR-PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa Transcriptasa Reversa.
UV	Luz Ultravioleta.
VERO	Células de riñón de mono verde africano.
VMC	Virus de Moquillo Canino.
VS	Virus de Sarampión.
VVM	Virus vivo modificado.



RESUMEN:

El moquillo canino es producido por un Paramixovirus del genero *Morbilivirus*, que a pesar de ser una enfermedad muy conocida suele presentar cierta dificultad para la interpretación de las pruebas de laboratorio.

La infección por el virus de moquillo canino se presenta como una enfermedad multisistémica potencialmente fatal que puede involucrar al SNC (Sistema Nervioso Central). La infección clínica del VMC (Virus de moquillo canino) se manifiesta de tres formas: aguda, subaguda y crónica. Para su diagnóstico son fundamentales tres elementos: el historial clínico, el examen físico y los estudios de laboratorio. Las manifestaciones clínicas de infección respiratoria o gastrointestinal son inespecíficas, y el diagnóstico no debería basarse solamente en la presentación de estos signos.

Se tienen antecedentes de que el VMC se multiplica en embrión de pollo, en células BHK 21 (Riñón de hámster dorado), B95a (Células de líneas linfoides de marmota), VERO (Células de riñón de mono verde africano). Sin embargo en estas líneas el ECP (Efecto citopático) muchas veces no es evidente, por lo que es necesario investigar nuevas líneas celulares permisivas.

En el presente trabajo se utilizo la línea celular MA-104 (Células de riñón de embrión de mono verde africano) [CRL-2378.1, ATCC, USA] para llevar a cabo el aislamiento del VMC. Las células se cultivaron, se adaptaron a crecimiento en el medio RPMI 1640 y se mantuvieron bajo condiciones de temperatura, pH y concentración de suplementos presentando una buena capacidad de adherencia y formación del monoestrato celular; obteniéndose la confluencia requerida (más 80%) en 48 hrs. después del primer pase celular; se realizo la infección utilizando una cepa del virus de moquillo canino (Snyder Hill del CDV VR-1587, ATCC, USA), observando el



inicio del ECP a las 24 hrs. PI (Post-Infección) y a las 48 hrs. presentaban redondeamiento e indicios de vacuolización obteniendo a las 72 hrs. la presencia de pequeños sincitios entre un 20-30% del monoestrato celular, y a las 96 hrs. post-infección la lisis celular fue evidente.



1.0 INTRODUCCION

1.1.1 ANTECEDENTES DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO

Tabla 1. Historia del VMC.

AÑO	EVENTO
S. XVII	Primeros datos sobre la enfermedad producida por el VMC (Virus de moquillo canino) en Europa [Acevedo 2003].
1761	Es mencionada en España por Gonzalo Argota de Molino, quien la consideraba como una importación de América del sur hacia Europa [Acevedo 2003].
1839	En Inglaterra Jenner hizo la primera descripción de la enfermedad [Appel et al 2008].
1905	Carre demostró por primera vez la fase de viremia durante el periodo febril, mediante la inoculación de sangre de animales enfermos en animales susceptibles [Acevedo 2003].
1923	Puntoni menciona el modo de combatir esta afección mediante la inoculación preventiva [Appel et al 2008].
1926-1931	Laidlaw y Dunkin confirman que la enfermedad es producida por un virus y mostraron que 0.2 mL de sangre de animales enfermos era suficientemente infectiva para hurones [Acevedo 2003].
1912	Serres la describe por primera vez en Argentina [Mascaro 1975].
1941	Arizpe y Wainer estudian la enfermedad en animales de zoológico [Mascaro 1975].
1940	Las vacunas inactivadas del virus disponible no lograron controlar la enfermedad [Mascaro 1945].
1960	Aparecieron las vacunas de VVM (virus vivo modificado), quedando bajo control la enfermedad producida por el VVM [Mascaro 2003].



1974	Menchaca y col describen una forma nerviosa en cachorros [Mascaro 1975].
1975	Backam y colaboradores comenzaron a estudiar la relación entre los polipéptidos del VMC y los polipéptidos de otros virus de la misma familia como los son el VS (virus del sarampión) y el morbilivirus bovino [Hernández A. 1987].
1976	Kingsburg y colaboradores clasificaron al virus de moquillo canino en el género de <i>Morbilivirus</i> [Acevedo 2003].
1976	Earlier reporto 7 polipéptidos estructurales del virión con sus respectivos pesos moleculares [Acevedo 2003].
1978	Graves y colaboradores les asignaron diversas letras de acuerdo a sus pesos moleculares [Acevedo 2003].
1984	Summers y colaboradores presentaron evidencia de que los leucocitos infectados por el virus, representaban la mayor forma de diseminación hacia el encéfalo [Acevedo 2003].

1.1.2 GENERALIDADES

El VMC es un miembro de la familia *Paramixoviridae*; del género *Morbilivirus*, este virus es relativamente grande (150-250 nm) con RNA de cadena sencilla, polaridad negativa y RNA polimerasa. Está rodeado por una envoltura de lipoproteína derivada de glucoproteínas del virus incorporadas en la membrana celular [Greence et al 2000].

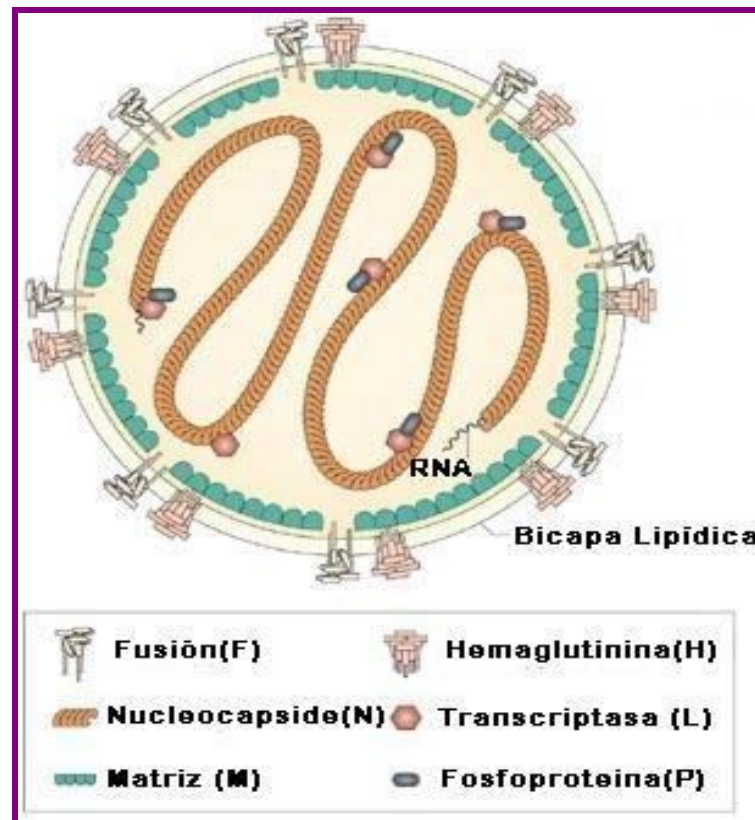


Fig. 1: Estructura del VMC, tomada de Moss et al 2006.

El genoma del VMC codifica para las proteínas que constituyen la partícula viral; dos glucoproteínas: una hemaglutinina (H) y una proteína de fusión (F); estas dos facilitan la unión del virus a las membranas celulares del hospedero; además de que la proteína F media la fusión de la envoltura viral con la membrana; también es responsable de la formación de sincitios, lo cual le permite al virus diseminarse. La hemaglutinina tiene una interacción específica con el receptor celular y es importante para la liberación de las partículas virales. Las proteínas H y F, inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, posee además proteínas de matriz (M), la cual es importante para la maduración del virus, sirve como enlace entre la nucleocápside (NP) y las proteínas de superficie (H y F) [Acevedo 2003, Hernández VAM 2009, Philippe et al 2005, Pringle et al 1999]. La NP provee protección al genoma, una transcriptasa (L), una polimerasa (P) encargadas estas dos de la transcripción del RNA [Hernández VAM 2009, Pringle et al 1999].



A pesar de existir algunas diferencias antigénicas entre cepas de VMC, se acepta un solo serotipo. Pero hay diferencias considerables respecto de la patogenicidad de las diferentes cepas aisladas. Cepas del VMC con diferentes propiedades pueden tener la misma reactividad frente al análisis de anticuerpos monoclonales [Fauquet et al 2005, Greence et al 2000, Martella et al 2007].

Al ser un virus envuelto es susceptible a éter y cloroformo, solución de formalina diluida, fenol y desinfectante de amonio cuaternario; y la lipoproteína de la envoltura es fácilmente destruida por los solventes lipídicos y así el virus pierde su capacidad efectiva. El VMC es susceptible a la luz UV, aunque las proteínas o los antioxidantes ayudan a protegerlo de la inactivación. Es extremadamente susceptible al calor y la resequedad y se destruye por temperaturas mayores de 50 a 60 °C por 30 minutos [Greence et al 2000].

1.1.3 EPIDEMIOLOGIA

En todo el mundo el moquillo es enzoótico y tiene una gran cantidad de hospederos (zorro, coyote, lobo, comadreja, hurón, visón, marta, nutria, coatí, mapache, entre otros) que pueden morir por infección a causa de este virus. Recientemente se encontró que los grandes felinos también son [Appel et al 2008]. Y es más frecuente durante el invierno [Mascaro 1975].

Todos los perros a cualquier edad, son susceptibles, pero más los cachorros cuando pierden los anticuerpos maternos. Los caninos infectados en forma aguda eliminan virus a través de todas las secreciones corporales, independientemente de la presencia o no de signos clínicos. La ruta más importante de contagio es a través de aerosoles de secreciones respiratorias. La eliminación del virus comienza



aproximadamente a la semana de la infección y por ser inestable, el virus se deteriora rápidamente [Greence et al 2000].

El VMC muy abundante en exudados respiratorios, suele diseminarse por exposición a aerosoles o gotitas; sin embargo, es posible aislarlo de la mayor parte de otros tejidos y secreciones del cuerpo incluso de la orina [Acevedo 2003].

Aunque la inmunidad al moquillo canino es prolongada, no es para toda la vida. Los perros que no reciben inmunizaciones periódicas pueden perder su protección e infectarse después de un estrés, inmunosupresión o en contacto con animales enfermos pero los perros que se recuperan después de la infección adquieren inmunidad de por vida [Appel et al 2008]. Y un punto muy importante a considerar es la mortalidad que va del 30 al 80% [Fenner et al 1992].

La virulencia es otro parámetro que puede afectar la gravedad y extensión o el tipo de enfermedad clínica. Las propiedades de los genes NP y M contienen los determinantes de persistencia viral [Greence et al 2000].

Los animales infectados en forma aguda eliminan al virus a través de todas las secreciones corporales a partir de los 7 días post infección, independientemente de la presencia o no de signos clínicos; durante la fase aguda de la enfermedad continúan eliminando virus [Hernández VAM 2009].



1.1.4 PATOGENIA

La edad y el momento de la exposición es muy importante para determinar el curso y pronóstico del moquillo [Mohanthy 1983] durante la exposición natural, el VMC se disemina por gotitas de aerosoles y entra en contacto con el epitelio de las vías respiratorias superiores [Greence et al 2000] el contagio se produce por contacto directo entre un animal sano y otro enfermo; el virus es generalmente inhalado y las secreciones de todo tipo contienen partículas virales [Grandjean 2003].

Se han comprobado tres formas clínicas:

Sobreaguda: Que se desarrolla en 2 a 3 días, con estado de postración, disnea, taquicardia, adinamia, y muerte.

Aguda: Con fiebre alta, es la más corriente y se presenta con síntomas en diversos órganos y aparatos.

Crónica: Con secuelas nerviosas, en los órganos y en los sentidos [Mascaro 1975].

Los perros se contaminan por lo general de manera directa, por inhalación del virus que atraviesa las vías respiratorias después de penetrar en el organismo, el virus se multiplica en las amígdalas y en los bronquios, para diseminarse luego en todo el organismo en alrededor de ocho días [Grandjean 2003].

La forma típica de la enfermedad se desarrolla de la manera siguiente: La incubación dura entre tres y siete días; durante esta fase el perro no presenta ninguna manifestación de la infección [Grandjean 2003]. El virus infecta y se replica en los macrófagos, los cuales diseminan el virus a los ganglios linfáticos regionales y las amígdalas [Nishi et al 2004] y en siete días alcanza todos los tejidos linfáticos [Appel et al 2008]. Entre 3 y 6 días PI se eleva la temperatura, lo que coincide con la aparición de interferón circulante [Greence et al 2000]. Así como secreciones líquidas oculares y



nasales y a veces, la aparición de pequeñas pústulas en el abdomen [Nishi et al 2004]. Durante la segunda y tercera semana, se inicia una fuerte respuesta inmune humoral y celular los perros pueden recuperarse sin signos clínicos posteriores, o bien desarrollan una débil respuesta inmune y presentan enfermedad aguda o subaguda [Greence et al 2000].

Los perros con respuestas débiles desarrollan una infección vírica de otros tejidos, como piel, SNC y órganos glandulares y epiteliales [Nishi et al 2004]. El perro presenta síntomas nerviosos que evolucionan de dos maneras. Los síntomas pueden aparecer rápidamente; se observan entonces dificultades de coordinación durante la locomoción, parálisis, convulsiones, y contracciones musculares involuntarias. Cuando los síntomas aparecen más lentamente (hasta algunos meses) el perro tiene también dificultades para coordinar los movimientos hasta llegar a la parálisis y trastornos de la visión [Grandjean 2003].

