

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN FIBROBLASTOS DE EMBRION
DE POLLO INFECTADOS CON UN PARAMIXOVIRUS PORCINO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

ADRIANA MARIA SALAZAR MONTES

D I R E C T O R E S

MVZ. MARIO ALBERTO RAMÍREZ HERRERA

MVZ. MARIA LUISA MENDOZA MAGAÑA

GUADALAJARA, JAL. ENERO 1992

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN FIBROBLASTOS DE EMBRION DE POLLO INFECTADOS
CON UN PARAMIXOVIRUS PORCINO.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A
ADRIANA MARIA SALAZAR MONTES

D I R E C T O R E S
MVZ MARIO ALBERTO RAMIREZ HERRERA.
MVZ MARIA LUISA MENDOZA MAGANA.

Abreviaturas.

SOA	Síndrome de Ojo Azul.
VSOA	Virus de Síndrome de Ojo Azul.
PK-15	Línea celular de riñón de cerdo.
BHK	Línea celular de riñón de hamster sirio.
TB	Células turbinadas de bovino.
RPM	Revoluciones por minuto.
RPMI-1640	Medio de modificación de McCoy 5A.
pH	Potencial de iones Hidrógeno.
M	Molar.
ml	Mililitros.
cel/ml	Células por mililitro.
°C	Grados Celcius.
hrs	Horas.
H-E	Hematoxilina-Eosina.
N-A	Naranja de Acridina.
DL ₅₀	Dosis letal media.
FEP	Fibroblastos de embrión de pollo.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
RNA	Acido rinonucleico.
SV-5	Virus sincitial respiratorio.
HA	Hemoaglutinación.
P.M.	Proporcion de mortalidad.
T.N.	Tasa de Mortalidad.
T.S.	Tasa de Supervivencia.
TL.M.	Total de Muertes.
TL.S.	Total de Supervivencia.
P	Proporción.
PTJ	Porcentaje.

A MIS PADRES

AGRADEZCO A MIS DIRECTORES Y ASESORES:

M.V.Z. Mario Alberto Ramírez Herrera.

M.V.Z. María Luisa Mendoza Magaña.

**los conocimientos que a su lado obtuve.
muchas gracias por todo.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE PATOLOGIA E
INMUNOPATOLOGIA DEL AREA DE INVESTIGACION CIENTIFICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
JUSTIFICACION	7
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
DIAGRAMA DE FLUJO	14
RESULTADOS	15
DISCUSION	18
BIBLIOGRAFIA	21
CARTA DE ACEPTACION DE TESIS	24
CARTA DE TERMINACION DE TESIS	25

NOTA: Parte de este trabajo fué presentado en el XXXIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLOGICAS que se celebró en Julio de 1990 en esta ciudad.

RESUMEN

Los cambios morfológicos que producen los virus en células en cultivo, son característicos de acuerdo a la familia a la que pertenece el virus, además son parte del comportamiento biológico de estos. Recientemente se descubrió un paramixovirus causante de infección en cerdos, que afecta principalmente al sistema nervioso central, aunque también afecta a los aparatos respiratorio, reproductor y reticuloendotelial. La enfermedad producida por este virus se conoce como "Síndrome de Ojo azul", el cual se manifiesta por opacidad de la córnea, aunque no es el signo más importante. Las alteraciones de tipo nervioso en lechones causan la muerte y dificultan el diagnóstico clínico ya que otras enfermedades del cerdo son similares a esta. Los objetivos de este trabajo son: describir el efecto citopático causado por el VSOA en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, calcular la DL_{50} y titular la cosecha viral por HA. Se emplearon fibroblastos de embrión de pollo y se inocularon con diluciones del virus obtenido de cerebro de cerdos infectados en brotes naturales, previo diagnóstico diferencial por HA e inmunofluorescencia directa. A las 48, 72 y 96 horas postinfección se fijaron las células y se tizaron con la técnica de H-E y N.A. Los fibroblastos mostraron a las 48 hrs. marcado redondeamiento en las diluciones más bajas, a las 72 hrs. se observó tendencia a la fusión celular y grandes agregados celulares y a las 96 horas se observaron cuerpos de inclusión eosinofílicos de ubicación citoplásmica similares a los producidos por otros paramixovirus. Las diluciones más altas mostraron ligero redondeamiento y agregados celulares así como vacuolizaciones. En base a lo anterior es necesario realizar pruebas inmunocitoquímicas para determinar la naturaleza de los cuerpos de inclusión encontrados y del punto de vista biológico este virus se comporta muy similar a otros paramixovirus (Newcastle, sarampión, parotiditis). Finalmente el cultivo de fibroblastos puede auxiliar en la identificación y aislamiento de este virus.

INTRODUCCION

Síndrome del Ojo Azul (SOA), nombre con que se designó a la enfermedad observada en cerdos en 1980, es una entidad patológica de etiología viral que produce opacidad de la córnea (1-3).

Quizas SOA no es el término más adecuado para esta enfermedad ya que la opacidad de la córnea es de presentación variable mientras que el daño en encéfalo es más constante (4).

Se describió por primera vez en La Piedad Michoacán y ha sido el principal foco de infección y se diseñó a varios estados del país (1,2,5,6). El SOA ha ocasionado considerables pérdidas económicas en las granjas en las que se presenta.

El cerdo es la única especie en que se ha detectado la enfermedad naturalmente aunque experimentalmente puede infectar ratones, conejos, y embrión de pollo (4). Pero se desconoce si infecta otras especies en forma natural. Afecta tanto sementales como hembras en gestación, cerdos en desarrollo, y lechones.

Se ha propuesto que el agente etiológico es un paramixovirus debido a que sus características generales se semejan a las de estos.

Los síntomas que caracterizan a esta enfermedad son: encefalomielitis, opacidad de la córnea en la mayoría de los casos unilateralmente, midriasis, ceguera, conjuntivitis, parálisis de miembros posteriores, ataxia e incoordinación motora, postración, pelo erizado, excitabilidad general, convulsiones y muerte (2,3,5,10,12-14).

En hembras causa falla reproductiva, retorno a estro, momificación de fetos, partos con mortinatos y probablemente aborto, anorexia, depresión, letargia así como opacidad de la córnea (2,10,12).

En sementales provoca orquitis tanto unilateral como bilateralmente,

atrofia del testículo reduciendo su tamaño hasta un 75%, epididimitis bilateral a nivel de cabeza con formaciones quísticas fácilmente detectables y baja motilidad espermática (8).

Se puede aislar este virus de encéfalo, ganglios linfáticos y pulmones ya que son los tejidos en que principalmente se localiza.

ANTECEDENTES

Morfologicamente por microscopía electrónica el agente causante del SDA se ha descrito como partículas virales de aproximadamente 165 nm, de una simetría helicoidal, presenta espinas sobre la envoltura externa, observadas por medio de tinción negativa de sobrenadantes de cultivo celular infectado (9,14).

