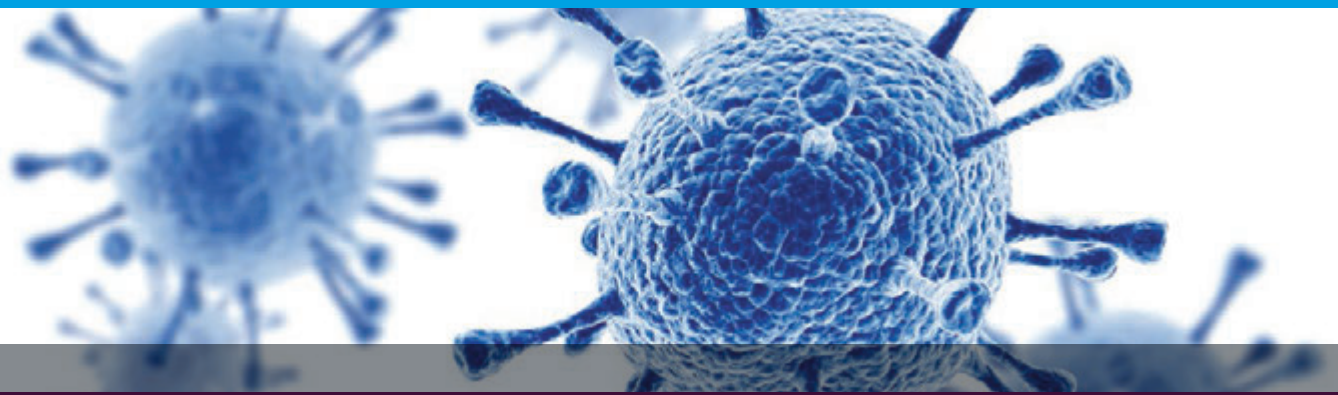


# Aplicaciones para vacunas y virología

Manual de los instrumentos Agilent xCELLigence RTCA



# Índice

<b>Descripción general</b>	<b>3</b>
Importancia de los efectos citopáticos en la investigación virológica	3
Limitaciones de los ensayos tradicionales de ECP	3
La solución: ensayo de ECP en tiempo real Agilent xCELLigence	4
E-Plates	6
Explicación del trazado de impedancia en tiempo real	6
Instrumentos xCELLigence	7
<b>Aplicaciones</b>	<b>8</b>
Determinación de títulos de virus	10
Detección y cuantificación de anticuerpos neutralizantes	11
Estudio de fármacos antivirales	14
Ensayo de viricidas	17
Virus oncolíticos	19
Caracterización de la calidad/aptitud de los virus	22

# Descripción general

## Importancia de los efectos citopáticos en la investigación virológica

Cuando resultan infectadas por un virus, las células anfitrionas suelen sufrir cambios visibles a nivel microscópico que reciben la denominación colectiva de efectos citopáticos (ECP). Entre los ECP se pueden incluir los siguientes: reducción o aumento de tamaño de las células, deterioro/lisis, fusión celular y formación de cuerpos de inclusión. No todos los virus provocan un ECP en su célula anfitriona; sin embargo, si lo hacen, esto puede ser una herramienta útil para diversas aplicaciones de investigación, que abarcan desde la determinación de títulos de virus hasta la detección y cuantificación de anticuerpos neutralizantes.

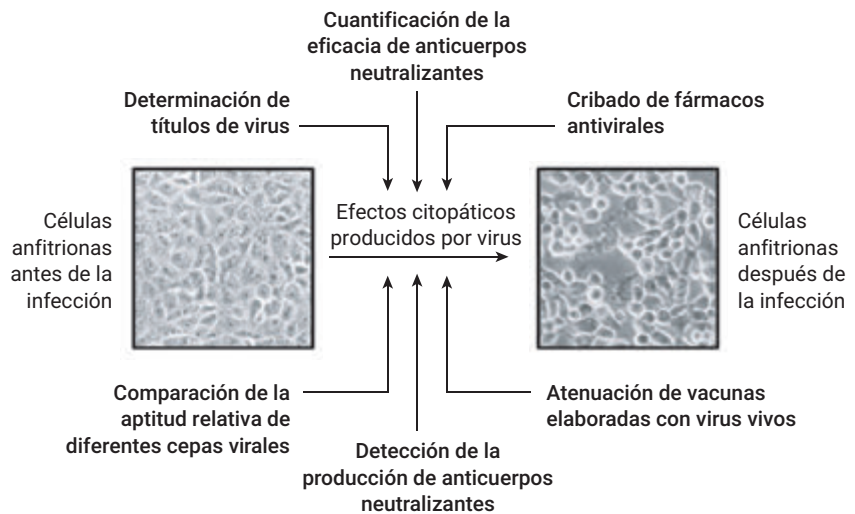


Figura 1. Factores que contribuyen a los efectos citopáticos.