En perros que tardan en recuperarse, los linfocitos y macrófagos infectados transportan el virus a la superficie de los epitelios de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, y al sistema nervioso central. Los signos clínicos aparecen después de esta infección local. Las cepas virales que inducen la infección aguda fatal afectan predominantemente la materia gris, y provocan destrucción neuronal [Greence et al 2000]. Los síntomas clínicos pueden aparecer en cualquier edad, independientemente del estado de vacunación [Nishi et al 2004].

La enfermedad del sistema nervioso asociada al moquillo se caracteriza anatomopatológicamente por dos formas básicas:

- 1.-Muerte de las células neuronales y gliales.
- 2.-Desmielinización.

Se ha observado que los animales que tienen una respuesta escasa de anticuerpos al virus tienden a presentar la primera de las dos formas y aquellos con respuesta inmunitaria adecuada al virus tienden a presentar la segunda forma, desmielinización inmunológica. Cualquier región del sistema nervioso puede estar afectada [Nishi et al 2004]. A las tres semanas post infección los perros murieron o se recuperaron totalmente [Greence et al 2000].

Existen otras formas de la enfermedad, llamadas formas atípicas. La forma cutaneoneurosis, que se manifiesta por un engrosamiento de la nariz y de las almohadillas plantares, secreción nasal y ocular e hipertemia persistente la evolución es lenta; en algunas semanas aparece una encefalitis que conduce a la muerte del animal [Grandjean 2003].

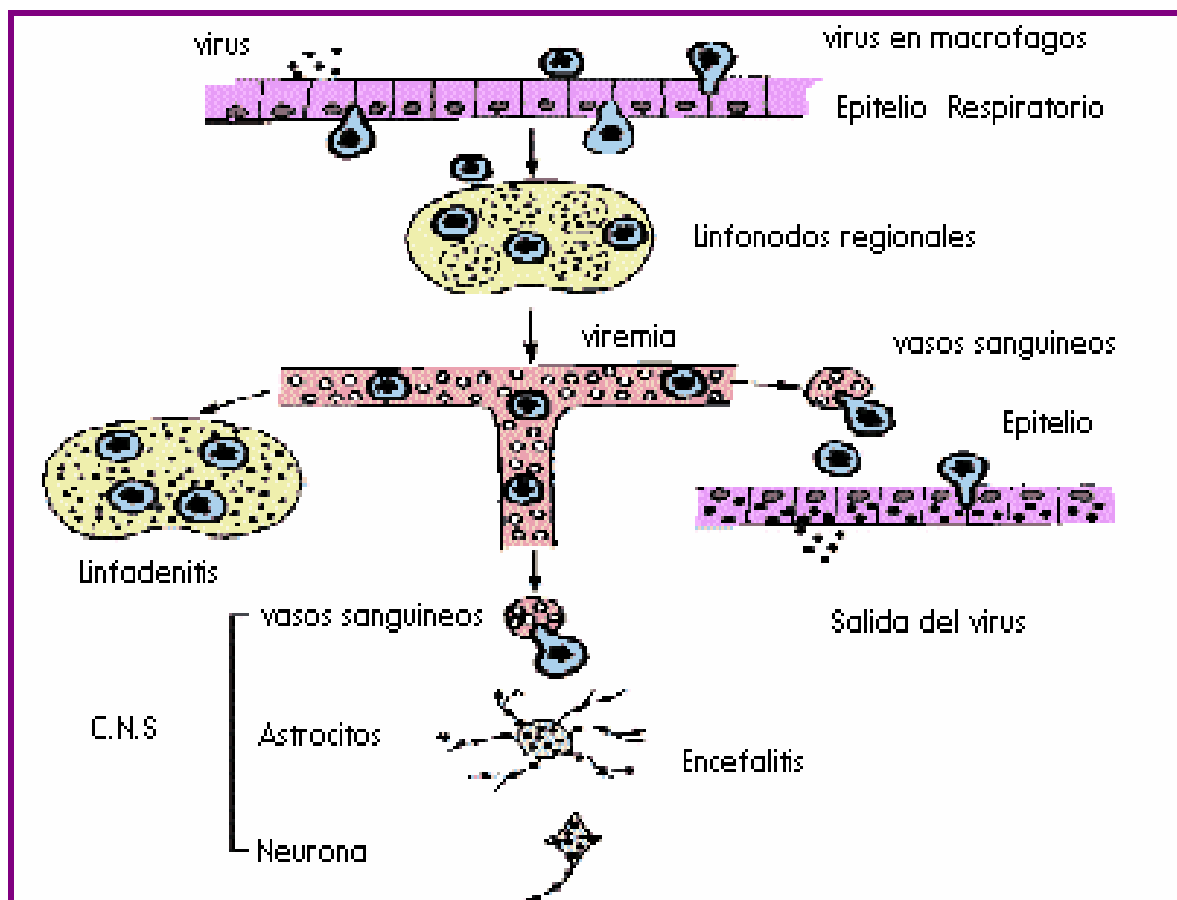


Fig. 2. Patogenia del VMC, tomada de Acevedo 2003.



1.1.5 SIGNOS CLINICOS

Existe gran variación en la duración y severidad de la enfermedad clínica. Los signos pueden ser desde invisibles hasta enfermedad severa, con o sin signos nerviosos, con 50% de mortalidad [Appel et al 2008].

La forma de la enfermedad que suele reconocerse es el moquillo generalizado grave, ocurre en perros de cualquier edad con mal estado inmunitario, pero afecta en mayor frecuencia a cachorros expuestos, no vacunados, de 12 a 16 semanas de edad que han perdido su inmunidad materna o a cachorros más jóvenes que han recibido cantidades inadecuadas de anticuerpo materno [Greence et al 2000].

La gravedad del curso clínico depende de la edad del animal en el momento de la infección, de la cepa vírica y de la respuesta inmunitaria. Los perros afectados pueden estar letárgicos, anoréxicos y febriles. Los animales con infección respiratoria pueden mostrar secreción ocular-nasal serosa o mucopurulenta y tos. Los animales afectados con mayor intensidad pueden mostrar una conjuntivitis inicial seguida de tos, vómitos, diarrea que puede ser sanguinolenta o mucoide. Los signos neurológicos pueden surgir de una a tres semanas después de la recuperación de los signos sistémicos, así como semanas o meses más tarde.

Los perros con lesiones cutáneas pustulosas tienen menos probabilidades de desarrollar enfermedades del SNC que aquellos con hiperqueratosis y las almohadillas digitales. Las alteraciones neurológicas pueden ser un reflejo en lesiones de cualquier lugar de SNC.

Los animales recuperados pueden presentar lesiones retinianas con aumento de la reflexión que se desarrollan a partir de la atrofia y el desprendimiento de la retina.



Los cachorros infectados intrauterinamente o como neonatos pueden desarrollar signos del SNC precozmente en su vida. También pueden presentarse abortos o muertes neonatales [Nishi et al 2004].

1.1.6 RESPUESTA INMUNE

Durante la primera semana de infección, los perros siempre desarrollan linfopenia y están inmunodeprimidos. El efecto más notable es la disminución de linfocitos T y B, y la necrosis de los tejidos linfáticos. Los animales que se recuperan rápido con signos clínicos mínimos desarrollan una fuerte respuesta celular y humoral. Los anticuerpos contra las proteínas del core (NP y P) pueden determinarse por ELISA o precipitación entre los 6 u 8 días. Los anticuerpos contra las proteínas de la cápsula (H y F) aparecen a los 10 y 20 días. Estos anticuerpos neutralizantes persisten durante años. La IgM específica determinada por ELISA aparece a los 6 u 8 días post infección, hasta tres meses, según la cepa viral y la severidad de la infección. La inmunidad medida por células representada por linfocitos T citotóxicos circulantes aparece entre los 10 y 14 días, y alcanza su pico entre los 14 y 28 días. Disminuyen gradualmente y desaparecen entre las 6 y 10 semanas. Los perros con enfermedad aguda o subaguda desarrollan una muy pobre o nula respuesta inmune neutralizante humoral y celular, o bien aparece tardíamente [Appel et al 2008, Martínez 2009]

Pueden aparecer anticuerpos contra NP y P. Los perros con infección crónica del sistema nervioso central pueden desarrollar una fuerte respuesta en forma tardía. El líquido cefalorraquídeo de perros recuperados rápidamente no suele poseer anticuerpos ni interferón. Los perros que mueren después de una infección aguda del sistema nervioso central tienen interferón en el líquido cefalorraquídeo, pero no anticuerpos neutralizantes. Los que desarrollan enfermedad subaguda o crónica con



signos nerviosos tienen interferón y también pueden contar con anticuerpos. Las concentraciones de IgM e IgG pueden ser elevadas [Appel et al 2008, Martínez 2009].

1.1.7 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico práctico de moquillo canino se basa principalmente en la sospecha clínica, y suele realizarse con base en los signos e historia clínica, apoyada por el antecedente característico de un cachorro de tres a seis meses de edad no vacunado con una enfermedad compatible; en perros de mayor edad se pasan por alto el gran número de infecciones respiratorias superiores que se consideren infecciosas [Greence et al 2000].

El diagnóstico se basa en la presentación de por lo menos cuatro de las seis siguientes características [Grandjean 2003]:

1. Secreción nasal y ocular
2. Síntomas digestivos
3. Síntomas respiratorios;
4. Síntomas nerviosos;
5. Aumento constante de la temperatura;
6. Edad joven del perro

Como bien se ha expresado durante la investigación, los signos y síntomas de la enfermedad son variables pudiendo estar presentes unos sí y otros no, por lo que en muchos de los casos tienden a confundirse con otras enfermedades que pueden cursar con síntomas parecidos [Appel et al 2008]. No siempre se dispone de pruebas de laboratorio específicas para confirmar la sospecha de infección por VMC [Greence et al 2000].



Existen a nivel de laboratorio diferentes técnicas diagnósticas, las cuales pudieran ayudar a la confirmación diagnóstica en la que se destacan:

- a) **Hematología:** En casos agudos, linfopenia, trombocitopenia, en la que los monocitos pueden estar aumentados [Appel et al 2008].
- b) **Inmunocitoquímica:** En casos agudos, pueden hallarse antígenos virales o cuerpos de inclusión en células blancas, improntas vaginales o conjuntivales, sedimentos urinarios o LCR, partículas virales en materia fecal pueden ser observadas por microscopía electrónica. En casos subagudos o crónicos, estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus [Appel et al 2008].
- c) **Aislamiento viral:** El virus puede ser aislado en las líneas celulares VERO (riñón de mono verde africano), MDCK (Cultivo primario de riñón de perro), B95a (Células de líneas linfoides de marmota), BHK21 (Riñón de hámster dorado), sin embargo, en estas líneas el ECP (Efecto citopático) muchas veces no es evidente, por lo que es necesario investigar nuevas líneas celulares permisivas; pero en general el aislamiento no se realiza en forma rutinaria en los laboratorios [Appel et al 2008, Greence et al 2000, Hernández A. 1987, Pérez et al 1993].
- d) **PCR:** Permite detectar ácido nucleico y puede resultar positiva aún cuando el aislamiento o la inmunocitoquímica no hayan detectado el virus. Se pueden detectar falsos positivos de 1 a 2 semanas luego de la vacunación. Se ha desarrollado una prueba de RT-PCR que permite detectar ácido nucleico del virus, sin embargo su sensibilidad depende de la muestra obtenida y de la fase de la infección. [Appel et al 2008, Frisk et al 1999, Stephen et al 2007]. Se han desarrollado técnicas de RT-PCR en tiempo real y RT-PCR anidado que han mostrado elevada sensibilidad y especificidad Que permite detectar el ácido nucleico del virus, sin embargo su sensibilidad depende de la muestra



obtenida y de la fase de infección [Elia et al 2006, Frisk 1999, Martella et al 2007, Saito et al 2006].

- e) **Análisis de LCR:** Es habitual en los perros con compromiso nervioso tomar muestra de LCR y encontrar una concentración de proteínas y células mononucleares en el LCR. También es posible hallar antígenos virales en casos agudos de encefalitis [Appel et al 2008].
- f) **Serología:** Se lleva a cabo la detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos sin embargo, perros infectados en forma aguda pueden morir sin la presencia de esos anticuerpos, mientras que los casos subagudos o crónicos pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los perros vacunados [Appel et al 2008].
- g) **Prueba de ELISA para la detección de IgM específica contra el VMC:** Es útil, ya que la IgM persiste por cinco semanas a tres meses. En perros vacunados, la IgM permanece por unas tres semanas [Hernández V. 2009].
- h) **Histopatología:** Buscando cuerpos de inclusión en diferentes tejidos [Appel et al 2008].
- i) **Radiología:** La radiografía de tórax muestra un patrón pulmonar intersticial en los casos tempranos de moquillo [Appel et al 2008].

1.1.8 TRATAMIENTO Y CONTROL

A pesar del enorme adelanto en la investigación acerca del VMC, sólo se han logrado cambios menores en las recomendaciones terapéuticas [Greence et al 2000].

Dos tratamientos son posibles:

- a) un tratamiento específico, que consiste en la administración de dosis importantes de suero, y



- b) un tratamiento para ayudar al organismo a luchar contra las sobreinfecciones eventuales y los síntomas digestivos y respiratorios [Grandjean 2003].

No existen drogas antivirales y se indica terapia antibiótica previniendo una infección bacteriana secundaria, especialmente del tracto respiratorio y el digestivo. Fluidoterapia y administración de electrolitos son pasos claves. El tratamiento de perros con signos neurológicos no es satisfactorio, los sedantes y anticonvulsivos pueden mejorar los signos clínicos pero no curan. Sin embargo los perros con signos nerviosos ocasionalmente se recuperan, y la mioclonía y neuritis óptica avanzan con el tiempo [Appel et al 2008]. El control de las convulsiones puede tratarse con diazepam, pentobarbital o bromuro de potasio puede ser necesario [Nishi et al 2004]. Si los signos clínicos son progresivos y el perro está en decúbito permanente, se aconseja la eutanasia [Appel et al 2008].

