

LEUCOCITOS BOVINOS: CULTIVO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGENESIS DE ESTOMATITIS VESICULAR BOVINA*

Silvio Arango J.
Andreis H. Jonkers
Alvaro Dueñas L.
Jaime Estupiñan A.**

1. INTRODUCCION

Hasta el momento no se ha logrado determinar la patogénesis completa y exacta del virus de la estomatitis vesicular (VEV) en bovinos. Así, por ejemplo, no es bien definida su forma de transmisión al bovino ni cómo se comporta el virus dentro del organismo animal para ocasionar las lesiones específicas, ni cómo se transporta el virus y cuáles son sus formas de eliminación.

En la estomatitis vesicular generalmente no se presenta viremia y cuando la hay es muy escasa.

Brandly *et al.*, (1951) y Hanson (1952), indicaron que sólo por inoculación del virus vía intracutánea, o por escarificación en zonas susceptibles, se desarrolla el cuadro clínico típico de la enfermedad.

La inoculación intravenosa al bovino produce infección, más no enfermedad clínica con síntomas y lesiones típicas, sugiriendo que además del inóculo intravenoso se necesita otro factor que podría ser una lesión previa inespecífica en las áreas típicas en donde normalmente se producen vesículas.

Jonkers *et al.*, (1964), informan que la inoculación en *Oryzomys* del virus Cocal, no desarrolla enfermedad clínica aparente y sólo se podía aislar virus de las escarificaciones de la piel cuando éste se inoculó en los bordes de tales heridas. Mientras que la inoculación en *Zygodontomys* por vía subcutánea en cualquier lugar, sí permitió el aislamiento a partir de abrasiones de la piel en otro lugar.

Se desconoce el papel que los leucocitos circulantes en sangre periférica pueden jugar como vehículos del virus a los sitios de presentación de las lesiones típicas, o como bases para la replicación del agente.

Edelman y Wheelock, (1967), cultivaron leucocitos humanos en MEM Eagle's, luego de separarlos de la sangre periférica mediante sedimentación acelerada por el Dextran al 5%, con peso molecular 200 a 275 mil. Luego lograron cultivos puros de cada tipo de célula blanca humana mediante absorción selectiva y elución de células a través de perlas de vidrio siliconizadas. También añadieron a esos cultivos de leucocitos el VEV tipo Indiana, obteniendo la replicación in vitro del virus en dichas células. Encontraron que monocitos y macrófagos fueron los principales hospedadores para dicha replicación.

* Contribución del Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias UN-ICA, del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, y de la Universidad del Valle. Adaptación y resumen de la Tesis de Grado presentada por el autor principal al Programa de Graduados, como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae.

** Respectivamente: Médico Veterinario, M.S., CIAT; Virólogo CIAT; Profesor Asociado Universidad del Valle; y Médico Veterinario Ph.D. Subgerente de Producción Pecuaria del ICA, hasta Julio de 1976.

Tokuda *et al.*, (1962), describen un método simple para cultivar leucocitos bovinos a partir de sangre periférica.

Edelman y Wheelock, (1967 y 1968) estudiaron el papel específico de cada tipo de leucocito humano en la infección viral y, más concretamente, concluyeron que los monocitos son células hospedadoras principales para la replicación in vitro del VEV y, así mismo, los linfocitos tratados con fitohemaglutinina.

Por lo anterior, se planteó fundamentalmente el presente trabajo con miras a comprobar si el VEV, tipo New Jersey, inoculado vía intramuscular a un bovino, con lesiones inespecíficas previas (escarificaciones en lengua y ubre) desarrolla un cuadro clínico completo de la enfermedad, e investigar si el virus penetra y se replica en los leucocitos de la sangre circulante periférica, distribuyéndose por este medio hasta los sitios de las lesiones vesiculares clínicas típicas. Por consiguiente, fue necesario hallar previamente un sistema práctico de cultivo para leucocitos bovinos.

2. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos métodos de obtención de leucocitos:

2.1. METODO DE LA SOLUCION HIPOTONICA*

Se tomó un volumen de solución salina 0,35% hipotónica más un volumen de sangre con heparina; se dejó en nevera durante 2,5 horas. Luego se centrifugó a 1.500 RPM durante cinco minutos; se botó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen igual de solución salina 0,35%. Después de centrifugar se repitió por dos veces más el lavado y uno final con solución tampón (Phosphate Buffer Solution, PBS). El último sedimento se reconstituyó en 2 cc de PBS. De ahí se inoculó lcc en 9 cc de medio de cultivo y se incubó a 37°C. La viabilidad de las células se juzgó por su estado morfológico.

2.2. METODO JAPONES

Según Tokuda *et al.*, (1962), se colocaron 10 cc de sangre heparinizada, en un frasco plástico de tipo Falcon para cultivo celular, de 30 cc de capacidad, y se llevó a la incubadora a 37°C durante tres días, en posición inclinada de unos 40 grados en relación con la posición horizontal. Con este método se adhiere una banda de leucocitos en la región media del plano inclinado formado por la superficie del fondo del frasco. Luego de tres días, se botó todo el material lavándose cinco veces con solución de PBS, colocando luego 10 cc de suero de bovino adulto; en este momento se colocó el frasco en posición horizontal.

Se trabajó con los siguientes medios: TC 199, Minimum Essential Medium MEM (Eagle's) con sales Hank's, MEM Eagle's con sales Earle's. Estos medios con y sin suero fetal bovino al 10% o al 20%.

También se usaron suero fetal bovino, suero de bovino adulto y suero del mismo bovino que donó los leucocitos.

Los antibióticos que se utilizaron en todos los medios fueron: penicilina 100 U por cc de medio, estreptomycin 0,1 mg por cc y anfotericina B, la cual de una solución de 50 mg en 100 cc de solución Hank.S, se usó al 0,2% en los medios de cultivo.

Se utilizó un frasco tipo F (Falcon Plastics) especial para cultivo celular, de 25 cm² de área y 30 cc de capacidad, y un frasco tipo D, botella marca "Furaglás" de una capacidad de tres onzas aproximadamente, no exactamente rectangular y de uso ocasional en cultivo celular.

El Virus: Cepa de estomatitis vesicular New Jersey (VEV-NJ) con siete pasajes en cerebro de ratón lactante, obtenida del Middle American Research Unit (MARU), Cepa No. 3566 SM₅, aislada de una lesión en el pezón de una vaca en 1967 (Brody *et al.*, 1967). Se utilizó en suspensión de cerebro de ratón lactante al 20% en PBS sin suero y congelado a -70°C.

Los aislamientos del virus y las titulaciones se efectuaron en células de la línea VERO. El inóculo siempre fue de 0,1 cc. La lectura del efecto citopático se hizo a las 48 horas.

* Adams, L.G. 1971. Información personal.

En ocasiones se intentaron aislamientos del virus usando ratones lactantes de dos a cinco días de edad, inoculándolos por vía intracerebral con dosis de 0,03 cc y observación cada 24 horas durante 10 días.

Para los ensayos con el virus in vitro en cultivos de leucocitos bovinos, se obtuvieron éstos por el sistema de la solución hipotónica, con excepción del último ensayo en el cual se inoculó un bovino, efectuando los cultivos de leucocitos luego de obtenerlos tanto por el sistema de la solución hipotónica como por el método japonés.

Las pruebas de neutralización se efectuaron en células VERO, colocando siempre una cantidad de virus equivalente a 100 dosis virales, aproximadamente, frente a diluciones dobles de suero, en cantidades respectivas de 0,8 cc incubadas durante una hora a 37°C y posterior inoculación de 0,2 cc en tubos con células VERO, para lectura a las 48 horas, utilizando cada vez una serie de controles. Los títulos se expresan por 0,1 cc en células VERO utilizando el sistema de Reed and Muench (1958).