Electroforéticamente se han encontrado por lo menos 4 proteínas de envoltura de las cuales una tiene actividad hemoaglutinante y otra neuroaminidasa, una proteína de fusión y dos proteínas más asociadas a la envoltura (5,7).

Es sensible a solventes orgánicos como éter y cloroformo (13), lo que lo ubica como un virus con envoltura lipídica. Es resistente a la actinomicina D lo que sugiere que contiene RNA en su genoma (8,4) y no posee transcriptasa inversa (5,7). Tiene capacidad de aglutinar eritrocitos de diversas especies así como elución de dicha aglutinación a 37°C debido a la presencia de dos de sus proteínas de envoltura la hemoaglutinina y neuroaminidasa (13).

La infección experimental en ratones inoculados por vía intracerebral causa la muerte de 3 a 5 días postinoculación con presentación de signos nerviosos (5).

Se propaga bien en cavidad alantoidea de embrión de pollo de 8-10 días de edad, causa muerte de los mismos entre 6 y 8 días postinoculación y el virus cosechado de líquido alantoideo se puede titular por hemoaglutinación (H.A) (15), al inocularlo por saco vitelino los embriones mueren a los 3 a 4 días postinoculación y al igual que la inoculación en cavidad amniótica solo se ha titulado por hemoadsorción y efecto citopático en cultivo celular (5).

Produce efecto citopático en líneas celulares de riñón de cerdo (PK-15), riñón de hamster sirio (BHK), Vero, células turbinadas de bovinos (TB), el cual se ha descrito como redondeamiento y agregación de células y por lo tanto formación de sincitios, por lo que probablemente posee una proteína de fusión como otros paramixovirus. En PK-15 se ha descrito la formación de cuerpos de inclusión citoplásmicos eosinofílicos, sin embargo no se ha encontrado este efecto en otras líneas celulares (1,10-13, 16).

Inmunológicamente no reacciona con conjugados fluorescentes contra Aujeszky, cólera porcino y encefalitis hemaglutinante, enfermedades al igual que ésta afectan al sistema nervioso central lo cual indica que sus propiedades antigénicas son diferentes (13). Asimismo no tiene relaciones inmunológicas con otros paramixovirus que atacan a otras especies animales (5,6,8,9,13).

Existen otros paramixovirus que al infectar cultivos celulares producen efecto citopático muy similar al que presenta el virus del SDA.

El virus del sarampión puede infectar líneas celulares de epitelio humano, células diploides humanas y cultivos primarios de simios y riñón de bovino.

Por otra parte líneas celulares como la HeLa, células de bovino, equino, riñón de conejo y células de embrión de pollo son buen soporte para la multiplicación del virus de la parainfluenza.

El cultivo del virus de la parotiditis se realiza en células de embrión de pollo y muchos tipos de células de mamíferos, las cuales soportan la multiplicación del virus.

El virus de Newcastle se propaga en células de riñón de mono, HeLa, de riñón de ternera y muchos otros tipos.

Por otra parte el virus SV-5 canino se replica en cultivo primario de riñón de perro, mono rhesus y renales de embrión humano.

Estos paramixovirus producen efecto citopático semejante en los tejidos en que se cultivan; los cambios observados son redondeamiento de células, fusión celular, cuerpos de inclusión citoplásmicos eosinofílicos y células multinucleadas. En algunas líneas el efecto citopático es solo visible microscópicamente y en otras es solamente detectable por hemoadsorción (17).

Moreno y col. y Martínez y col. han realizado varios trabajos de cultivo celular con diferentes líneas y que se ha reportado lo siguiente: En la línea celular PK-15 infectada con VSDA se observó efecto citopático que consistió en células muertas, y algunas de gran tamaño y el monoestrato ya no proliferó. Observaron también cuerpos de inclusión eosinofílicos (5,9).

Por otra parte al octavo pase en células TB el efecto citopático consistió en células redondeadas, agrupación de las mismas y desprendimiento de grupos de células, en general a las 48 hrs. se observa destrucción de monoestrato en un 60-70% .

En las células MDBK el monoestrato mostró efecto citopático a los 7 días postinoculación que consistió en células arrugadas y estrelladas, espacios sin células en el monoestrato, células flotando, en general destruido en un 80%, con aspecto reticular (5,9,14).

J U S T I F I C A C I O N

Debido a que solamente hay estudios de propagación del virus, dosis letal media y caracterización del efecto citopático en cultivo de líneas celulares más no en cultivo primario, el cual es muy utilizado en la propagación del virus. Por lo tanto se realiza este trabajo para contribuir a la descripción de las características biológicas del virus y conocer la utilidad de los fibroblastos de embrión de pollo para propagar este virus.

H I P O T E S I S

Si el virus del Síndrome del Ojo Azul es un paramixovirus, entonces causa efecto citopático similar al causado por los paramixovirus en las células adecuadas.

O B J E T I V O S

- 1.- Describir el efecto citopático causado por el virus del SOA en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo.**
- 2.- Calcular la dosis letal media necesaria para provocar la muerte en estas células.**
- 3.- Obtener el virus directamente de cultivo celular y titularlo por hemaglutinación.**

MATERIAL Y METODOS

Cultivo Celular.- Los fibroblastos se obtuvieron de embriones de pollo de 9 días de edad los cuales fueron donados por la incubadora INFANZON la cual mantiene un estricto control sanitario y desarrollo embrionario de los mismos.

Virus para infección.- El virus para la infección de las células se obtuvo de homogenado de cerebro al 20% de cerdos positivos a Ojo Azul que daban mayor título hemaglutinante (15). Se usaron cerebros de cerdos de diferentes brotes naturales: El primero de una granja de Tepatitlán Jalisco y el otro de La Piedad Michoacán, se centrifugaron a 3000 RPM por 20 minutos y fueron filtrados en membrana de 0.44 y 0.22 micras de diámetro, se agregó antibiótico 50 μ /ml.(Gentamicina) y antimicótico (Nistatina) 50 μ /ml.

Medio de Cultivo.- Se utilizó RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 5%, antibiótico y antimicótico. Después de la infección se utilizó el medio con suero fetal bovino al 2%.