La medida de control más importante es la prevención Las vacunas inactivadas estuvieron disponibles desde la década de los 40, pero no lograron controlar la enfermedad. Un cambio notable se observó en los años 60, cuando aparecieron las VVM (vacunas de virus vivo modificado) [Hernández V 2009]. Las vacunas de VVM actuales o las recombinantes son eficaces para inducir inmunidad. Las vacunas de moquillo y sarampión pueden administrarse a cachorros de 4 a 12 semanas de edad con riesgo elevado de infección para proporcionar protección en presencia de anticuerpos maternos frente al VMC [Nishi et al 2004].

La duración de la inmunidad después de la administración de vacunas de VVM se considera prolongada y se recomiendan intervalos de vacunación de tres años. Además de la vacunación de los cachorros cuando los anticuerpos maternos disminuyen después de la lactancia. Pero la inmunización de perros con vacunas de VVM se ha asociado a complicaciones post-vacunales, siendo la más frecuente la



encefalitis, que puede dar lugar a signos clínicos de enfermedad neurológica y alteraciones neurológicas variables de 7 a 14 días a partir de la vacunación [Nishi et al 2004].

Además de la vacunación, el aislamiento estricto de los animales con VMC parece ser la etapa más importante en el control de la enfermedad; el contacto directo de perros infectados con perros susceptibles parece ser la vía principal de diseminación viral. La desinfección del medio ambiente puede ser prolongada con productos de uso común, ya que el virus es destruido rápidamente fuera del hospedero.

A pesar de la vacunación, en los últimos años se ha informado de brotes de la enfermedad en perros vacunados de diferentes países. Esto sugiere cierta diversidad genética de VMC de campo; en México se ha demostrado la presencia de al menos 2 variedades genéticas de VMC [Hernández V 2009].

1.2 CULTIVO CELULAR

1.2.1 ANTECEDENTES

El cultivo de células animales empezó a ser una técnica rutinaria en los laboratorios de los años 50, pero el concepto de mantener líneas de células vivas separadas del cuerpo de origen fue descubierto en el siglo XIX [Moss et al 2006].

El cultivo de células (también denominado “cultivo de tejidos”) tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio. El término *in vitro* significa literalmente “en vidrio,” aunque en la actualidad la mayor parte de los cultivos celulares se realizan sobre plástico [Morgan et al 2002].



Tabla 2. Historia del cultivo celular [Bolaños y Yañez 2007].

1885	Wilhem Roux demostró que en una solución salina las células embrionarias de pueden mantenerse vivas
1907	Harrison cultivó médula espinal de anfibio en un coagulo linfático, demostrando así que los axones producen como prolongaciones de células nerviosas.
1910	Rous indujo un tumor utilizando un extracto filtrado de célula tumoral de pollo, que más tarde se demostró que contenían virus de RNA (Virus de Sarcoma de Rous).
1913	Carrel demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo, siempre que fueran alimentadas regularmente en condiciones asépticas.
1948	Earle y colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que en cultivo celular formaban clones.
1952	Gey y colaboradores establecieron una línea continua de células derivada del carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la conocida línea celular HeLa.
1954	Levi-Montalcini y sus colaboradores demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula el crecimiento de los axones en cultivo
1955	Eagle desarrolló la primea investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo y encontró que las células animales se pueden propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas.
1956	Puck y colaboradores seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados a partir de células HeLa en cultivo.



1958	Temin y Rubin desarrollaron un método cuantitativo para la infección de cultivos de células de pollo mediante el virus del sarcoma de Rous purificado.
1961	Hayflick y Morread demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo mueren tras un número finito de divisiones.
1964	Littelfield introdujo el medio HAT para el crecimiento selectivo de híbridos celulares somáticos. Junto con la técnica de fusión celular, este medio hizo accesible la genética de las células somáticas.
1965	Ham introdujo un medio definido, sin suero, que permitía el crecimiento clonal de células de mamífero.
1968	Augusti-Tocco y Sato adaptaron al cultivo de células nerviosas tumorales de ratón (neuroblastoma) y aislaron clones que eran excitables eléctricamente y producían prolongaciones nerviosas. En esta época se aislaron otras células diferenciadas, entre ellas líneas celulares de hepatocitos y de músculo esquelético.
1975	Kohler y Milstein produjeron las primeras líneas de hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales.
1986	Martín, Evans y colaboradores aislaron y cultivaron células madre embrionarias totipotenciales de ratón.
1998	Thomson, Gearhart y colaboradores aislaron células madre embrionarias humanas.

El cultivo celular es el proceso por el cual tanto células procariotas como eucariotas o plantas pueden cultivarse en condiciones controladas. El desarrollo histórico y metodológico del cultivo celular está íntimamente ligado a los del cultivo de tejidos y el cultivo de órganos [Sánchez 2004].

Tras la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios más sofisticados, se hizo posible el cultivo de células tumorales procedentes de muestras de tejidos



malignos tanto del hombre como de animales. El cultivo celular ha alcanzado en el presente una posición en la que su objetivo es con frecuencia reproducir las condiciones existentes *in vivo* que permitan al crecimiento en cultivo de células “normales” (no tumorales) [Morgan et al 2002].

1.2.2 TIPOS DE CULTIVO

Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

- 1. Cultivo de órganos:** Implica que la arquitectura característica del tejido “*in vivo*” se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad [Reina 2010].
- 2. Explantes primarios:** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante [Reina 2010].
- 3. Cultivo celular:** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la



heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetitibilidad de las muestras. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos [Inchaustegui, Reina 2010].

Los cultivos celulares son de tres tipos]:

3.A. Los primarios. Consisten en una mezcla de células, obtenidas por disociación de las células a partir de trozos del órgano. Estas células pueden mantenerse en cultivo sólo durante periodos limitados [Bolaños y Yañez 2007]. Una vez que se cultivan *in vitro*, los cultivos celulares se transforman en cepas celulares [Coll 1993].

3.B. Cepa celular. Es un cultivo de células animales obtenido a partir de un cultivo primario y cuyas células pueden ser subcultivadas varias veces. Las cepas celulares con el tiempo degeneran, no pudiendo volver ser cultivadas. pero hay células de cepas celulares que sufren una alteración y comienzan a desarrollarse en forma indefinida, formando entonces una línea celular [Bolaños y Yañez 2007].

3.C. Línea celular. Cuando un cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación se convierte en una línea celular. Las líneas celulares continuas están



formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores [Bolaños y Yañez 2007]. Las líneas celulares utilizadas con mayor frecuencia están compuestas por fibroblastos obtenidos de pie o pulmón embrionario. Una línea celular es diploide si por lo menos el 75% de las células posee un conjunto normal de cromosomas y es heteroploide si más del 25% tiene un conjunto anormal de cromosomas [Koneman 1999].

La expectativa de vida de las células diploides normales es de aproximadamente de 50 pasajes de duplicación *in vitro*, las que tienen por lo menos 70 pasajes se consideran líneas celulares establecidas. Estas líneas, establecidas ó continuas, pueden provenir de tejidos normales; alternativamente pueden originarse de epitelios neoplásicos [Coll 1993].

Tabla 3. Tipos de cultivo celular [Koneman 1999].

TIPO DE CULTIVO	CARACTERISTICAS	EJEMPLOS	USO PRINCIPAL
PRIMARIO	Diploide; tipos celulares mezclados; 1 o 2 pasajes	Primario de riñón de mono	Influenza, parainfluenza, algunos enterovirus.
LINEAS CELULARES	Diploides; fibroblastos; cantidad limitada de pasajes (<50-70)	Fibroblastos diploides humanos	Herpes simple, citomegalovirus, rinovirus.
LINEAS CELULARES ESTABLECIDAS	Heteroploide; pasaje continuo <i>in vitro</i>	HeLa; Hep-2	Adenovirus, virus respiratorio sincicial.



1.2.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO CELULAR

Para cultivar células *in vitro*, el ambiente debe ser lo más parecido posible con el que se cuenta *in vivo*. Necesitan satisfacer sus requerimientos físicos, nutritivos, factores de crecimiento y sus necesidades antitóxicas y de defensa [Coll 1993]. Son factores importantes el substrato sobre el que crecen las células, el medio que rodea las células y la temperatura.

Básicamente cualquier medio de cultivo está constituido por un medio nutriente mínimo tamponado e isotónico que contiene sales inorgánicas, una fuente de energía y aminoácidos, además de varios suplementos. Para la mayoría de las líneas celulares los suplementos son relativamente pocos [Morgan et al 2002].

Los requerimientos físicos pueden agruparse en: pH, osmolaridad, oxígeno, temperatura y sustrato [Coll 1993].

1.2.4 TIPOS DE MEDIO Y SUPLEMENTOS

Para la mayor parte de los objetivos de un cultivo celular resulta perfectamente adecuado un medio de tipo general [Greence et al 2000]. El BME (Medio Basal de Eagle) es uno de los medios definidos originales. Posteriormente se han desarrollado otros medios a partir del BME; como por ejemplo, DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).

En la composición de muchos medios de cultivo se incluye una elevada cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} en parte porque estos cationes divalentes son necesarios para la adherencia de proteínas situadas sobre las células formadoras de tapiz [Morgan et al 2002].



Los medios para el cultivo de células en suspensión no necesitan concentraciones tan elevadas; por ejemplo el RPMI 1640 (llamado así por el Roswell Park Memorial Institute) [Morgan et al 2002].

La mayoría de los medios nutrientes esenciales se encuentran disponibles en tres presentaciones: polvo, líquido 1x, y líquido 10x. Los medios listos para usar (1x) son la opción más sencilla pero son caros, si bien también deben añadirse los suplementos (por ejemplo, suero y glutamina) antes de usarlos [Morgan et al 2002].

**Tabla 4. Composición del medio RPMI 1640 y medio MEM. [Morgan et al 2002].**

	RPMI 1640 (mg/L)	MEM (mg/L)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	*****	264
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100	****
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100	200
NaCl	6.000	6.800
NaHCO ₃	2.000	2.200
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	****	158
Na ₂ HPO ₄	800	****
D-glucosa	2.000	1.000
Rojo de fenol	5	10
Piruvato sódico	****	****
L-arginina · HCl	****	126
L-asparagina · H ₂ O	50	****
Ácido L-aspártico	20	****
L-cistina	50	24
Ácido L-glutámico	20	****
L-glutamina	300	292
Glutati6n	1	****
Glicina	10	****
L-histidina	15	****
L-hidroxi prolina	20	****
L-isoleucina	50	52
L-leucina	50	53
L-lisina · HCl	40	73
L-metionina	15	15
L-fenilalanina	15	33
L-prolina	20	****
L-serina	30	****
L-treonina	20	48
L-tript6fano	5	10
L-tirosina	20	36
L-valina	20	****
Biotina	0.2	****
Cloruro de colina	3	1
<i>D</i> -inositol	35	2
Nicotinamida	1	1
Ácido para-aminobenz6ico	1	****
Piridoxal · HCl	1	1
Rivoflavina	0.2	0.1
Tiamina · HCl	1	1
Vitamina B12	0.005	****



Después de preparar el medio básico, deben añadirse otros suplementos, de modo que pueda utilizarse en el cultivo celular [Morgan et al 2002].

Para que las células puedan crecer, necesitan satisfacer:

- A. REQUERIMIENTOS FÍSICOS:** pH, osmolaridad, oxígeno, temperatura y sustrato.
- B. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS:** Aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, coenzimas, y sales.
- C. FACTORES DE CRECIMIENTO:** Suero, requerimientos hormonales.
- D. ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICOTICOS** [Coll 1993].

A. REQUERIMIENTOS FÍSICOS:

A.1 pH:

Los tejidos producen CO₂ como consecuencia de la oxidación de carbohidratos y ácidos gaseosos principalmente, el CO₂ reacciona con el agua contenida en los líquidos fisiológicos, dando lugar a iones bicarbonato e iones hidrógeno que alteran el pH [Coll 1993]. El pH fisiológico varía de 6.9-7.7; los amortiguadores biológicos o soluciones balanceadas de sales proporcionan la tonicidad y regulación del pH, además de sales inorgánicas y glucosa, y sirven básicamente para prevenir las fluctuaciones en el pH [Jan 2004].

Se han utilizado medios sin bicarbonato amortiguados con Hepes este es un sistema alternativo de tampón que puede utilizarse en un sistema cerrado, es decir, sin CO₂. Los medios con Hepes también están comercializados, normalmente contienen 25 mM de Hepes [Morgan et al 2002].

El Mops es otro amortiguador orgánico de uso frecuente en estufas sin gas a una concentración final de 20 mM, además del bicarbonato añadido por rutina [Morgan et al 2002].

Rojo de fenol

Se agrega a la mayoría de los medios de cultivo con el fin de proporcionar un índice visual rápido de fluctuación del pH el rango de pH en el cual crecerán satisfactoriamente las células es de 7.2 – 7.6 [Hasmish 1975, Jan 2004]. El intervalo de pH del rojo de fenol es:

Amarillo a pH menores de 6.0, naranja a pH de 6.5 – 7.0, rosa a un pH mayor de 7.0 y menor de 7.6 y púrpura a pH mayor de 7.8. [Freshney 2005].

