

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL BASADA EN EL USO
DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA INVESTIGAR LA ADSORCIÓN DEL
VIRUS IPN A CÉLULAS CHSE-214**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

CONSUELO ALEJANDRA SÁNCHEZ VALENZUELA

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

DR. JUAN KUZNAR H.

PROFESOR COPATROCINANTE

DR. RICARDO ENRIQUEZ S.

FIRMA_____

PROFESORES CALIFICADORES

DR. ALEX ROMERO Z.

FIRMA_____

DR. GUSTAVO MONTI

FIRMA_____

FECHA APROBACIÓN:

29 de Septiembre 2008

**A MIS PADRES,
LEONARDO SÁNCHEZ E INGRID VALENZUELA.**

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSIÓN.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39
8. ANEXOS.....	44
9. AGRADECIMIENTOS.....	47

1. RESUMEN

El *virus de la necrosis pancreática infecciosa*, virus IPN, produce pérdidas económicas a la industria del salmón ya que es el agente causal de una enfermedad altamente contagiosa que provoca una alta mortalidad en peces jóvenes.

Este trabajo propone una metodología experimental para investigar la etapa de adsorción del virus IPN a la superficie celular, y así definir la cinética con que lo hace y disponer de una poderosa herramienta para investigar diferencias entre líneas celulares en cuanto a la susceptibilidad que presentan para adsorber virus, y/o diferencias entre cepas de virus, respecto a su capacidad de unirse a células susceptibles.

La metodología consistió en visualizar las partículas virales en forma individual adsorbidas a la superficie celular. Para este fin, fueron incubadas células CHSE-214 con virus IPN a 4°C, para evitar la entrada de las partículas virales a la célula. Posteriormente, tras la fijación de las células, se realizó la marcación del virus adsorbido con un primer anticuerpo monoclonal anti-VP3 y luego con un segundo anticuerpo policlonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Durante la observación en un microscopio de epifluorescencia, se tomaron fotografías digitales, desde las cuales se cuantificaron las partículas virales mediante el programa computacional de procesamiento de imágenes Image pro plus.

También se efectuaron experimentos midiendo la adsorción de partículas virales activas. Para ello se tituló el virus no adsorbido, en los diferentes tiempos de adsorción. Así fue posible constatar, que aparentemente, las partículas virales activas son más eficientes que las partículas virales incompletas y/o defectuosas, en cuanto a su capacidad de unirse a las células.

Palabras claves: IPNV, adsorción, inmunofluorescencia, procesamiento de imágenes.

2. SUMMARY

DEVELOPMENT OF METHODS BASED ON FLUORESCENS ANTIBODIES TO ASSESS THE ADSORPTION OF IPN VIRUS IN CHSE-214 CELL LINE.

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the causative agent of a highly contagious disease with a rate mortality in young fish which produces important economic losses in the salmon industry.

The aim of this work was to develop and standardize protocol to investigate the adsorption of IPNV to the cell surface. Measuring IPNV binding capacity will allow to define the virus kinetics and will provide a powerful tool to study differences among cellular lines and/or virus strains, regarding their capacity to be attached to them.

The proposed methodology consisted in the visualization of individual viral particles adsorbed to the cellular surface. CHSE-214 cells were incubated with IPNV at 4°C to avoid virus penetration to the cell. After fixing the cells, the viruses were labeled with a monoclonal antibody against VP3 and with a second polyclonal antibody conjugated with fluorescein isotiocyanate (FITC). The virus particles were visualized with a fluorescence microscope and digital images were obtained and processed with computational software Image pro plus to quantify viral particles.

The adsorption of active viral particles was measured as well. Virus no-adsorbed was titrated at different times after adsorption. The results showed that active viral particles are more efficient in their attachment capacity than the defective and/or incomplete physical particles.

Keywords: IPNV, adsorption, immunofluorescent, images processing.

3. INTRODUCCIÓN

La Necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad altamente contagiosa, propia de los salmónidos jóvenes, en especial de la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), aunque también puede afectar al salmón del atlántico (*Salmo salar*) en etapa de post-smolt (Ariel y Olesen 2002).

Esta enfermedad es considerada como una de las de mayor impacto en el cultivo de salmónidos en la Unión Europea (Roberts y Pearson 2005, Smail y col 2006) y en general en países productores de salmón, siendo Oceanía, la única región considerada libre (OIE 2005).

El brote de la enfermedad se caracteriza por provocar altas mortalidades, siendo esta variable inversamente proporcional a la edad del huésped (Wolf 1988). En las crías que han completado la primera alimentación se puede presentar un brote explosivo llegando a un 70% de pérdidas en 2 meses, no así, en animales mayores donde las pérdidas alcanzan de un 10 a un 20% (Roberts y Pearson 2005).

La principal vía de transmisión de esta enfermedad ocurre por vía horizontal, de pez a pez, por medio del contacto con fecas, orina, líquido ovárico o seminal. La transmisión vertical se ha comprobado en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha café (*Salmo trutta*), como aún no ha sido demostrada en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), no puede ser descartada en otras especies de salmónidos (Reno 1999).

Los peces que sobreviven a la infección quedan como portadores, de esta forma el virus IPN se mantiene en el ecosistema, infectando a otros peces susceptibles (Wolf 1988).

La patogénesis de esta enfermedad aún no ha sido completamente aclarada, aún más, no existe información reciente que ayude a dilucidar las primeras etapas de la infección.

Se ha determinado que el virus penetra a través de las branquias, boca o poros sensoriales de la línea lateral (Wolf 1988, Novoa y col 1995, Chou y col 1999).

El período de incubación de la enfermedad va a depender de factores tales como la especie afectada, edad del hospedero y temperatura del agua. En una infección experimental

en alevines de truchas, los signos clínicos de la enfermedad son observados a partir de los 2 a 4 días post-inoculación (Swanson y Gillespie 1982).

Swanson y Gillespie (1981), estudiaron el curso de la infección en truchas jóvenes a través de inyección intraperitoneal e inoculación oral, demostrando que el virus IPN ingresa a la cavidad peritoneal del pez interactuando con las células pancreáticas exocrinas en 2 días, lo que confirma las aseveraciones respecto que el páncreas es el principal órgano de replicación del virus. Sin embargo, aún no se ha podido determinar si la vía de ingreso al páncreas es directamente traspasando la serosa o a través del flujo sanguíneo.

Los signos clínicos de esta enfermedad son inespecíficos, siendo los más característicos: anorexia, nado en espiral, ataxia (Wood y col 1955), oscurecimiento de la piel, abultamiento abdominal, exoftalmia y hemorragias en las zonas ventrales del pez (Wolf 1988).

El estómago e intestino, internamente, se encuentran desprovistos de alimento y sólo es posible encontrar un mucus cohesivo de aspecto lechoso (Rodríguez y col 2003).

Los peces infectados pueden presentar petequias en los ciegos pilóricos y tejidos adiposos. Además, ciertos órganos (bazo, corazón, hígado y riñón) pueden presentar palidez anormal y petequias (McKnight and Roberts, 1976; Smail et al 1995).

El método de diagnóstico a elegir dependerá de la sensibilidad de detección requerida, la naturaleza del reservorio del virus y la urgencia en la obtención del diagnóstico (Rodríguez y col 2003). Existen métodos directos con los cuales es posible detectar:

- El virus como agente infeccioso (aislamiento viral).
- La presencia de antígenos virales (técnicas inmunológicas): Inmunofluorescencia (IF), Enzimoimmunoanálisis (EIA), Test de aglutinación, Tinción de inmunoperoxidasa (IP).
- La presencia de ácidos nucleicos virales (PCR).
- El virus como partícula viral (microscopía electrónica).

Además, existen métodos indirectos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) por parte del huésped. Estos métodos son utilizados para detectar:

- Anticuerpos específicos antivirales por técnicas inmunológicas: Enzimoimmunoanálisis (EIA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Western Blot (WB), etc.
- Producción de anticuerpos *in vitro*.

Las principales medidas de prevención y control están dirigidas a controlar los aspectos zoonosarios e higiénicos. Dentro de las medidas zoonosarias, la que adquiere mayor importancia es la prevención del contacto del virus con peces susceptibles, requiriendo altos niveles de monitoreo, certificación y colaboración entre los productores y autoridades sanitarias. Es por esto que el éxito de los programas sanitarios depende de la rápida detección e identificación del patógeno en todas las etapas de crecimiento del pez, incluyendo en los peces portadores (Rodríguez y col 2003). Otra de las medidas zoonosarias está dirigida a la exportación de ovas, las que se encuentran detalladas en el Código Sanitario para Animales Acuáticos de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE 2005).

Las medidas de control se encuentran enfocadas a disminuir la transmisión vertical y horizontal, a pesar de que la transmisión vertical no está demostrada para todas las especies de salmónidos. Además, como medida de prevención se debe tener precaución en la incorporación de reproductores u ovas al sistema, evaluándolos y diagnosticándolos previamente. Otra medida es restringir el movimiento de peces vivos y ovas para evitar la transmisión del agente proveniente de otros sectores (Rimstad y col 2003).

Las medidas higiénicas son utilizadas para evitar el riesgo de recontaminación. Algunos de los métodos utilizados en la desinfección del agua han sido el uso de ozono, luz ultravioleta y cloro, obteniendo mejores resultados con el primer método (Oye y Rimstad 2001).

Por otro parte, en sistemas de crianza de truchas arco iris, la reducción de la densidad de población en Dinamarca, resultó ser un buen manejo, disminuyendo la mortalidad por virus IPN (Jorgensen y Bregnballe 1969).

El virus IPN pertenece a la familia Birnaviridae, género *Aquabirnavirus*. Los virus que pertenecen a esta familia presentan una cápside con simetría icosaédrica, sin envoltura lipídica y con un diámetro promedio de 60 nm. El ciclo de replicación de este virus ocurre en el citoplasma y dura entre 16 y 20 horas, manifestando un característico efecto citopático (CPE) asociado a la pérdida de la integridad de células y del tejido, que termina en destrucción celular (Moss y Gravell 1969, Dobos 1977, Kuznar y col 1995, Hjalmarsson y Everitt 1999) y consecuente liberación de las partículas virales.

El genoma del virus consiste en dos segmentos de ARN de doble cadena que representan un 8,7% del total de la masa del virión. El segmento A del ARN codifica una poliproteína y una proteína no estructural (VP5). La poliproteína a su vez, es escindida por una proteína con actividad proteasa (VP4), dando forma a dos nuevas proteínas de la cápside, pVP2 y VP3, (Duncan y col 1987b) y a una proteína no estructural (VP4). El segmento B codifica la proteína VP1 (Song y col 2005).

La proteína estructural pVP2, es procesada nuevamente durante la maduración viral, resultando la proteína VP2, componente de la cubierta externa del virus. VP3, de ubicación interna, participa en el ensamblaje de la partícula viral. Sin embargo, es importante mencionar la existencia de una gran cantidad de comunicaciones que concluyen que una fracción de VP3 está expuesta sobre la superficie permitiendo que sea reconocida por el anticuerpo monoclonal (Nicholson 1993, Tarrab y col 1993). VP5 es una proteína no estructural, la cual sólo se encuentra en células infectadas y es sintetizada en la fase inicial de multiplicación viral en baja cantidad (Dobos 1995). La proteína VP1, es una ARN polimerasa-ARN dependiente, con función de partidor y polimerasa para la transcripción o síntesis de ARNm. También participa en la multiplicación, cooperando en el ensamblaje de la partícula viral (Maraver y col 2003).

Se ha propuesto que la virulencia y patogenicidad de este virus se basa en redireccionar la señalización celular. Esto es realizado a través de sus proteínas virales que tienen actividad enzimática capaz de utilizar la maquinaria celular para su propia multiplicación. Además, al unirse el virus a los receptores celulares, inhiben la expresión de genes que participan en el mecanismo de defensa celular o vía interferón, a través de cascadas de fosforilación y defosforilación (Lyles 2000).

Se encuentra en discusión si la infección de este virus produce necrosis o apoptosis celular. Los dos términos aluden a muerte celular, pero el segundo de ellos se refiere a una muerte programada por la célula como mecanismo para prevenir la infección de las células vecinas (Ortega y Enríquez 2007).

Existen dos proteínas virales reconocidas como factores de virulencia, VP5 y VP2. La proteína VP2 estaría relacionada con el rango de hospedadores que pueden ser infectados por el virus, mientras que la proteína VP5 presenta dominios de homología con las proteínas pro y antiapoptóticas (Hong y col 1998, Hong y col 1999), pudiendo impedir la apoptosis de las células huéspedes, para que las partículas virales maduren y adquieran infectividad (Santi y col 2004). Sin embargo, estudios recientes con cepas de virus IPN carentes de VP5, confirmaron una alta virulencia de dicha cepa, ya que causó una mortalidad del 80% en smolts de salmón del Atlántico, concluyendo así que la proteína VP5 no es un factor importante de virulencia (Santi y col 2005).