Preparación del cultivo celular.- El cultivo se realizó en un cubículo equipado con campana de flujo laminar. A los embriones de pollo se les desinfectó el cascarón con alcohol al 70%, por la cámara de aire se abrió con unas tijeras, se desprendieron las membranas y se extrajo el embrión, se decapitó y evisceró, el cuerpo se hizo pasar por una jeringa varias veces hasta obtener una suspensión inicial de tejido el cual fue lavado con solución amortiguadora de fosfatos estéril pH 7.2 0.1 M hasta eliminar la mayor cantidad de sangre, posteriormente se agregó 2

ml tripsina al 1% con agitación a 37°C durante 30 min. para lograr una completa dispersión. Se detuvo la actividad de la tripsina con suero fetal bovino al 5% y se filtró con una gasa estéril para retener material de mayor tamaño. Se centrifugó a 2000 RPM durante 15 min. para obtener el paquete celular. El botón de células obtenidas se resuspendió en el medio de cultivo en concentración de 1×10^6 cel/ml de medio y se sembraron en tubos leighton que contenían un cubreobjetos. Se incubaron a 37°C y se revisaron diariamente. Ya que el monoestrato se encontró al 80 % de crecimiento se procedió a infectar las células (16, 19, 20).

Inoculación del virus.- Se realizaron 3 repeticiones del experimento y en cada uno se inocularon 52 tubos con células crecidas previamente y se infectaron con diluciones del virus de Tepatitlán y del virus de La Piedad. Seis tubos con homogenado de Tepatitlán y seis con homogenado de La Piedad (que se tomaron como testigos positivos) y los restantes se dejaron sin inocular como testigos negativos. Las diluciones que se inocularon fueron dobles seriadas y se tomaron las siguientes: 1/20, 1/80, 1/160, 1/640 y 1/2560. A cada tubo se le inoculó 0.2 ml de la dilución respectiva y se incubó a 37°C durante 30 minutos para permitir la adsorción del virus a las células y posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos para eliminar el virus que no fue adsorbido a las células. Se les colocó nuevamente medio de cultivo y se mantuvieron a 37°C hasta su sacrificio.

Fueron sacrificados a 3 tiempos : 48 , 72, y 96 hrs. A cada tiempo un tubo de cada dilución, dos controles positivos, y dos controles

negativos, se cosecha el sobrenadante en frascos estériles y las células se fijan con formaldehído al 10% en solución amortiguadora de fosfatos por una hora para posteriormente teñirlas con hematoxilina-eosina (H-E), los controles (positivos y negativos) con H-E y otros con naranja de acridina (18).

Se montaron en portaobjetos con resina sintética las laminillas teñidas con H-E y fueron observados al microscopio óptico para analizar el efecto del virus y se procedió a tomar fotografías.

Las teñidas con naranja de acridina se montaron con glicerina bufferada pH 9 y se observaron en fotomicroscopio de epifluorescencia y al igual que el anterior se tomó fotografía.

Titulación de la cosecha.- Con los sobrenadantes cosechados se realizó la prueba de hemaglutinación la cual se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, se utilizó una suspensión de eritrocitos de ratón al 0.5% y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (15). Para establecer los valores de significancia entre los resultados obtenidos, se utilizó la prueba de Análisis de Varianza.

Dosis Letal Media.- La DL_{50} se obtuvo por la prueba de Reed-Muench en el que se analizan las diluciones en las que se encontraron los límites superior e inferior al 50% de muerte celular. Y se aplicó la siguiente

fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad de la dilucion arriba del } 50\% - 50\% \text{ distancia propor}$$
$$\% \text{ de mortalidad de la dilucion arriba del } 50\% - \% \text{ de cional.}$$
$$\text{mortalidad de la dilucion debajo del } 50\%.$$

Resulta la dilución del virus necesaria para matar al 50% de las células.

a) logaritmo negativo de la dilución menor siguiente al 50% de mortalidad.

b) distancia proporcional como logaritmo de la DL_{50} .

La distancia proporcional corresponde a una mortalidad del 50% que se sitúa entre las dos diluciones (17).

DIAGRAMA DE FLUJO

Muestra de encéfalo de cerdos sospechosos de SOA



Diagnóstico por Inmunofluorescencia de Aujeszky y Cólera Porcino y Hemoaglutinación.



Preparación de cultivo celular de fibroblastos de embrión de 9 días de edad.



Infección del cultivo con diluciones dobles seriadas del homogenado de cerebro positivo a ojo azul en volumen 0.2ml. por tubo de las diluciones



Observación del efecto citopático en células.



Tinción con H.E. y N.A.



Microfotografía



Cálculo de DL 50 de actividad vírica por Reed-Münch.



Titulación de cosecha de sobrenadante por H.A.



Análisis estadístico

RESULTADOS

La recolección de datos para resultados concernientes a los cambios morfológicos en las células se inició a las 48 hrs postinfección. Los testigos negativos quedaron sin inocular y en estos las células crecieron y presentaron una monocapa homogénea. Fotografía No. 1.

Los testigos positivos a SOA que se inocularon con homogenado al 20% de cerebros de cerdos presentaron un efecto citopático marcado consistente en redondeamiento celular, aglutinación de las mismas, fusión celular, inclusiones citoplásmicas, grandes sincitios y muerte celular observada como desprendimiento de las mismas. Fotografía No. 2.

En la dilución 1/20 la monocapa presentó severos daños observados como redondeamiento celular en la mayor parte del cultivo, además hay aglutinación marcada de las mismas por consiguiente espacios libres de células en la monocapa y muchas células se encontraron flotando muertas.

Existen cuerpos de inclusión citoplásmicos eosinofílicos en la mayoría de las células. Fotografías 3, 4 y 5.

Las células infectadas con dilución 1/80 muestran redondeamiento y agregados celulares, células gigantes y sincitios mas pequeños. Asimismo se observan en algunas células cuerpos de inclusión y vacuolización citoplásmica. Fotografías Nos.6 y 7.

El daño causado por el virus con la dilución 1/160 se observa también como agregados celulares y solo en algunas células se detecta redondeamiento y fusión celular, en otras se presenta vacuolización citoplásmica y pocas células desprendidas. Fotografías Nos. 8 y 9.

En la dilución 1/640 aproximadamente la mitad de las células se observan dañadas con el efecto arriba mencionado como es acúmulos celulares, redondeamiento de las células, vacuolización, células gigantes y solo en

algunas se pueden ver cuerpos de inclusión eosinófilos citoplásmicos.

Fotografías Nos. 10 y 11.

Para la dilución 1/1280 la mayor parte de las células se encuentran normales, solo algunas pocas células tienden a agruparse pero no son visibles espacios libres de células y pocas pierden sus prolongaciones y tienden a verse redondas. Se observó ligera vacuolización del citoplasma.

Fotografía Nos. 12 y 13

En la última dilución utilizada que es la de 1/2560 las lesiones causadas en las células son poco notorias, a las 48 hrs. las células se muestran normales pero ya a las 96 hrs. solo se puede observar un ligero redondeamiento en algunas de las células y escasa fusión celular. Fotografías Nos. 14, 15 y 16.

Con N.A. en el grupo testigo se observó fluorescencia amarillo-verdoso para el DNA nuclear y escasa fluorescencia en rojo para el RNA citoplásmico. Fotografía 17.; mientras en el grupo infectado se observó fluorescencia amarillo-verdoso en el núcleo y rojizo en citoplasma con distribución homogénea. Fotografías 18 y 19.