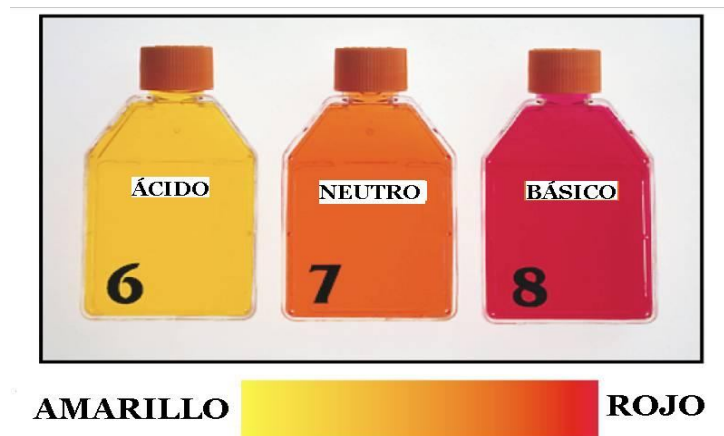


Fig. 3 Escala de pH del rojo de fenol, tomada de Reina 2010.

A.2 OSMOLARIDAD:

De la concentración de iones depende la presión osmótica, que es la responsable del intercambio de agua y de nutrientes; para mantener constante la osmolaridad de los cultivos se hace necesario evitar la evaporación del agua, bien utilizando recipientes cerrados, bien utilizando incubadores de alta humedad [Coll 1993].



A.3 TEMPERATURA:

Las células animales se cultivan a la temperatura del tejido a que pertenecen. El mantenimiento de una temperatura constante se lleva a cabo mediante termostatos en los incubadores, existiendo varios diseños para evitar gradientes de temperaturas: camisa de agua, circulación forzada de aire, situación de los termostatos [Coll 1993].

B. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS:

Un nutriente es una sustancia que necesitan las células para realizar sus funciones normales: metabolismo, división celular, o diferenciación. Los principales requerimientos nutritivos de los cultivos celulares son esencialmente: aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales [Coll 1993].

B.1 AMINOACIDOS:

Los aminoácidos varían con la especie y el tejido; y se utilizan en cultivos celulares a unas concentraciones de 0.01 a 4 mM. La glutamina es generalmente el factor limitante del crecimiento celular debido a que es inestable en el medio de cultivo. Por ello el medio debe enriquecerse en glutamina cuando se realiza un cultivo celular [Coll 1993].

L-Glutamina

Aminoácido absolutamente imprescindible para las células en cultivo. Puede adquirirse en forma de líquido estéril listo para usar (200 mM) ó bien en polvo.

La glutamina es la fuente principal de carbono para la mayoría de las células en cultivo y genera precursores para posteriores biosíntesis y para la producción de proteínas. También actúa, junto con la glucosa (y a veces



con el piruvato sódico), como fuente de energía mediante la ruta del ciclo de Krebs.

La glutamina en solución es lábil y tiene una vida media relativamente corta, especialmente a 37° C tras 3 ó 4 días en una estufa, puede haberse degradado un 20% de la glutamina original, incluso en ausencia de crecimiento celular. El medio al que se le haya incorporado glutamina debe conservarse de forma rutinaria a 4 °C.

La L-Glutamina es inestable a temperaturas mayores a -10 °C.; a la hora de emplearse la glutamina debe estar a una concentración de 2 mM, es decir a una dilución 1:100 de la original [Morgan et al 2002].

B.2 CARBOHIDRATOS:

Los carbohidratos que necesita una célula en cultivo son principalmente: la D-glucosa, D-manosa, D-fructuosa, D-galactosa y el piruvato (el más utilizado) como fuente de energía mediante la ruta del ciclo de Krebs [Coll 1993].

Piruvato

La adición del piruvato de sodio en el medio celular incrementa la producción endógena de CO₂ para así crear gas carbónico y agua. Es importante adicionarlo ya que además de servir como precursor de numerosos metabolitos esenciales que constituyen la armazón de proteínas y de los ácidos nucleicos, ayuda a la producción de energía por medio del ciclo de Krebs.

Se utiliza a una concentración de 0.08 a 10 mM ya que a concentraciones altas el piruvato de sodio puede ser contaminante y dañino para las



células. Debe mantenerse congelado hasta su uso y realizar alícuotas de volúmenes pequeños. [Cohen 1973, Freshney 2005].

B.3 LÍPIDOS:

Son necesarios para las células porque forman parte de la membrana y un porcentaje de la energía requerida se deriva de la oxidación de los ácidos grasos; estos deben estar presentes en el medio de cultivo o bien los obtienen del suero donde se encuentran ligados a albúmina o a lipoproteínas [Coll 1993].

B.4 VITAMINAS:

Son colina, acetilcolina, ácido fólico, nicotinamida, coenzima A, tiamina, piridoxamina, ácido nicotínico, fosfato de piridoxal. Se utilizan a concentraciones de 2×10^{-5} a 10 mM [Coll 1993].

B.5 SALES:

Son necesarias porque mantienen la osmolaridad y se requieren para la actividad de algunas enzimas. Los metales son necesarios para el crecimiento y metabolismo celular [Coll 1993].

C. FACTORES DE CRECIMIENTO:

C.1 SUERO:

El suero es la fracción de sangre que queda después de coagulación y centrifugación de la parte celular. Es una mezcla sumamente complicada de proteínas de plasma que constituye aproximadamente el 80% del volumen de sangre completa [Bolaños y Yañez 2007], factores de crecimiento, hormonas etc. Los componentes pueden variar; con base en el origen y condiciones nutrimentales [Jan 2004] y contiene una mezcla importante pero poco definida de compuestos favorecedores del crecimiento [Morgan et al 2002].



La complejidad de la composición del suero hace difícil su estudio y aislamiento y dependiendo de la especie, unos sueros son mejores que otros para un determinado tipo de cultivo celular.

Se han usado sueros de muchas especies pero los más comunes son: los de humano, el de ternera, el de conejo [Jan 2004]; pero el suero proveniente de bovinos y equinos es el más común [Bolaños y Yañez 2007]. La mayoría de los cultivos requiere como suplemento el suero al 10% v/v, para mantener la proliferación de las células [Bolaños y Yañez 2007].

Suero Fetal Bovino

Es un potente promotor de proliferación de células además de que contiene muy bajos niveles de anticuerpos, la mayoría de los cultivos requiere como suplemento el suero al 10% v/v, para mantener la proliferación de las células [Bolaños y Yañez 2007, Freshney 2005,].

Tabla 5. Composición del SFB, tomada de Bolaños y Yañez 2007.

COMPONENTE	mg/mL	COMPONENTE	g/mL	COMPONENTE	ng/mL
Cloro	19.312	Colesterol	375.0	Glutación reducido	1.5
Sodio	3.082	Fósforo	78.5	Disulfuros	0.3
Potasio	466.0	Triglicéridos	370	Lipoproteína	360.0
Glucosa	1.6	Creatinina	30.0	Glutación oxidado	0.3
Urea	0.3	Acido úrico	28.0	Hemoglobina	21.0
Calcio	0.1	Vitamina C	9.0	Cobre	1,050,000,
Proteína T	180.5	Hierro	2.0	Vitamina	2,100,000
Albumina	113.0	Bilirrubina	7.0	Selenio	260,000
		Vitamina E	2.3	Cortisol	120,000



Dependiendo del procesamiento, se obtienen diferentes clases de sueros [Jan 2004]:

- Sueros pre-inactivados con calor.
- Sueros de IgG bajos
- Sueros dializados
- Sueros Gamma-irradiados.

El suero debe ser inactivado por calor antes de usarlo con el fin de destruir las moléculas de complemento y algunas inmunoglobulinas reactivas que pueda contener. La cascada del complemento puede conducir a la lisis y muerte de las células en cultivo [Morgan 2002]. Algunos sueros son citotóxicos por lo cual es necesario comprobar cada nuevo lote con cultivos de células en uso, antes de disponer de ellos para su uso general. Finalmente, como el suero es probablemente una parte costosa dentro del cultivo celular, determinar el suero a elegir dependerá en gran parte del estado financiero [Hasmish 1975].

RECOMENDACIONES:

- * Almacenamiento: -20 °C.
- * Calor de desactivación: 60 °C, 30 minutos antes de su uso.
- * Hacer alícuotas de 50 mL o volúmenes que se vayan a utilizar.
- * No calentar e inmediatamente congelar.
- * Filtrar con membrana de nylon de poro 0.22 μm . Alícuotar y congelar a -20 °C; hasta su uso [Jan 2004].



D. ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICÓTICOS:

El uso de los antibióticos y antimicóticos en el cultivo celular ha reducido el riesgo de contaminación que enfrentaban los primeros investigadores [Hasmish 1975].

Los cultivos celulares pueden contaminarse con bacterias y/u hongos, cuando el entrenamiento no es el adecuado o se trabaja en condiciones no estériles, las contaminaciones por bacterias y/u hongos pueden constituir problemas. La decisión de usar antimicóticos se basa en la elección individual y con base en la experiencia que se tenga [Jan 2004]. Y empleados en niveles no tóxicos, constituyen un “paraguas” bajo el cual se puede reducir la contaminación a proporciones no catastróficas y sí muy convenientes [Morgan et al 2002].

RECOMENDACIONES:

- * Almacenamiento: De 4 °C a -20 °C dependiendo del antibiótico o antimicótico.
- * Realizar alícuotas de 5 o 10 mL. por porción, o de otros volúmenes que se requieran.
- * Determinar la contaminación: Hongo, levaduras, bacteria, micoplasma, virus [Jan 2004].

Los antibióticos son utilizados por muchos laboratorios aunque algunos renuncian a ellos. Algunas células pueden resultar afectadas negativamente por los antibióticos [Morgan et al 2002]. En general se agrega a los medios de cultivo una solución de penicilina a 100 unidades/mL y estreptomycinina a 100 µg/mL. Y con respecto a los agentes antimicóticos, para dominar el problema a corto plazo se pueden utilizar la nistatina a razón de 100 µg/mL y la anfotericina B en la proporción de 5 µg/mL, pero ambas tienden a ser acumulativamente citotóxicas después de unos cuantos subcultivos celulares [Morgan et al 2002]



Tabla 6. Antibióticos y antimicóticos utilizados en el cultivo celular [Coll 1993, Hasmish 1975, Jan 2007].

ANTIBIOTICO ANTIMICÓTICO	ESPECTRO ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION RECOMENDADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ESTABILIDAD A 37 °C (DIAS)
AMOXICILINA	Gram positivas y Gram negativas	100	3
AMPICILINA	Gram positivas y Gram negativas	100	3
ERITROMICINA	Gram positivas y Mycoplasma	100	3
PENICILINA	Gram positivas	100	3
TETRACICLINA	Gram positivas, negativas Mycoplasma	10	4
ANFOTERICINA B	Hongos y levaduras	0.25-2.5	3
GENTAMICINA	Gram negativas, Gram positivas y Mycoplasma	5-50	5
KANAMICINA	Gram positivas, Gram negativas y Mycoplasma	100	5
NEOMICINA	Gram positivas, negativas	50	5
NISTATINA	Hongos y levaduras	100	3
PENICILINA G	Gram positivas	50-100 U/mL	3
POLIMIXINA B	Gram negativas	100 U/mL	5
ESTREPTOMICINA	Gram positivas y Gram negativas	50-100	3



AGENTES DISPERSORES CELULARES:

La propiedad de las células de adherirse a superficies adecuadas está condicionada a la presencia de iones calcio y magnesio. En los subcultivos en monoestrato se puede usar un agente quelante el cual actúa retirando los iones calcio y magnesio, con lo cual libera las células de la superficie a la cual se hallan adheridas [Hasmish 1975].

TRIPSINA:

La tripsina es el producto más comúnmente utilizado para disgregar tejido o bien para romper monoestratos celulares [Jan 2004].

RECOMENDACIONES [Jan 2004]:

- * Almacenamiento: -20 °C.
- * Se recomienda no congelar y descongelar en múltiples ocasiones o repetidamente.
- * Realizar alícuotas de 5-10 mL.

Tabla 7. Sugerencia para soluciones de lavado y concentración de tripsina [Jan 2004].

TIPO DE CULTIVO	SOLUCION DE LAVADO	SOLUCION DE DISOCACION
Células con adherencia fuerte	HBBS o PBS	Tripsina EDTA 0.25%
Células epiteliales/Endoteliales	0.5 mM EDTA	Tripsina 0.05%
Multicapa	0.05% Tripsina	Tripsina EDTA 0.25%

Las proteínas de adherencia necesitan calcio y magnesio, por lo que la tripsina y el EDTA se utilizan conjuntamente en la mayoría de los casos. La tripsina actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia y el EDTA se encarga de quelar los cationes divalentes libre. La actividad de la tripsina es inhibida por la presencia de las proteínas del suero [Morgan et al 2002].



Es importante recordar que la tripsina es potencialmente dañina y que debe estar en contacto con las células el tiempo mínimo necesario para desprender las células del plástico. Algunas células pueden formar grumos tras la tripsinización especialmente si el cultivo es confluyente [Morgan et al 2002].

1.2.5 USOS Y APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR

Desde principios de siglo la técnica de los cultivos celulares ha aportado un poderoso instrumento analítico para el estudio de los fenómenos celulares hasta entonces no utilizado. Los cultivos celulares se usan hoy en día para obtención y propagación de híbridos celulares, diagnóstico de enfermedades hereditarias y cáncer, propagación de virus y micoplasma, estudio de los efectos de fármacos y antibióticos y producción de sustancias orgánicas complejas [Coll 1993].

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular como son:

- a) Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplo transcripción del DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético.
- b) Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos como por ejemplo ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares.
- c) Ecología celular. En el estudio de las condiciones ambientales del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación como por ejemplo estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.



d) Interacciones celulares. En los procesos de inducción embrionaria cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacción célula-célula.