Las pruebas de fijación del complemento se realizaron según el sistema de microtécnica adaptado por Fulton y Dumbell, (1948), usando 18 horas de inoculación primaria a 4°C y dos unidades de complemento aproximadamente.

Los experimentos se enfocaron hacia la demostración del mantenimiento del virus en cultivos de leucocitos bovinos, así como su curva de replicación. Además, titulación y curva replicativa del virus comparativamente en VERO y leucocitos.

Una vaca adulta, libre de anticuerpos específicos fue inoculada por vía intramuscular con 1 cc del virus 10⁻¹. Fue escarificada inmediatamente antes de la inoculación imitando lesiones inespecíficas en la lengua y la ubre.

Se le tomó sangre dos horas después de la inoculación y cada 24 horas hasta los siete días, con el fin de obtener leucocitos, cultivarlos y buscar el virus en suero, glóbulos blancos y en el material procedente de los sitios escarificados.

Para aislamiento del virus a partir de suero, se inocularon ratones lactantes y VERO. El raspado de las áreas escarificadas fue macerado en mortero, tratado con antibióticos (penicilina 10 U por cc, estreptomina 0,1 mg por cc), centrifugado a 3.000 RPM por 30 minutos en refrigeración e inoculado a VERO y ratones.

Todo lo anterior se completó con observaciones de temperatura, pulso, frecuencia respiratoria, recuento celular sanguíneo y fórmula leucocitaria.

3. RESULTADOS

Con el método de la solución hipotónica se realizaron numerosos ensayos variando los sistemas de cultivo con diferentes factores; en todos los casos hubo presencia del leucocitos, bien sea en suspensión o ya en monocapa. Se obtuvieron inóculos muy abundantes con recuentos entre los 40 y los 50 millones de leucocitos por centímetro cúbico.

Cuando se usaron frascos tipo F, siempre pudo observarse monocapa de leucocitos. Con el método japonés se destacó el hecho de la presencia de monocapa visible en todos los casos, permaneciendo hasta 40 días.

Los leucocitos bovinos obtenidos por el sistema de la solución hipotónica fueron inmediatamente colocados en frascos tipo D, mezclados con 0,1 cc del virus 10⁻⁴ por 0,9 cc de suspensión de células blancas (40 millones de leucocitos por centímetro cúbico aproximadamente).

Un centímetro cúbico de leucocitos infectados fue incubado con 9 cc de medio por 48 horas, al cabo de las cuales los siguientes constituyentes fueron probados para determinar la presencia del virus, usando células VERO.

1. Medio con leucocitos en suspensión.
2. Filtrado del medio (filtro Millipore 0,22 μ), después de centrifugarlo a 1.500 RPM durante cinco minutos.
3. Sedimento del medio con leucocitos en suspensión centrifugado.
4. El mismo sedimento congelado y descongelado tres veces.

El título control del inóculo fue $10^{7.5}$

Cada botella con leucocitos en suspensión recibió 3,5 log., o sea, 3.160 dosis virales (D.V.) aproximadamente. A las 48 horas el virus estaba aún presente en los cuatro constituyentes probados. La titulación del medio centrifugado y filtrado y del sedimento congelado y descongelado mostró títulos de $10^{3.76}$ y $10^{4.0}$, respectivamente. Esto indicó presencia de 5.760 y 10.000 D.V. por 0,1 cc respectivamente, en forma aproximada. Como el inóculo por frasco de 10 cc fue 3.160 D.V. (31.6-0.1 cc), se produjo gran aumento del virus durante las primeras 48 horas de incubación.

Al repetir el experimento usando de nuevo el virus 10^{-4} como fuente y con titulaciones del medio más leucocitos en suspensión al momento del inóculo y posteriormente con intervalos de 12 horas, dió una curva con punto máximo a las 72 horas y descenso total a las 108 horas (Figura 1).

