

Método para la purificación del virus herpes simplex *

Dr. Julio Enrique Ospina **

INTRODUCCION

Diversos procedimientos han sido descritos en la literatura con el propósito de purificar al virus Herpes, de varias líneas celulares (1), (2), (3), (4), con resultados muy diferentes en relación a la capacidad de la técnica propuesta para obtener partículas virales intactas que retengan, en las concentraciones necesarias, su capacidad de infección. Se debe mencionar también que la mayoría de dichos sistemas son difíciles de ejecutar, como procedimientos rutinarios ya sea por su alto costo o por el excesivo tiempo que se lleva en su desarrollo.

* Sección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, Ministerio de Salud, Bogotá.

** Profesor Asistente de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. D. E. Jefe del Grupo de Microscopía Electrónica, del Instituto Nacional de Cancerología.

Con el presente trabajo nos proponemos presentar la metodología para la concentración y posterior purificación de virus Herpes Simplex, la cual creemos permite la obtención de partículas biológicamente activas o sea con su capacidad de infección preservada.

MATERIAL Y METODOS

CELULAS.

Se usaron cultivos en monocapa de riñón de conejo. Los cultivos se establecieron en botellas de tipo MA de 500 ml. con tapa de rosca. Se utilizó medio de Eagle (5) suplementado con suero fetal, de ternero al 20%, estreptomycin y penicilina 200 ug. y 200 unidades respectivamente 2 mM de 1-glutamina por ml. (6). Todos estos componentes fueron adicionados poco antes de su uso. Las células se cultivaron a 37°C, en una incubadora National con CO₂ y O₂. Las concentra-

ciones celulares fueron del orden de 2.5×10^7 .

VIRUS.

Se empleó el virus Herpes hominis, cepa HF, de Flexner y Amoss (7), obtenida originalmente del doctor Chester A. Southam. Se hizo titulación en placas para determinar la infectividad del virus sobre células de riñón de conejo cultivadas en platos plásticos de Petri. El virus recibido se colocó en volúmenes de 0.2 ml. sobre las monocapas celulares y el conjunto se incubó a 37°C, durante 60 minutos y con agitación suave cada 10 minutos. Posteriormente se agregó medio de Eagle suplementado con 10% de suero de ternero. Las células se incubaron a 37°C, durante 48 horas y se colorearon con cristal violeta. Se establecieron títulos hasta de $10^{-7.3}$ por ml. Una vez establecido lo anterior, se procedió a preparar reservas de virus Herpes en las mismas células de riñón de conejo. Cuando estas últimas mostraron capas confluentes, se les aspiró el medio y se volvió a colocar sobre ellas medio líquido representado por solución salina de Pucks A, suplementada con 1% de suero de ternero, en volúmenes de 5 ml., para un total de 15 cajas de Petri. Un mililitro de la preparación viral arriba mencionada se diluyó en 7.5 ml. de solución salina de Pucks con suero de ternero al 1%. Cada caja de Petri se infectó con 0.5 ml. de la solución final, calculándose 1 1/2 unidad formadora de placas por célula,

(PFU). El material se incubó a 37°C durante 60 minutos con agitación suave cada 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se añadieron 15 ml. de medio de Eagle a cada caja de Petri y se procedió de nuevo a incubar a 37°C, hasta que se observó un efecto citopático aparente, generalmente a las 24 horas de la infección. Al observarse este último, las células se rasparon de la superficie de la caja de Petri y se centrifugaron a 1000 rpm, por 10 minutos. El sobrenadante se guardó y el sedimento se disolvió en 15 ml. de medio de Eagle para cultivos en monocapa, suplementado con suero de ternero al 20%. Este material fué centrifugado de nuevo, el sedimento descartado y los dos sobrenadantes mezclados. El material viral así obtenido se almacenó en volúmenes de 2 ml. La titulación de su efectividad se hizo en forma similar a la técnica descrita más arriba para titular la cepa recibida.

