



Selecciones Veterinarias

Volumen 19 - Nº 3 - 2011

Zoonosis

Oncología

Exóticos

Dossier: Oftalmología

Toxicología

Emergentología pediátrica

Secciones especiales

Incluye revista

vet

REVISTA DE OTOLOGÍA
Y OTOLOGÍA



México, 50 pesos
INTERmedica
Editores
Por un mundo más saludable

Cultivos primarios de córnea felina para el estudio del herpesvirus felino 1

P. Casagrate, G. L. Zapata, L. Zubragui, V. Cid de la Paz, N. A. Fontalba, C. M. Gallo

Introducción

Entre los agentes infecciosos que afectan la córnea, el HSV-1 es el más común en la población mundial humana.¹⁻³ Más del 90% de los felinos han estado expuestos al virus y son serológicamente positivos. Esto puede deberse a la respuesta vacunal o a la transmisión de cepas salvajes entre gatos.⁴⁻⁶ Los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, como el herpesvirus felino, luego de la infección inicial ingresan por terminaciones sensitivas de las membranas mucosas y migran a través de los axones hacia los ganglios intravertebrales.⁷⁻⁹

Existen cada vez más evidencias de que el sitio principal de latencia es el ganglio del nervio trigémino.¹⁰ Más del 90% de los felinos son portadores del virus en por vida.¹¹⁻¹³ Esta capacidad de establecer una infección persistente es una característica distintiva del herpesvirus.¹⁴ En el 4% de los animales infectados se puede producir la reactivación viral con recurrencia de enfermedad con sintomatología clínica o de manera asintomática.¹⁵ La recurrencia de la infección, en general, está relacionada con fenómenos de estrés o inmunodepresión, ya sea natural o tras la administración de

corticoides,¹⁶ siendo estos animales eliminadores intermitentes de virus hasta por 3 semanas posteriores a cada recurrencia.

Se ha demostrado que en las infecciones crónicas la mortalidad es baja, mientras que en las infecciones agudas en animales jóvenes puede llegar a un 50%.¹⁷

El HSV-1 puede afectar la córnea de dos formas totalmente diferentes. La presentación más frecuente es la queratitis dendrítica, que se caracteriza por lisis de las células del epitelio corneal con forma de dendritas llamada "úlceras dendríticas" (fig. 1). Estas lesiones no progresan hacia el estroma y tienden a ser autolimitantes, aunque pueden hacerse más profundas cuando se produce contaminación bacteriana secundaria.¹⁸⁻²⁰ La presentación de menor frecuencia diagnóstica es la queratitis estromal, la cual se caracteriza por la opacidad del estroma como consecuencia de un proceso inmunoinflamatorio (fig. 2). El desarrollo de la fisiopatología es controvertido y algunos autores han demostrado que se basa en una reacción inflamatoria mediada por células polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas asociada con un proceso de neovascularización, lo que da como resultado un

Anikil



Oftalmología

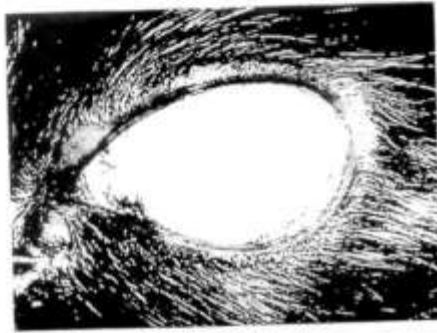


Figura 1

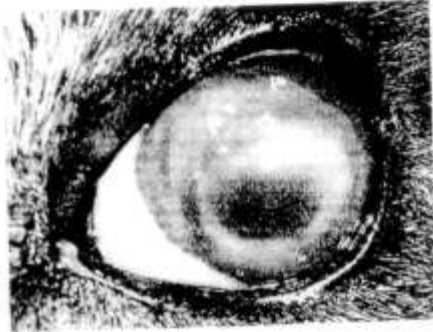


Figura 2

grace proceso de cicatrización corneal con coagula por pérdida de transparencia.

El método diagnóstico de elección para la detección de FHV-1 en muestras biológicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Existe una gran controversia en cuanto al uso de antivirales frente a cuadros de queratitis herpética felina. Los fármacos como el aciclovir y el valaciclovir poseen por ejemplo efectos tóxicos óseos hepáticos, anemia cuando se administran en forma oral en los felinos.

Distribuidora de medicamentos y Biológicos veterinarios.