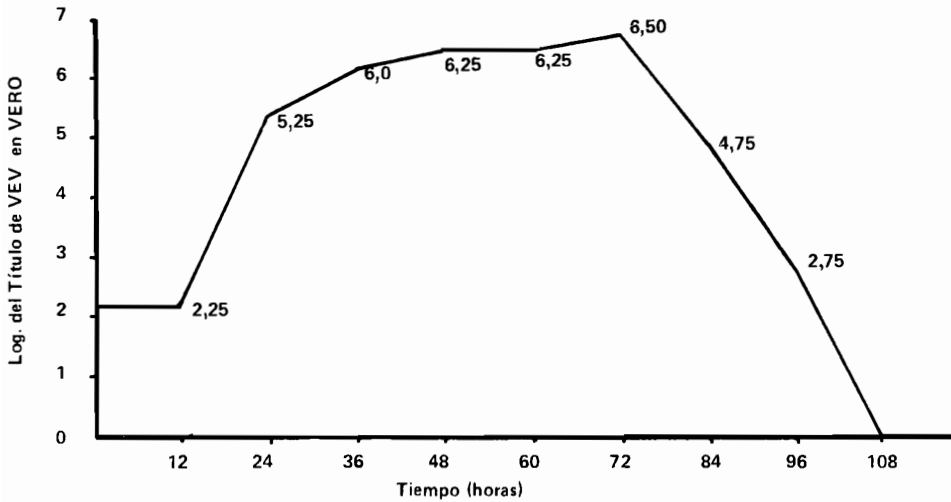


FIGURA 1. Curva de Replicación del VEV en Leucocitos in vitro, cultivados en frasco tipo D.

Como no estaba claro si se formaba capa celular en el fondo de los frascos D, tales botellas se inocularon con 3.160 D.V. Tres días después se removió todo el medio más los leucocitos en suspensión y se lavó el frasco por dos veces con nuevo medio. Al centrifugar en igual forma en este momento, el sobrenadante del medio removido tuvo un título de $10^{4.75}$ mientras que el sedimento congelado y descongelado por tres veces, uno de $10^{3.5}$.

Se colocó nuevo medio (10 cc) en el frasco y se incubó durante 24 horas más. Después de este período el medio presentó título de $10^{5.5}$, lo cual indicó presencia de leucocitos en el frasco, después del lavado. Estos, presumiblemente, estaban formando monocapa en el fondo de la botella.

Posteriormente se efectuó en tres oportunidades, en diferentes días, un ensayo para determinar la curva de replicación del virus en leucocitos y en VERO usando frascos tipo F. Estas células blancas se tomaron del mismo bovino en diferentes días y usando el sistema de la solución hipotónica con 40 millones de leucocitos por centímetro cúbico aproximadamente y el título del

virus al momento del inóculo estuvo entre 10^2 y 10^3 . En la primera ocasión, los títulos se elevaron hasta las 120 horas (cinco días) después de la inoculación del virus, en los cultivos de leucocitos, descendiendo bruscamente al cambiar el medio y lavar, aunque se conserva algún título 24 horas después del cambio de medio (Figura 2).