## Limitaciones de los ensayos tradicionales de ECP

En un ensayo típico de ECP, se infecta una monocapa de células con un virus y, posteriormente, se monitoriza durante varios días (o semanas) para hacer un seguimiento de los cambios morfológicos. Estos cambios se producen en distintos focos que corresponden a los puntos de infección. Durante muchas décadas, el ensayo de referencia ha sido el ensayo de placas, en el que, poco después de la inoculación, la monocapa de células se recubre con un material semisólido (por ejemplo, agarosa). A medida que se produce la lisis de las células infectadas, la agarosa evita que los viriones descendientes se difundan libremente por el medio e infecten células en puntos lejanos del pocillo. Únicamente las células próximas resultarán infectadas, ya que el virus solamente puede difundirse de forma lateral bajo la capa de agarosa. A medida que avanza este ciclo de infección, lisis e infección de células adyacentes, se forman regiones sin células conocidas como placas, que pueden contabilizarse a simple vista o bajo el microscopio. Existen numerosas variantes del ensayo de placas (con o sin tinción celular, por ejemplo), pero todas ellas son procesos laboriosos. Es difícil determinar si una placa es o no es auténtica. Esto hace que conseguir niveles elevados de exactitud y reproducibilidad se convierta en un desafío. Por último, resulta difícil obtener información cinética a partir de los datos del punto final de un ensayo de placas. Esta información cinética puede ser útil a la hora de comparar la aptitud relativa de dos cepas/colonias aisladas de virus.

El uso de un virus diseñado para expresar una proteína fluorescente puede facilitar la identificación de puntos de infección dentro de la monocapa de células anfitrionas. Sin embargo, en muchos contextos (como el desarrollo de vacunas atenuadas elaboradas con virus vivos), este tipo de modificación del genoma viral no es admisible. Como alternativa, la identificación de células infectadas mediante una combinación de anticuerpos específicos contra las proteínas del virus y microscopía de fluorescencia puede resultar útil, pero requiere mucho tiempo de intervención y los reactivos pueden ser caros. Otro problema de los dos tipos anteriores de ensayos de fluorescencia es que no proporcionan una evaluación/cuantificación del ciclo de vida completo del virus. Por ejemplo, una cepa de virus puede ser capaz de infectar las células y expresar una proteína fluorescente, pero presentar deficiencias en pasos posteriores, como la formación de la cápside o la lisis de la célula anfitriona. En este contexto, el seguimiento de la presencia de proteína viral por fluorescencia no resulta apropiado para evaluar la aptitud/calidad del virus.

### La solución: ensayo de ECP en tiempo real Agilent xCELLigence

Como alternativa más eficiente y productiva a los ensayos tradicionales de ECP, actualmente un gran número de laboratorios del ámbito industrial y académico están utilizando instrumentos de análisis celular en tiempo real (RTCA) Agilent xCELLigence para muchas aplicaciones virológicas.

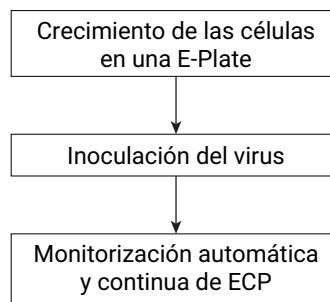


**Figura 2.** Ejemplo de un instrumento Agilent xCELLigence. Los instrumentos xCELLigence están disponibles en distintos formatos (16, 48, 96 y 576 pocillos). El instrumento mostrado contiene seis soportes, cada uno de los cuales aloja una microplaca electrónica de 96 pocillos. La parte del instrumento en la que va colocada la placa está situada dentro de una incubadora estándar de cultivos de tejido, mientras que el analizador y la unidad de control (un ordenador portátil) están ubicados fuera de la incubadora. Las seis placas pueden monitorizarse de forma simultánea e independiente entre sí, lo que maximiza la productividad y la flexibilidad.