CRECIMIENTO DEL VIRUS Y PURIFICACION.

Células de riñón de conejo con condiciones de crecimiento similares a las ya descritas, y con aspecto morfológico de monocapas enteramente confluentes, se infectaron con el virus obtenido, en una multiplicidad de 1 1/2 PFU por célula. Se siguieron los mismos procedimientos arriba mencionados. Cuando se observó el efecto citopático, se rasparon las células de la superficie de la caja de Petri y se procedió a centrifugar su contenido a

500 g. por 10 minutos. El sobrenadante se guardó y el sedimento se disolvió en 15 mls. de medio de Eagle para monocapa, suplementado con suero de ternero al 20%. Este material volvió a centrifugarse a 500 g. por 10 minutos. El sobrenadante se guardó el sedimento se descartó y el sobrenadante se combinó con el anterior. El material líquido fué centrifugado a 1700 g. por 20 minutos y el sedimento fué descartado. De nuevo se centrifugó a 30000 g. por 60 minutos. Los sedimentos fueron disueltos en 10 ml. de solución salina de Pucks suplementada con 1% de suero de ternero. Esta solución se colocó sobre un gradiente de sucrosa en PBS a un pH de 8.0, en una concentración del 40% al 20% y se centrifugó a 40000 g. durante 90 minutos. Al cabo de ese tiempo se obtuvo una banda a 4 cms. de la superficie del tubo para SW 25.1, la cual midió 0.25 cms. de espesor. Esta fué removida del gradiente, examinada al microscopio electrónico y usada en experimentos de infección para comprobar la pureza y calidad del material obtenido.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se siguió la técnica de la pseudoreplicación en agar previamente descrita por nosotros (8) para la "coloración negativa", la cual se efectuó con fosfotungstato al 1.5% pH 7.0. El material líquido se fijó en glutaraldehído al 3% por 4 horas y a 4°C, se post-fijó en tetroxido de osmio al 2% durante 5 horas, fué sometido a

las técnicas corrientes para deshidratación y se incluyó en mezcla de Epon y Araldita según el procedimiento de Mollenhauer (9). Los cortes se hicieron en un ultramicrotomo MT2 Porter Blum. El material se colocó sobre rejillas de 300 "mesh" y se coloreó con uranilo y citrado de plomo. Las preparaciones se estudiaron en un microscopio JEM 7A con un voltaje de aceleración de 80 kilovoltios.

INMUNOFLUORESCENCIA.

El antisuero se obtuvo del Doctor James T. Grace y se usó la técnica directa de Coons para el estudio de los anticuerpos marcados con fluoresceína. Se usó el método de Riggs (10) para la separación de las globulinas y su conjugación con isotiocianato de fluoresceína. El colorante no conjugado se removió por diálisis. Las células se infectaron con la preparación obtenida del gradiente de sucrosa, en volúmenes y procedimientos exactamente iguales a los previamente descritos. Las células se rasparon de la superficie de la caja de Petri a los días 2 y 4 de la infección y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos. El sedimento fué disuelto en PBS y se efectuaron frotis de la preparación en láminas de vidrio, secándose las preparaciones a temperatura ambiente y con aire. Posteriormente se fijaron en acetona durante 10 minutos, fueron secadas con aire, recubiertas con el suero marcado e incubadas en cámara húmeda a 37°C durante 10 minutos. El exceso de suero

se eliminó con papel de filtro, las láminas se sumergieron una vez en PBS y se lavaron durante 10 minutos y con agitación constante. Después de lavarlas en agua destilada se recubrieron con laminillas por medio del uso de glicerol al 50% en PBS. Las preparaciones se examinaron en un microscopio American Optical con una lámpara de alta presión de mercurio tipo Osram HBO 200. Se usaron filtros excitadores Schott BG-12 y de barrera Schott GG-1.