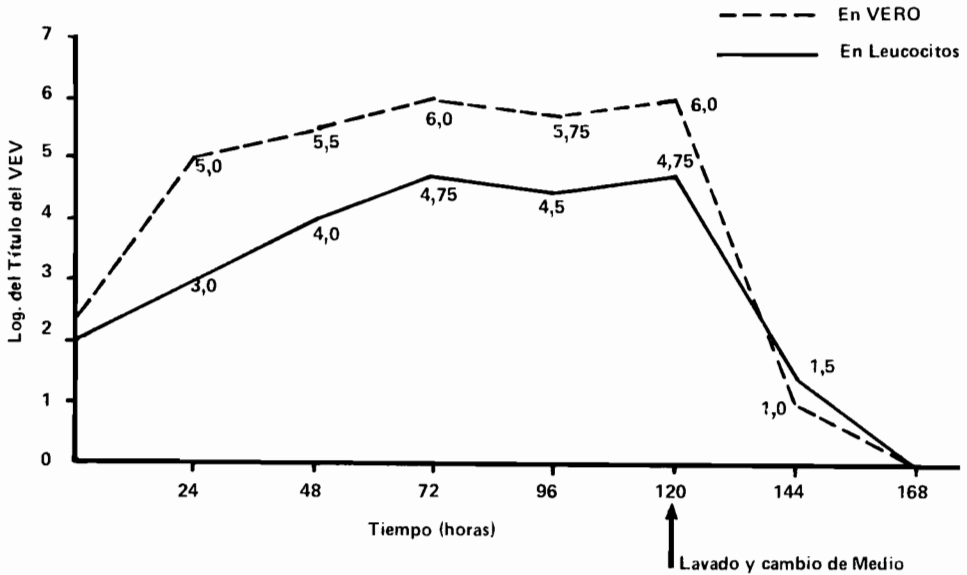


FIGURA 2. Curva de Replicación del VEV en Leucocitos y VERO en frasco tipo F (Primer Caso).

En las células VERO el título fue alto, más rápidamente que en los leucocitos, y también descendió bruscamente al hacer el cambio de medio, en el cual se desechó la mayoría de células, las cuales fueron desprendidas por la acción del virus. En la segunda ocasión no hubo elevación manifiesta de títulos en los leucocitos, mientras que sí fue notoria en las células VERO (Figura 3). En la tercera oportunidad sí hubo incremento del título viral en los leucocitos. En las células VERO el comportamiento fue muy similar a los dos casos anteriores de este experimento (Figura 4).

La titulación comparativa entre el virus en leucocitos y el virus en células VERO señaló lo siguiente:

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Título del virus en leucocitos | $10^{4,75}$ |
| Título del virus en VERO | $10^{6,25}$ |

Lo que indica mayor sensibilidad al virus por parte de las células VERO frente a los leucocitos bovinos cultivados con el método hipotónico.

El bovino recibió $10^{8,5}$ D.V. por vía intramuscular, aproximadamente. No se logró recuperar o aislar el virus ni de los leucocitos cultivados por los dos sistemas diferentes utilizados en este experimento, ni tampoco de los inoculados a ratones lactantes y células VERO. No dió resultado positivo el aislamiento del virus, a partir de suero y de material procedente de los sitios escarificados.

La inoculación efectuada no desencadenó la presentación de los síntomas típicos de la enfermedad en el bovino. La temperatura rectal, pulso y frecuencia respiratoria fueron normales, durante siete días de observación post-inóculo. El recuento leucocitario y la fórmula diferencial durante este período, también fueron normales. Quince días después de la inoculación del virus se encontraron anticuerpos neutralizantes y fijadores del complemento.