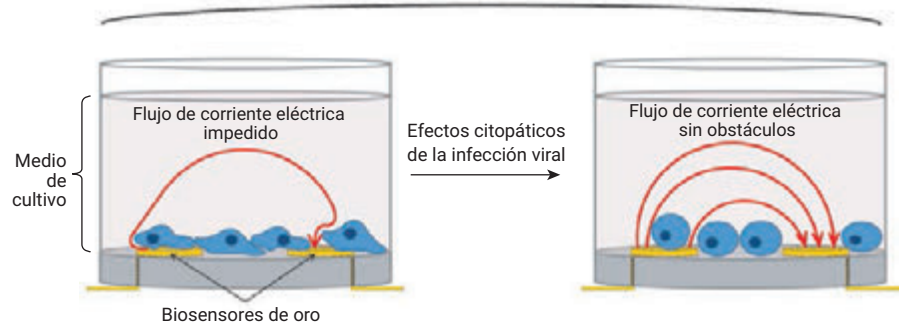
Los instrumentos xCELLigence usan microplacas patentadas (Agilent E-Plates) que contienen biosensores de oro integrados en el fondo de cada pocillo. Cuando se sumergen en una solución conductora de la electricidad (como un medio de cultivo de tejido estándar), la aplicación de un potencial eléctrico débil entre estos biosensores produce el flujo de una corriente eléctrica minúscula entre ellos (Figura 3B). La presencia de células adheridas a los biosensores de oro impide el flujo de corriente, y la magnitud de esta impedancia depende del número de células y su tamaño, la calidad de la unión célula-sustrato y la adhesión entre células (función de barrera). Ni las superficies de los biosensores de oro ni el potencial eléctrico producen efectos en el estado o el comportamiento de la célula.

En el contexto de los ensayos virológicos, las células infectadas que progresan a lo largo del proceso de los efectos citopáticos (mostrando redondeo y, en última instancia, desprendimiento o lisis) ven mermada progresivamente su eficacia a la hora de impedir el flujo de corriente eléctrica (Figura 3B). El instrumento xCELLigence detecta cambios mínimos, indetectables por microscopía, como la pérdida de fuerza de adhesión de la superficie celular. Al medir estos cambios de forma continua, el instrumento xCELLigence realiza un seguimiento de los ECP virales con un nivel de detalle sin precedentes, y proporciona una cinética cuantitativa que puede utilizarse en numerosas aplicaciones.

**A Flujo de trabajo**



**B Vista lateral del mismo pocillo en dos momentos diferentes**



**Antes de la infección**

- Gran parte del área superficial del biosensor cubierta de células
- Interacción fuerte entre las células y los biosensores
- Impedancia eléctrica elevada

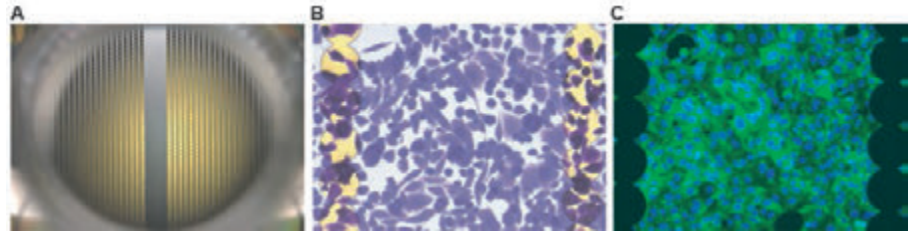
**Después de la infección**

- Pequeña parte del área superficial del biosensor cubierta de células
- Interacción débil entre las células y los biosensores
- Impedancia eléctrica baja

**Figura 3.** Uso de un instrumento Agilent xCELLigence para monitorizar ECP virales en tiempo real. (A) Flujo de trabajo sencillo para monitorizar ECP virales. Una vez que las células estén infectadas, no se requerirá más tiempo de intervención: la adquisición de datos está automatizada y es continua. (B) Los biosensores de oro monitorizan en tiempo real los cambios producidos por el virus en lo relativo al número de células y su tamaño, la calidad de la unión célula-sustrato y la adhesión entre células.

## E-Plates

En contraste con el ejemplo simplificado de la Figura 3, los biosensores de oro de las Agilent E-Plates están dispuestos como un microarray interdigitado que cubre aproximadamente el 75 % del área superficial del fondo de cada pocillo. Esto permite analizar miles de células en masa, lo que proporciona una sensibilidad excelente a los cambios en tiempo real, del estado y el comportamiento de las células.