Hasta hace pocos años atrás los cultivos celulares eran utilizados solamente por los biólogos celulares en la investigación de la estructura y función celular; por los virólogos para el aislamiento, caracterización, estudio del ciclo replicativo y patogenia de los distintos agentes virales, así como también en el desarrollo de vacunas contra los mismos.

Actualmente ha pasado a ser una herramienta indispensable para algunas áreas de investigación entre las cuales se encuentran las siguientes:

Virología: Para el establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales.

Inmunología: En la introducción en las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como el análisis de la genética de la célula somática.

Ingeniería de proteínas: Gracias a la producción de proteínas en líneas celulares como el interferón, insulina, hormona del crecimiento.

Estudios de interacción y señalización celular de la diferenciación en el desarrollo: Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.

Aplicaciones diagnósticas: Por ejemplo en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad.



Aplicaciones industriales y agronómicas: En la producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial. En pruebas de citotoxicidad como una medición de calidad, de aguas de uso industrial, agua potabilizada para ser distribuida por red, efluentes industriales y desagües hospitalarios, en busca de agentes contaminantes biológicos y químicos.

Aplicaciones médicas: En el mantenimiento y producción de tejidos para trasplante por ejemplo: el cultivo de epitelio humano, injertado en los quemados o utilizado en cirugía plástica, el cultivo de médula ósea, el uso de cultivo celulares para realizar ensayos de biocompatibilidad en materiales de implante y en el control de calidad de productos de origen biológico, permiten la producción y utilización de anticuerpos monoclonales, linfoquinas, enzimas, hormonas, etcétera [Bolaños y Yañez 2007].

1.2.6 CURVA DE CRECIMIENTO (LINEAS ESTABLES) FASES DEL CULTIVO:

Fase de latencia. Fijación al sustrato e inicio del ciclo celular.

Fase de crecimiento exponencial. El número de células se duplica aproximadamente cada 24 horas

Fase de confluencia. Las células del cultivo, que se ha saturado, dejan de dividirse (monocapa: inhibición por contacto; suspensión: consumo del medio).

Fase de muerte. Si el cultivo se prolonga por demasiado tiempo, las células entran en una fase de senescencia que termina con la muerte de las células en cultivo [Escribá P. 2009].

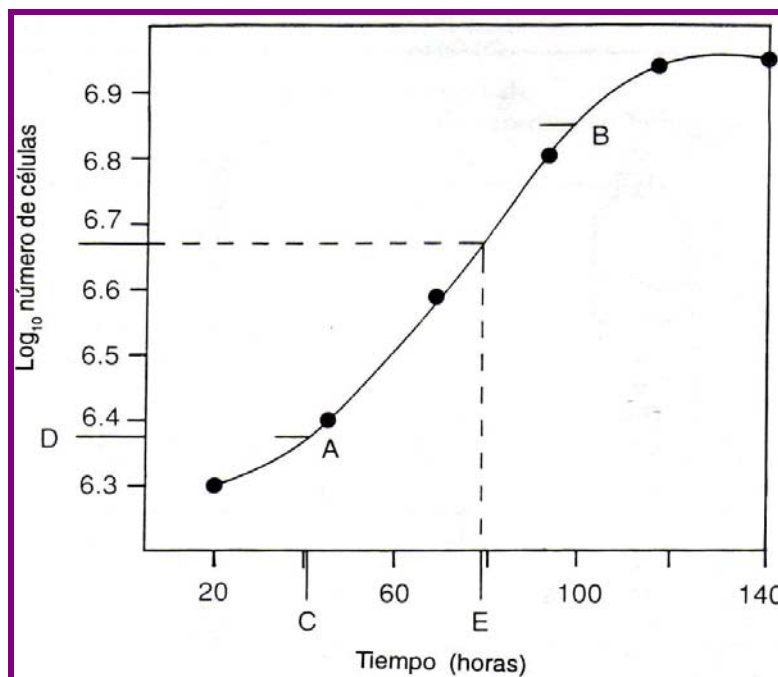


Fig. 4. Curva de crecimiento celular, tomada de Coll 1993.

1.2.7 CÉLULAS MA-104

CARACTERÍSTICAS:

Las células MA-104 provienen de riñón del embrión de un mono verde africano, el *Cercopithecus aethiops* son células de tipo epitelial que se adherieren a la base donde están contenidas y formando un monoestrato celular [ATCC 2010]

Esta línea celular es susceptible a la infección por rotavirus; y el medio recomendado para su crecimiento es el MEM adicionando SFB a una concentración final de 10% y ha sido el principal modelo celular en la elucidación de los mecanismos de entrada, replicación e infección de rotavirus [ATCC 2010]. Ya que estas células son altamente susceptibles a la infección por este virus y por lo tanto son utilizadas también para la caracterización del mismo [Jolly et al 2001].



1.3 AISLAMIENTO VIRAL

1.3.1 GENERALIDADES

Debido a que los virus solo pueden multiplicarse en tejidos vivos, uno de los métodos para su propagación son los cultivos celulares y el más común es el cultivo celular en monocapa. La multiplicación de los virus en las células cultivadas se ha usado principalmente para su aislamiento, ensayo, diagnóstico y obtención de vacunas. Además de que es puede observarse en la mayoría de los casos el efecto destructivo o citopático que se produce en las células por infección con virus [Coll 1993].

La mayoría de los virus sólo crece bien en células procedentes de la misma especie de la que se aislaron en primer lugar; esta es una de las mayores dificultades al trabajar con virus *in vitro*. Incluso la adaptación de *in vivo* a *in vitro* y de *in vitro* a *in vivo* no es siempre fácil y muy a menudo implica una pérdida de virulencia de la cepa del virus aislado, lo que a su vez se utiliza para la realización de vacunas vivas atenuadas. La adaptación a cultivos celulares se consigue con varios pases en una línea celular definida [Coll 1993].

1.3.2 INFECCIÓN DE CÉLULAS

La infección viral está determinada por la interacción virus-célula. Un virus resulta ser un parásito que vive dentro de las células de un organismo, en donde obtiene el medio y los nutrimentos necesarios para su desarrollo (replicación) [OMS 2006].

El ciclo de replicación del virus puede dividirse en varias fases [Hitoshi et al, Lant et al 2005]:

Fase precoz.	El virus debe reconocer a la célula apropiada, adherirse a ella hasta introducir su genoma al núcleo.
Fase tardía.	Donde comienza la replicación del genoma.
Periodo de eclipse.	Termina con la aparición de nuevos viriones tras en ensamblaje del virus.
Periodo de latencia.	Durante el cual no se detecta n virus infeccioso extracelular. Y la aparición de viriones progenie en el medio es el fin de la fase de latencia.

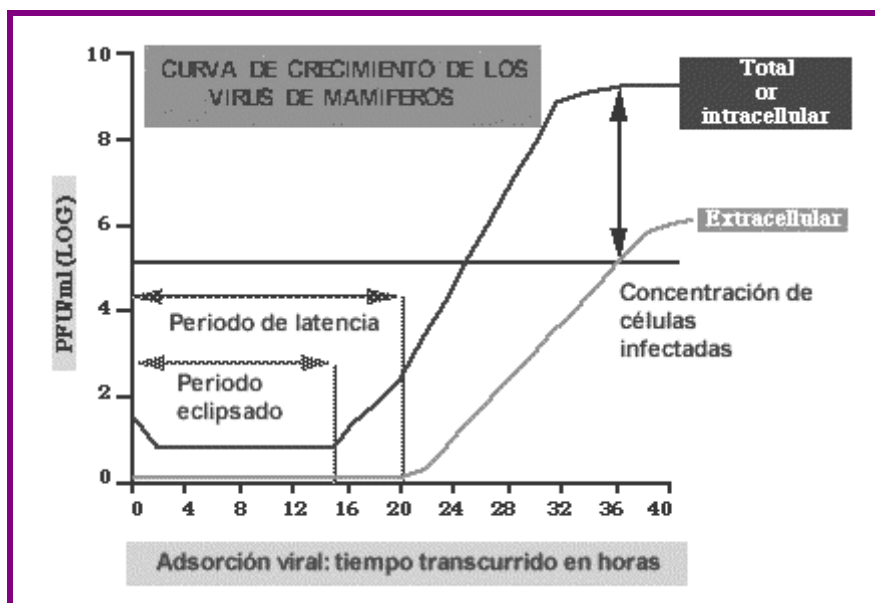


Fig. 5 Curva de ciclo infeccioso de virus, tomada de Inchaustegui

1.3.3 AISLAMIENTO DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO

El aislamiento de virus con fines de diagnóstico e investigación es a veces difícil de realizar debido a que se emplean tejidos de animales y a que el cultivo en líneas celulares comunes requiere periodos de tiempo muy prolongados, lo cual incrementa los costos [Hernández V. 2009].



Se tienen antecedentes de que el VMC se multiplica en embrión de pollo y en células BHK 21 (riñón de hámster dorado) [Mascaro 1975] actualmente el aislamiento del VMC se realiza mediante la inoculación de tejidos infectados macerados procedentes de animales sospechosos, en cultivos de macrófagos pulmonares de hurón o perro SPF (Libre de patógenos específicos) y se tiene reportado que detectan al virus en 24 a 48 horas, pero han sido reemplazados últimamente por linfocitos de timo o de sangre periférica de perros SPF, estimulados con mitógenos [Lant et al 2005]. En un lapso de 3 a 6 días se detecta el efecto citopático característico que consiste en la formación de sincitios y lisis celular, entonces el virus se puede aislar mediante pases a otras células; como CRP o MDCK (Madin-Darby células epiteliales de riñón canino) y VERO (riñón de mono verde africano) [Lednicky et al 2004] el aislamiento del VMC directamente en estas líneas celulares es más accesible y menos costoso pero tiende a ser mucho más prolongado (hasta 72 días); y también se han utilizado para evaluar la capacidad de multiplicación del virus y ECP producido en estas células; evaluándose la adaptación del virus a las células VERO estudiando los efectos sobre las células [Hitoshi et al 2009].

El uso de las células MDCK y la línea B95 (línea de células linfoides de marmota) han reportado tener éxito en el aislamiento del VMC en casos clínicos [Lant et al 2005]. Se han utilizado las B95a (Linfocitos B de mono transformados por el virus de Epstein-Barr) [Greence et al 2000] y los investigadores reportan mayor eficiencia respecto de otras líneas celulares pero hay que considerar que esta línea celular produce virus de Epstein-Barr por lo que debe manejarse como material infeccioso en todo momento lo cual hace más complicado su uso. [Hernández A. 1987, OMS 2006].

En los últimos años se han reportado con éxito cultivos de células VERO que han sido transfectadas para que expresen el receptor del virus, SLAM (Molécula de señal de activación de linfocitos, CD150) que actúa como receptor celular para el VMC, esta



molécula de superficie es abundante en los linfocitos y en las células dendríticas [Bolaños, Yañez 2007, Hitoshi et al 2009, Lant et al 2005]. Se observa el ECP a las 24 horas post-inoculación con tejido esplénico de animales diagnosticados clínicamente. El SLAM expresado en células del sistema inmune y en otros tejidos no linfoides pueden actuar como receptores para el VMC, y es uno de los principales determinantes para el rango de hospederos y tropismo tisular [Hernández V. 2009, Zhao et al 2008].

El ECP característico del VMC consiste en una primera etapa con la formación de gránulos en el citoplasma acompañados de pequeñas vacuolas; que con el transcurso de la infección se observa el redondeamiento de células y separación entre célula-célula, posteriormente se hace evidente la formación de sincitios el cual consiste en la unión de dos a tres células [Pérez et al 1993] en muchos cultivos de tejidos, se detecta en el transcurso de 2 a 5 días y en algunas líneas celulares puede prolongarse hasta 72 días y no todas las líneas desarrollan ECP; si no se observa ECP los cultivos deben examinarse con anticuerpos fluorescentes para buscar y evidenciar al virus. [Greence et al 2000, Hitoshi et al 2009].

1.3.4 REPLICACIÓN DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO

a. RECONOCIMIENTO:

Las estructuras responsables de la unión específica al receptor son las glucoproteínas y la proteína H reconoce receptores en la superficie celular [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

b. FIJACIÓN:

La envoltura contiene dos glicoproteínas codificadas por el virus: La proteína F que esta implicada en la fusión a un pH fisiológico y la proteína de fijación, que se une a



receptores en la célula hospedadora esta proteína puede tener actividad de hemoaglutinación y actividad de neuraminidasa o únicamente poseen actividad de hemoaglutinación o ninguna de las dos. Y posteriormente se da la fase de entrada y el desnudamiento [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

c. FASE DE REPLICACION:

Síntesis temprana: Adsorción, penetración y desnudamiento, culminan con la desintegración de las partículas, el proceso continúa y comienza la replicación del ácido nucleico así como la síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales necesarias para la producción de virus [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

La multiplicación viral ocurre en el citoplasma.

- a. La RNA polimerasa viral utiliza la nucleocápside como plantilla y no se necesita la pérdida completa de la nucleocápside (descapsidación).
- b. Los RNAm virales son transcritos y se requiere la presencia de una RNA transcriptasa dependiente, que no se encuentra en la célula.
- c. Como es un virus de RNA de cadena negativa, las enzimas de modificación del RNA son empacadas en el virión.
- d. Los RNAm virales son traducidos para sintetizar proteínas virales.
- e. No hay división de las funciones de expresión genética en fases tardía ni temprana.
- f. La replicación RNA viral implica la síntesis completa de cadenas de sentido positivo. Esto es usado como plantilla para cadenas completas en sentido negativo. Ambas cadenas son envueltas con proteína de nucleocápside mientras son sintetizadas.