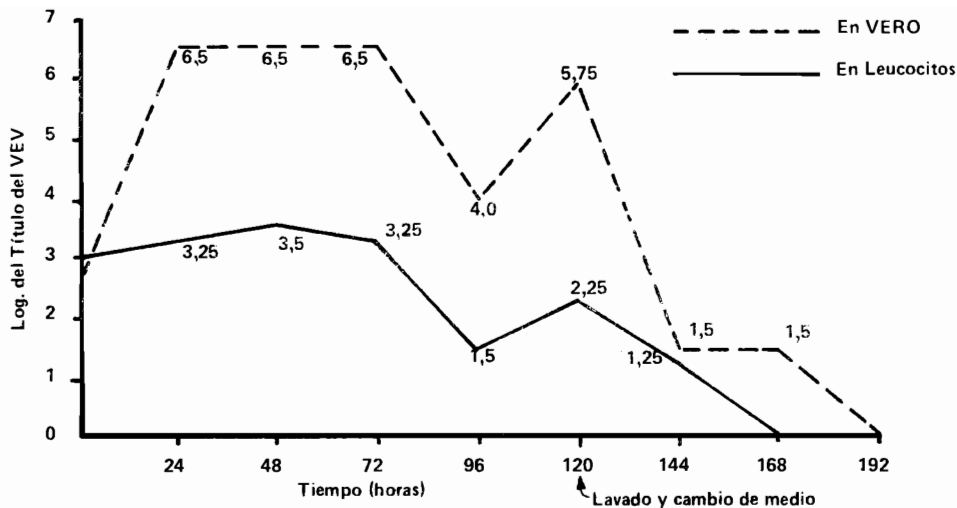


FIGURA 3. Curva de Replicación del VEV en Leucocitos y VERO en frasco tipo F (Segundo Caso).

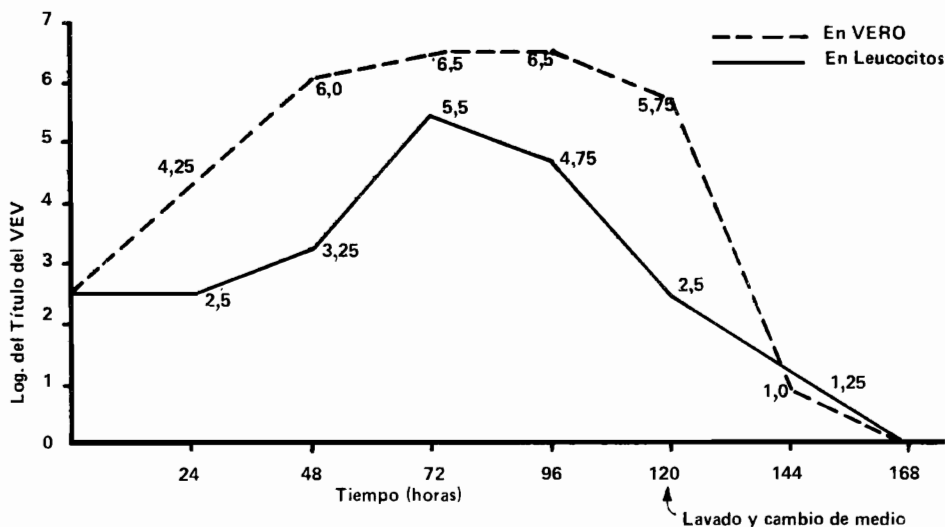


FIGURA 4. Curva de Replicación del VEV en Leucocitos y VERO en frasco tipo F (Tercer Caso).

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Fue notoria la influencia del tipo de frasco para poder analizar los resultados.

La mayor dificultad al ensayar con leucocitos bovinos fue la lentitud de sedimentación sanguínea lo cual hizo imposible obtener los inóculos que se comenzaron a lograr con sangre humana. Por ello se modificó el sistema de obtención y se trabajó a base de separación por medio de la centrifugación a distintas RPM y diferentes tiempos: los resultados fueron negativos, pues los inóculos estuvieron muy bajos.

Con el método de la solución hipotónica para separar los leucocitos de los eritrocitos, el éxito fue notable por los fuertes inóculos logrados. Pero un paso definitivo fue la utilización de los

frascos plásticos tipo F que permitieron juzgar la presencia o no de monocapa en el fondo. Al combinar el sistema de la obtención por el método de la solución hipotónica y el uso del frasco tipo F se obtuvo pleno éxito en la formación de una monocapa incompleta de leucocitos.

El método que se denomina aquí como japonés, dió buenos resultados sobre todo cuando se usó suero de bovino adulto como medio de cultivo.