Se ha demostrado que el virus IPN penetra a las células a través de compartimentos vesiculares (Couve y col 1992, Granzow y col 1997), por lo tanto, es necesario que la adsorción de él se realice utilizando receptores específicos localizados en la superficie celular. Kuznar y col (1995) determinaron que las células CHSE-214 tienen aproximadamente 1500 sitios específicos de unión para el virus IPN.

Los avances en las técnicas de microscopía de fluorescencia y el aumento de la calidad de los microscopios de fluorescencia, han permitido reinvestigar éstas temáticas ya que las investigaciones anteriores se basaban en métodos indirectos.

Recientemente, se ha desarrollado una metodología basada en la cuantificación de focos fluorescentes (FF) que permite la detección y cuantificación simultánea del virus IPN, siendo más rápida que las técnicas convencionales (Espinoza y Kuznar 2002). A través de esta misma técnica, hoy en día es posible visualizar una partícula viral marcada con sondas fluorescentes o anticuerpos conjugados con fluoróforos (Osorio y col 2005). Con este método se podría cuantificar los viriones de una manera directa y se podrá avanzar por lo tanto, en el conocimiento de la interacción temprana entre virus y células.

La importancia de este trabajo de memoria de título radica en el uso de una técnica directa, a diferencia de otras metodologías en las cuales los resultados cuantitativos son indirectos, por ende sujetos a mayor error.

De los antecedentes mencionados previamente, el objetivo general es implementar una metodología experimental basada en el uso de anticuerpos fluorescentes para investigar la etapa de adsorción del virus IPN en células *in vitro*. Los objetivos específicos son:

- 1) Desarrollar protocolos experimentales para medir a través de microscopía de fluorescencia, virus IPN unido a la superficie externa de las células CHSE-214.
- 2) Cuantificar partículas virales adsorbidas mediante el manejo de un programa computacional.
- 3) Determinar la relación partículas físicas (PF) adsorbidas versus partículas virales con actividad biológica (FF).
- 4) Comparar la unión de partículas virales activas (FF) versus partículas físicas (PF).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar los experimentos de adsorción viral se utilizaron células CHSE-214 (Chinook salmon embryo, ATCC CRL 1681) ya que éstas son susceptibles a la infección por el virus IPN.

El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (virus IPN, serotipo VR-299) fue aislado y caracterizado en el Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso.

Además, fueron empleados dos programas computacionales, Adobe Photoshop 7.0 e Image Pro Plus 4.0. El primer programa fue utilizado en el procesamiento de imágenes y el último en la cuantificación de partículas virales.

- ❖ Los reactivos, soluciones, materiales de laboratorio y equipos utilizados se encuentran descritos en el Anexo.

4.1 MÉTODOS

Los métodos que a continuación serán descritos pertenecen al Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso. Algunas variantes de éstos han sido desarrollados en el presente trabajo.

Para realizar los experimentos de adsorción fue necesario producir una gran cantidad de virus. Esto se obtuvo infectando células CHSE-214 que fueron cultivadas en botellas plásticas de 75 cm² (6,5 x 10⁶ células/ cm² aprox.) a 20°C, en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 50 mg/mL de gentamicina. Las células fueron infectadas con inóculos de virus IPN a una multiplicidad de infección (m.d.i) de 0,001. Tras tres ciclos de infección (48 horas), cuando ya se observó efecto citopático, se obtuvo un lisado celular conteniendo el virus amplificado.

4.1.2 Purificación parcial del virus para efectuar el proceso de marcaje

Este método simple de purificación se realizó para obtener imágenes claras de las partículas virales y reducir la marca fluorescente de fondo.

Se infectaron cuatro botellas de 75 cm² a una mdi = 0,001, conteniendo monocapas celulares preconfluentes. Tras el efecto citopático, el medio de cultivo que contiene células lisadas y viriones (60 mL) fue centrifugado a 3220 x g por 15 minutos a 10°C, en un rotor SS-34. Esta centrifugación a baja velocidad, se denomina clarificación ya que consiste en hacer decantar los organelos y restos celulares del medio, mediante la formación de un pellet, el que posteriormente será descartado. El sobrenadante resultante de la clarificación (C) es el que contendrá las partículas virales.

El virus del sobrenadante (C) se precipitó con polietilenglicol (PEG 6000) a una concentración final del 5%, conteniendo NaCl 2,2% final. El sobrenadante con PEG se mantuvo en agitación durante toda la noche a 4°C con un agitador magnético, y posteriormente fue centrifugado a 72000 x g durante 2 horas en un rotor SW 28. El sobrenadante fue descartado, mientras que el pellet (P) fue resuspendido en 1mL de buffer TNE (pH 7,4, Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM).

Para eliminar el polietilenglicol (PEG) residual de la suspensión viral obtenida con buffer TNE, se agregó un volumen equivalente de cloroformo (1 mL), y posteriormente, la solución fue agitada y centrifugada a 3220 x g durante 15 minutos a 10°C, en un rotor SS-34. Como resultado de ello se obtuvo un sobrenadante con dos fases, una acuosa y una orgánica, encontrándose el virus semi-purificado en la fase acuosa (FA), la cual fue extraída cuidadosamente del tubo de centrifugación. Durante el proceso de purificación parcial fueron tomadas muestras en las diferentes etapas para titular el virus presente en cada una de ellas.

4.1.3 Visualización de partículas físicas totales de virus IPN

Para lograr individualizar y visualizar una partícula viral, es necesario que ésta sea retenida y marcada. La marcación del virus fue realizada sobre filtros Anodisc siguiendo el protocolo que se especificará a continuación.

4.1.3.1 Protocolo para la observación de virus IPN fluorescente sobre filtros Anodisc. La implementación de este protocolo tuvo como propósito conocer el tamaño del virus fluorescente, ya que este valor permitirá posteriormente identificarlo y contarlo a través de un programa computacional y así determinar la relación PF/FF (partículas físicas/focos fluorescentes), es decir, qué fracción de las partículas virales totales son activas o tienen la capacidad de infectar.

El filtro tiene un diámetro de poro de 0,02 µm, permitiendo la retención de las partículas virales de IPN sobre su superficie.

Para permitir una mejor observación de las partículas de interés sobre el filtro Anodisc, éste fue lavado con buffer TNE, usando jeringas con dispositivos filtrantes con diámetro de poro de $0,02\mu\text{m}$, que a su vez retienen las impurezas presentes en el buffer. Posteriormente fueron bloqueados los sitios inespecíficos de unión del filtro, incubándolo con TNE 2% suero bovino fetal durante 10 minutos. Este procedimiento previo a la filtración de la muestra viral permite que no exista unión inespecífica de las sondas fluorescentes a adicionar posteriormente sobre el filtro.

Posteriormente se procedió a filtrar sobre una bomba de vacío, una suspensión de virus IPN diluida en $500\mu\text{L}$ de buffer TNE, conteniendo aproximadamente 3×10^6 FF totales. Esta suspensión fue filtrada totalmente, en volúmenes de $100\mu\text{L}$ para permitir una mejor distribución de las partículas sobre la superficie del filtro. Luego, se realizó un lavado con buffer TNE y el filtro fue incubado con $100\mu\text{L}$ de anticuerpo monoclonal (Am1), a una concentración de $2\mu\text{g/mL}$, durante 45 minutos. Una vez terminada la incubación, se retiró el anticuerpo con una micropipeta y el filtro fue lavado nuevamente con buffer para eliminar el anticuerpo que no se unió a las partículas virales.

Antes de incubar el filtro con el segundo anticuerpo, éste nuevamente fue bloqueado para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. La incubación del filtro con el segundo anticuerpo (1/100) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se llevó a cabo durante 45 minutos, en oscuridad. Posteriormente, se retiró el anticuerpo que no se unió mediante una micropipeta y se realizó un primer lavado con TNE sobre una bomba de vacío. Un segundo lavado se realizó incubando el filtro con buffer durante 10 minutos, para eliminar el anticuerpo que no se ha unido a las partículas virales.

Finalmente, el filtro fue montado sobre un portaobjeto rectangular, embebido con $30\mu\text{L}$ de medio de montaje fluorescente (Dako) y cubierto con un cubreobjeto. El filtro ya montado, fue observado en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000X.

4.1.3.2 Determinación del número de campos visuales del filtro. Para determinar el número de campos totales contenidos en un filtro, se calculó el área de éste y el área del campo óptico del microscopio, ambos expresados en pixeles.

El filtro tiene un radio de $10.000\mu\text{m}$. Para transformar este valor a pixeles se fotografió una regla de calibración para microscopio con un aumento total de 1000X y se determinó, a través del programa Image Pro Plus, la equivalencia entre pixeles y micrómetros al usar este aumento. Con esto se obtuvo que el radio del filtro tiene una extensión de 112.000 pixeles. Entonces, el área del filtro fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned}\Pi \times r^2 &= \Pi \times (112.000 \times 112.000) \\ &= 3,94 \times 10^{10} \text{ pix}^2\end{aligned}$$

Por otra parte, el radio del campo óptico, en pixeles, resultó tener una extensión equivalente 1.252 pixeles. Por lo tanto, el área del campo se calculó de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}\Pi \times r^2 &= \Pi \times (1.252 \times 1.252) \\ &= 4,924 \times 10^6 \text{ pix}^2\end{aligned}$$

Finalmente, el número de campos totales de un filtro, se calculó dividiendo el área del filtro por el área del campo, es decir:

$$3,94 \times 10^{10} \text{ pix}^2 / 4,924 \times 10^6 \text{ pix}^2 = \mathbf{8.003 \text{ campos totales.}}$$

4.1.3.3 Calibración del tamaño del virus fluorescente. Para determinar un rango de tamaño, en pixeles, de los viriones de IPN presentes en una suspensión purificada parcialmente, fue necesario calibrar el tamaño de las partículas virales a través del programa computacional Image Pro Plus. Esta calibración se realizó midiendo y contando las partículas de tamaños entre 2 y 501 pixeles, presentes en cinco imágenes obtenidas de los filtros anteriores, que corresponden a cinco campos ópticos de cada filtro, elegidos a través del método que se señala en la sección 4.1.5 Elección de los campos ópticos a fotografiar.

4.1.3.4 Cálculo de la relación Partículas Físicas/Focos Fluorescentes (PF/FF). En una suspensión viral, los virus se pueden encontrar como partículas activas (focos fluorescentes, FFs) o como partículas físicas (PFs), que tienen o no la capacidad de infectar. La relación entre estas dos poblaciones de virus dentro de una misma suspensión se caracteriza con la siguiente fórmula: PFT/FFT. Para calcular la relación en este experimento, fueron filtrados 15 μ L de una suspensión viral (título de 7 x 10⁶ FF/mL), diluidos en 500 μ L de buffer TNE.

El cálculo de PF totales se realizó a partir de la siguiente fórmula:

$$\mathbf{PFT = PPF \times CT}$$

- PFT, son las partículas físicas totales de la suspensión inicial.
- PPF, es el promedio de partículas físicas en 5 campos
- CT, es el N° de campos totales del filtro.

Entonces para obtener la relación, se divide PFT/FFT, donde:

- FFT, es el N° de focos fluorescentes contenidos en la suspensión determinados por medio de titulación.

4.1.3.5 Evaluación de la repetibilidad de los datos y concordancia de las observaciones. La repetibilidad de las determinaciones del número de PFs, contabilizadas sobre filtros de membrana, fue evaluada filtrando dos volúmenes iguales de una misma suspensión viral en distintos filtros, y luego comparando las cantidades de PFs obtenidas en cada uno de ellos.

También se evaluó la concordancia de las imágenes obtenidas de filtros con partículas retenidas, con la cantidad de virus adicionado inicialmente a los filtros. Además se determinó si se pueden establecer visualmente diferencias entre estos filtros si se agregan dos cantidades diferentes de virus (6×10^6 y 3×10^7 FF totales).

La notación utilizada para estos filtros se señala a continuación: F1 (filtro con menor cantidad de virus, réplica 1), F2 (filtro con menor cantidad de virus, réplica 2), F3 (filtro con mayor cantidad de virus, réplica 1), F4 (filtro con mayor cantidad de virus, réplica 2).

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado en la sección 4.1.3 Visualización de partículas físicas totales de virus IPN y luego se fotografiaron 5 campos ópticos de cada filtro ensayado.