RESULTADOS

El análisis al microscopio electrónico de la banda obtenida del gradiente de sucrosa demostró que aproximadamente un 90% de las partículas virales obtenidas presentaban membranas uniformes y bien definidas alrededor de capsides intactas. Las fotografías 1 y 2 demuestran este hecho. La primera, con un menor aumento presenta las capsides protegidas por las membranas referidas, las cuales son consideradas de naturaleza lipoproteica (11). Algunas membranas sin embargo, rodean espacios vacíos y otras se encuentran en disolución. La segunda con mayor aumento muestra el mismo aspecto. En estas, como en las otras preparaciones llama la atención la total ausencia de fragmentos celulares o de material extraño a las partículas virales. Los virus obtenidos con este aspecto morfológico los hemos denominado como del tipo A. En un 10%

de los virus obtenidos, faltó la membrana lipoproteica de origen celular. La mayoría de ellas demostraron capsides intactas en las cuales los capsomeros pueden ser fácilmente identificados en las figs. 3 y 4. Los virus intactos fueron denominados del tipo B. La figura 4 presenta algunas capsides rotas cuyas partículas constituyeron aproximadamente el 2% de todos los virus obtenidos.

En la fotografía 5 se pueden ver partículas virales del tipo A y B en la misma preparación.

La técnica de fluorescencia permite ver el resultado obtenido en células de riñón de conejo infectadas con el virus purificado con el procedimiento propuesto. La fotografía 6, tomada del material infectado por dos días, muestra las características bandas fluorescentes perinucleares, anchas en algunas de las células. En la fotografía 7 vemos el resultado de la infección a los 4 días de haberse iniciado. Todavía persisten algunas gruesas bandas fluorescentes perinucleares en algunas células, pero la gran mayoría se caracteriza por presentar un punteado fluorescente que también ha sido descrito como producto de la infección por virus Herpes (6).

Todas las células mostraron efecto citopático a los 6 días del cultivo.