La monocapa incompleta que se obtuvo en los frascos F pudo calificarse como tal por cuanto los leucocitos no están muy agrupados sino más bien ampliamente distribuidos. Por la morfología apreciable con coloración Giemsa de estos fondos de frascos plásticos, las células blancas fueron diferentes a las normales encontradas al hacer un frotis de sangre periférica bovina, pero sí mostraron una tendencia marcada a presentar morfología de células blancas en la fase de "blasto".

En nuestros cultivos no se separaron los leucocitos en sus diferentes tipos. En cuanto a los experimentos con el VEV en los leucocitos bovinos *in vitro*, puede concluirse que éste no sólo se mantuvo por dos días en estas células, liberándose al medio de cultivo, sino que también se probó su replicación en el ensayo de 120 horas de cultivo de leucocitos.

En la curva de replicación llegó a un máximo el virus a las 72 horas de cultivados los leucocitos, más no se pudo explicar su descenso posterior, bien sea que se deba a exceso de virus que cope por completo las células, o bien a daño celular invisible a esta altura del cultivo, o tal vez a otra circunstancia, como exceso de interferón, indicando que no es infección crónica de los leucocitos.

La titulación en VERO y leucocitos indicó la mayor sensibilidad de las células VERO. También lo mostró la curva de replicación del virus en VERO y leucocitos. En dos oportunidades se elevó el índice de virus en cultivo de leucocitos hacia las 72 horas, mientras que en la otra ocasión permaneció casi en equilibrio todo el lapso del cultivo. En todos los casos la curva en VERO indicó que en estas células se produce más virus.

Es más lógico el descenso de la curva en VERO, por cuando el virus desprendió estas células, cosa que no ocurrió con los leucocitos.

Edelman y Wheelock, (1967), obtuvieron la replicación *in vitro* del VEV en leucocitos humanos, trabajando con el tipo Indiana. En el presente trabajo fue con New Jersey y, además los cultivos de leucocitos fueron de bovino. Esto no lo hemos encontrado reportado aún en la literatura.

Como no se ensayaron métodos de separación de diversos tipos de leucocitos, no fue posible determinar cuáles fueron los principales hospedadores para la replicación.

Como se pretendía averiguar si el virus viajaba, o se replicaba, en los leucocitos de sangre periférica, no se podía tomar la vía intravenosa para la inoculación del virus, pues ello equivaldría casi a infectar *in vitro* los leucocitos. Por ello se escogió la vía más similar, o sea, en este caso, la intramuscular.

En la vaca no se desencadenó la enfermedad clínica típica al inocularse el virus por vía intramuscular, lo cual estuvo de acuerdo con las anotaciones de Hanson, (1952). La vaca presentó anticuerpos detectables por neutralización y muy escasos por fijación del complemento. Las lesiones inespecíficas previas en lengua y ubre no se desarrollaron como lesiones específicas.

Los resultados de esta inoculación estuvieron de acuerdo con trabajos de otros autores en lo que se refiere a la ausencia de viremia.

Podría sospecharse que el virus al penetrar el organismo del bovino, fuera tomado por los leucocitos y se desplaza con éstos hasta los sitios escarificados. Pero los resultados negativos al intentar aislar el virus de las células blancas, no soportaron esta hipótesis.

5. RESUMEN

En la primera parte del trabajo se efectuaron ensayos sobre el cultivo *in vitro* de leucocitos bovinos. Algunos medios y diferentes frascos y condiciones fueron ensayados para dichos cultivos y utilizados dos sistemas para su obtención: método de solución hipotónica, y el método japonés, los cuales sirvieron para lograr cultivos en monocapa.

Las monocapas de leucocitos bovinos se produjeron al usar frascos de tipo F (Falcon Plastics), o sea, de plástico especial para cultivo celular, usando varios medios de cultivo y en especial con suero de bovino adulto como único medio.