Asesoramiento profesional
Llámanos al 00363636

En la actualidad, se utiliza ganciclovir en forma de gel oftálmico, pero no hay ensayos clínicos que demuestren su efectividad.¹⁷ La mayoría de los estudios con antivenales se efectuaron en casos de queratitis por herpes víricos humanos (con *Simplexvirus*) y no hay datos sobre este tipo de estudios con el HSV-1, perteneciente al género *Varicellivirus*. Hasta el momento no existen modelos *in vivo* convenientes para estudiar el HSV-1, es de suponer que extrapolar tratamientos antivirales para herpes humano podría no ser satisfactorio en equinos. Por lo tanto, se hace necesario contar con un modelo *in vitro*, como los cultivos celulares, para poder llevar a cabo estudios con diversos antivirales para el HSV-1.¹⁸

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue entonces desarrollar cultivos primarios de córnea felina para estudiar las características culturales y cinética de multiplicación del HSV-1, de manera que posteriormente estos cultivos infectados pudieran ser utilizados para otros ensayos.

Materiales y métodos

Muestras

La obtención de corneas felinas (n = 20) se realizó en área consultorios externos e internación del Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Se utilizaron corneas felinas con no más de 8 horas postmortem. Se colocó 1 gota cada 5 minutos durante 15 minutos de proflóxico tópico (Clodoxal, Alcon, Argentina); durante este lapso se realizó el examen oftalmológico mediante lámpara de hendidura (Kowa SL-14, lapso) y cámara ocular directa (Heme Beta 200). Ingresaron al estudio pacientes que no presentaban sintomatología ocular ningún tipo.

Extracción del tejido corneal

Se realizó una incisión pupilar manual a 1 mm del limbo corneal que se continuó en 360° con tijera de córnea. Una vez finalizada la extracción, el tejido se colocó inmediatamente en solución amortiguadora de fosfato suplementada con penicilina estreptomicina y nistatina (como de las páginas 12 fuera del arbo del topico) en el laboratorio de la Cátedra de Virología, (FCV-UNLP), se dio inicio al desarrollo del cultivo celular de córnea felina. Para ello se utilizó la metodología de explante celular.

Desarrollo de cultivo celular primario

Se realizaron tres lavados sucesivos de cada córnea en solución salina amortiguadora de fosfato suplementada con penicilina estreptomicina y nistatina. Posteriormente, se efectuaron con material de mano limpia incisiones sobre las corneas para obtener fragmentos menores a 7 mm de lado. Los explantes fueron cultivados en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning) colonizando un fragmento de córnea por pocillo y 3 ml de medio de cultivo. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM-GIBCO, Invitrogen, UK) suplementado con glucosa y 10% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se incubaron en estufa a 37 °C, en atmósfera controlada de CO₂ al 5%. La presencia de contaminantes bacterianos y micóticos fue evaluada mediante el análisis de los sobrenadantes del cultivo en caldo nutritivo, tungi colato y medio de Sabouraud. Los cultivos fueron examinados diariamente en microscopio invertido hasta que lograron, con renovaciones del medio de cultivo, el desarrollo completo. Una vez lograda la monocapa celular se realizaron cultivos secundarios.

Desarrollo de cultivo celular secundario

Se retiraron los explantes de corneas felinas de cada pocillo y se trasladaron a otras placas de cultivo con el fin de confirmar utilizándolos. Posteriormente, las monocapas celulares ya desarrolladas se trataron con una solución de tripsina al 0,25% (GIBCO, Invitrogen, UK) y ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) (GIBCO, Invitrogen, UK). Luego de 7 minutos y mediante una suave agitación, se obtuvieron células en suspensión para su posterior remoción. Se realizó el pasaje de 1x 10⁶ ml de células a otro frasco de cultivo.

Virus

Se utilizó una cepa japonesa de HSV-1 donada por la Universidad de Tokio en el marco del convenio de la FCV-UNLP a través de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón.

Inoculación viral

Se inocularon monocapas confluentes de cultivo postmorte de 5-7 días de desarrollo en placas de 96 pocillos (Corning) con 30 µl por pocillo de diluciones en base 10 de la suspensión viral para (desde 10⁻¹ a 10⁻⁷) en 5 replicas para cada dilución viral. Se dejaron 5 replicas sin inocular para control de células. Luego de 1 hora de adsorción a 37 °C, en estufa con atmósfera controlada de CO₂ al 5%, se retiró el inoculo y a cada pocillo se le

Figura 3

aducción 1,00 µl de medio de cultivo (MEM) con 2% de SFB. La placa se incubó durante 96 horas controlando el avance del efecto citopatogénico (ECP) por observación microscópica y se realizó el cálculo del título viral con el método de Reed y Muench.