4.1.4 Visualización del virus IPN fluorescente en células de cultivo

4.1.4.1 Adsorción de virus IPN a células CHSE-214. Las células fueron cultivadas como se explicó inicialmente y se mantuvieron a 20°C hasta que formaron una monocapa preconfluyente. Logrado esto, las monocapas fueron climatizadas por 1 hora a 4°C , para evitar el transporte celular. De igual forma se procuró mantener la temperatura del inóculo viral y el buffer PBS que serán utilizados para infectar y lavar las células de los experimentos de adsorción, de modo de que al ser adicionados no eleven la temperatura necesaria para la realización de este ensayo.

Para infectar las células, el medio de cultivo en el que son mantenidas fue reemplazado por $300 \mu\text{L}$ de medio de cultivo fresco conteniendo $1,1 \times 10^7$ FF totales de virus IPN, es decir, una m.d.i de 110. Cuatro monocapas fueron mantenidas con el inóculo por un período de 0, 15, 30, 60 minutos respectivamente y una última fue utilizada como control negativo. En cada experimento fueron titulados los FFs iniciales, o sea, la cantidad de partículas virales activas presentes en cada inóculo antes de ser adicionado a las monocapas (FF_I).

Tras los tiempos de adsorción, se retiró el inóculo que resta sobre las células y se tituló una muestra de él para conocer el número de FFs que no se adsorbieron a la monocapa (FF_F). Posteriormente, se realizó un lavado con buffer PBS a 4°C , para eliminar las partículas virales que no fueron adsorbidas a la membrana de las células ensayadas. El buffer se suplementó con 1mM de MgCl_2 y 1mM de CaCl_2 para evitar el desprendimiento de las células del sustrato donde se encuentran adheridas. Después del lavado, las monocapas fueron fijadas con metanol

a -20°C , durante 10 minutos y luego nuevamente lavadas con PBS para retirar los restos de metanol.

En el siguiente paso se realizó la inmunoreacción sobre las monocapas, cuyas especificaciones se encuentran detalladas en el protocolo de la sección 4.2.2.

Luego, los cubreobjetos con las monocapas fueron embebidos en medio de montaje para fluorescencia y montados sobre portaobjetos rectangulares.

Las monocapas con virus adsorbido fueron observadas y fotografiadas bajo un microscopio de fluorescencia a 1000X.

4.1.4.2 Visualización de virus IPN adsorbido a células marcadas con Ioduro de Propidio. Para permitir una mejor delimitación de las células de las monocapas y un mejor contraste en las imágenes obtenidas, se incubaron las monocapas durante 3 minutos, posterior a la inmunoreacción, con 300 μL de una solución de Ioduro de Propidio (2 μL IP en 1500 μL PBS). Este reactivo ingresa a las células muertas, marcando los núcleos de ellas. Al ser excitado al interior del núcleo emite un color naranja, que permite diferenciar el núcleo del citoplasma celular marcando los núcleos de un color anaranjado. Transcurrido el tiempo de la tinción, las monocapas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con buffer PBS y luego montadas y observadas al microscopio de fluorescencia.

4.1.5 Especificaciones para la obtención de microfotografías digitales

Para capturar imágenes a través de una cámara digital ensamblada al microscopio de fluorescencia, se consideraron los siguientes aspectos:

4.1.5.1 Elección de los campos ópticos a fotografiar. Se eligió un campo óptico aleatoriamente dentro de 5 cuadrantes preestablecidos, tanto en los experimentos con filtros Anodisc como en las monocapas celulares. En la figura 1 se muestran a través de 5 círculos pequeños los cuadrantes seleccionados.

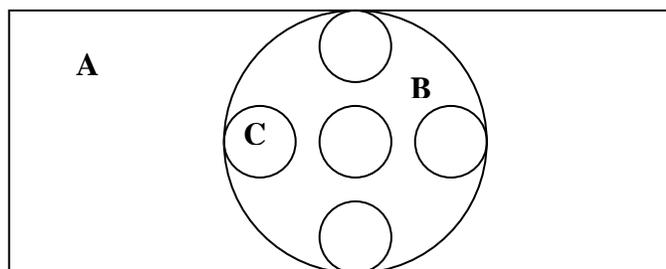


Figura 1. Diseño de la estrategia utilizada para la selección de los cuadrantes donde se fotografiaran aleatoriamente los campos ópticos en cada filtro Anodisc o monocapa celular. **A.** Portaobjetos. **B.** Monocapa celular o filtro Anodisc. **C.** Cuadrante seleccionado.

4.1.5.2 Profundidad de campo. La célula es una estructura tridimensional, por lo tanto con una imagen bidimensional no es posible captar todas las partículas virales adsorbidas a la membrana celular.

Para contar el máximo número posible de entidades individuales adsorbidas a las células, se procedió de la siguiente manera:

Primero se seleccionó una profundidad de campo en la que se observó el máximo número de entidades fluorescentes. A continuación se fue desenfocando progresivamente para visualizar eventuales partículas presentes en otras profundidades de campo. De esta manera se integró, sumando, las partículas que no se superponían en los planos examinados. Normalmente basta con la inspección de dos profundidades de campo complementarias para contabilizar la gran mayoría de las partículas presentes.

4.1.6 Procesamiento de imágenes

El procesamiento de las microfotografías digitales obtenidas de cada experimento, se realizó a través de los programas computacionales Adobe Photoshop 7.0 e Image Pro Plus 4.0. Con ello fue posible modificar las imágenes para permitir una correcta cuantificación de las partículas virales presentes en ellas.

Las funciones de los programas utilizadas en el procesamiento de imágenes se encuentran esquematizadas en la figura 2.

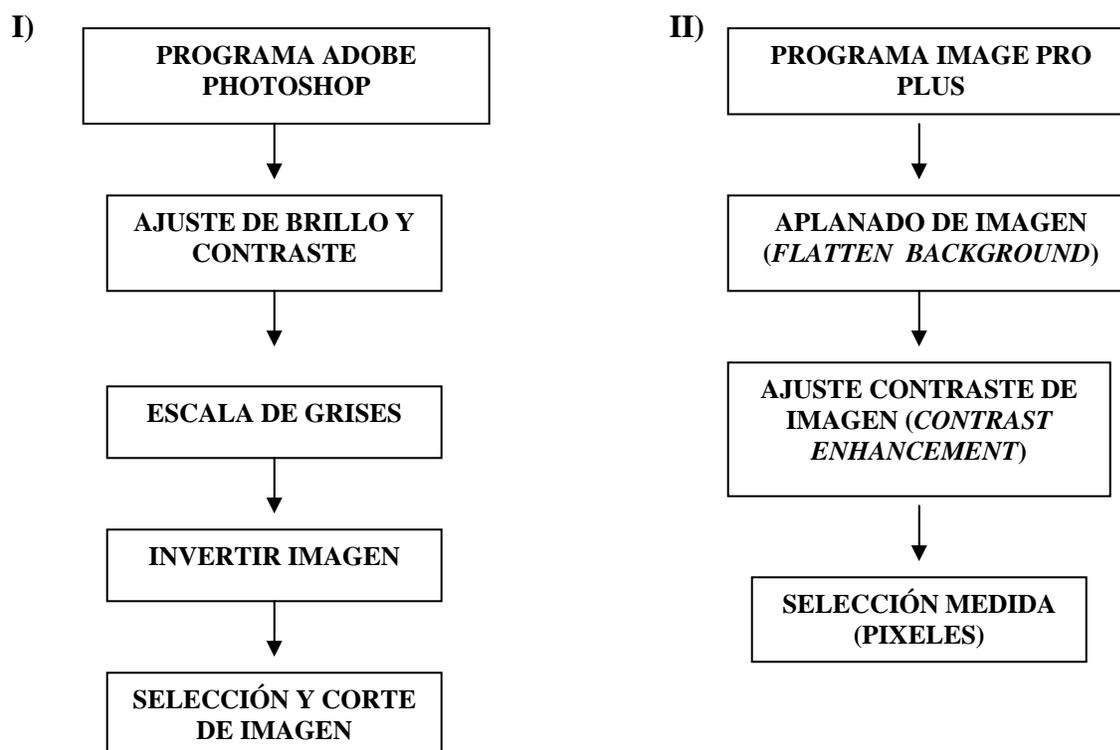


Figura 2. Etapas para el procesamiento de imágenes digitales en los programas Adobe Photoshop e Image Pro Plus, utilizados para permitir la correcta cuantificación de las partículas virales.

Las funciones de cada programa son las siguientes:

- Ajuste de brillo y contraste. Le entrega nitidez a la imagen.
- Escala de grises e invertir imagen. Utilizadas para facilitar la cuantificación de las partículas virales realizada por el programa Image Pro Plus ya que mejora la limpieza de la foto, eliminando la marca fluorescente de fondo.
- Selección y corte de imagen. El campo óptico fue seleccionado como se explicó en la sección 4.1.5.1 Elección de los campos ópticos a fotografiar. Posteriormente, las células fueron seleccionadas utilizando como criterio que éstas se puedan delimitar e individualizar, no importando el número de partículas virales unidas a la célula.
- Aplanado de imagen. Permite eliminar la profundidad de la imagen, observando así, las partículas virales en una misma dimensión.

- Ajuste de contraste de imagen. Esta función le otorga definición a la imagen, permitiendo la visualización de partículas virales como entidades compactas y definidas.
- Selección medida. Para que el programa computacional realice la cuantificación de las partículas virales es necesario que el tamaño de éstas fuese calibrado. Para esto, se realizó la calibración del tamaño de las partículas físicas adsorbidas en tres células.

4.1.7 Cuantificación del virus adsorbido a monocapas celulares

4.1.7.1 Cuantificación de PFs adsorbidas. Para definir la cinética de adsorción del virus IPN, se realizó un conteo de las partículas físicas totales (PFs) adsorbidas, luego de cada tiempo de interacción virus-célula, a través del programa Image Pro Plus.

4.1.7.2 Cuantificación de los FFs adsorbidos. Una segunda cuantificación se realizó por medio de la titulación de las muestras del volumen inicial y final del inóculo utilizado en cada tiempo, de modo de evaluar también la cinética de adsorción en base a los FFs adsorbidos. Estos últimos valores (FFs adsorbidos) se obtienen indirectamente al conocer el título de los FFs ingresados al sistema y los remanentes que no fueron adsorbidos, de la siguiente forma:

$$\mathbf{FFs\ adsorbidos} = \mathbf{FFs\ iniciales} - \mathbf{FFs\ finales}$$

5. RESULTADOS

5.1 PURIFICACIÓN PARCIAL DEL VIRUS PARA EFECTUAR LOS PROCEDIMIENTOS DE MARCAJE

Se tomaron muestras para titular de 100 y 20 μL de la suspensión viral en la primera y última etapa del proceso (clarificación C y fase acuosa FA), respectivamente. Los resultados de esta titulación se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Títulos virales (FF/mL), volúmenes (mL), FFs totales (focos fluorescentes), y rendimientos porcentuales obtenidos en la primera y última etapa del proceso de purificación parcial de virus IPN.

Muestra	Título FF/mL	Volumen (mL)	FF totales	Rendimiento %
C	$8,9 \times 10^6$	60	$5,34 \times 10^8$	100
FA	$6,5 \times 10^6$	1,8	$1,17 \times 10^8$	22

Se puede observar que el rendimiento obtenido de la purificación parcial, o sea, el porcentaje de virus que fue recuperado en la suspensión final fue de un 22%, cantidad contenida en un volumen final de 1,8 mL.

Además, las imágenes obtenidas de partículas virales parcialmente purificadas, retenidas en filtros Anodisc, resultaron ser claras y con reducida marca fluorescente inespecífica (Figura 3), lo que permitió su posterior cuantificación.

5.2 PROTOCOLO PARA LA OBSERVACIÓN DE VIRUS IPN FLUORESCENTE SOBRE FILTROS ANODISC

5.2.1 Visualización de partículas físicas totales de virus IPN

El marcaje fue realizado sobre filtros Anodisc como se indicó en la sección 4.1.3. En la Figura 3, se visualizan las partículas virales parcialmente purificadas como puntos fluorescentes e individuales.



Figura 3. Visualización del virus IPN fluorescente retenido en filtros Anodisc. La barra representa una longitud de $10\mu\text{m}$.

5.2.2 Calibración del tamaño del virus fluorescente

Las partículas virales marcadas sobre filtros Anodisc fueron evaluadas para calibrar su tamaño en píxeles. En la Figura 4 se observa que el 75% de las partículas virales totales de una muestra tienen un tamaño entre 2 y 101 píxeles, por ello, se realizó una posterior calibración dentro de este rango, utilizando intervalos de tamaños más acotados (Figura 5).

En la figura 5 se observa que la distribución de tamaños de las partículas fluorescentes originó una curva descendente, encontrándose que el rango que contiene la mayor cantidad de las partículas fluorescentes es el que va entre 2 y 6 píxeles, correspondiendo a partículas con tamaños entre $0,18$ y $0,53\ \mu\text{m}$, respectivamente.