Para que lo anterior pueda suceder el RNA contiene la secuencia para sintetizar a la RNA transcriptasa, su genoma y proteínas estructurales [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

Replicación del genoma:

Formación de un RNA mensajero capaz de traducir en el ribosoma celular las proteínas codificadas por el genoma viral y una vez que el RNA vírico y las proteínas son sintetizados, la maduración tiene lugar de una manera similar en el citoplasma. Las recién sintetizadas cadenas de sentido negativo pueden servir a su vez como plantillas para la replicación, o para la transcripción, o pueden ser empacadas con nuevos viriones [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

d. FASE DE LIBERACIÓN Y SALIDA

***Maduración y ensamblaje:** Es el proceso de ensamblaje de las partículas virales a través de la unión de la cápside con el genoma.

***Cápsides helicoidales:** Como es el caso del VMC; no pueden formarse sin RNA viral.

***Envueltos:** Se insertan glucoproteínas de cubierta específica del virus en las membranas celulares. Las nucleocápsides hacen gemación a través de la membrana a nivel de estos sitios modificados y al hacerlo así, adquieren su cubierta. La gemación ocurre a menudo en la membrana plasmática y puede abarcar a otras membranas de la célula. Los virus cubiertos no son infecciosos hasta que han adquirido su cubierta.

***Liberación:** Proceso mediante el cual los viriones salen de la célula hospedadora. Las células infectadas acaban por experimentar lisis y liberar las partículas virales. La liberación se produce atravesando una membrana de la célula hospedadora, parte de

la cual es llevada por el virus, que así adquiere su envoltura y sus espículas [Moss et al 2006, Inchaustegui Nuñez y Rodríguez 2007].

Ambas glicoproteínas virales (la proteína de fijación y la proteína F (de fusión) son traducidas como proteínas transmembranales y transportadas a la membrana plasmática de la célula. La proteína M habilita las nucleocápsides para que interactúen con regiones de la membrana plasmática que tienen las glicoproteínas insertadas. [Inchaustegui, Moss et al 2006, Nuñez y Rodríguez 2007].

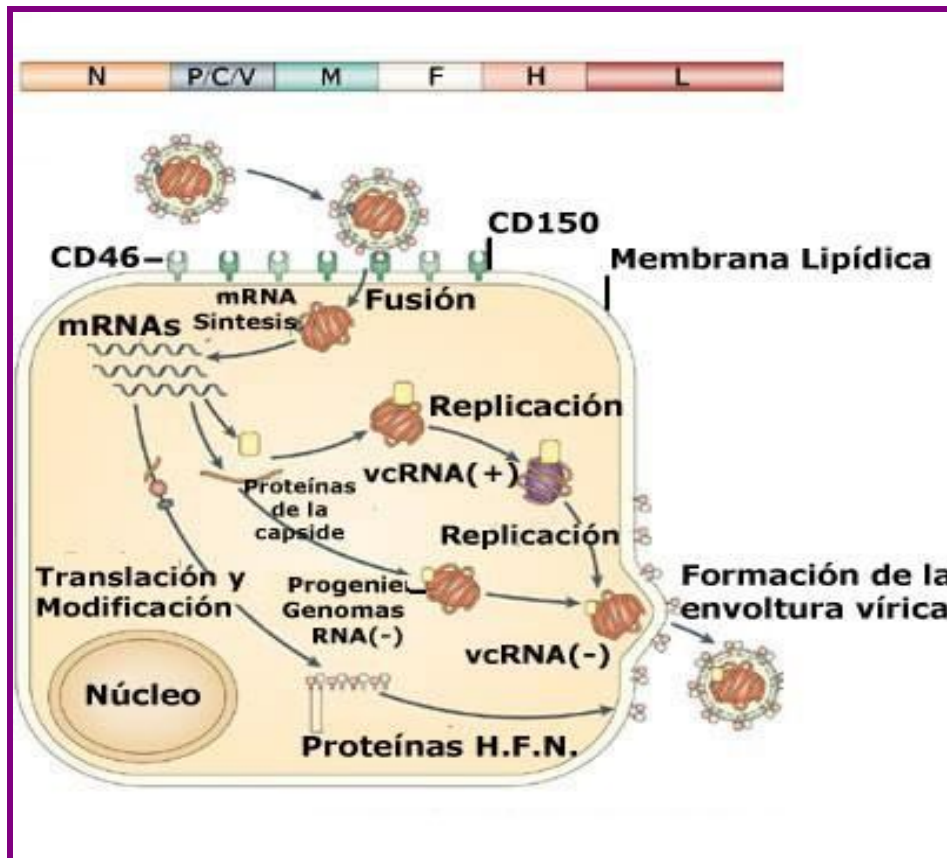


Fig. 6 Replicación del VMC, tomada de Moss et al 2006.



1.3.5 TITULACIÓN DE VIRUS

CÁLCULO DEL TÍTULO VIRAL

La titulación es normalmente expresada como el recíproco de la dilución más alta del virus el cual causa una reacción específica en 50% del material inoculando con, o expuesta a la dilución de material infeccioso. Donde células cultivadas son usadas como el sistema indicador, las titulaciones son expresadas como el 50% de dosis infecciosa de tejido cultivado (DICT₅₀). Donde se emplean animales o embriones para experimentos con la muerte como criterio, la dosis letal al 50% de los inoculados y se expresa como DL₅₀.

El método de Reed y Muench es ampliamente utilizado para calcular el punto de actividad viral (título). El mérito de este sistema es que acumulando muertes y sobrevivientes, reactores y no reactores sobre el intervalo entero de dilución, todos los inoculados y los titulados son usados en el cálculo en lugar de sólo aquellos en las diluciones cercanas al punto final. Este es un método relativamente fácil de aprender y tiene la ventaja de que funciona una vez que se ha dominado. Siempre se debe comparar una titulación con otra de un control preparado bajo las mismas condiciones. Recordando que el punto final detecta solamente viriones capaces de iniciar una infección y una titulación se refiere a la concentración de estas unidades infecciosas.

MÉTODO DE REED Y MUENCH:

1. Número constante de animales por dilución.
2. Factor de dilución constante que cubra de 100% a 0% de reactores positivos (enfermos o muertos).
3. Ninguna muerte accidental (por ejemplo muertos por traumatismo) [Mendoza et al 2008].



2.0 JUSTIFICACIÓN

El moquillo canino, esta considerado como una de las enfermedades infecciosas más importante en los perros; y se ha diagnosticado en todo el mundo incluyendo México en donde se considera una enfermedad enzoótica que afecta a perros jóvenes de 3 a 6 meses de edad y la cual no se ha podido erradicar a pesar del uso de vacunas. El aislamiento del virus con fines de diagnóstico e investigación es a veces difícil de realizar, debido a que se emplean tejidos de animales y a que el cultivo en líneas celulares comunes requiere periodos de tiempo muy prolongados, lo cual incrementa los costos.

En el presente trabajo se plantea como primer punto la adaptación de las células MA-104 al medio RPMI 1640, para su posterior infección con el VMC con la finalidad de optimizar el tiempo de aislamiento del virus en esta línea celular; lo cual disminuiría considerablemente los costos y por lo tanto se tendría una excelente opción para utilizarlas en el diagnóstico y estudios posteriores del mismo virus.



3.0 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Evaluar la permisividad a la infección de las células MA-104 (CRL-2378.1, ATCC, USA) por el virus responsable de moquillo canino (Distemper canino, Snyder Hill del CDV (VR-1587, ATCC, USA) y de esta manera poder utilizarla en el aislamiento y diagnóstico oportuno de este virus en casos clínicos.

3.2 PARTICULARES

- Se adaptaran las células MA-104 al medio de cultivo RPMI 1640 para que posteriormente se realice el cultivo de células MA-104 controlando las variables que influyen en el cultivo celular como lo son: temperatura, pH, concentración de suplementos, y manipulación.
- Se llevará a cabo la infección de células MA-104 con el virus de moquillo canino para saber si estas son permisivas a la infección por el virus.
- Realizar el monitoreo tanto de células control como de células infectadas para determinar si la infección por el virus se ha logrado, tomando en consideración el efecto citopático característico del virus.



4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Cepa del virus de moquillo canino Snyder Hill del CDV (VR-1587, ATCC, USA); Ampolleta con células MA-104 (CRL-2378.1, ATCC, USA); Suero Fetal Bovino para uso en cultivo celular (Cellgro, USA).

4.2 Reactivos

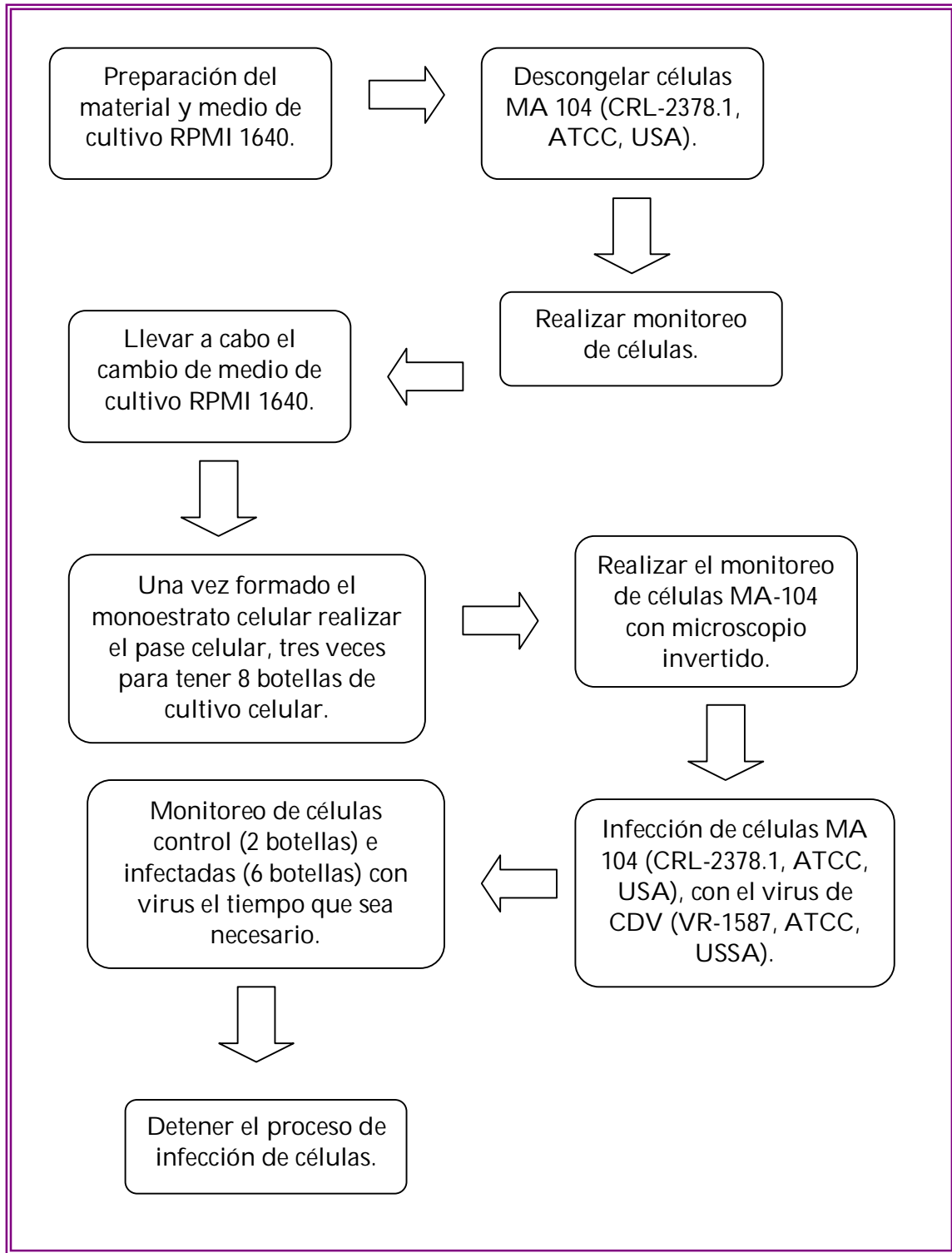
Piruvato de sodio (100 mM) para uso en cultivo celular. (In Vitro, México); L-Glutamina 200 mM (100X) con 29.2 mg/mL en 0.85 % de NaCl, para uso en cultivo celular (H y Q Cell Culture Reagents, USA); Penicilina y estreptomina 10,000 u/μg/mL para uso en cultivo celular. (In Vitro, México); Tripsina para uso en cultivo celular. (In Vitro, México); Medio para cultivo celular RPMI 1640 con Bicarbonato de sodio (In Vitro, México).

4.3 Equipo

Estufa de incubación; botellas de poliestireno para cultivo celular de 50 mL. (Nunc, Dinamarca); Tanque de Nitrógeno líquido (-196 °C); Microscopio invertido (Lieder, Alemania); Micro- centrifuga (Beckman, USA); Campana de flujo laminar (Veeco, México).



5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL





5.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Se preparó la campana de flujo laminar y los reactivos; la concentración final de antibiótico (estreptomicina y penicilina) a una concentración final de 100 UI/mL y 100 µg/mL respectivamente; piruvato de sodio a una concentración de 0.08 a 10 mM; la L-glutamina a una concentración final de 0.01 a 4 mM; y por último el suero fetal bovino 10% en relación al volumen final. Se llevó a un volumen final de 100 mL con el medio de cultivo. Todo lo anterior utilizando recipientes y matraces previamente esterilizados. Los reactivos se esterilizaron por filtración y se les realizó la prueba de esterilidad.