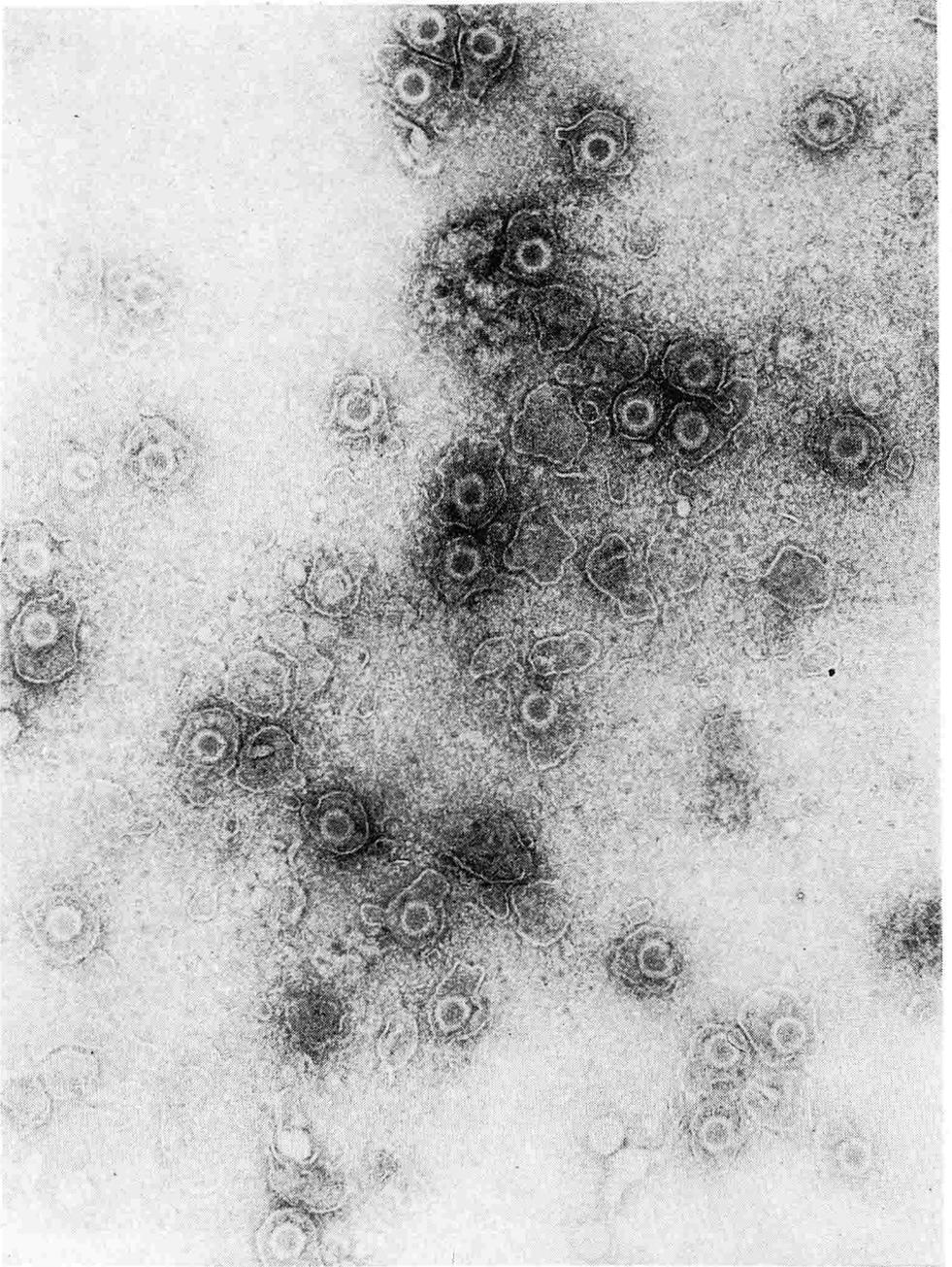


FOTO Nº 1 Virus Herpes Simplex obtenido de gradientes de sucrosa. x 170.000. Explicación en el Texto. Coloración negativa.

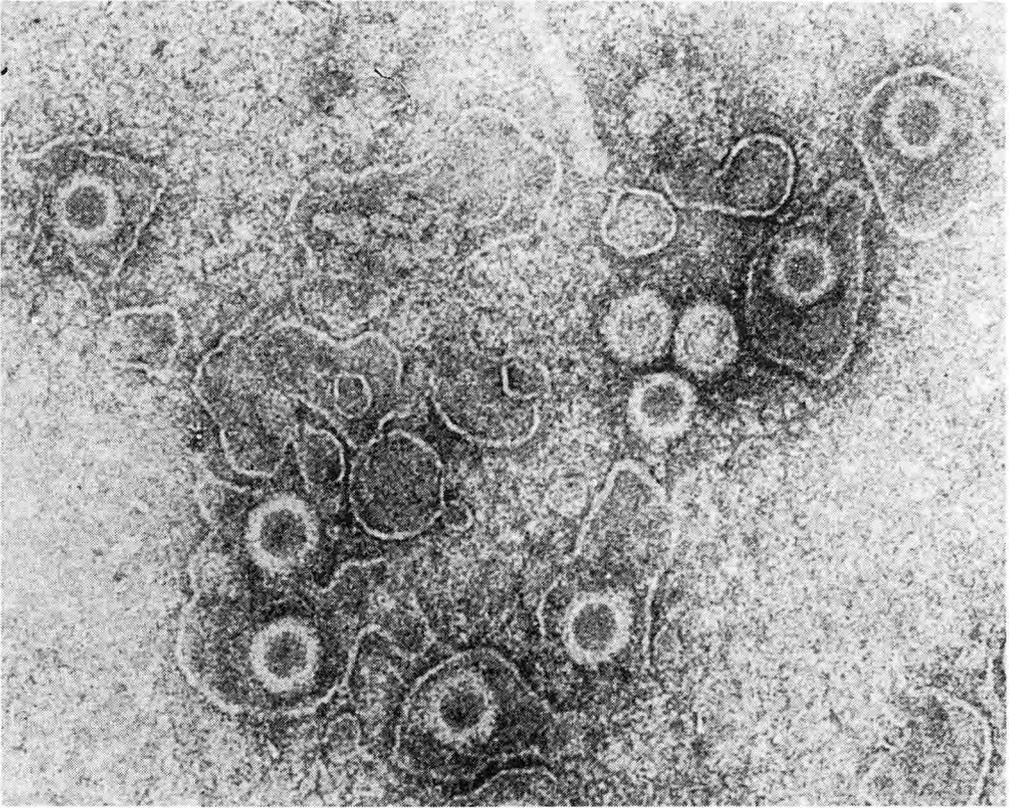
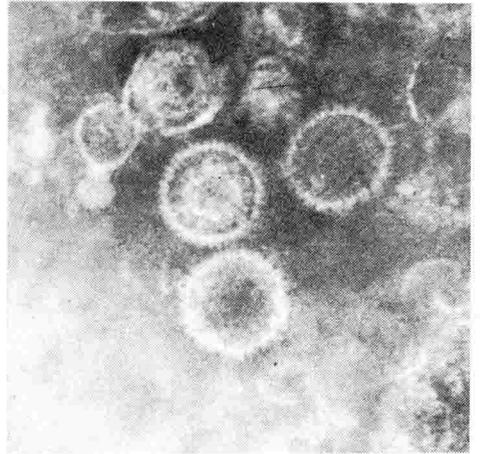