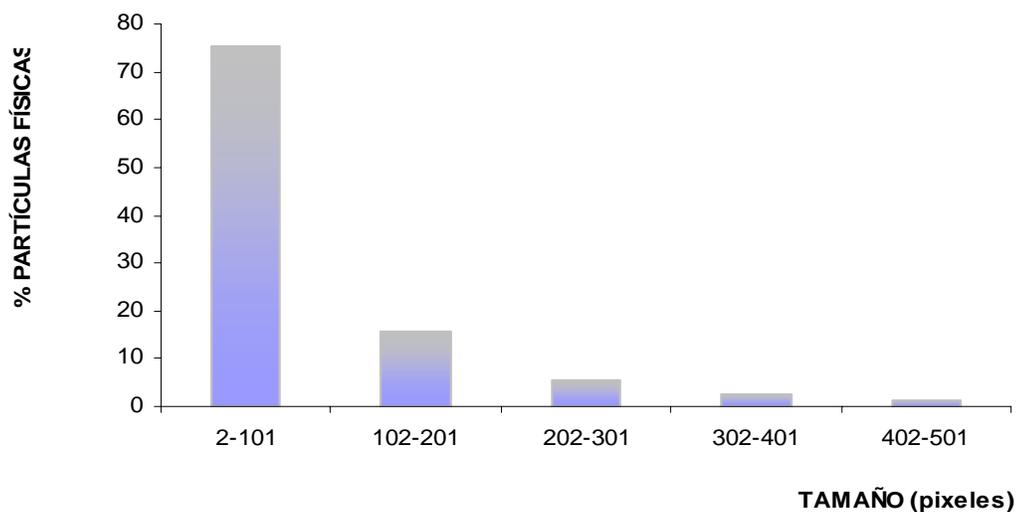


Figura 4. Frecuencia porcentual de los rangos de tamaños (en pixeles) de las partículas de virus IPN fluorescente, al ser analizadas mediante el programa Image Pro Plus.

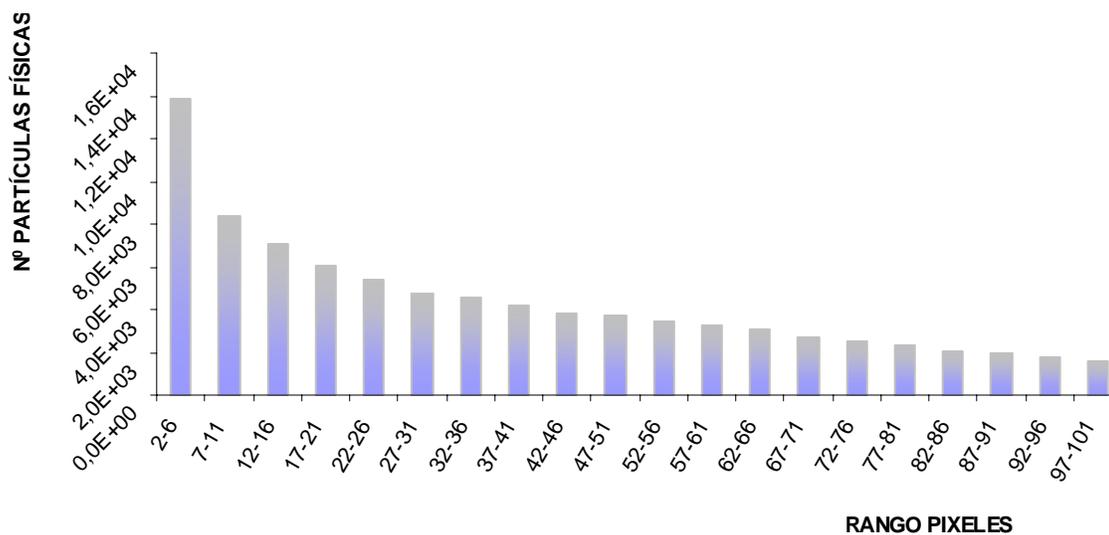


Figura 5. Frecuencia porcentual de los rangos de tamaños (en pixeles) de las partículas de virus IPN fluorescente con tamaños entre 2 y 101 pixeles, al ser analizadas mediante el programa Image Pro Plus.

5.2.3 Relación PF/FF

A modo de ejemplo se presenta el caso de una suspensión viral filtrada que contenía $1,02 \times 10^5$ FF totales. La fórmula utilizada para este cálculo fue explicada en la sección 4.2.2.4 Cálculo de la relación Partículas Físicas/Focos Fluorescentes (PF/FF). Por lo tanto:

$$\begin{aligned} \mathbf{PFT} &= \mathbf{PPF} \times \mathbf{CT} \\ \mathbf{PFT} &= 4174,4 \times 8003 \\ \mathbf{PFT} &= \mathbf{3,3 \times 10^7} \end{aligned}$$

Entonces la relación PF/FF es:

$$\begin{aligned} \mathbf{PFT/FFT} &= \mathbf{3,3 \times 10^7 / 1,02 \times 10^5} \\ \mathbf{PFT/FFT} &= \mathbf{328} \end{aligned}$$

Es decir, de cada 328 partículas físicas (PF) de virus IPN sólo una tiene la capacidad de infectar (FF).

5.2.4 Repetibilidad de los datos experimentales y concordancia de las observaciones

Para evaluar la repetibilidad de los datos experimentales del n° de PF totales del virus IPN, se filtraron dos alícuotas de una misma suspensión viral en filtros diferentes y se cuantificaron las partículas fluorescentes en ellos.

La tabla 3, muestra la cantidad de partículas virales de los filtros 1 y 2 (filtros con menor cantidad de virus), cuyos valores son similares. Al utilizar muestras virales cinco veces más concentradas, filtros 3 y 4, se observó claramente un aumento en el número de PFs (Figura 6), sin embargo, no fue posible su cuantificación ya que a esta mayor concentración, las partículas se superpusieron impidiendo la individualización de cada una de ellas.

Por otra parte, las imágenes obtenidas de las partículas físicas retenidas fueron concordantes con las cantidades de virus de las distintas suspensiones inicialmente filtradas (Figura 6)

Tabla 3. Partículas físicas (PFs) totales de virus IPN contenidas en los filtros ensayados (F1 y F2), para evaluar repetibilidad y concordancia de los datos experimentales.

Filtro	FF totales	PF totales
F1	3×10^6	$1,5 \times 10^8$
F2	3×10^6	$1,7 \times 10^8$

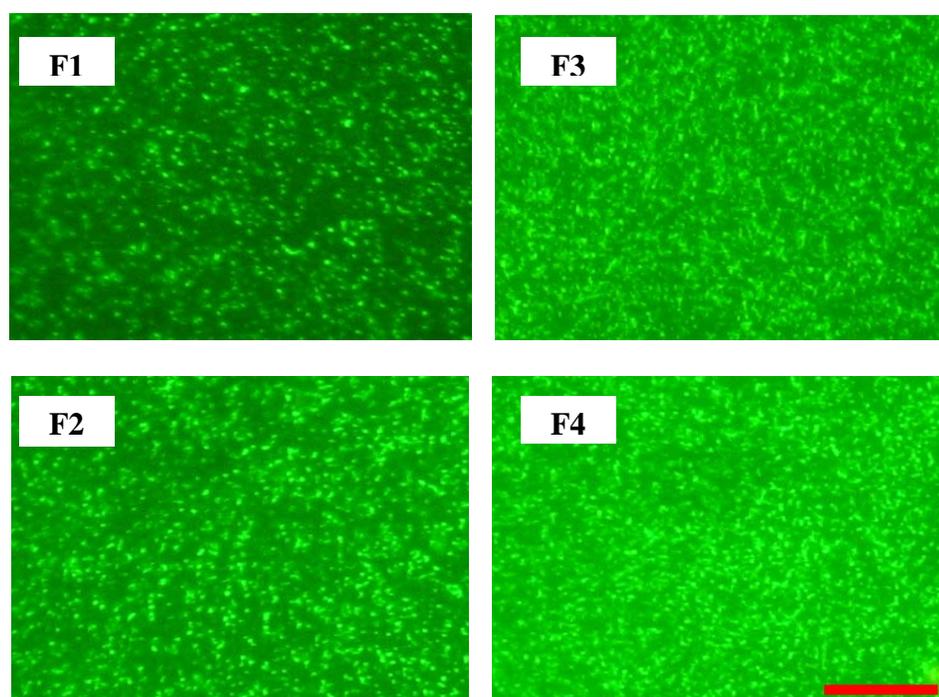


Figura 6. Partículas físicas de virus IPN retenidas sobre filtros Anodisc. Los filtros 1 y 2 contienen 3×10^6 FF totales/filtro y los filtros 3 y 4 contienen $1,5 \times 10^7$ FF totales/filtro. Barra = $10 \mu\text{m}$.

5.3 VISUALIZACIÓN DE VIRUS IPN FLUORESCENTE UNIDO A CÉLULAS EN CULTIVO

5.3.1 Adsorción de virus IPN a células CHSE-214

Al observar las monocapas celulares al microscopio de fluorescencia, se visualizaron las partículas virales como entidades fluorescentes e individuales adsorbidas a la superficie celular. Transcurrido el tiempo de interacción virus-célula, se observó un aumento en el número de PFs adsorbidas a cada célula (Figura 7).

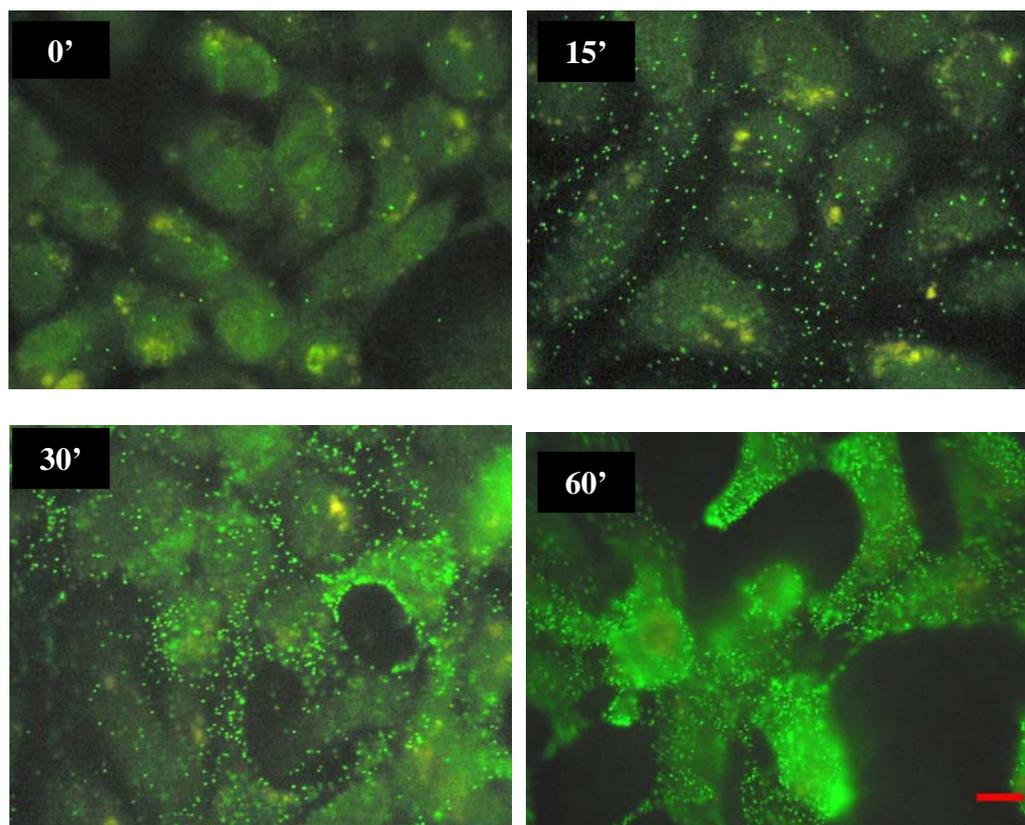


Figura 7. Virus IPN fluorescente unido a la superficie de células CHSE-214 transcurrido los tiempos (0, 15, 30 y 60 minutos) indicados en la parte superior de las imágenes. Experimento realizado con una m.d.i = 110. Barra = 10 μ m.

5.3.2 Adsorción de virus IPN incluyendo el marcaje de células con Ioduro de Propidio

El marcaje de las células con Ioduro de Propidio permitió una mejor delimitación y un mejor contraste en las imágenes obtenidas de los experimentos de adsorción. Este fluoróforo ingresa a las células muertas, marcando los núcleos de ellas. Al ser excitado al interior del

núcleo emite un color naranja, que permite diferenciar el núcleo del citoplasma celular. Esto es observado en la Figura 8.