En lo que respecta a las titulaciones del sobrenadante de cultivo, podemos decir que presentan un título decreciente tal como se muestra en la gráfica No. 1 que muestra las medias de ambos aislamientos y entre estas existe diferencia significativa con una $P < 0.001$.

Por otra parte la prueba de Reed-Muench para calcular la DL50 de muerte celular nos da como resultado que la dosis letal media para el virus de Tapa es $6 \times 10^{-9.66}$ y para el virus de la Piedad es $1 \times 10^{-9.45}$ cuyos cálculos se muestran en la tabla 1.

Los porcentajes de mortalidad celular para cada una de las diluciones se muestran en la gráfica No. 2.

Con estos datos nosotros podemos notar que la mortalidad celular está relacionada con la dilución del virus con que se infectan. En las diluciones mas bajas la mortalidad es mayor y a medida que se aumenta la dilución, la mortalidad decrece.

Fig. 1.- Esta microfotografía muestra la monocapa de aspecto homogéneo formada por fibroblastos normales () H-E X 851.

Fig.2. -Se muestran FEP infectados con homogenado de cerebro de lechón infectado con VSOA al 20 % en el que se observa redondeamiento celular (*), aglutinación (), fusión celular (★), sincitios () y muerte celular () H-E X 718.

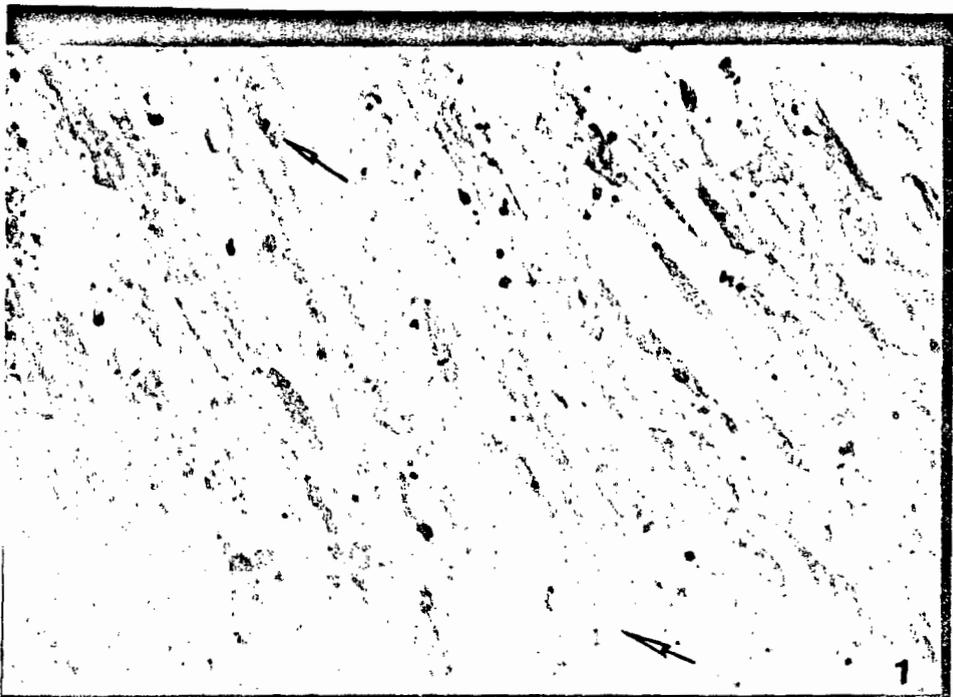


Fig. 3.- A mayor amplificación se muestra el efecto causado por el VSOA en una dilución 1/20 en el que se observa aparentes cuerpos de inclusión () H-E X 739.

Fig. 4.- .Fotomicrografía de mediana amplificación que corresponde a la dilución 1/20 donde se observa fusión celular (), redondeamiento celular () y vacuolización citoplasmática () H-E X 436.

Fig. 5.- Fibroblastos infectados con VSOA con la dilución 1/20 donde se distingue espacios libres de células ( ), células muertas () y células redondeadas () con aparentes cuerpos de inclusión citoplasmáticos () H-E X 672.

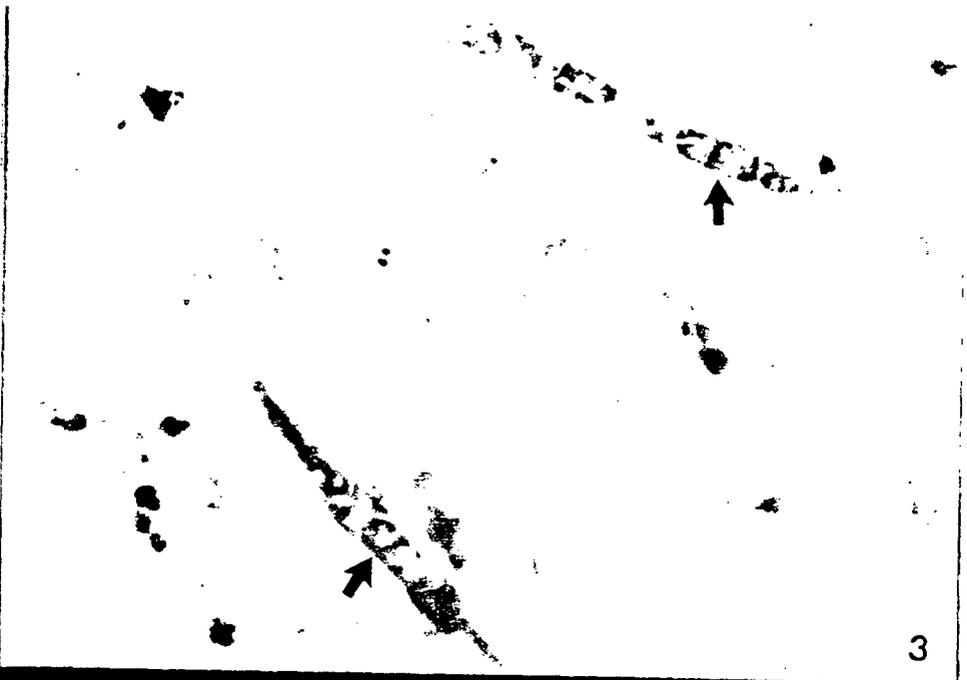


Fig. 6.- Que pertenece a la dilución 1/80 a mayor amplificación que muestra vacuolización (□) y cuerpos de inclusión citoplasmáticos (→) y grandes espacios libres de células (« ») H-E X 513.

Fig. 7.- Microfotografía de igual dilución que el anterior, se observa redondeamiento (*) y aglutinación celular (()) H-E X 369.