Se utilizó la línea celular MA-104 (CRL-2378.1, ATCC, USA).

5.2 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS

Se sacaron las ampollas de células del contenedor de nitrógeno (-196 °C) y se sumergieron rápidamente en baño María a 37 °C posteriormente se abrió la ampolla y las células se extrajeron con ayuda de una micropipeta transfiriendo el contenido a una botella para cultivo celular de 25 cm². Se les colocó 5 mL. del medio de cultivo RPMI 1640. Se observaron al microscopio invertido; y se rotularon con los siguientes datos:

- a) Tipo de célula descongelada
- b) Número de pase descongelado o afectado, y
- c) Fecha.

Posteriormente las botellas se incubaron a 37 °C en posición horizontal.



5.3 CAMBIO DE MEDIO DE CULTIVO

El cambio de medio de cultivo celular se realizó una vez que las células estuvieron adheridas al soporte, y el cambio visual del pH fue evidente, el medio viró de color canela (pH 7.0) a color amarillo (pH ácido). También se observó el grado de confluencia y adherencia, así como la morfología celular con ayuda de un microscopio invertido. El medio de cultivo se decantó por el lado opuesto de la monocapa celular, posteriormente se colocaron 5 mL de medio de cultivo.

5.4 PASE CELULAR

Las células se revisaron con ayuda del microscopio invertido; se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con tripsina al 0.15% moviendo sobre el estrato celular y decantando como se menciona en el párrafo anterior. Se colocan 0.15 mL de tripsina nuevamente y se deja actuar durante 5 min. a 37 °C en posición horizontal. Se tomó la mitad del volumen y se colocó en una botella nueva; se agregaron 5 mL de medio RPMI 1640, se etiquetó e incubó a 37 °C en posición horizontal.

5.5 INFECCIÓN DE CÉLULAS MA-104

La cepa Snyder Hill del CDV (VR-1587, ATCC, USSA) fue inoculada en células MA-104, una vez que la confluencia celular fue como mínimo del 70%; se desechó el medio de cultivo y se les adicionó 1 mL de la solución viral (10^4 virus/mL) para cubrir la monocapa de células; se incubó a 37 °C durante una hora, agitando periódica y suavemente; se agregó medio RPMI 1640 con SFB al 2%. Se incubó a 37 °C en posición horizontal y se revisó cada 24 horas para observar el inicio del efecto citopático. Cuando el efecto citopático se observó en al menos el 80% de las células, las botellas se trataron con tres ciclos de congelación y descongelación, para finalizar el proceso de infección.

6.0 RESULTADOS

6.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Se prepararon 100 mL de medio de cultivo RPMI 1640; como se indica en el punto 5.1 del diseño experimental, una vez que el medio de cultivo paso la prueba de esterilidad se refrigeró a 4 °C hasta el momento de su uso; las características del medio son: líquido de color canela, con un pH de 7.0 (Fig. 7).



Fig. 7. Medio RPMI a pH de 7.0

6.2 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS

Posteriormente se procedió a descongelar las células MA-104, obteniéndose una suspensión de apariencia homogénea (Fig. 8a), al microscopio las células se observaban suspendidas en el medio y sin forma definida, por no estar adheridas aún a la pared de la botella en la cual se encontraban contenidas (Fig. 8b). A las 24 h post-descongelación las células observadas al microscopio se encontraban adheridas al soporte, el medio de cultivo no presentaba cambio de color.



Fig. 8a Suspensión de células MA-104

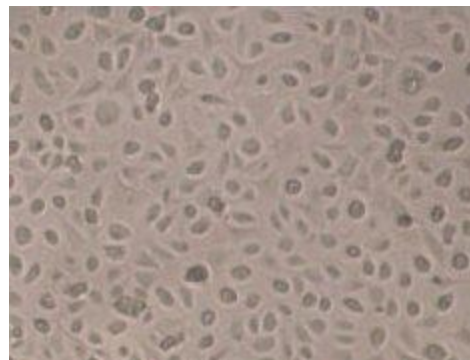


Fig. 8b Vista al microscopio de la suspensión de células MA-104

6.3 CAMBIO DE MEDIO DE CULTIVO

A las 48 h de haberse realizado la descongelación se cambió el medio de cultivo, el indicador para realizar dicho procedimiento es el cambio visual de pH en el medio de cultivo; ya que del color canela original en donde pH es 7.0 (Fig. 9a), cambió a un color amarillo indicativo de que el pH es ácido (Fig. 9b); por lo tanto las células están consumiendo y degradando los nutrientes del medio.

En este momento las células se encontraban adheridas a la pared de la botella formando un monoestrato, además se observó su morfología, que es de tipo epitelial y de apariencia hexagonal. Realizándose así mismo el monitoreo celular observando una buena adaptación celular.



Fig. 9a Suspensión de células a pH de 7.0



Fig. 9b Suspensión de células a pH ácido

6.4 PASE CELULAR

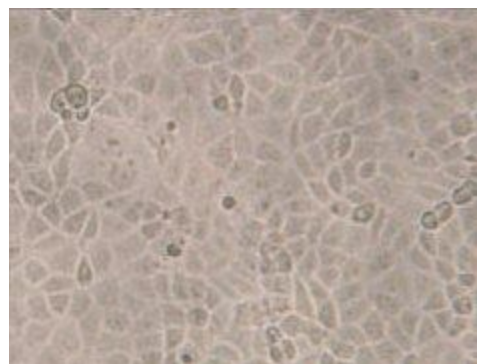
Al existir una confluencia celular entre el 70-80%; se procedió a realizar un segundo pase celular, como se indicó en el diseño experimental en el punto 5.4, este proceso fue satisfactorio ya que al monitorear las células, 24 hrs. después de haberse realizado el pase, se encontraban adheridas formando el monoestrato celular y con una morfología normal (Fig. 10a y b).

**Fig. 10a Monoestrato celular****Fig. 10b Morfología del monoestrato**

6.5 INFECCIÓN Y MONITOREO DE CÉLULAS MA-104

Para realizar la infección celular; se requería que la confluencia del monoestrato celular fuera superior al 70%. El monitoreo se realizó con ayuda de un microscopio invertido, cada 24 horas; tanto en células MA-104 sin infectar (control) (Fig. 10b), como en las células infectadas con el virus.

Las células MA-104 se infectaron con la cepa Snyder Hill del CDV (ATCC VR-1587, USA) del virus de moquillo canino como lo indica el diseño experimental en el punto 5.5; a las 24 h post-infección ya las células comenzaban a presentar el efecto citopático característico causado por este virus, el cual consiste en el redondeamiento de las células; a las 48 h post-infección, las células presentar vacuolización, además del redondeamiento (Fig. 11a y 11b).

**Fig. 11a Células MA-104 a las 48 h post-infección.****Fig. 11b Células MA-104 a las 48 h post-infección.**

A las 72 h post-infección se observó la presencia de pequeños sincitios entre un 20 y 30% del monoestrato celular; el cual consiste en la fusión de células (Fig. 12a y 12b).



Fig. 12a Células MA-104 a las 72 h post-infección.

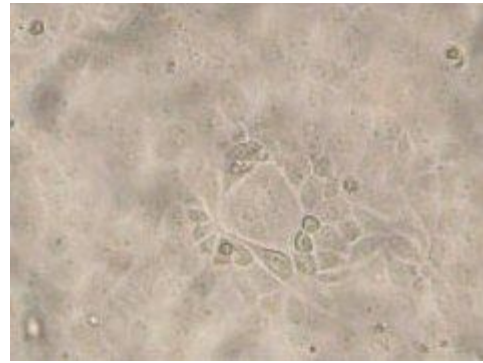


Fig. 12b Células MA-104 a las 72 h post-infección.

En este punto se paro el proceso (en tres botellas) llevando a cabo el procedimiento indicado en el punto 5.5 del diseño experimental. Y se continuó 4 días más (3 botellas). A las 96 h el monoestrato presentaba lisis celular (Fig. 13a, 13b y 13c)

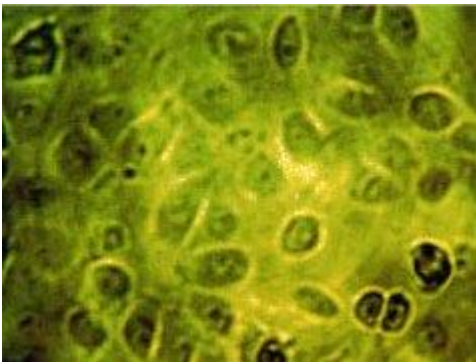


Fig. 13a Células MA-104 a las 96 h post-infección.

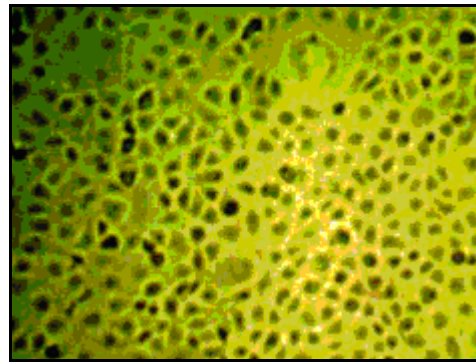


Fig. 13b Células MA-104 a las 96 h post-infección.

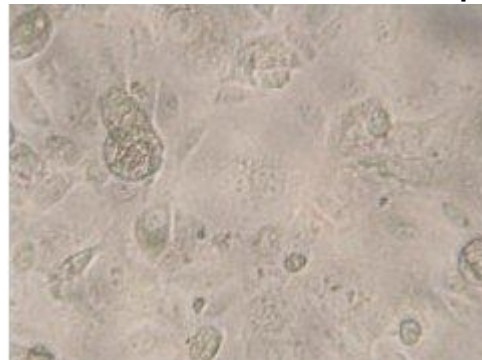
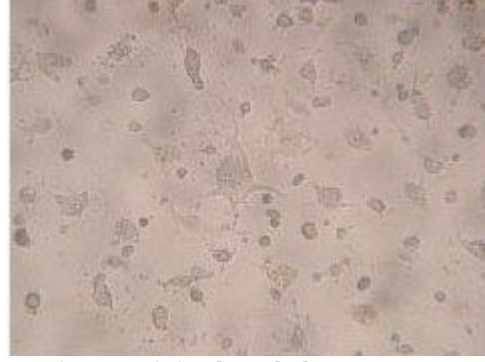


Fig. 13c Células MA-104 a los 96 h post-infección.

A su vez se continuó con el monitoreo celular y en el día 5 post-infección se observó que la lisis celular ya era evidente (Fig. 14) y por consiguiente en el día 7 la lisis del monoestrato celular era completa (Fig. 15).



**Fig. 14 Lisis de células MA-104
5días post-infección.**



**Fig. 15 Lisis de células MA-104
7días post-infección.**



7.0 DISCUSIÓN

El moquillo canino, está considerado como una de las enfermedades infecciosas más importantes en medicina veterinaria, y todos los perros de cualquier edad son susceptibles. Los perros que no reciben vacunación periódica pueden perder su protección e infectarse después de un estrés, inmunosupresión o por el contacto con animales enfermos y aunque la inmunidad al moquillo canino es prolongada, va perdiendo eficacia, por lo que es necesaria la revacunación.

El diagnóstico de moquillo canino se basa principalmente en la sospecha clínica, y suele realizarse con base en los signos e historia clínica. Los signos y síntomas de la enfermedad son variables, de un animal a otros, pudiendo estar presentes algunos y otros no, por lo que en muchos casos tiende a confundirse con otras enfermedades, (por ejemplo: parvovirus, sarampión) que pueden cursar con síntomas semejantes [Appel et al 2008].

Se han utilizado múltiples líneas celulares para el aislamiento y estudios diversos del VMC, entre ellas las células VERO, MDCK, B95a, SPF, y macrófagos alveolares; pero las células MDCK y VERO son las que se utilizan con mayor frecuencia, ya que el aislamiento en estas líneas celulares es más comercial y menos costoso, pero tiende a ser mucho más prolongado (hasta 72 días) [Hernández V 2009].

En estas líneas celulares los resultados son diversos, en algunas el ECP se hace visible a los pocos días post-infección y se extiende hasta los 6 o más días post-infección, en otras líneas se recurre a pasajes ciegos en donde la presencia del virus no es visible; lo cual no es tan conveniente si se pretende utilizar como diagnóstico rápido y de rutina [Hernández V. 2009, Saito et al 2006, Zhao et al 2008].



Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden compararse con los ya reportados, destacando que en la línea celular MA-104 a las 24 h post-infección el ECP comenzó a ser evidente, y no se recurrió al pase ciego. Lo cual disminuye considerablemente el costo del procedimiento.

La línea celular B95a, modificada con el virus de Epstein-Barr, es una de las más utilizadas para el aislamiento de este virus; esta línea celular bajo condiciones óptimas tarda 3 días en formar el monoestrato celular adecuado para poder infectarlas con el VMC, y se tienen datos de que el ECP se hace visible a las 24 h post-infección, mientras que los sincitios aparecen al tercer día; una desventaja es que esta línea produce también el virus de Epstein-Barr y debe manejarse como material infeccioso en todo momento [Zhao et al 2008]. En comparación con las células MA-104 que no presentan este riesgo de infección por no producir el virus de Epstein-Barr y por lo tanto su manejo es menos complicado y peligroso. Además de que a las 48 h post-descongelación el monoestrato celular estaba formado.