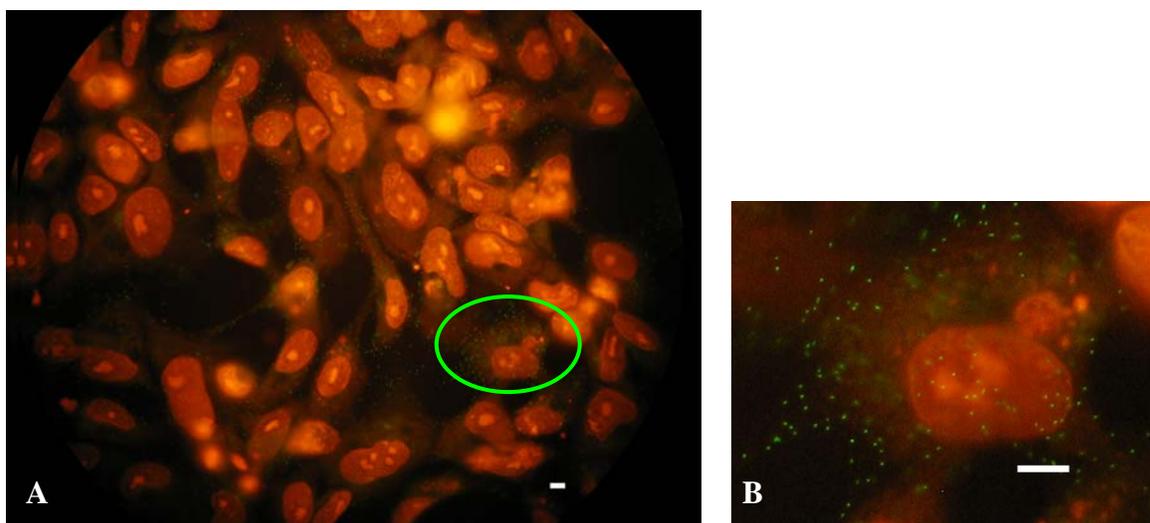


Figura 8. A. Adsorción de virus IPN y marcaje de células CHSE-214 con Ioduro de Propidio a una m.d.i = 63. Barra = 5 μ m. **B.** Imagen correspondiente a la célula marcada con un círculo en la Figura A. Las partículas virales son visualizadas de color verde y el núcleo de la célula naranja. Barra = 5 μ m.

De igual forma que en las células que no fueron marcadas con Ioduro de Propidio, al aumentar el tiempo de interacción virus-célula, aumentó el número de partículas físicas unidas (Figuras 9 y 10).

Al momento de cuantificar las partículas virales por medio del programa Image Pro Plus, la coloración naranja del núcleo dificultó la cuantificación. Es por esto, que las imágenes debieron tratarse (Figuras 9 y 10), lo que será detallado en la sección 5.5 Procesamiento de imágenes.

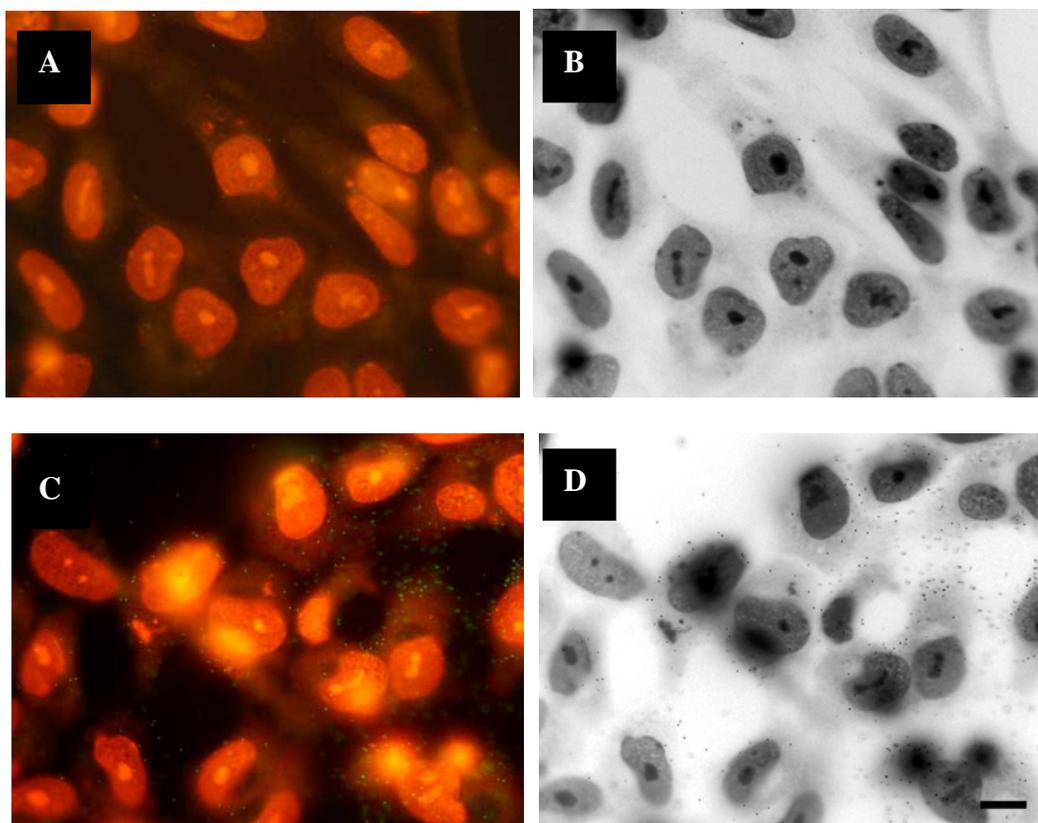


Figura 9. Virus IPN adsorbido a monocapas de células CHSE-214 a distintos tiempos de interacción. **A-B** 0 minutos, **C-D** 15 minutos. Las imágenes en escala de grises se obtienen como resultado de la transformación de las imágenes originales. Barra = 10 μm .

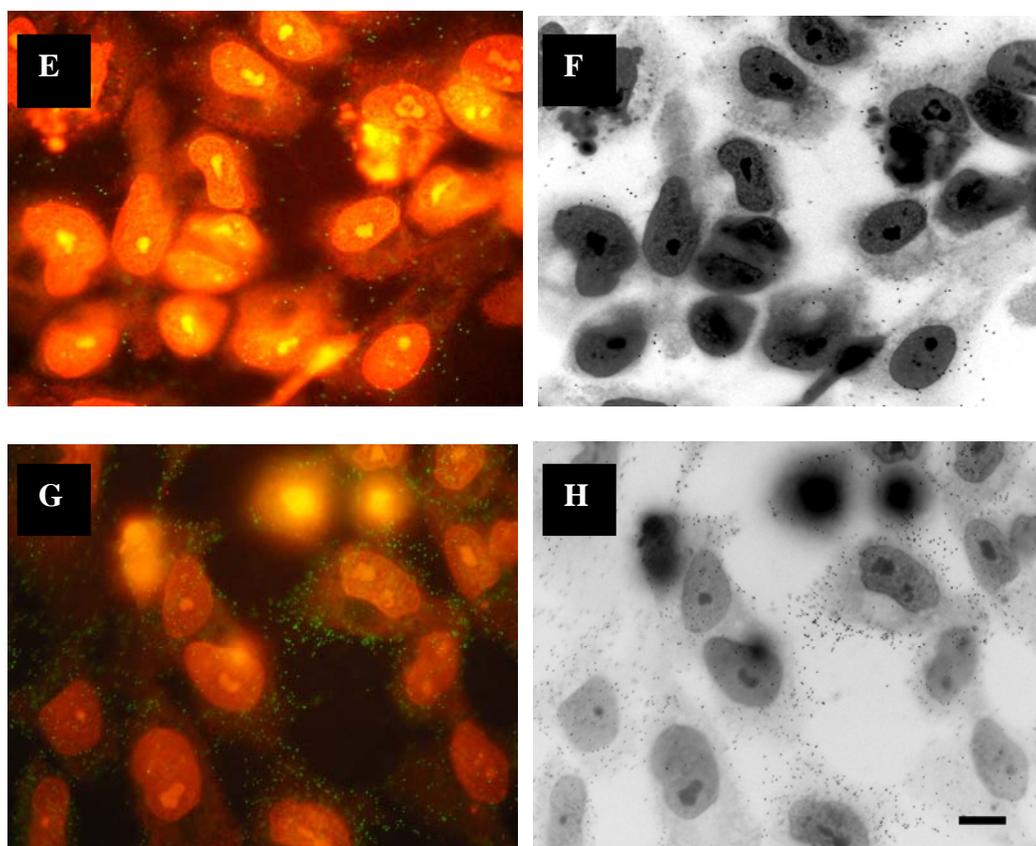


Figura 10. Virus IPN adsorbido a monocapas de células CHSE-214 a distintos tiempos de interacción. **E-F** 30 minutos, **G-H** 60 minutos. Las imágenes en escala de grises se obtienen como resultado de la transformación de las imágenes originales. Barra = 10 μm .

5.4 ESPECIFICACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE MICROFOTOGRAFÍAS DIGITALES

La célula es una estructura tridimensional. Para captar en imágenes digitales el máximo de partículas físicas adsorbidas a su superficie, se procedió de la siguiente manera:

Se seleccionó una profundidad de campo en la que se observó el máximo de entidades fluorescentes. Luego, se desenfocó progresivamente para visualizar eventuales partículas presentes en otras profundidades.

Ejemplos de distintas profundidades de campo para una misma célula se observan en las figuras 11 y 12.

En la figura 11, gran parte de las partículas virales (puntos negros) adsorbidas a la célula se repiten en las imágenes de las dos profundidades de campos mostradas, por lo tanto fueron cuantificadas las partículas de ambas imágenes y luego se eligió el n° de PF de la imagen que resultó tener una mayor cantidad de partículas virales.

En la Figura 12, las imágenes de las profundidades de campo fueron diferentes, es decir, no se superpusieron la mayoría de las partículas virales. Por esto, las partículas virales de ambas imágenes fueron sumadas. Sin embargo, esta última situación es la menos frecuente, generalmente se logra captar una imagen de profundidad de campo intermedia que contiene el máximo de partículas virales.

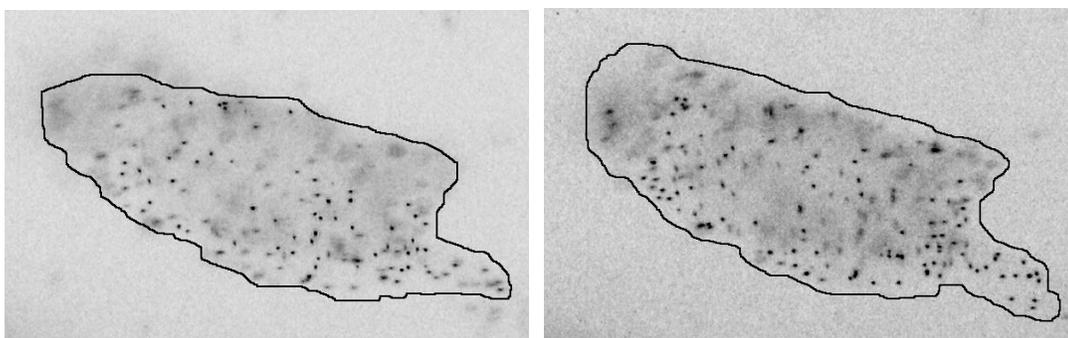


Figura 11. Dos imágenes, transformadas a escala de grises, de distinta profundidad de campo de una célula CHSE-214 con virus IPN adsorbido. Aumento 1000X.

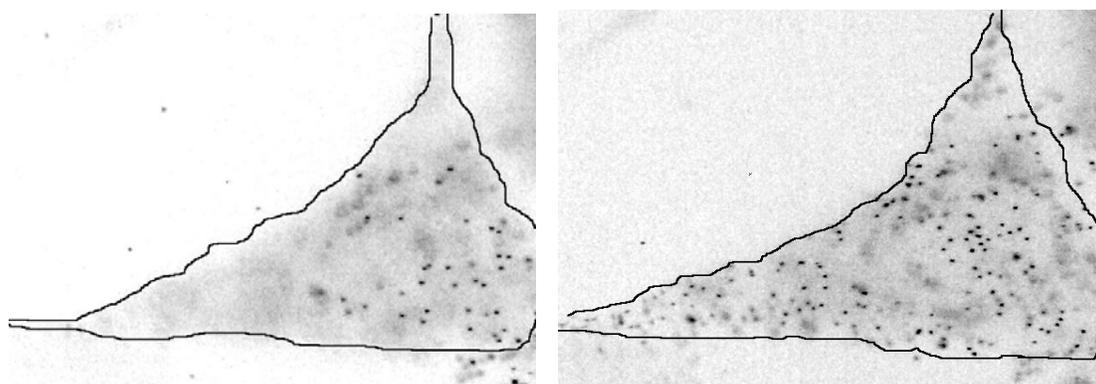


Figura 12. Dos imágenes con diferente profundidad de campo donde se visualiza virus IPN adsorbido a una célula CHSE-214. Aumento de 1000X.