FOTO Nº 2 Virus Herpes Simplex. x 200.000 Gradientes de sucrosa. Coloración negativa.

FOTO Nº 3 Virus Herpes Simplex. x 200.000. Coloración negativa.



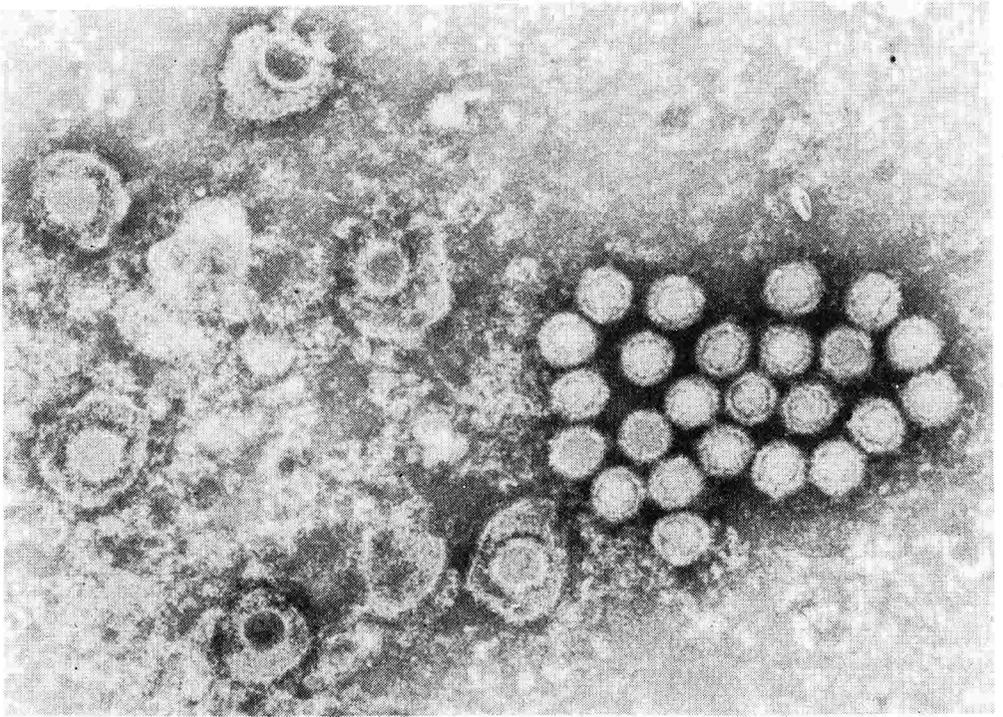
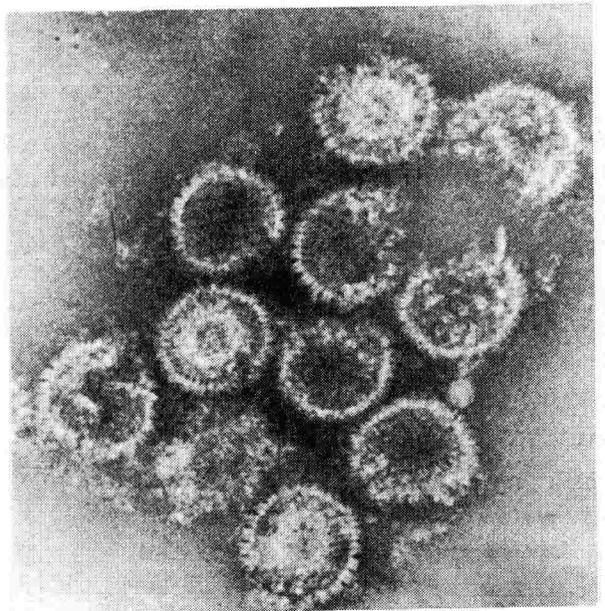