Fig. 8.- En mayor amplificación se observan fibroblastos infectados con VSDA en la dilución 1/160 que muestra redondeamiento celular (*) H-E X 403.

Fig. 9.- Muestra el efecto causado por VSDA en FEP se detecta agregados celulares (()) y redondeamiento (*) H-E X 515.

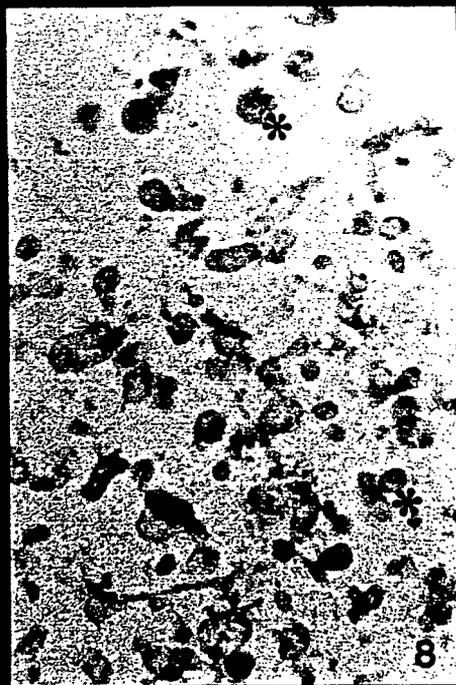
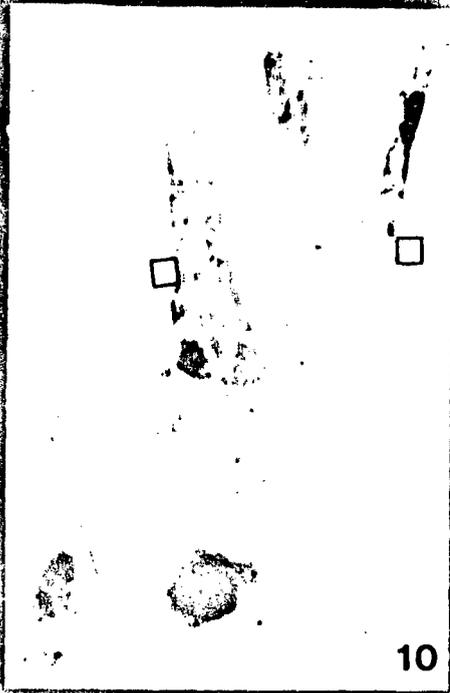


Fig. 10.- Microfotografía a mayor amplificación que corresponde a la dilución del VSDA de 1/640 donde se distingue vacuolización citoplasmática () H-E X 865.

Fig. 11.- En la dilución 1/640 se detectan algunas células aparentemente normales (), mientras que las infectadas muestran redondeamiento (*), aglutinación () H-E X 403.

Fig. 12.- Se observa el efecto causado por el VSDA con la dilución 1/1280 donde se detecta persistencia de vacuolización () H-E X 448.

Fig. 13.- Microfotografía a baja amplificación de FEP infectados con la dilución 1/1280 en la que se conserva la estructura normal de la monocapa con pequeños focos de daño celular () H-E X. 156.



10



11



12



13

Figs.- 14, 15 y 16. Fotomicrografías de FEP infectados con VSOA con la dilución 1/2560 en la que se observan las células en su mayoría aparentemente normales (\rightarrow), las células dañadas se encuentran picnóticas (\star), vacuolización (\square) y fusión celular (\star) H-E X 609, 615, 641.

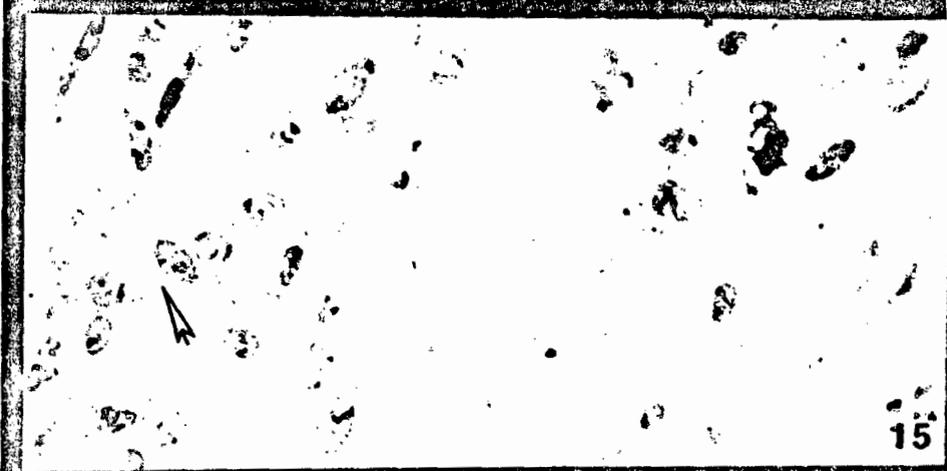
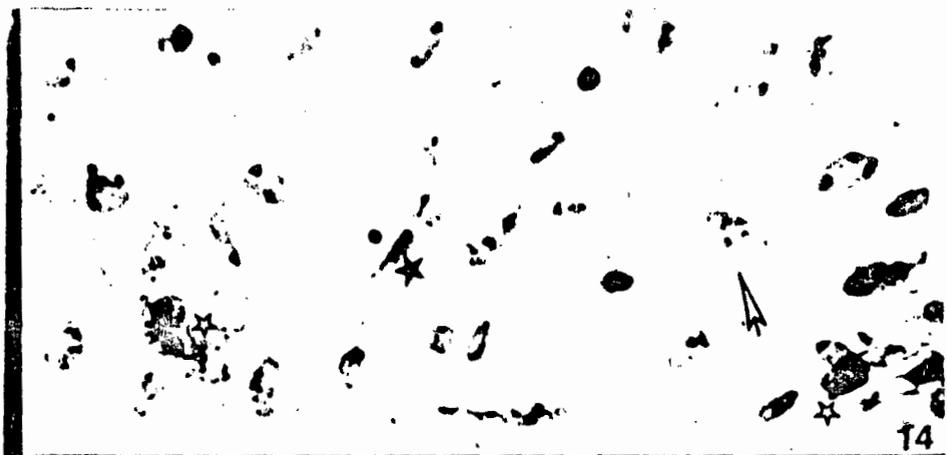


Fig. 17. . Muestra fibroblastos no infectados tejidos con N.A. con citoplasma homogéneo y nula fluorescencia rojiza (RNA cadena sencilla) en éste (★) , además muestra fluorescencia amarillo-verdoso a nivel nuclear (Ⓟ). N.A. 10X.

Figs. 18 y 19. Estas microfotografías muestran fibroblastos infectados con VSDA que exhiben un citoplasma rojizo de distribución homogénea (→) y vacuolizado (★) , sin embargo no aparecen cuerpos de inclusión a un en células fusionadas (*) , N.A. 40X y 100X respectivamente.