5.5 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Ajuste de brillo y contraste

La imagen se observa con poca claridad (Figura 13). Esta función le otorgó nitidez y brillo a la imagen, lo que hizo posible visualizar individualmente las partículas fluorescentes (Figura 14).

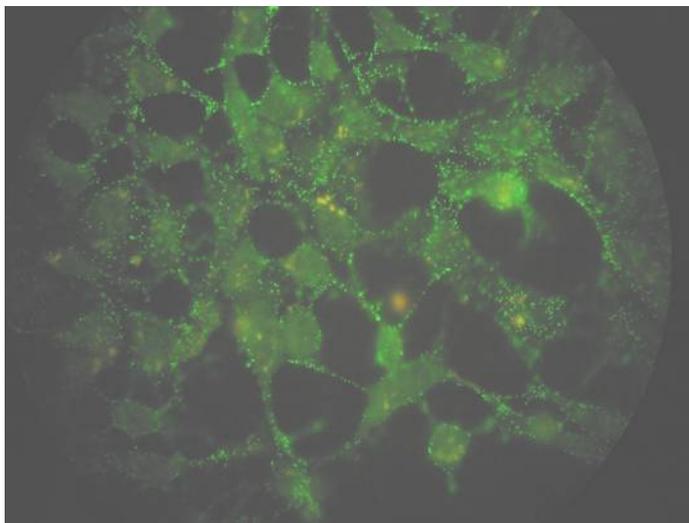


Figura 13. Imagen sin procesar de virus IPN unido a células CHSE-214. Aumento de 1000X.

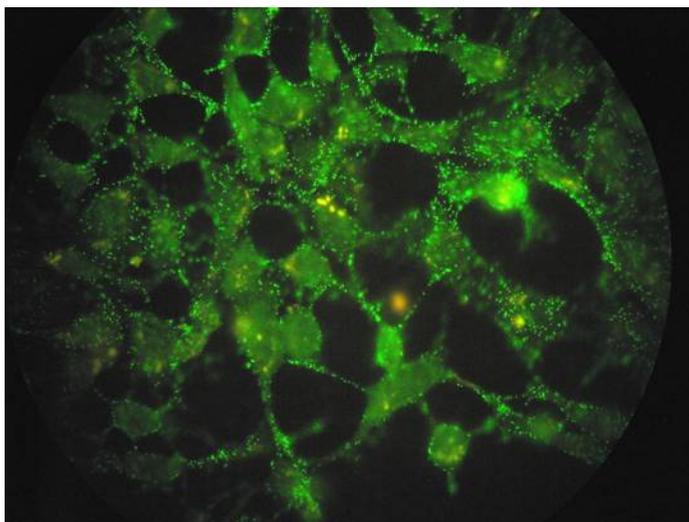


Figura 14. Imagen con ajustes de brillo y contraste.

5.5.2 Escala de grises

Al transformar la imagen a escala de grises e invertirla (Figuras 15 y 16) facilitó la cuantificación de las partículas virales realizada por el programa Image Pro Plus ya que mejoró la limpieza de la foto, eliminando la marca fluorescente de fondo.

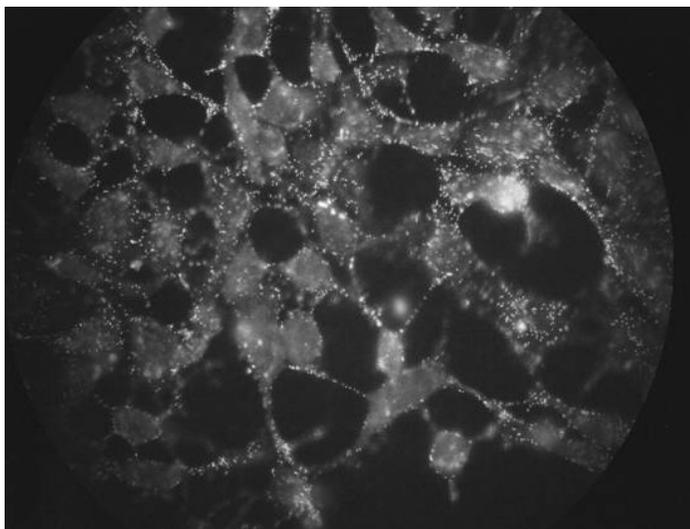


Figura 15. Imagen transformada a escala de grises

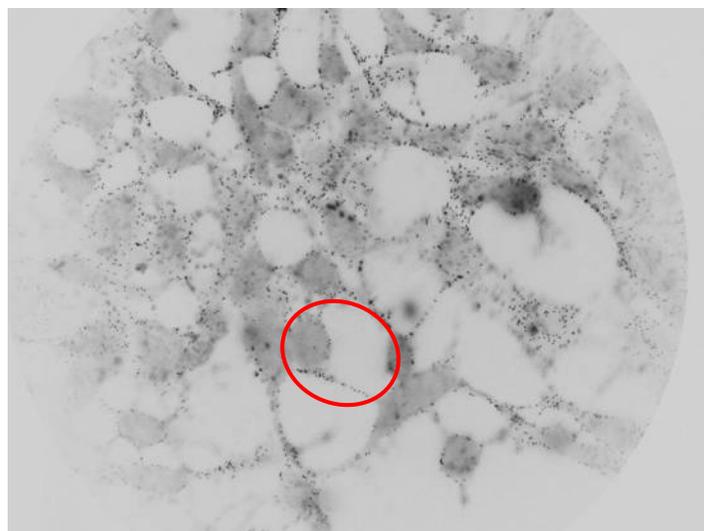


Figura 16. Imagen invertida. La célula marcada con el círculo rojo será utilizada como ejemplo de las próximas funciones.

5.5.3 Selección y corte

Para individualizar las células en las cuales se cuantificó virus, fueron comparadas la imagen sin procesar con la imagen transformada a escala de grises e invertida. Así fue posible la delimitación del citoplasma (Figura 17).

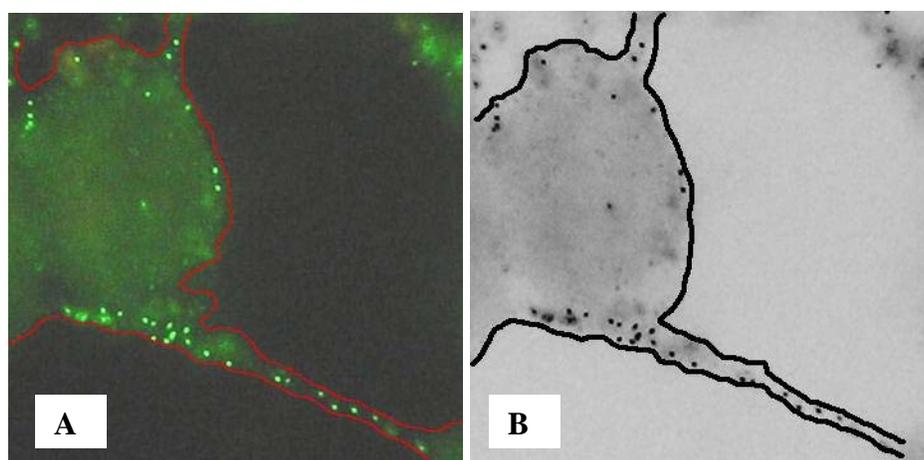


Figura 17. A. Imagen sin procesar de una célula CHSE-214 con virus IPN adsorbido B. Imagen transformada a escala de grises e invertida. Amplificación de 1000X.

5.5.4 Aplanado de imagen

Esta función permitió eliminar la profundidad de la imagen, observando así las partículas virales en una misma dimensión (Figura 18A).

5.5.5 Ajuste de contraste de imagen

La foto fue procesada ajustando el contraste de la imagen, logrando así que las partículas virales fueran visualizadas como entidades compactas claramente definidas (Figura 18B).

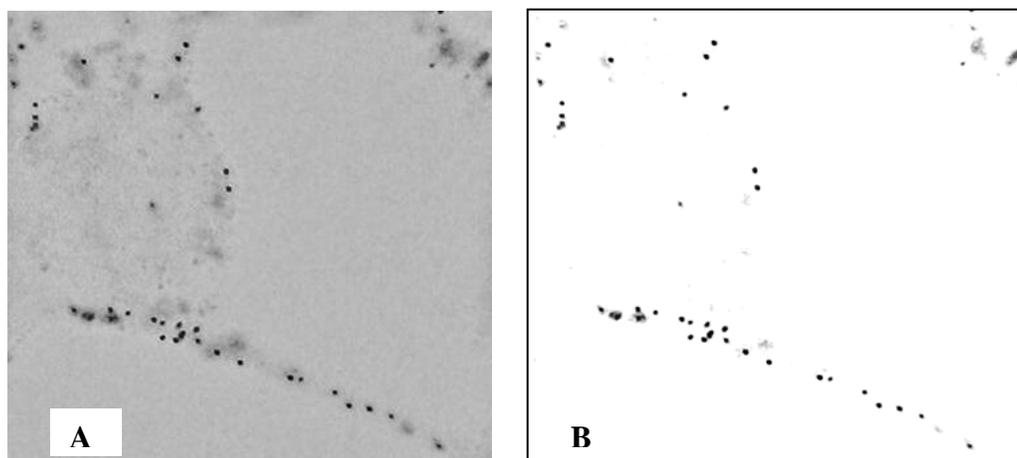


Figura 18. **A.** Función aplanado de imagen. **B.** Ajuste de contraste

5.5.6 Selección del rango de tamaño en pixeles.

Se realizó la cuantificación de las partículas virales adsorbidas en tres células, encontrándose en el rango de tamaño de 2 a 31 pixeles (Figura 19).

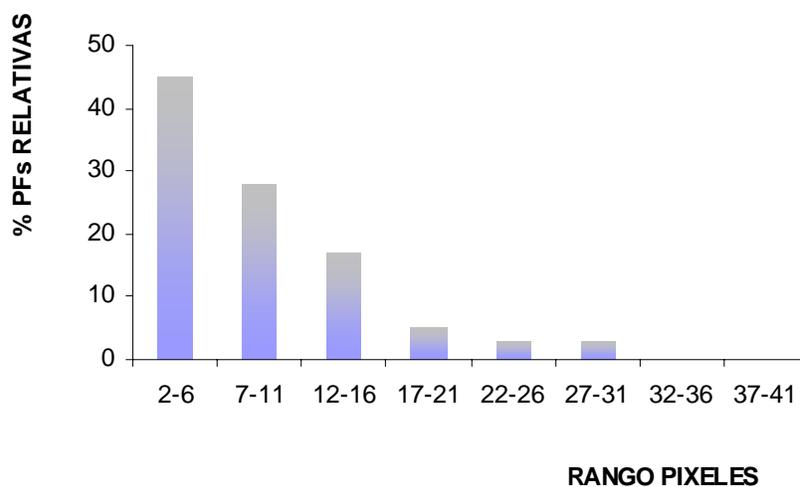


Figura 19. Frecuencia porcentual de tamaños, entre 2 y 41 pixeles, que presentan las partículas de virus IPN fluorescente adsorbidas en células CHSE-214 al ser analizadas a través del programa Image Pro Plus.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE VIRUS IPN ADSORBIDO A CÉLULAS CHSE-214

Para definir la cinética de unión de las partículas virales, se utilizaron dos métodos diferentes de cuantificación.

5.6.1 Partículas Físicas adsorbidas

Para realizar la cuantificación de las partículas físicas adsorbidas, las imágenes debieron tratarse a través de dos programas computacionales y las partículas virales fueron calibradas como se indicó anteriormente. Posteriormente, cuarenta células fueron individualizadas por monocapa, cuantificando las partículas virales en cada una de ellas. Las imágenes de la figura 20 muestran que existe relación en lo cuantificado mediante el programa computacional y lo observado.

Al cuantificar las partículas físicas y su curva de cinética de unión (Figura 21) podemos apreciar que el porcentaje de adsorción es muy bajo comparado con el total de partículas virales presentes en el inóculo.