Extracción de ADN viral

Para la extracción de ADN se infectó un cultivo en placa con la cepa viral de referencia a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Se recogieron las células infectadas junto con el medio de cultivo 48 horas postinoculación viral cuando el ECP era de aproximadamente el 90% sin llegar a la lisis de la monocapa celular. Se centrifugaron 10 minutos a 7000 rpm y se descartó el sobrenadante. Una vez obtenido el pellet celular se procedió a la extracción de ADN utilizando el kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Cal. A1120) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se cuantificaron mediante espectrofotometría (Smart spec TM 3000, BIORAD) por lectura de absorbancia a 260 nm (A260).

Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento que codifica para la glicoproteína F de envoltura de HVE-1. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (dependor) en un volumen final de 25 µl, utilizando: 2,5 µl de Taq Buffer 10X con KCl, 1,5 µl de 13 Mg, 0,7 µl de dNTP, 0,7 µl de Taq DNA polimerase (Merkens, EPI400), 1 µl del primer positivo (10 µM), 1 µl del primer negativo (10 µM), 14,5 µl de

Figura 4

agua libre de nucleosidos y 1 µl de la muestra de ADN obtenida previamente. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 51 °C, y 30 segundos a 72 °C. El producto obtenido se sembró en un gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora TBE (1X) 5 mM Tris borato, 1 mM EDTA, pH 8) y se realizó la corrida electroforética. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se observó con un transiluminador de luz ultravioleta.

Los primers utilizados fueron los siguientes:

- PF: 5'-GCTCATGTC-TAGTCTGACG-3'
- PR: 5'-ATCTTCGCTTCTGAGTAC-3'

Resultados

Las células de cornea fetal se desarrollaron de acuerdo con los parámetros normales para los cultivos celulares primarios. A partir de las 72 horas de iniciados los cultivos se observó el crecimiento de células adheridas alrededor del explante (Fig. 3). En un plazo de 14 días, más del 90% de la superficie de cada porallo presentaba células adheridas en su base.

La renovación del medio de cultivo, tanto para los cultivos celulares primarios como los secundarios, fue en un promedio de 7 días, y no se observaron contaminaciones bacterianas ni micóticas.

De las 20 corneas cultivadas de fetos con edades promedio de 4 años, todas presentaron desarrollo celular con similares características.

Los cultivos secundarios se incubaron 10 a 14 días hasta que alcanzaron una confluencia celular del 90% en que se procedió a la inoculación viral (Fig. 4).

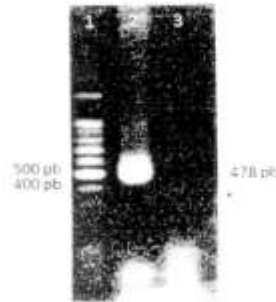


Figura 5. PCR de ADN genómico de HWT-1 en cultivo celular (10⁶ células/ml).

Figura 6. Hibridación Southern de ADN genómico de HWT-1 en cultivo celular (10⁶ células/ml).

La actividad biológica del HWT-1 por visualización del TC-P mediante microscopio invertido comenzó a las 24 horas postinoculación (TC-P) consistió en aumento de refringencia, lisis y redondeamiento celulares (Fig. 1). Los resultados de la titulación viral se observan en la tabla 1. Se determinó que el título viral fue de 30 u.v./dosis infectante cultivo celular (50% CIU) 50% por cada 50 µl (1.316.000 partículas virales en 50 µl).

La extracción de ADN fue satisfactoria y se logró amplificar por PCR el fragmento de 478 pb esperado (Fig. 6).

Discusión

El HWT-1 es de distribución mundial en la población felina. En la clínica diaria nos encontramos a la proliferación del tratamiento para los cuadros de queratitis herpética debido a la ausencia de ensayos clínicos que comprueben la eficacia de diversos fármacos.

La utilización de cultivos celulares es una valiosa herramienta en el manejo de la investigación *in vitro* para el estudio de la respuesta celular. En este sentido trabajos publicados por Kouchi, K. (1999) y García, V. (2001) sobre cultivos primarios de córnea de diversas especies, han utilizado diferentes medios de cultivo celular

Tabla 1. Titulación viral por el método de Reed y Muench

	Diluciones virales											
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4	204.8
A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nº	5/5	5/5	3/3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Nº	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%

0: ausencia de propagación (0%), 1/5: 20%, 2/5: 40%, 3/5: 60%, 4/5: 80%, 5/5: 100% CIU.

nuestros resultados demuestran que con el medio de cultivo utilizado en este trabajo el crecimiento y el desarrollo celulares tuvieron características similares a las obtenidas por estos autores.¹⁰

En la actualidad, numerosos estudios sobre la actividad antiviral de diversas drogas frente a cuadros de queratitis herpética por FHV-1 se realizan sobre cultivos de lentes celulares establecidas como la *Candell files feline kidney* (CFK).¹¹ debido a que hasta el momento no están bien establecidas ni caracterizadas lentes celulares de córnea felina por el estudio.¹²

La observación del TCD luego de la infección viral demuestra la capacidad de infección del FHV-1 en los cultivos celulares logrados en esta experiencia. Los datos, asociación con los resultados de la titulación viral y la detección del ADN viral por PCR indican que estos cultivos celulares de córnea felina podrían ser utilizados para el estudio de las características culturales y cinética de multiplicación viral.