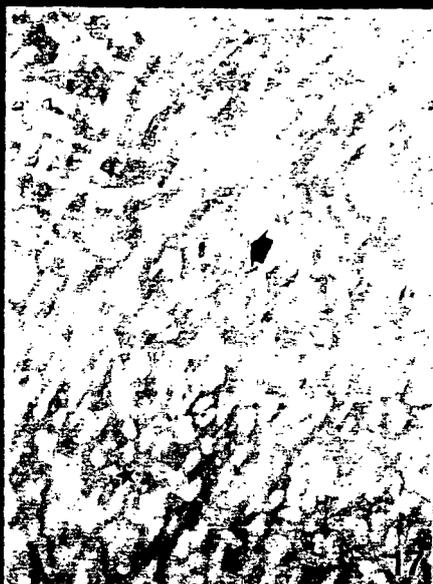


TABLA 1

Cálculo de la DL₅₀ por el método de Reed-Müench para el virus aislado de Tepatitlán, Jalisco.

DILUCION	P.M.	T.M.	T.S.	TL.M.	TL.S.	P	PTJ
1/20							
(5 X 10 ⁻²)	144/116	116	28	462	28	462/490	94 %
1/80							
(1 X 10 ⁻²)	144/97	97	47	346	75	346/421	82 %
1/160							
(6 X 10 ⁻³)	144/79	79	65	249	140	249/389	64 %
1/640							
(1 X 10 ⁻³)	144/64	64	80	170	220	170/390	43 %
1/1280							
(8 X 10 ⁻⁴)	144/55	55	89	106	309	106/415	25 %
1/2580							
(3 X 10 ⁻⁴)	144/51	51	93	51	402	51/453	11 %

Aplicando la fórmula y sustituyendo:

$$\frac{64 - 50}{64 - 43} = \frac{14}{21} = 0.66 (-1) = -0.66$$

Dilución por arriba de 50 % = 6 X 10³ el logaritmo es -3 + (-0.66) = -3.66 que finalmente se expresa como 1 x 10^{-3.66}.

Cálculo de la DL₅₀ por el método de Reed-Müench para el virus aislado de La Piedad, Michoacán.

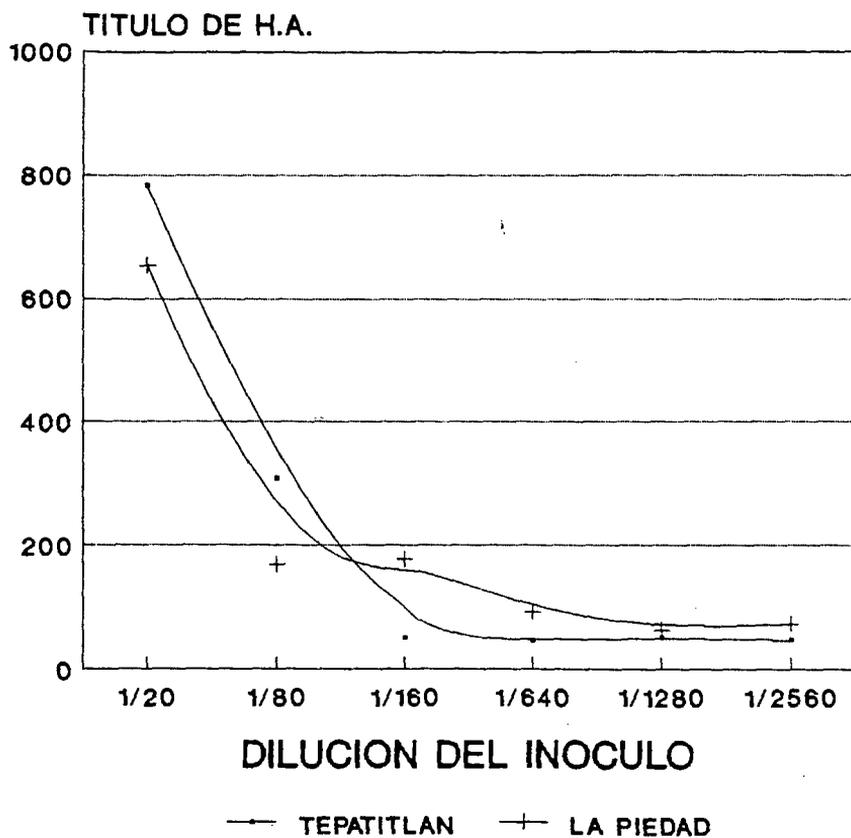
DILUCION	P. M.	T.M.	T.S.	TL.M.	TL.S.	P	PTJ
1/20							
(5 x 10 ⁻²)	144/128	128	16	562	16	562/578	97 %
1/80							
(1 X 10 ⁻²)	144/101	101	43	434	59	434/493	88 %
1/160							
(6 X 10 ⁻³)	144/96	96	48	333	107	333/440	75 %
1/640							
(1 X 10 ⁻³)	144/91	91	53	237	160	237/397	59 %
1/1280							
(7 X 10 ⁻⁴)	144/79	79	65	146	225	146/371	39 %
1/2560							
(3 X 10 ⁻⁴)	144/67	67	77	67	302	67/369	18 %

Aplicando la fórmula y sustituyendo:

$$\frac{59 - 50}{59 - 39} = \frac{9}{20} = 0.45 (-1) = -0.45$$

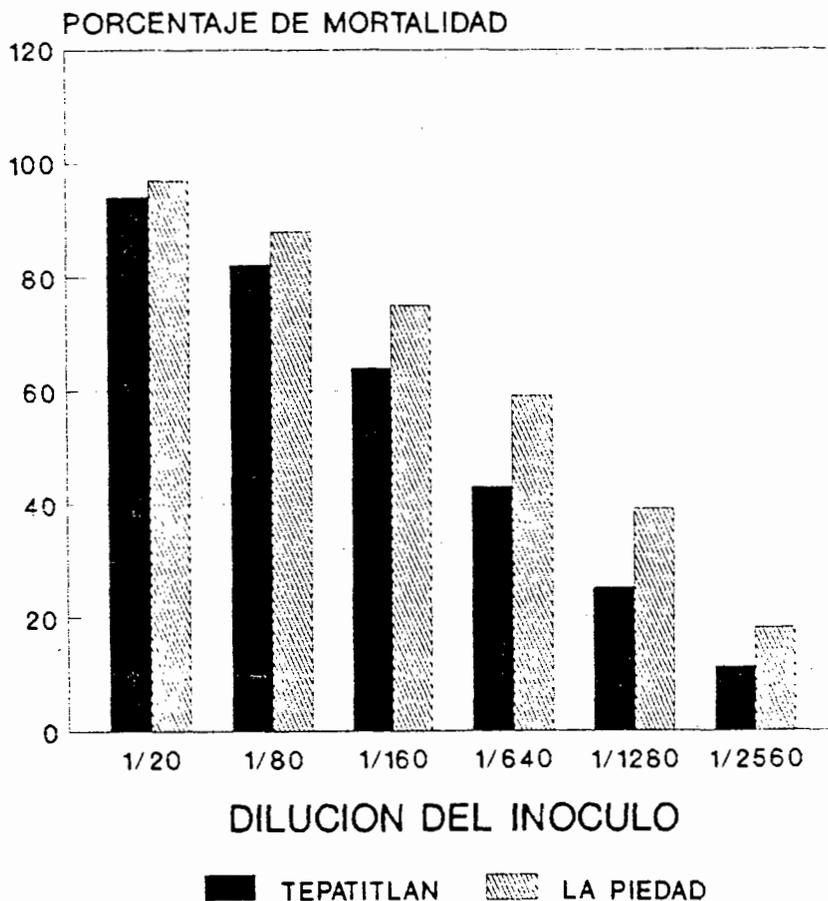
Dilución por arriba del 50 % = 1 x 10³ el logaritmo es -3 + (-0.45) = -3.45 que finalmente se expresa como 1 x 10^{-3.45}