En la segunda parte de este estudio, se efectuaron experimentos con el virus de estomatitis vesicular tipo New Jersey (VEV-NJ) en cultivos de leucocitos bovinos *in vitro* y en un bovino inoculado por vía intramuscular luego de haberlo escarificado previamente en la lengua y la ubre, imitando lesiones inespecíficas.

Se determinó así la curva de replicación del VEV-NJ en las células blancas y su comparación con la que se describe en células VERO. La sensibilidad al virus por parte de las VERO frente a los leucocitos bovinos cultivados en esas condiciones fue mayor. La inoculación del VEV al bovino no desencadenó síntomas clínicos de la enfermedad y no fue posible el aislamiento del virus a partir de suero ni de sus leucocitos rotos, ni de cultivos de leucocitos o de raspados de las áreas previamente escarificadas, por espacio de siete días.

Pasados 15 días de la inoculación se comprobó la presencia de anticuerpos contra VEV-NJ, mediante prueba de neutralización y por fijación del complemento. No pudo así establecerse el papel de los leucocitos en la patogénesis del VEV en bovinos.

6. SUMMARY

Live leukocytes: Cultivation and possible role in the pathogenesis of the bovine vesicular stomatitis

In the first part of this thesis, investigations on the culture of leucocytes *in vitro* are described. Different media and containers were tried.

Bovine leucocytes were obtained by two methods: Hypotonic treatment, and the Japanese method. The two gave sufficient leucocytes to form a cell sheet.

Leucocytes cell sheets were obtained using Falcon plastic bottles and diverse media of which pure bovine serum worked best.

In the second part of the thesis studies with VEV-NJ in bovine leucocytes cultures and in a bovine inoculated intra muscularly are described. The bovine was scarified on the tongue and a teat before inoculation.

The replication curve of VEV-NJ was determined in leucocytes and VERO. VERO cells appeared to be the more sensitive of the two.

The inoculated cow did not show clinical symptoms. No virus was isolated from serum, leucocytes frozen and thawed, leucocyte culture and material of the scarifications during seven days. Fifteen days post inoculation neutralizing and Complement Fixation (CF) antibodies were present in the serum. The role of leucocytes in the pathogenesis of VEV infection in the bovine was not established.

7. BIBLIOGRAFIA

1. BRANDLY, C.A. *et al.* 1951. Vesicular Stomatitis with Particular Reference to the 1949 Wisconsin Epizootic. Proc. Book Amer. Vet. Med. Ass'n. **88**:61-70.
2. BRODY, J.A.; G.F. FISCHER and P.H. PERALTA. 1967. Vesicular Stomatitis Virus in Panama. Amer. J. Epid. **86**:158-161.
3. EDELMAN, R. y E.F. WHEELOCK. 1967. Specific Role of Each Human Leukocyte Type in Viral Infection. I. Monocyte as Host Cell for VSV Replication *in vitro*. J. Virol. **7**:1139-1149.
4. ----- y E.F. WHEELOCK. 1968. Specific Role of Each Human Leukocyte Type in Viral Infection. II. Phytohemagglutinin treated Lymphocytes as Host Cells for VEV Replication *in vitro*. J. Virology **2**:5440-5448.
5. FULTON, F. and K.R. DUMBELL. 1948. The Serological Comparison of strains of Influenza Virus. Journal of General Microbiology. **3**:97-111.
6. HANSON, R.P. 1952. The Natural History of Vesicular Stomatitis, Bacteriological Reviews. **16**(3):179-204. Reviews.
7. JONKERS, A.H. *et al.*, 1964. Laboratory studies with Wild Rodents and Viruses Native to Trinidad. I. Studies on the Behavior of Cocal virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **13**(4):613-619.
8. TOKUDA, G. *et al.* 1962. Studies on Rinderpest Virus in Bovine Leukocyte Cultures. I. Cultivation of Leukocytes and Appearance of Inclusions in Infected Cells. National Institute of Animal Health Quarterly. **2**(4):189-200.