En trabajos posteriores se analizará el efecto inhibitorio de diversos fármacos antivirales sobre la replicación de FHV-1 en los cultivos celulares.

Referencias bibliográficas

- Maggis, D.L., 2009. *Comparativa. En Slatter, Fundamentos de oftalmología veterinaria*. 1ª ed. Elsevier, Barcelona (España) 139-154.
- Maggis, D.L., 2009. *Cornea y Esclera. En Slatter, Fundamentos de oftalmología veterinaria*. 2ª ed. Elsevier, Barcelona (España) 179-206.
- Goold, D., 2011. Feline herpesvirus 1 ocular manifestations, diagnosis and treatment options. *Feline Practice Clinical Review Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 331-346.
- Maggis, D.L., 2005. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clin Technol Small Anim Pract*, 26, 94-101.
- Stiles, J., 2003. Feline herpesvirus. *3th Technol Small Anim Pract*, 18, 178-185.
- Andrew, S.L., 2001. Ocular manifestations of feline herpesvirus 1. *Feline Med. Surg*, 1, 9-16.
- Corkell, B., Dawson, S., Radford, A., Dhry, F., 2007. Feline herpesvirus. *Vet Res*, 38(2), 337-344.
- Hugh J. Field, Subhrajit Biswas and Islam T. Mohammad, 2006. Mini review: Herpesvirus latency and therapy - From a veterinary perspective. *Antiviral Research* 67(1-2), 113.
- Dubey, S. M., Ghayer, J., 2003. *Goveranus herpeticus del gato. Bases terapéuticas y resultados. Congreso MEXM*, 2003, Nimes 21-22-23 de Noviembre.
- Pepose, L., Leib, D., Stuart, M., and Easty, D., 1996. Herpes simplex virus disease, anterior segment of the eye. *In: Pepose, J., Dolland, C., Wilhelmus, K. Ocular infection & immunity. Ed Mosby*, 905-932.
- Hartley, C., 2010. Aetiology of corneal ulcers. *Asymptomatic FHV-1 unless proven otherwise. Clinical review journal of feline medicine and surgery* 12, 34-35.
- Dhry, F., Adde, D., Belak, S., Bönrciani, Baratori, V., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hoare, M., L. Horst, A., Lutz, H., Marsden, J., Penttilä, M., S., Radford, A., D., Travers, G., and Horzinek, M. C., 2009. Feline herpesvirus infections. ABC guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 547-555.
- Van der Meulen, K., Garre, B., Coudébec, S., and Nanyemba, A., 2006. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. *BMB Veterinary Research*, 2, 13.
- Nusse, M.P., Dorman, D.C., Iatrouska, K., Weighl, B.J., Hawkins, E.E., Steyerin, J.R., 1985. Effects of acyclovir in cats infected with feline herpesvirus 1. *Am J Vet Res*, 50, 1141-1144.
- Cunningham HC., 1971. *Virologia Practica*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Lasig ES de, Nebel AE., 1980. Medios de cultivo. En: *Cultivos de tejidos. Un manual práctico*, 45-68.
- Weiss, R., 1989. Synergistic antiviral activities of acyclovir and recombinant human leukocyte alpha interferon on feline herpesvirus replication. *Am J Vet Res*, 50, 1672-1677.
- Komoto, K., Kazuhito, S., Masayoshi, N., Aki, A., Saitoshi, S., 1996. Characterization of *Cyclosporin A* Transport in Cultured Rabbit Corneal Epithelial Cells. *P-Glycoprotein Transport Activity and Binding to Cyclophilin*. *Am. Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39, 1738-1744.
- Carlas, S., Luaces, M., Suarez, B., Sanchez-Narvaez, S., Boteneo-Martinez, M. C., 2007. Immunological characteristics of limbal epithelial cells: in vitro analysis of HLA function. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 82(2), 95-102.
- Williams, D.L., Robinson, J.C., Lay, F., Field, H., 2005. Efficacy of topical acyclovir for the treatment of feline herpes keratitis: results of a prospective clinical trial and data from in vitro investigations. *Vet Rec*, 157, 254-257.
- Maggis, D.L., Clarke, J.C., 2004. In vitro efficacy of ganciclovir, vidofabir, penciclovir, foscarnet, famciclovir, and acyclovir against feline herpesvirus type 1. *Am J Vet Res*, 65(4), 395-403.