TITULACION VIRAL POR H.A. FIBROBLASTOS INFECTADOS POR VSOA.



Esta grafica muestra el titulo de hemoaglutinacion de sobrenadante de fibroblastos infectados.

MORTALIDAD CELULAR POR DILUCION DE INOCULO CON VSOA.



Esta grafica muestra los porcentajes de mortalidad observada en cada dilucion de inoculo, obtenida por Reed-Muench.

DISCUSION

El efecto citopático causado por el virus del SOA en los fibroblastos de embrión de pollo es muy similar al producido por los virus del sarampión, parainfluenza, parotiditis y Newcastle que en general producen redondeamiento celular, aglutinación celular, sincitios, cuerpos de inclusión y vacuolización citoplásmica. Sin embargo en el caso del virus de parainfluenza se produce alargamiento y engrosamiento en las células. El virus de la parotiditis a diferencia del VSOA provoca un efecto citopático muy lento mientras que algunas cepas del virus de sarampión producen células en forma de huso y cuerpos de inclusión eosinofílicos tanto en citoplasma como en núcleo (18).

En la infección por el virus sincitial respiratorio en líneas celulares humanas de tipo epitelial, en células diploides humanas y en cultivos primarios de células de riñón de monos y bovinos, los cuerpos de inclusión pueden considerarse como cicatrices de la infección, porque no contienen DNA, RNA, partículas víricas ni antígenos víricos sino que están formados de material granular o fibrilar y a diferencia del VSOA no se multiplica en embrión de pollo y solo el SV-5 canino se replica en embrión de pollo (22).

Con lo que respecta al virus de Newcastle en algunas líneas celulares el efecto citopático solo es visible microscópicamente en los cultivos ocurre cuerpos de inclusión citoplásmico y células multinucleadas. Ocasionalmente se observan cuerpos de inclusión intranucleares bien definidos (22). En los resultados de este trabajo a pesar de que los daños causados por los paramixovirus son similares en los diferentes tipos de cultivos celulares, con respecto al virus del SOA podemos

observar que son un poco más ligeros en fibroblastos de embrión de pollo que en células PK-15, TB y MDBK (9,14) puesto que este es un virus de mamíferos y al infectar fibroblastos de embrión de pollo como no es su huésped natural su efecto citopático no es tan severo. Cuando las células permanecen infectadas hasta las 96 hrs. el efecto citopático es más visible y claro y por lo tanto más fácil de distinguir.

En las diluciones más bajas el virus infectó a casi el 100% de las células las cuales rápidamente (24hrs.) mostraron degeneración y muerte. En las diluciones más altas la destrucción celular fué baja y se recuperó un sobrenadante de menor actividad hemoaglutinante tal como fué reportado (14), a diferencia de los virus de parainfluenza, sincitial respiratorio y newcastle que solo se pueden detectar por hemoadsorción (18,22).

En lo que respecta a las titulaciones del sobrenadante por hemoaglutinación se detectó buena actividad hemoaglutinante del virus y fue proporcional a la dilución inoculada, en las diluciones altas se detectó baja actividad hemoaglutinante viral pero en diluciones bajas existe mayor actividad lo que nos permite observar que este es un medio para la multiplicación del virus y la obtención de cantidades aceptables del mismo para otros fines.

La DL50 obtenida de los 2 brotes estudiados fué $1 \times 10^{-3.45}$ y $6 \times 10^{-3.66}$ y la reportada en la bibliografía con trabajos en la línea celular PK-15 fué de $1 \times 10^{-4.5}$ (6) por lo que es más fácil que se replique en ellas y los fibroblastos de embrión de pollo provienen de una clase zoológica completamente diferente y extraña al virus y le resulta más difícil el poder multiplicarse, por lo que las titulaciones tienden a ser menores.

Por los resultados obtenidos con las titulaciones, DL50 y tomando en cuenta que el tipo de efecto citopático es típico para cada familia de virus y que el efecto citopático del VSOA es similar al de los paramixovirus se propone considerarlo por el momento como integrante de la familia paramixoviridae.

Con los virus de las enfermedades de Aujeszky y cólera porcino el efecto citopático es completamente distinto. El virus de Aujeszky produce cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares en cultivo de células de mamífero, células gigantes por la disolución de la membrana celular, y formación de placas en los cultivos en los que se inocula. Sin embargo este virus no produce destrucción completa del cultivo, el foco de infección con efecto citopático típico parece detenerse (22). Por otra parte el virus de cólera porcino al infectar un cultivo celular no causa ningún efecto citopático aparente aunque el efecto citopático se puede realizar por infección con virus de Newcastle. La replicación viral es considerada extranuclear (22,23).