FOTO Nº 4 Virus Herpes Simplex. x 200.000. Coloración negativa.

FOTO Nº 5 Virus Herpes Simplex.
x 185.000. Coloración negativa.



DISCUSION

Los estudios experimentales en diversos virus del grupo Herpes han tomado gran importancia por la posible relacion de este virus con diversas entidades patológicas. Su relación con ciertos tipos de encefalitis (12) y su presencia en algunos tumores coincidencial o no, ha contribuido a que se desarrollen técnicas y procesos experimentales que permitan una mejor comprensión de sus relaciones con la célula hospedera (13) así como de sus ciclos de crecimiento intracelular.

Diversos virus cuya morfología es similar a la de los virus Herpes han sido relacionados con tumores de varias naturalezas. Lunger (14) ha sugerido que el virus de Lucké (15) observado en el adenocarcinoma renal de ranas leopardo pertenece al grupo Herpes. Lo mismo se ha dicho del virus Epstein-Barr (16) observado en el linfoma de Burkitt (17).

Por lo anterior se puede concluir la gran importancia que tiene el poder desarrollar procedimientos técnicos que permitan comprobar en una forma experimental las anteriores hipótesis. Uno de los problemas básicos sería el de obtener preparaciones virales lo suficientemente puras o sea libres de contaminantes celulares o bacterianos que permitieran dilucidar cual es la acción biológica de este virus principalmente en lo referente a los tumores mencionados.

La importancia del método propuesto en este trabajo, reside fundamentalmente en que el 90% de la partículas obtenidas atravez de el se encuentran rodeadas por membranas lipoproteicas de origen celular. No hay ninguna duda que la capacidad infecciosa de estas partículas es grande como lo demuestran los trabajos de Willy y Watson (18) en células HEP-2 infectadas con Herpes Simplex. En los trabajos de estos autores se demuestra la baja relación existente entre el No. de partículas y el grado de infectividad (10:1), cuando el virus está rodeado en un 90% del total por las membranas referidas. Con relación a las capsides desnudas, existe hasta el momento una gran discusión sobre su capacidad infecciosa. Agunos autores como Watson (19) y Smith (20) han informado hallazgos contradictorios. El primero ha obtenido infección con partículas desnudas en cuando el segundo niega tal posibilidad, en partículas obtenidas de gradientes con cloruro de cesio. Debe tenerse en cuenta sinembargo la gran sensibilidad de los virus no encapsulados a la acción tóxica del cloruro de cesio (11), fenómeno que se evita con nuestro procedimiento ya que el medio usado es sucrosa.