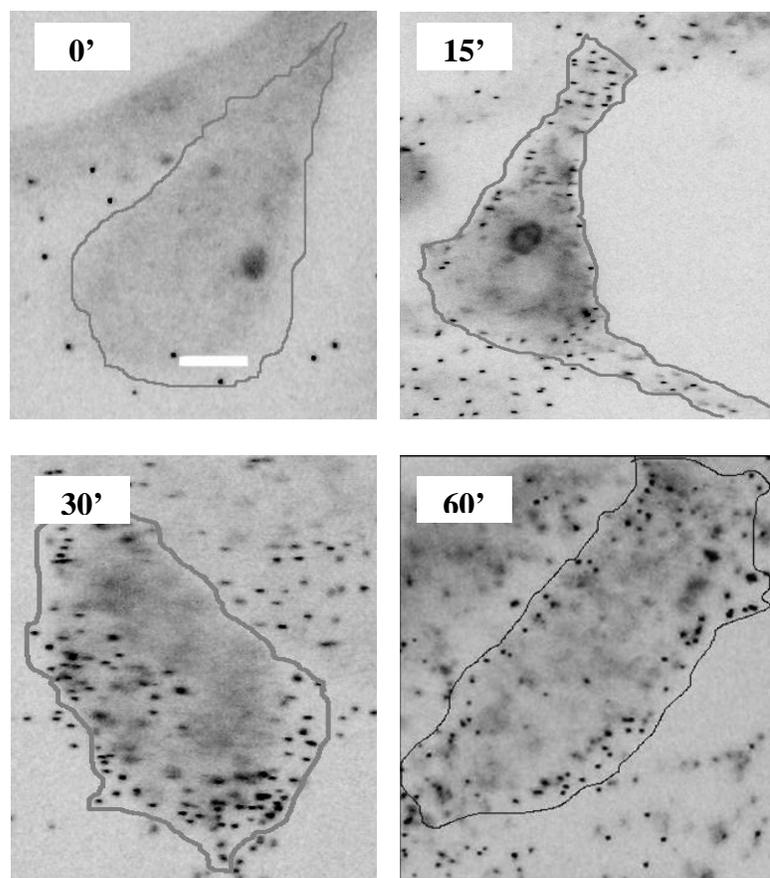


Figura 20. Virus IPN unido a la superficie de células CHSE-214 con una $md.i = 110$ a los tiempos 0, 15, 30 y 60 minutos. Se cuantificó por medio del programa Image Pro Plus: 2, 35, 68 y 80 partículas físicas (PFs), respectivamente. Barra = 10 μ m.

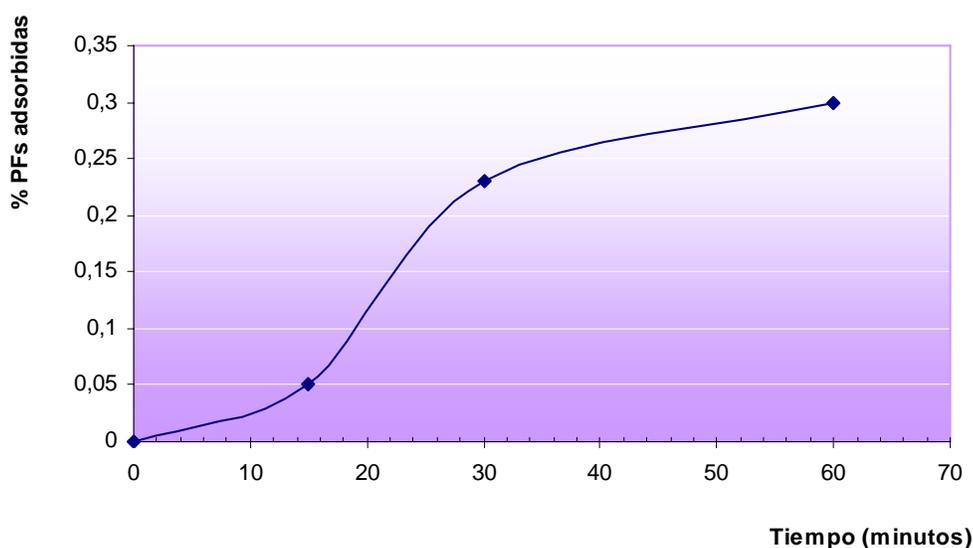


Figura 21. Porcentaje de partículas físicas de virus IPN adsorbidas a una monocapa de células CHSE-214 (~ 100.000 células) en función del tiempo. M.d.i =110.

5.6.2 Focos Fluorescentes adsorbidos

La cuantificación de las partículas virales activas o focos fluorescentes (FFs), se realizó cuantificando indirectamente los FFs a través de titulación. De esta forma, fueron titulados los focos fluorescentes iniciales (FF_I) y transcurrido el tiempo de adsorción, los FFs remanentes o finales (FF_F) que no fueron adsorbidos.

El título de los FF_F al tiempo 0 fue tomado como título del inóculo o FF_I utilizado para infectar en todos los tiempos.

Tabla 4. Cuantificación de focos fluorescentes totales (FFs o partículas virales activas), adsorbidos y no adsorbidos, por una monocapa de células CHSE-214 (~100.000 células) a diferentes tiempos. M.d.i = 110.

TIEMPO	FF_I	FF_F	FF_{AD}	% FF_{AD}	% FF_{SINAD}
0	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	0	0	100
15	$1,1 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	18	82
30	$1,1 \times 10^7$	$7,4 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	33	67
60	$1,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	48	52

Al contrario del porcentaje de adsorción de las partículas físicas, tras 60 minutos de adsorción se unió el 48% de las partículas virales activas (tabla 4).

La figura 22, muestra la cinética de unión de las partículas virales activas. En los primeros minutos de adsorción, la velocidad de la curva fue mayor, disminuyendo su velocidad a medida que transcurrió el tiempo.

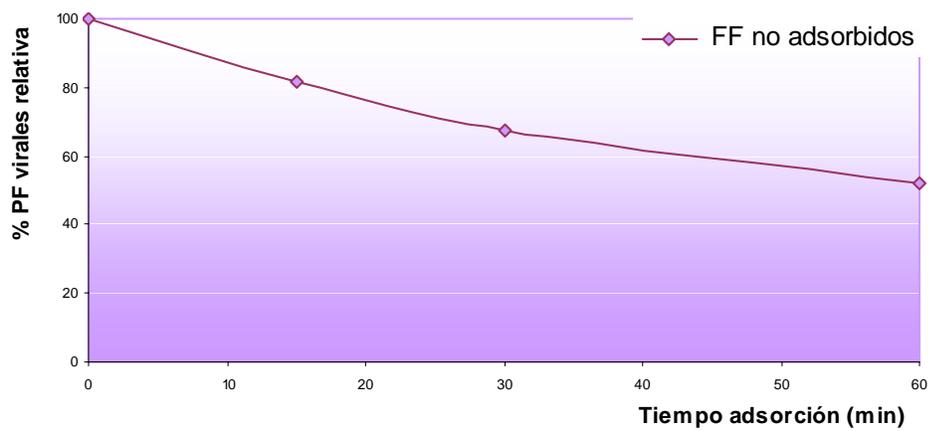


Figura 22. Porcentaje de focos fluorescentes (FFs o partículas de virus IPN activas) no adsorbidos a una monocapa de células CHSE-214, a los tiempos 0, 15, 30 y 60 minutos. M.d.i = 110.

6. DISCUSIÓN

A medida que avanza la tecnología, más sofisticadas son las estrategias utilizadas en el estudio de las interacciones virales. En los primeros estudios para analizar cuantitativamente las etapas tempranas en la infección con virus IPN, las partículas virales fueron marcadas con radioactividad. Sin embargo, los resultados obtenidos sólo permitieron evaluar una situación promedio en la que una cierta cantidad de cuentas por minuto (cpm) tienen correspondencia con una cierta cantidad de partículas virales (Kuznar y col 1995). Recientemente, gracias al avance de técnicas de epifluorescencia, comenzó el análisis virus IPN-célula desde la perspectiva de visualizar partículas virales individuales (Osorio y col 2005).

Existen al menos dos alternativas para marcar los virus. Una de ellas consiste en incorporar un fluorocromo que se une directamente a algún componente estructural del virus, por ejemplo Sybr Green que se une al ácido nucleico viral. La otra es el marcaje indirecto del virus a través de anticuerpos que contienen a los fluorocromos adheridos (Osorio y col 2005).

El Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso dispone, desde hace algunos años, de anticuerpos monoclonales anti-VP2, anti-VP3 que han sido utilizados con diferentes propósitos tales como en el diseño de un método de diagnóstico de rápida detección (Espinoza y Kuznar 2002) y más recientemente para establecer, precisamente, si era posible visualizar una partícula viral asociada a una determinada superficie (Osorio y col 2005).

Para continuar con estas investigaciones, se decidió para este trabajo, el marcaje de las partículas virales con anticuerpos fluorescentes, una sonda específica que permite la individualización de las partículas virales.

Para esto, fue necesario realizar un procedimiento de purificación de virus IPN para obtener imágenes limpias, es decir, con una reducida marca fluorescente de fondo. Si bien los virus pueden purificarse mediante diferentes técnicas y hasta diferentes grados, mientras más purificado mayor es el tiempo requerido para hacerlo y más compleja suele ser la técnica (Imajoh y col 2003). En este trabajo, se adoptó el compromiso de utilizar un método simple, que por una parte disminuyó el tiempo para obtener una suspensión viral adecuada para los experimentos de adsorción, pero por otra parte no permitió obtener una alta concentración y una purificación total del virus, aún cuando esto último no era necesario para lograr los objetivos de este trabajo.

Una vez realizado el proceso de purificación, las partículas virales fueron marcadas en dos superficies diferentes. Una de ellas, se realizó en partículas retenidas sobre filtros Anodisc. La principal utilidad de realizar el marcaje sobre filtros es que permite obtener la relación PF/FF, es decir, que cantidad de la fracción viral corresponde a virus activo. Esta relación es de gran importancia en los ensayos de adsorción ya que nos permitirá conocer el número total de partículas virales contenidas en la suspensión. Por otro lado, desde el punto de vista del control de la enfermedad, esta relación podría verse relacionada con la virulencia de las distintas cepas.

Además, el marcaje de partículas virales retenidas sobre filtros permite calibrar su tamaño mediante un programa computacional. A diferencia de los resultados obtenidos por Osorio y col (2005), cuando se marcó el virus con anticuerpos fluorescentes se obtuvo un amplio rango de tamaño. Este podría explicarse por la mayor o menor cantidad de moléculas de fluorocromo unidas por partícula viral.

El marcaje sobre filtros ha demostrado ser un método óptimo para diagnóstico ya que permite visualizar y cuantificar partículas virales. En el Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso, se desarrolló un método para concentrar partículas virales desde muestras de agua, ya que el virus IPN se mantiene y disemina a través de ella, esto podría permitir a futuro la predicción de brotes de infecciones virales (Chamorro y col 2006). Existen otros métodos para cuantificar partículas virales como la microscopía electrónica, pero no todas las partículas suelen unirse a la grilla (Couve y col 1992).

Para estudiar la cinética con que el virus se une a las células se realizó el marcaje de las partículas virales adsorbidas a las células a diferentes tiempos. El número de partículas virales fue aumentando a medida que transcurrió el tiempo como era lo esperado (Kuznar y col 1995). Para mejorar la visualización de las partículas virales adsorbidas, los núcleos celulares fueron marcados con Ioduro de Propidio, obteniendo un mayor contraste. Sin embargo, al cuantificar las partículas virales con el programa computacional, las imágenes debieron ser tratadas ya que el contraste del núcleo interfirió con el conteo. Por otra parte, otra dificultad ocurrió en el proceso de la toma de imágenes ya que las células al ser estructuras tridimensionales presentan su superficie en diferentes profundidades de campo. Por lo tanto, para realizar un óptimo conteo fueron seleccionadas las imágenes de las profundidades que contenían el máximo de entidades fluorescentes.

Con el propósito de evaluar el protocolo diseñado, se realizó a modo de prueba, la cuantificación de las partículas virales adsorbidas por medio del programa computacional. La cinética obtenida fue la esperada, uniéndose al inicio una gran cantidad de partículas físicas (Kuznar y col 1995).

Antes de realizar la cuantificación de las partículas virales adsorbidas, éstas debieron ser calibradas para conocer su tamaño equivalente en pixeles encontrándose en un estrecho rango de 2 a 31 pixeles. Esto podría deberse a que precisamente los virus que se unen a los receptores celulares son entidades de tamaño homogéneo por su integridad estructural, esto implica que se une a las células una determinada población de partículas virales. No así, cuando las partículas virales son calibradas sobre filtros ya que el rango de tamaño obtenido fue mucho mayor.