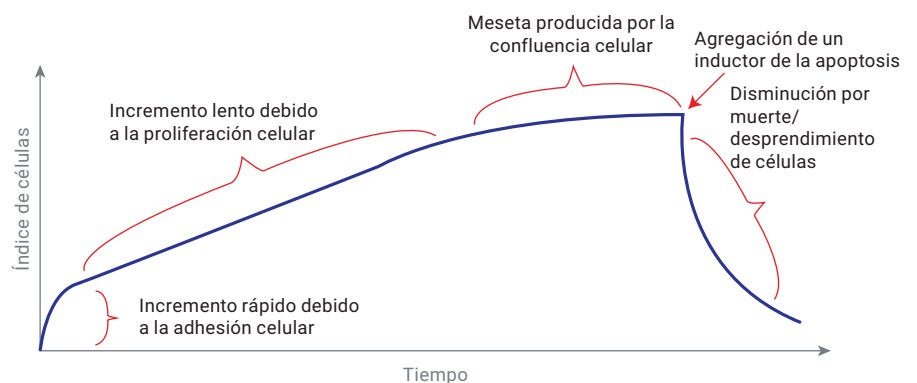
**Figura 4.** Biosensores de impedancia de las Agilent E-Plates. (A) Fotografía de un pocillo individual de una E-Plate. Aunque las células pueden observarse en las superficies de los biosensores de oro, la región sin electrodos del centro del pocillo facilita la adquisición de imágenes microscópicas. (B) Vista ampliada de los biosensores de oro y las células humanas con tinción con cristal violeta, como muestra la microscopía con epi-iluminación. (C) Microscopía de inmunofluorescencia en la que aparece la silueta de los biosensores de oro.

## Explicación del trazado de impedancia en tiempo real

La impedancia eléctrica generada por las células adheridas se registra usando un parámetro adimensional denominado índice de células (IC), donde:

$$IC = \frac{(\text{Impedancia en } n) - (\text{Impedancia sin células})}{(\text{Constante nominal de impedancia})}$$


La Figura 5 proporciona un ejemplo genérico de un trazado de impedancia en tiempo real a lo largo del proceso de preparación y ejecución de un ensayo de ECP virales. Durante las primeras horas después de la agregación de células en un pocillo, se produce un rápido aumento de la impedancia debido a la adhesión y la propagación de las células. Si las células son subconfluentes después de la etapa inicial de adhesión, empezarán a proliferar y a generar un incremento gradual y constante del IC. Cuando las células alcancen la confluencia, el valor del IC formará una meseta, ya que toda el área superficial del biosensor se habrá saturado. La infección con un virus causante de ECP provocará posteriormente una reducción constante del IC. Una caída del IC hasta volver a cero indicará la lisis o el desprendimiento total de las células diana. Esta correlación entre la señal de impedancia y la presencia/el estado de las células de los biosensores puede confirmarse fácilmente mediante microscopía.



**Figura 5.** Trazado genérico de impedancia en tiempo real para la preparación y la ejecución de un ensayo de ECP virales. Cada fase del trazado de impedancia y el comportamiento celular se explica en el texto.

## Instrumentos xCELLigence

Los nueve instrumentos xCELLigence diferentes que existen emplean la monitorización no invasiva de la impedancia eléctrica para hacer un seguimiento del estado y el comportamiento de las células, tal como se ha descrito en las dos páginas anteriores. La tabla siguiente muestra los cuatro instrumentos xCELLigence más adecuados para el desarrollo de vacunas y los estudios virológicos generales. Además de presentar diferencias respecto al formato y la productividad de las placas, algunos de los instrumentos incluyen funciones especializadas, como la capacidad de monitorizar la invasión y la migración de células.



	Propósito doble (DP)	Una sola placa (SP)	Varias placas (MP)	Alta productividad (HT)	eSight
Formato	3 × 16 pocillos	1 × 96 pocillos	6 × 96 pocillos	1 × 384 pocillos	3 × 96 pocillos (impedancia) 5 × 96 pocillos (adquisición de imágenes)
Productividad máxima	48 pocillos	96 pocillos	576 pocillos	Hasta 4 × 382 pocillos (1.536 pocillos en total)	288 pocillos (impedancia); hasta 480 pocillos en total para adquisición de imágenes