Para el crecimiento y producción del VMC se prefiere a las células MDCK, ya que si se somete a pruebas de detección del VMC, en éstas se detecta primero que en las células VERO; pero las células VERO son utilizadas y preferidas para desarrollar el ECP causado por el VMC. Todo esto ha sido evidenciado y comprobado con ayuda de IF y PCR-TR [Elia et al 2006]. El ECP en las células MDCK se manifiesta normalmente alrededor de un mes pos-infección, en tanto que en las células VERO tarda cerca de 40 días en manifestarse; por lo que es necesario buscar líneas celulares más permisivas, la línea MA-104 resulta ser una opción viable tanto para observar el ECP el cual comenzó a ser evidente a las 24 h post-infección, así como para la producción del virus ya que el procedimiento de infección se detuvo a las 72 h ya que si se dejaba más tiempo era imposible la cosecha del virus del monoestrato celular.



Algunas infecciones virales provocan cambios característicos en el aspecto y las propiedades de las células [Lant et al 2005], estos cambios que causan algunos virus a las células *in vitro* (en cultivo) pueden ser intensos ó precoces, ocasionando la muerte celular en 24 o 48 horas, acompañada de lisis fácilmente observable al inspeccionar los cultivos celulares con el microscopio [Martínez 2009]. El ECP que produce el VMC en diferentes líneas celulares se produce en varias etapas:

En la primera etapa hay formación de gránulos en el citoplasma acompañados de pequeñas vacuolas; en la siguiente se observa el redondeamiento de células y separación entre célula-célula; en una tercera etapa se hace evidente la formación de sincitios y en la última etapa hay lisis celular [Pérez et al 1993].

El VMC contiene dos glucoproteínas: una hemaglutinina (H) y una proteína de fusión (F); estas dos facilitan la unión del virus a las membranas celulares; la hemaglutinina tiene una interacción específica con el receptor celular y es importante para la liberación de las partículas virales. La proteína F facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana y además también es responsable de la formación de sincitios, lo cual le permite al virus diseminarse. Las proteínas H y F, inducen la producción de anticuerpos neutralizantes [Acevedo 2003, Hernández V 2009, Prinlge et al 1999]. Este virus posee además una proteína de matriz (M), que es importante para la maduración viral, y sirve como enlace entre la nucleocápside y las proteínas de superficie (H y F) [Barret 1999]; la nucleocápside (NP) que provee protección al genoma, una transcriptasa (L), y una polimerasa (P) encargadas de la transcripción del RNA [Hernández V 2009]. La razón por la que hay presencia de ECP es por que durante la infección viral hay inhibición de ácidos nucleicos y proteínas celulares [Martínez 2009].

Las células MA 104 utilizadas para el presente proyecto, son utilizadas para el estudio de la infección por rotavirus principalmente [Jolly et al 2001]; sin embargo los



resultados indican que esta línea celular podría ser utilizada para el aislamiento y diagnóstico rutinario del VMC, ya que su adaptación celular fue excelente; y tiene buena sensibilidad ya que evidencia el ECP entre los 2 y 5 días post-infección.

Las células MA-104 son de fácil adquisición, su costo es accesible; su mantenimiento es común, como el de cualquier otra línea celular, además de que no presentan riesgo biológico de infección para la persona que las trabaja o las manipula.

Su adaptación y crecimiento es muy fácil y rápido, así como la formación del monoestrato celular. El efecto citopático en estas células característico del VMC se puede observar desde las 24 hrs. post-infección, llevando a la lisis total a los 4 días pos-infección; lo cual es una gran ventaja ya que comparando con otras líneas celulares utilizadas rutinariamente el ECP se hace presente a los 3 días en algunas de estas, y en algunas otras se recurre a pases ciegos y otras técnicas, que por lo general utilizan la IF para evidenciar la presencia del virus, lo cual incrementa los costos del procedimiento.



8.0 CONCLUSIONES

1. La adaptación de las células MA 104 al medio de cultivo RPMI 1640 fue posible.
2. Se confirmó en primer instancia con la adherencia de las células al soporte de poliestireno, seguido por la rápida formación del monoestrato celular el cual se logró en muy poco tiempo, 24 h post-descongelación.
3. Se mantuvieron constantes las variables de temperatura y pH trabajando en condiciones controladas; una incubación a 37 °C y con pH 7.0 para el medio de cultivo, condiciones recomendadas en la literatura; lográndose el mantenimiento de las células en buenas condiciones tanto de adherencia y morfología, para poder realizar los pases celulares y su posterior infección con el VMC.
4. Se realizó el monitoreo las células (control e infectadas), destacando que la interacción virus-célula sí ocurrió, esto se confirma por el ECP observado
5. Con todo lo anterior se abre un panorama de oportunidades para poder utilizar las células MA-104 en trabajos posteriores tanto de investigación para estudiar al virus, y a las mismas células.
6. Se plantea utilizar estas células para realizar el diagnóstico de VMC en muestras clínicas de animales sospechosos y poder ofrecerles una mejor calidad de vida si este es oportuno.



9.0 REFERENCIAS

1. Acevedo GRM. (2003). *Respuesta inmune contra moquillo*. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. FESC UNAM.
2. Appel MJG, Summers BA. (2008) *Estado actual del distemper canino*. En Carmichael L. (Ed.) *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. [En línea] http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/appel_es/chapter_frm.asp?LA=2 [Consultado el 26 de mayo de 2010].
3. ATCC. (2010) Descripción del producto CRL-2378.1. [En línea] <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2378.1&Template=cellBiology> [Consultada el 26 de mayo de 2010].
4. Barrett T. (1999). *Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnívoros*. Vet. Microbiol. Vol. 69, No. 1-2. pp. 3-13.
5. Bolaños U.I, Yañez L.C.G. (2007). *Efecto promotor en líneas celulares (BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD) por extractos de caléndula officinalis*. Tesis licenciatura QFB. FESC UNAM.
6. Coll M.J. (1993). *Técnicas de diagnóstico en virología*. Ed. Díaz de Santos. España.
7. Cohen G. Trad. Bozal JED (1973). *Metabolismo celular y su regulación*. Ed. Omega. España
8. Crespo MP. (2000). *El diagnóstico viral por el laboratorio*. Col Médica. Vol. 31, No. 3 pp. 135-150.
9. Elia G. (2006). *Detection of virus distemper canino in dogs by real time RT-PCR*. J. Virol Methods. Vol. 136, pp. 171-176.
10. Escriba PV. (2009). *Cultivos celulares: Métodos y técnicas de estudio en biología celular*. **Universidad de Barcelona, España**. [En línea] <http://www.uib.es/depart/diba/cellbiology/cultivos!20celulares.ppt> [Consultada el 01 de junio de 2010].
11. Fauquet CM., Mayo J., Maniloff U., Desselberger U., Ball LA. (2005). *Virus taxonomy. 8th. Report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier.
12. Fenner F, (1992). *Virología veterinaria*. Ed. Acribia. España.
13. Freshney RI. (2005). *Culture of animal Cells a manual of basic technique*. 5a ed. Ed. Wiley liss.USSA.
14. Frisk AL. König M, Moritz A. (1999). *Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper*. J. Clin. Microbiol. Vol. 37 No. 11, pp. 3634-3643.
15. Grandjean D. y Vaissaire JP. (2003). *Enciclopedia del perro*. Aniwa Publishing Francia.
16. Greence CE, Appel MJ. (2000). *Moquillo canino, en Enfermedades infecciosas de perros y gatos*. 2a. ed. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill, México, pp.11-25.



17. Guerrero CA, Calderón MN, Acosta O y Guzmán F, (2008). *Interferencia de la infección por rotavirus mediante la inhibición de la actividad de la proteína disulfuro isomerasa (DPI) de la membrana celular de las líneas MA104 y Caco-2*. REVISTA DE MEDICINA. Vol. 30 No. 4 (83) [En línea] <http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/Academ300408/Premioareadeciencia.htm> [Consultada el 26 de mayo de 2010]
18. Hasmish C. (1975) *Virología de cultivos de tejidos*. Ed. El manual moderno. México. pp. 28-39.
19. Hernández A. (1987). *Distemper canino. estudio recapitulativo*. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. FESC. UNAM.
20. Hernández VAM, Mendoza ES, Martínez LA. *Uso de células MA-104 para el aislamiento de VCM de casos clínicos*. Publicación en proceso.
21. Hernández VAM. (2009). *Evaluación del efecto terapéutico del Factor de transferencia específico (Fte) sobre parámetros inmunológicos en cachorros infectados experimentalmente con virus de moquillo canino (VMC)*. Tesis de maestría FESC UNAM.
22. Hitoshi N., Auki K., Kiyohiko A., Yoghito O., Massami M., Ken M. (2009). *Establishment of canine and feline cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule for canine distemper virus study*. Vet. Microbiology Vol. 133. p. 179-183.
23. Inchaustegui SM. <http://clasedevirologia.blogspot.com/> [Consultada el 26 de mayo de 2010.]
24. Jan TS. (2004). *A manual for primary Human cell culture*. Ed. Wold Scientific. Singapore. pp. 86-96.
25. Jolly C. et-al. *Selection of Rotavirus VP4 cell receptor binding domains for MA-104 cells using a phage display library*. Vol. 98- No. 1. pp. 41-51. 2001.
26. Koneman E. (1999). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color*. 5a ed. Ed. Panamericana. México pp. 1198.
27. Lant NT., Yamaguchi R., UchidaK., Sugano S., Tateyama S. (2005). *Growth profiles of recent canine distemper isolates on VERO cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)*. J. Comp Pathology. Vol. 133 pp. 77-88.
28. Lednicky JA., Meehan TP., Kinsel MJ., Dubach J., Hunderford LL., Sarich NA., Witecki KE., Braid MD., Pedrak C., Houde CM. (2004). *Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and VERO cells without nucleotide sequence changes within the entire hemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes*. J. of Virological Methods. Vol. 118 pp. 147-157.
29. Martella V. (2007). *Genotyping canine distemper virus (CDV) by a heminested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks*. Vet. Microbiol. Vol. 122 pp. 32-42.



30. Martínez Manrique CE. (2005) *Modulación de la respuesta inmune. Tendencias vigentes*. MEDISAN Vol. 9 No. 3. [Artículo en línea]. http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol9_3_05/san06305.htm [Consultada el 26 de mayo de 2010].
31. Mascaró L. (1975). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos epizootiología, inmunología, profilaxis y terapéutica*. Ed. Albatros. Argentina. pp. 164-167.
32. Mendoza ESE., Alvarado JL., Hernández BE., Cíprían CA. (2008). *Manual de diagnóstico virológico*. FESC. UNAM, México.
33. Mohanty BS. Trad. Colchero AF. (1983). *Virología veterinaria*. Ed. Interamericana. México. pp. 235-237.
34. Morgan SJ., Darling DC. (2002). *Cultivo de células animales*. Ed. Acribia. España.
35. Moss WJ., Griffin D. (2006). *Global measles elimination*. Nature Reviews Microbiology. Vol. 4, No. 3, pp. 900-908. [Artículo en línea] http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n3/box/nrmicro1550_BX1.html [Consultada el 04 de junio del 2010].
36. Nishi T, K. Tsukiyama-Kohara. (2004). *Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus*. Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Disease. Vol 24. pp. 445-455.
37. Nuñez MF., Rodríguez MK. (2007). *Infecciones virales de interés médico*. Tesis de licenciatura QBF. FESC. UNAM.
38. OMS. (2006). *Manual para el diagnóstico de laboratorio de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola*. [Versión electrónica] http://www.who.int/immunization_monitoring/LabManualFinalSpanishV.pdf. [Consultada el 26 de mayo de 2010]
39. Pérez S., Iturbide R., Saldivar E. (1993). *Caracterización del virus del distemper canino (moquillo canino) en cultivos celulares aislado de animales clínicamente enfermos*. Vet. México. Vol. 24. No. 1. pp.15-19.
40. Plattet P., Zweifel C., Wiederkehr C., Bellot L., Cherpillod P., Zuebriggen A., Wittek R. (2004). *Recovery of persistent canine distemper virus expressing the enhanced green fluorescent protein from cloned cDNA*. J. Virus Res. Vol. 101. No. 2. pp. 147-153.
41. Plattet P., Rivals JP., Zuber B., Brunner JM., Zurbriggen A., Wittek R. (2005). *The fusion protein of wild-type canine distemper virus is major determinant of persistent infection*. Journal Virology. Vol. 337, No. 2 pp. 312-326.
42. Pringle CR. (1999). *The universal system of virus taxonomy, update to include the new proposals ratified by the International Committee in Taxonomy of Viruses during*. Arch. Virol. Vol. 144. No. 2. pp. 421-429.
43. Reina M. (2010a). *Introducción al cultivo celular*. **Universidad de Barcelona, España**. [En línea] <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm> [Consultada el 26 de mayo de 2010]



44. Reina M. (2010b). *El laboratorio de cultivo celular*. **Universidad de Barcelona, España**. [En línea] <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap2.htm> [Consultada el 26 de mayo de 2010].
45. Saito TB., Alfieri AA., Wosiacki SR., Negrao FJ., Morais HS., Alfieri AF. (2006). *Detection of canine distemper virus by reverse Transcriptasa-Polymerase Chain Reaction in the urine of dog with clinical signs of distemper encephalitis*. *Res Vet. Sci.*; Vol.80, No. 1, pp. 116-119.
46. Sánchez Vizcaíno JM. (2004). *Sanidad Animal*. **Universidad Complutense de Madrid, España**. [En línea] <http://www.sanidadanimal.info/sanidadanimal/es/cursos-mainmenu-86/inmunologporcina-mainmenu-76.html>. [Consultada el 26 de mayo de 2010].
47. Stephen J., Ettingen., Feldman E. (2007). *Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y gato*. 6a. Ed. Vol. I. Ed. Elsevier. España.
48. Zhao J. (2008). *Genetic variations and cellular receptors of canine distemper virus-a review*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. Vol. 48. No. 7. pp. 986-991.