La tinción con N.A. en fibroblastos infectados nos muestra que los cuerpos de inclusión eosinofílicos citoplásmicos que se observan con H-E probablemente no contengan RNA viral ya que la fluorescencia roja que se observa se ubica en el citoplasma distribuido de manera homogénea, entonces probablemente estos cuerpos de inclusión sean proteínas virales o cicatrices de la infección lo cual requiere probarse.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Campos M. E., Calderon, S.E., Solorio, S. (1982) "The blue eye syndrome. Síndrome del ojo azul. Pro. of the International Pig Veterinary Society Congress México. 171
- 2.- Stephano H. A., Ramírez T.C., Flores A.H. (1983) Situación actual del Síndrome de Encefalitis y Opacidad de la cornea conocido como " Ojo Azul". Escuela de Veterinaria de la Universidad de Nuevo León.
- 3.- Stephano H. A., (1984) Brotes de Encefalitis en cerdos de engorda. Síntesis Porcina. 9 - 12.
- 4.- Stephano H. A., Gay G. M., (1986) Análisis de cepas del virus del síndrome del ojo azul aisladas en brotes diferentes de encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos. Reunión de Investigadores pecuarios en México. 163.
- 5.- Moreno L. J., Correa G. P., Martínez A., Ericsson A., (1986) Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. Archives of Virology 91: 221 - 231.
- 6.- Diaz P. P., Ibarra, P.T., Maldonado M. P., Rincon R. F. J., Rodríguez G. H., Santillan S. S. (1989) Correlación clínico patológica del Síndrome de Ojo Azul. (SOA). VII Congreso Nacional Asociación Mexicana de Veterinarios especialistas en cerdos. 67 -68.
- 7.- Uribe A. J., Martínez L.P., Correa G. P. (1989) Presencia y título viral del paramyxovirus porcino de la Piedad Michoacán en tejidos de cerdos infectados naturalmente. VII Congreso Nacional, Asociación Mexicana de Veterinarios especialistas en cerdos. 53 -54.
- 8.- Campos H. R., Carbajal S. M. (1989) Transtornos reproductivos en los sementales de una granja de ciclo completo ante un brote de Ojo

Azul. VII Congreso Nacional. Asociación Mexicana de especialistas en cerdos. 62 - 64.

9.- Martínez L. A., Correa G. P. Fajardo R. M., Garibay M. (1985) Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. Avances en enfermedades del cerdo. 313 - 319.

10.- Stephano H. A., Gay G.M. (1982) El Síndrome del Ojo Azul, estudio experimental. Reunión de Investigaciones Pecuarias en México. 523 - 528.

11.- Stephano H. A., Gay G. M. (1986) El síndrome del ojo azul, una enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Vet. Mex. 17:120-122.

12.-Stephano H. A., Gay G. M., (1984) Efecto del virus del ojo Azul en la reproducción de la cerda. II Congreso Nacional, Asociación Mexicana de Veterinarios especialistas en cerdos. 83 - 85.

13.- Stephano H. A., Gay G. M., (1985) Síndrome del Ojo Azul en cerdos en México. Reunión de Investigaciones pecuarias en México. 138.

14.- Martínez L. A., Correa G. P., Fajardo M. R., Garibay S. M., Moreno. L. J., Ramos R. I., Rosales F. (1985) virus hemoaglutinante similar a los paramixovirus que produce encefalitis y mortalidad en los cerdos. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 81.

15.- Méndez C. I. Inoculación del virus del síndrome de ojo azul del cerdo en embrión de pollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara, 1991, Guadalajara, Jalisco, Méx.

16.-Carbrey E. A., Beard C., Cooper R., Hansen P. R., Pomery S. B. (1974) Antigen titration Hemagglutination and hemagglutination-inhibition. Commite on standard method for the hemagglutination inhibition test for Newcastle disease. Reprints from 17 the Anual Proceedings American of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 1-6.

- 17.-Ugalde V. J. Obtención de cultivo celular primario a partir de embrión de pollo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara, 1980, Guadalajara, Jalisco, Méx.
- 18.- Davis D. B., Dulbecco R., Eisen N. H., Ginsberg S. H. (1980) The Nature of Virus. Paramixoviruses. Microbiology. Third Edition. Harper international edition. 854-884, 1140-1159.
- 19.-Cumming, H. (1975) Métodos de cultivo para tejidos. Métodos de coloración. Virología. Cultivo de Tejidos. Editorial el manual moderno, S.A. pag 36-50, 76-81.
- 20.-Cunningham, Ch. H. (1959) Selección, empleo y esterilización del material. Virología Práctica. Traducción de la tercera edición norteamericana. Editorial Acribia. 1-40.
- 21.-Jakoby B. W., Pastan H. I., (1979) Physical aspects of a tissue culture laboratory. Detection of contamination. Preservation, storage and shipment. Safety considerations. Media and growth requirements. Serum-free hormone-supplemented media. Antibiotics in cell culture media. Dispersion and disruption of tissues. Monolayer culture techniques. Cell Culture. Edit. Academic Press Inc. 1 - 139.
- 22.-Howard G. J., Francis T. J., (1981) Hagan and Bruner's Domestic Animals. Seventh Edition 570. 742-757.
- 23.-Leman A. D., Glock R. D., Mengeling W. L., Penny R.H.C., Scholl E., Straw B., with 93 authoritative contributors. (1981) Pseudorabies. Hog Cholera. Diseases of swine. Fifth Edition. 209-236.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
Expediente
Número

SEÑORA ADRIANA MARÍA SALAZAR MONTES
ESTUDIANTE

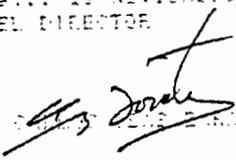
México, D.F., a los 11 días del mes de Noviembre de 1991.
Señora Adriana María Salazar Montes, inscrita en el expediente de tesis "CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EMBRIONES DE POLLO POR INFECCIÓN CON UN PARAMIXOVIRUS PORCINO" para obtener la licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M.V.Z. Mario Alberto Ramírez Herrera.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
AÑO "LIC. JOSE GUADALUPE OJEDA HERRANDEZ"
Guadalajara, Jal., 11 Noviembre de 1991.
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C.  DIRECTOR

EL SECRETARIO



M. EN C. MARTÍN PEDRO TENA MEDA

- c.c.p. - El M.V.Z. Mario Alberto Ramírez Herrera Director de Tesis. c.p.s.
- c.c.p. - El expediente del alumno.
- CCO-MPTM-Caj.

AJ contestar este oficio dítese fecha y número

M. en C. Carlos Beas Zarate.
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Guadalajara.

P R E S E N T E

Estimado M. en C. Carlos Beas:

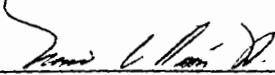
Por medio de este conducto, comunico a usted que la C. Adriana María Salazar Montes, pasante de la licenciatura en Biología con el número de registro 81485364 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: CAMBIOS MORFOLOGICOS EN FIBROBLASTOS DE EMBRION DE POLLO POR INFECCION CON UN PARAMIXOVIRUS PORCINO. El cual se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas a su digno cargo en el área de investigación.

Asimismo le informo que se ha revisado el manuscrito de la tesis y cumple con los requisitos establecidos por la H. Comisión de tesis de esta Facultad.

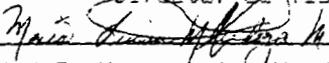
Sin mas por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

Guadalajara, Jal a 5 de Noviembre de 1991.


M.V.Z. Mario A. Ramirez Herrera.

Director de Tesis.


M.V.Z. Maria Luisa Mendoza Magaña.

Director de Tesis.