La infectividad del virus purificado por el presente método se ha comprobado en forma muy clara por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes.

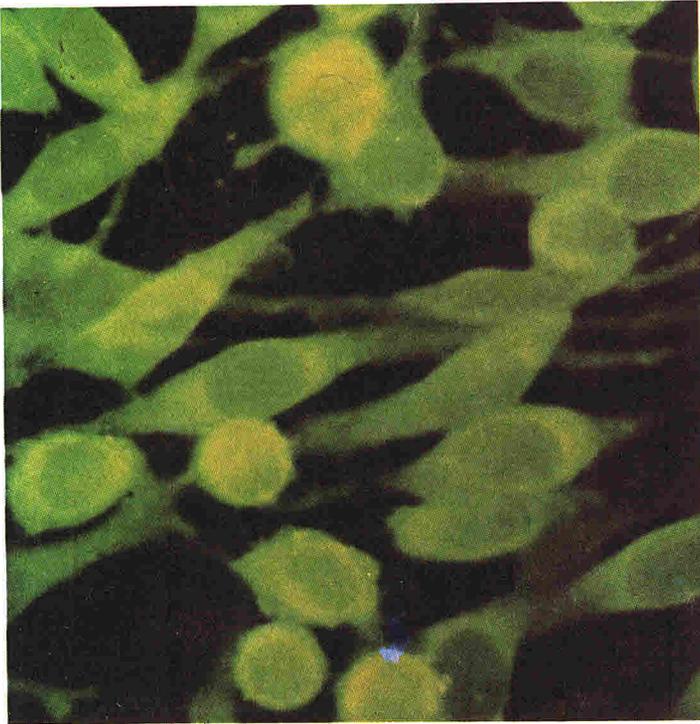


FOTO Nº 6 Células cultivadas infectadas con Virus Herpes
Tiempo de infección 2 días. Explicación en el
texto.

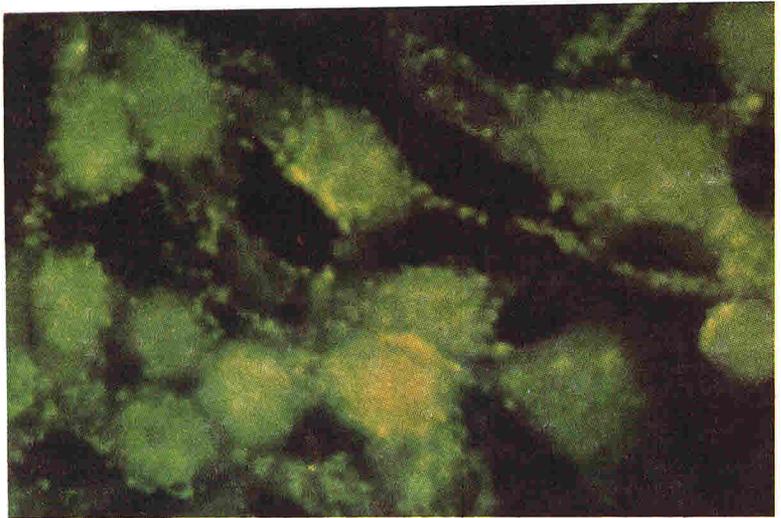


FOTO Nº 7 Células infectadas con Herpes Simplex. Tiempo de
infección 4 días.