Al realizar la cuantificación de las partículas virales encontramos que sólo un bajo porcentaje de partículas virales se unieron a las células, esto es, un 0,3% a los 60 minutos de adsorción. Si comparamos estos resultados con trabajos anteriores de adsorción en el cual el virus es marcado con radioactividad, se obtuvo un 15% de adsorción al mismo tiempo con una mdi similar (Kuznar y col 1995). Esta diferencia en los resultados puede deberse a una sobreestimación en el método de marcaje con radioactividad, ya que se podría estar cuantificando radioactividad unida a la célula que no es virus. De igual forma, partículas parcialmente ensambladas, podrían no ser reconocidas por los anticuerpos por lo que las partículas no serían visibles ni cuantificadas, subestimando el porcentaje de partículas adsorbidas. Además, algunas partículas virales pueden quedar fuera de foco y no ser cuantificadas al encontrarse en otra profundidad de campo. Sin embargo, trabajos realizados hace algunos años con microscopía electrónica demuestran que el mecanismo de infección es limitado a la interacción de pocos virus ya que fue muy difícil encontrar virus adsorbido y/o internalizado en vesículas citoplasmáticas (Couve y col 1992).

Por otro lado, también fueron cuantificadas las partículas virales activas (FFs), titulando el sobrenadante con virus remanente a los diferentes tiempos. El porcentaje de FFs adsorbidos se obtuvo teóricamente por diferencia entre los FFs iniciales y finales. Por lo tanto, este valor podría estar sujeto a errores ya que partículas virales podrían perderse con los lavados. Sin embargo, como el virus se une a su receptor específicamente, la población viral que no tenga esta capacidad debiera cogerse y titularse en su totalidad ya que las células fueron previamente bloqueadas con suero bovino fetal para evitar la adsorción inespecífica del virus. Por lo tanto, sería válido comparar los resultados obtenidos con la cuantificación de las partículas físicas. Este es uno de los resultados más relevantes de este trabajo ya que el porcentaje de adsorción de FFs fue mayor, obteniéndose un 48% de adsorción a los 60 minutos, esto nos muestra que existe una subpoblación de partículas virales (las con actividad biológica) que se unen preferentemente a las células. Este resultado es concordante con el concepto de que las partículas virales perfectamente ensambladas son las que se espera que tengan actividad biológica, ya que tienen la estructura adecuada para asociarse con los receptores específicos (Helenius 2007).

En conclusión, en este trabajo se logró desarrollar una metodología sencilla para estudiar la interacción virus-célula a través de la visualización de partículas virales fluorescentes adsorbidas. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para mejorar

la cuantificación de las partículas virales desde programas computacionales ya que no se encuentra determinado el porcentaje de error asociado a cada una de las etapas del método.

Adicionalmente, se espera que los ensayos de adsorción viral, permitan evaluar mediante una metodología relativamente simple y visual, la afinidad relativa del virus IPN por los diferentes tejidos del pez. Así será posible investigar en profundidad la patogenie de la enfermedad propiamente tal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ariel E, and NJ Olesen. 2002. Finfish in aquaculture and their diseases –A retrospective view on the European Community. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 22 (2): 72-85.
- Chamorro C, JC Espinoza, K Soto, J Kuznar. 2006. Concentration of infectious pancreatic necrosis virus determined flow filtration with exclusion filtration. *Arch Med Vet* 38, N°1, 77-82.
- Chou HY, TY Peng, SJ Chang, YL Hsu, JL Wu. 1999. Effect of heavy metal stressors and salinity shock on the susceptibility of grouper (*Epinephelus sp.*) to infectious pancreatic necrosis virus. *Vir Res* 63, 121-129.
- Couve E, Kiss J, Kuznar J. 1992. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol Int Rep* 16: 899-906.
- Dobos P. 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 21, 242-258.
- Dobos P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus. *Annual Rev Fish Dis* 5, 25-54.
- Duncan R, E Nagy, PJ Krell, and P Dobos. 1987a. Comparative study of in-situ cell death induced by the viruses of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) and infectious pancreatic necrosis (IPN) in rainbow trout. *J Comp Pathol* 124, 300-307.
- Duncan R, E Nagy, PJ Krell, and P Dobos. 1987b. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 61: 3655-3664.
- Espinoza JC, J Kuznar. 2002. Rapid simultaneous detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Virol Methods* 105, 81-85.

- Granzow H, F Weiland, D Fitchner, PJ Enzmann. 1997. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis* 20, 1-10.
- Helenius A. 2007. Principles of virus structure. En: Knipe D & P Howley (eds), *Fields Virology* vol 1: 99-118. Wolters Klumer, Philadelphia.
- Hjalmarsson A, E Everitt. 1999. Identification of IPNV-specified components released from productively infected RTG-2 cell following massive cytopathic effect. *Arch Virol* 144, 1487-1501.
- Hong JR, TL Lin, YL Hsu, JL Wu. 1998. Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virol* 250, 76-84.
- Hong JR, YL Hsu, JL Wu. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line. *Virus Res* 63, 75-83.
- Imajoh M, K Yagyu, S Oshima. 2003. Early interaction of marine birnavirus infection in several cell lines. *J Gen Virol* 84, 1809-1816.
- Jorgensen, PEV, and F Bregnballe. 1969. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nord Vet Med* 21:142-148.
- Kuznar J, M Soler, G Farias, JC Espinoza. 1995. Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells. *Arch Virol* 140, 1833-1840.
- Lyles D. 2000. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expresión by RNA virases. *Microbiol and Mol Biol Rev* 64, 709-724.
- McKnight I J and Roberts RJ 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis: The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br Vet* 132:76-86.
- Maraver A, A Oña, F Abaitua, D González, R Clemente, JA Ruiz-Díaz, JR Castón, F Pazos, JF Rodríguez. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of

- infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol* 77, 6438-6449.
- Moss LH, M Gravell. 1969. Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 3, 52-58.
- Nicholson B. 1993. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Ann Rev Fish Dis* 3:241-257.
- Novoa B, JL Barja, A Figueras. 1995. Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 131, 1-9.
- OIE, Organización Mundial de Salud Animal. 2005. *Aquatic Animal Health Code* (8th ed). Paris, France.
- Ortega C, R Enríquez. 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Arch Med Vet* 39, N°1, 7-18.
- Osorio M, JC Espinoza y J Kuznar. 2005. Visualization of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) particles labelled with fluorescent probes. *J Virol Meth* 130, 140-144.
- Oye AK, and E Rimstand. 2001. Inactivation of infectious salmon anemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Dis. Aquat. Org.* 48:1-5.
- Reno. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus and associated aquatic *Birnaviruses*. En "*Fish Diseases and Disorders*": Viral, bacterial and fungal infections (PT Woo and DW Bruno, eds.), Vol 3, CAB Publishing, Wallingford, U.K., Pp 1-55.
- Rimstad E, Brun E, Jensen I, Johansen L, Gregory A, Raynard R, Stagg R and P Midtlyng. 2003. *IPN in salmonids a review*.
- Roberts RJ, MD Pearson. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 28, 383-389.

- Rodríguez S, JJ Borrego, SI Pérez-Prieto. 2003. Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv Vir Res* 62, 113-165.
- Santi N, VN Vakharia, O Evensen. 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31-40.
- Santi N, H Song, VN Vakharia, O Evensen. 2005. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J Virol* 79, 9206-9216.
- Smail DA, McFarlane, LA Bruno, DW and McVicar, A. H. (1995). The pathology of an IPN-Sp sub-type (Sh) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland. *J. Fish Dis.* 18:631-638.
- Smail DA, N Bain, DW Bruno, JA King, F Thompson, DJ Pendrey, S. Morrice, CO Cunningham. 2006. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J Fish Dis* 29, 31- 41.
- Song H, N Santi, O Evensen, VN Vakharia. 2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol* 79, 10289-10299.
- Swanson RN and JH Gillespie. 1981. An indirect fluorescent-antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. *J Fish Dis* 4: 309-315.
- Swanson RN and JH Gillespie. 1982. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood and blood components of experimentally infected trout. *Can J Fish Aquat. Sci.* 39; 225-228.
- Tarrab E, L Berthiaume, J Heppell, M Arella, and J Lecomte. 1993. Antigenic characterization of serogroup 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 74: 2025-2030.
- Wolf K. 1988. Infectious pancreatic necrosis. *Fish Viruses and Fish Diseases*, Cornell Univ, Press, Ithaca, NY, Pp 115-157.

Wood EM, Snieszko SF and WT Yasutake.1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout.
Am Med Assoc Arch Pathol 60: 26-28.

8. ANEXO

REACTIVOS

- Cloruro de Sodio HCl fumante 37% (*Merck*).
- Cloroformo CHCl₃ (*Analytic*).
- Hidróxido de Sodio NaOH (*Merck*).
- Metanol CH₃OH (*J.T.Baker*).
- CO₂ comprimido (*Aga*).
- Polietilenglicol (HO(C₂H₄O)_n H) 6000 (*Merck*).
- Sacarosa C₁₂H₂₂O₁₁ (Riedel-De Haën Ag Seelze-Hannover).

SOLUCIONES

- Buffer Fosfato Salino (PBS). Na₂HPO₄ 8,10 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, NaCl 1,37 mM. pH 7,3.
- Buffer Fosfato Salino (PBS) suplementado con MgCl₂ 1mM y CaCl₂ 1 mM.
- Buffer TNE. Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM.
- Medio Mínimo Esencial Eagle (*USBiological*) con sales Earle, L-glutamina y Aminoácidos no esenciales, suplementado con 2% suero bovino fetal.
- Medio de montaje fluorescente DakoCytomation.
- Anticuerpo monoclonal anti-VP3 (Laboratorio Bioquímica y Virología, Universidad de Valparaíso).
- Anticuerpo policlonal anti-mouse IgG (whole molecule) – FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (*Sigma*).
- Ioduro de Propidio.

- Suero bovino fetal (Bio Whittaker).
- Tripsina-EDTA (*Sigma*).

MATERIAL DE LABORATORIO

- Filtros de membrana de óxido de aluminio (Anodisc) de 0,02 μm de diámetro de poro (*Whatman*, England).
- Porta objetos 76 x 26 x 1 mm (*Marienfeld*).
- Cubre objetos de 25 mm de diámetro (*Marienfeld*).
- Multiplacas para cultivo celular 24 pocillos (*Nunc Inter Med, Kamstrup, Dinamarca*).
- Cubre objetos de 12 mm de diámetro (*Marienfeld*).
- Micropipetas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μL (*Biopette-Labnet*).
- Micropipetas (*Eppendorf*).
- Tubos de ultracentrífuga *Ultra-Clear* de 39mL.
- Tubos eppendorf 1,5 mL y 0,6 mL (*Eppendorf*).
- Unidades filtradoras dispensables Minisart[®] estériles de 0,20 μm (*Sartorius*).
- Unidades filtradoras dispensables Anostop 25 estériles de 0,02 μm (*Whatman*).
- Jeringas estériles 5 mL (*Nubenco*).
- Cintas indicadoras de pH. ColorPHast pH 5-10 (*Merck*)
- Frascos plásticos de 75 cm^2 para cultivo celular, con tapa rosca y posición de venteo (*Orange Scientific*).
- Materiales de vidrio de uso rutinario en laboratorio.

EQUIPOS

- Agitador magnético Nuova II Stith Plate (*Thermolyne*).
- Vortex (Lab-Line Instruments, Inc).
- Orbitador Rotox mix type 48200 (*Thermolyne*).
- Balanza Analítica (Sartorius).
- Bomba de vacío. Motor Electromotors LTD (Ac Motor, Bs 5000-11).
- Cámara de flujo laminar equipada con luz U.V mod. Un-126-300E (*Nuair*).
- Cámara digital Power Shot G5 (*Canon*).
- Microscopio de epifluorescencia BX60 (*Olympus*).
- Microscopio óptico (*Leitz*).
- Refrigerador Intelligent frost 44 (*Bosch*).
- Incubador 20°C Bioref mod W.19 (*P+L electronica*).
- Ultracentrífuga Beckman. Rotor swinging-bucket SW-28.
- Centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B. Rotor fixed-angle.

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi profesor Patrocinante, el Dr. Juan Kuznar H, por permitirme realizar esta Memoria de Título, dedicarme gran parte de su tiempo e iluminarme por el camino de los virus.

A mi profesor copatrocinante, el Dr. Ricardo Enríquez S, quien me apoyó y dedicó lo mejor de su tiempo en mi proceso de tesis.

A Juan Carlos Espinoza, por entregarme sus conocimientos y su sentido del humor.

A María Soledad Pavlov, mi compañera de laboratorio y gran amiga que siempre me apoyó y ayudó entregándome lo mejor de sus conocimientos.

A mis padres, por su amor y comprensión y su gran esfuerzo económico.

A mi familia, hermanos y abuelos quienes me entregaron su apoyo incondicional.

Y a todos mis amigos y compañeros de carrera que hicieron de estos años valdivianos los mejores de mi vida. Entre ellos a mi gran amiga Pepolina, David y Liz.