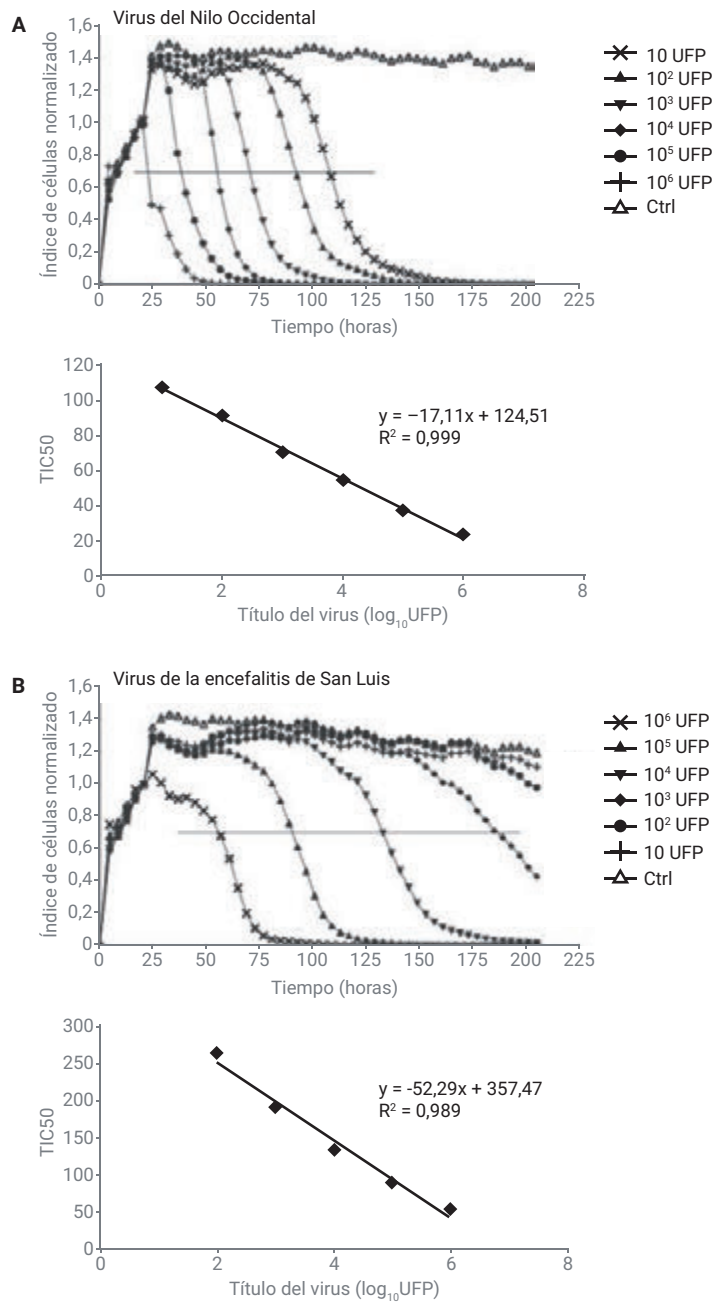


**Figura 6.** Análisis celular en tiempo real directamente dentro de una incubadora. Colocados en el interior de una incubadora estándar de cultivos de tejido o una cámara de hipoxia, los instrumentos Agilent xCELLigence son compatibles con todo el rango biológicamente relevante de temperaturas, composiciones ambientales y humedades.

# Aplicaciones

Dado que los ensayos tradicionales de ECP/placas utilizados para la cuantificación de títulos virales son laboriosos y requieren una gran cantidad de tiempo, Reisen y colaboradores evaluaron la eficacia del ensayo xCELLigence RTCA para la determinación de títulos del virus del Nilo Occidental (VNO) y el virus de la encefalitis de San Luis (VESL)<sup>1</sup>. Para ello, se incubaron células Vero en suspensión con diluciones en serie de una concentración conocida de VNO o VESL durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió inmediatamente la suspensión de células/virus a los pocillos de la E-Plate y se llevó a cabo la monitorización posterior de la impedancia en un instrumento xCELLigence. A diferencia de las células de control sin infectar, que crecieron hasta alcanzar la confluencia y mantuvieron un IC con una meseta, las células infectadas por los virus mostraron una reducción del IC dependiente del tiempo hasta cero, lo que indica la lisis celular completa (gráficos superiores de las Figuras 7A y 7B). De forma coherente con la actividad citolítica conocida del VNO y el VESL, el ensayo xCELLigence muestra que los ECP aparecen de forma más temprana y progresan con mayor rapidez para el VNO.

