

Resumen #518

OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES DE CULTIVO DE BOCAPARVOVIRUS PRIMATE 1 EN CÉLULAS CACO-2

¹Olmos P, ¹Tejerina P, ¹Ghietto LM, ¹Adamo MP
¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". FCM. UNC

Persona que presenta:

Tejerina P, pau_10493@hotmail.com

Área:

Básica

Resumen:

El Bocaparvovirus primate 1, anteriormente denominado Bocavirus Humano 1 (HBoV1), causa infección respiratoria aguda (IRA) y está asociado a IRA baja en niños. Los estudios moleculares y la relación virus-célula, así como el desarrollo de métodos diagnósticos, requieren un modelo bien caracterizado de infección in vitro, por lo cual en nuestro laboratorio hemos implementado la línea celular Caco-2. Estas células son susceptibles de infección por HBoV1 mediante el uso de DEAE-dextrán, un compuesto que al desorganizar las cargas electrostáticas superficiales facilita la entrada del virus a la célula. En este trabajo el objetivo fue determinar una concentración de DEAE-dextrán que asegure la capacidad infectiva del HBoV1 en Caco-2 sin dañar la monocapa. Para ello, cultivos de células Caco-2 se infectaron con un inóculo obtenido a partir de una muestra respiratoria HBoV1+, adicionando diferentes concentraciones de DEAE-dextrán, 1 y 10 µg/ml. Los cultivos se observaron y fotografiaron diariamente al microscopio óptico de fase invertida, a fin de determinar la presencia de efecto citopático (ECP). Se recolectaron sobrenadantes y monocapas 1 a 6 días postinfección (dpi) y, luego de extraer los ácidos nucleicos, se detectó la presencia del HBoV1 mediante PCR convencional seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de plata (ssPAGE). La carga viral absoluta se determinó por qPCR con Syber Green en muestras de sobrenadantes y monocapas tomadas 1 a 6 dpi. En los cultivos suplementados con 1 µg/ml de DEAE-dextrán no se observó toxicidad asociada a la incorporación del compuesto y se detectó el virus en monocapas y sobrenadantes desde el primer día de infección. La mayor concentración de DEAE-dextrán se asoció con efecto citotóxico y muerte celular. Los resultados de PCR/ssPAGE muestran la banda específica en las monocapas de los cultivos suplementados con 10 µg/ml de DEAE-dextrán, evidenciando la posible replicación vírica en esta condición; sin embargo, la cuantificación no arrojó valores de cargas virales estadísticamente diferentes a lo observado con 1 µg/ml del compuesto. En conclusión, la mejor concentración de DEAE-dextrán en la infección por HBoV1 de células Caco-2 sería cercana a 1 µg/ml, facilitando la infección y disminuyendo la toxicidad sobre las células.

Palabras Clave:

Bocavirus Humano, cultivo celular, infección

OPTIMIZATION OF EXPERIMENTAL CONDITIONS OF PRIMATE BOCAPARVOVIRUS 1 CULTURE IN CACO-2 CELLS

¹Olmos P, ¹Tejerina P, ¹Ghietto LM, ¹Adamo MP
¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". FCM. UNC

Persona que presenta:

Tejerina P, pau_10493@hotmail.com

Abstract:

Primate bocaparvovirus 1, a virus including the previously named Human Bocavirus 1 (HBoV1), can cause acute respiratory tract infection (ARTI) and it is associated with low ARTI in children. Molecular studies of the virus-cell relationship, as well as the development of diagnostic methods, require a model of *in vitro* infection, therefore our laboratory has implemented the Caco-2 cell line. These cells are susceptible to infection by HBoV1 when the culture medium is supplemented with DEAE-dextran, a compound that disorganizes the surface electronic charges and facilitates the entry of the virus into the cell. In this work the objective was to determine a concentration of DEAE-dextran that guarantees the infective capacity of the HBoV1 in Caco-2 without damaging the monolayer. Caco-2 cell cultures were infected with an inoculum obtained after processing an HBoV1+ respiratory sample, adding 1 µg/ml or 10 µg/ml DEAE-dextran. In order to determine the presence of cytopathic effect, the cultures were observed and photographed daily under an inverted-phase optical microscope. Supernatants and monolayers were collected 1-6 days postinfection (dpi), from which nucleic acids were extracted. In these samples the presence of HBoV1 was tested by conventional PCR followed by electrophoresis in silver stained-polyacrylamide gel (ssPAGE). Absolute viral load was also determined in samples of supernatants and monolayers taken 1-6 dpi, using a qPCR technique with SybrGreen. In cultures supplemented with 1 µg / ml DEAE-dextran no toxicity associated with the compound was observed and the virus was detected in monolayers and supernatants from the first day of infection. The highest concentration of DEAE-dextran was associated with cytotoxic effect and cell death. The PCR/ssPAGE results show the specific band in the culture monolayers supplemented with 10 µg/ml DEAE-dextran, evidencing the possible viral replication in this condition. However, the quantification did not yield viral load values statistically different from that observed with 1 µg/ml of the compound. In conclusion, the best concentration of DEAE-dextran in HBoV1 infection of Caco-2 cells would be about 1 µg/ml, facilitating infection and decreasing toxicity on cells.

Keywords:

Human Bocavirus, cell culture, infection