RESUMEN

Se propone en el presente trabajo un procedimiento técnico para la purificación de virus Herpes Simplex por medio de centrifugación diferencial y gradientes de sucrosa en una concentración del 40% al 20% y centrifugación final a 40000 g. El 90% de las partículas obtenidas presentaron alrededor de sus capsides

formaciones membranosas similares a las descritas en la literatura como de origen celular y naturaleza lipoproteica. Un 10% de las partículas se obtuvieron desnudas, algunas con sus capsides rotas. Se usó virus Herpes Hominis, cepa HF, en células de riñón de conejo. La infectividad de las partículas purificadas se comprobó por medio de técnicas inmunofluorescentes.

Agradecemos la excelente labor del técnico en Microscopía Electrónica José Orlando Franco y de la bióloga señorita Nohora Elizabeth Hoyos por su trabajo en los cultivos celulares.

REFERENCIAS

- 1 Crawford, L. V., y Lee, A.J. *The Nucleic Acid of Cytomegalovirus. Virology.* 23:105, (1964).
- 2 Darlington, R.W., y Randall, C.C. *The Nucleic Acid content of Equine Abortion Virus. Virology.* 20:391, (1963).
- 3 Ben-Porat, T., y Kaplan, A.S. *The chemical composition of Herpes Simplex and Pseudorabies Viruses. Virology.* 16:261, (1962).
- 4 Roisman, B., y Spear, P.G. *Preparation of Herpes Simplex Virus in High Titer. J. Virology.* 2:83, (1968).
- 5 Eagle, H., *Aminoacid Metabolims in Mammalian Cell Cultures. Science.* 130:432, (1959).
- 6 Shipkey, F.H., Erlandson, R.A., Bailey, R.B., Babcock, V.I., y Southam, Ch. M. *Virus Biographies. 11. Growth of Herpes Simplex Virus in Tissue Culture. Experimental and Mol. Path.* 6:39, (1967).
- 7 Flexner, S., y Amoss, H.L. *Contribution to the Pathology of Experimental Virus Encephalitis. 11. Herpetic Strains of Encephalitogenic Virus. J. Exptl. Med.* 41:233, (1925).
- 8 Ospina, J.E., Munyon, W., y Grace J. T. *Cambios en Virus Vaccinia durante la Síntesis de RNA in Vitro. Revista de la Facultad de Medicina.* 37:79, (1971).
- 9 Mollenhauer, H.H. *Plastic Embedding Mixtures for use in Electron Microscopy. Stain Technology.* 39:111, (1964).
- 10 Riggs, J.L., Seiward, R.J., Burckhalter, J.H., Downs, C.M., y Metcalf, T.G. *Isothiocyanate Compounds as Flourescent Labelling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol.* 34:1081, (1958).
- 11 Plummer, G. *Comparative Virology of the Herpes Group. Progr. Med. Virol.* 9:302,

(1967).

12. *Leider, W., Magoffin, R.L., Lennette, E.H., y Leonards, L.N.R. Herpes Simplex Virus Encephalitis. New England J. Med. 273:342, (1965).*
13. *Roisman, B. The programming of Herpes Virus multiplication in doubly infected and in Puromycin treated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49:165, (1963).*
14. *Lunger, P.D. The isolation and morphology of the Lucké frog Kidney Tumor Virus. Virology. 24:138, (1964).*
15. *Lucké, B. Carcinoma of the Leopard Frog, its probably causation by a Virus. J. exp. Med. 68:457, (1938).*
16. *Epstein, M.A., Achong, B.G., y Barr, M. Particles in cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. Lancet. 1:702, (1964).*
17. *Burkitt, D. A. A Sarcoma involving the jaws in African Children. Brit. Med. Surg. 46:218, (1958).*
18. *Watson, D.H., y Wildy, P. Some serological properties of Herpes Virus particles studied with the Electron Microscope. Virology. 21:100, (1958).*
19. *Watson, D.H., Wildy, P., y Russell, W.C. Quantitative Electron Microscope studies on the growth of Herpes Virus using the techniques of negative staining and ultramicrotomy. Virology. 24:538, (1964).*
20. *Smith, K.O. Relationship between the envelope and infectivity of Herpes Virus. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 115:814, (1964).*