Para el VNO y el VESL, el momento en el que se produjeron los efectos citopáticos presenta una correlación con el título conocido del virus en cuestión. Esto quedó patente al representar el TIC50 (tiempo necesario para que el IC disminuya un 50 %) en función del título del virus (gráficos inferiores de las Figuras 7A y 7B). Mediante el uso de este tipo de curva patrón, fue posible determinar el título del virus en muestras de concentración desconocida. Además de caracterizar soluciones madre virales utilizadas para fines relacionados con la investigación o las vacunas, este planteamiento puede aplicarse en el laboratorio para cuantificar la carga de un virus específico antes, durante y después de la exposición.



**Figura 7.** Uso del ensayo Agilent xCELLigence RTCA para determinar títulos de virus. (A) Gráfico superior: monitorización en tiempo real de los efectos citopáticos producidos por el VNO en células Vero. El índice de células normalizado corresponde a los pocillos de la E-Plate que fueron inoculados con un control negativo (Ctrl) o distintos números de unidades formadoras de placas (UFP) del VNO. Cada curva representa la media de los pocillos de dos réplicas individuales. La línea horizontal indica el punto en el cual el IC disminuyó hasta el 50 % de su valor inicial (antes de la agregación del virus). El tiempo necesario para alcanzar este punto se denomina TIC50. Gráfico inferior: al representar el TIC50 en función del título del virus, se obtuvo una curva patrón que puede utilizarse para determinar la concentración viral en diversos tipos de muestras. (B) Monitorización en tiempo real de los efectos citopáticos producidos por el VESL en células Vero. Los detalles del experimento y el procesamiento de datos son similares a los de la parte (A).

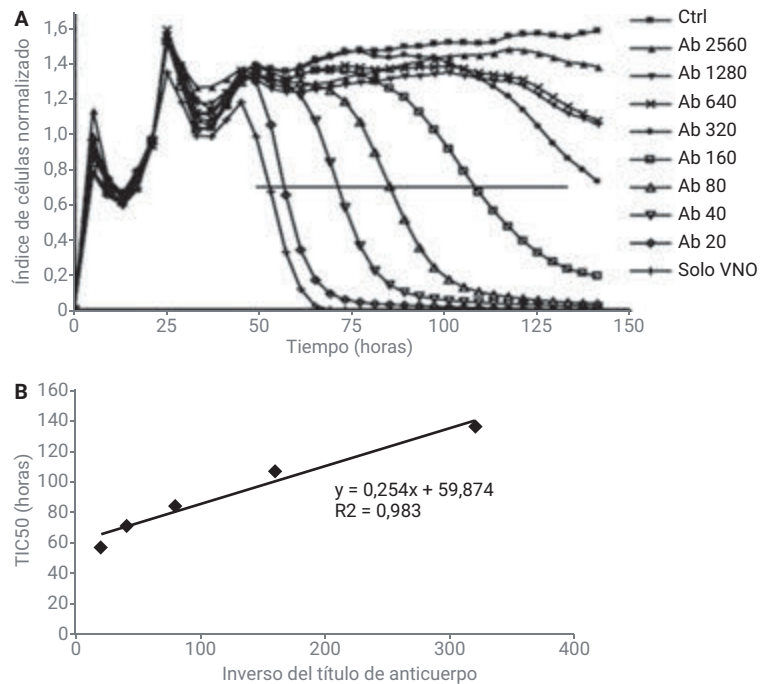
Figura reimpressa de *Journal of Virological Methods*, volumen 173 (2), Fang, Y. et al., "Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology", páginas 251-8. Copyright 2011, con autorización de Elsevier.

Referencias: uso del  
instrumento xCELLigence  
para la determinación de  
títulos de virus

1. Fang, Y. *et al.* Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods.* Mayo de **2011**, 173 (2), 251-8.
2. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8 de octubre de **2010**, 401 (1), 37-41.
3. Charretier, C. *et al.* Robust Real-Time Cell Analysis Method for Determining Viral Infectious Titers During Development of a Viral Vaccine Production Process. *J. Virol. Methods.* 14 de noviembre de **2017**, 252, 57-64.

## Detección y cuantificación de anticuerpos neutralizantes

La función del instrumento xCELLigence que permite hacer un seguimiento en tiempo real de los ECP producidos por virus puede utilizarse para detectar y cuantificar anticuerpos neutralizantes. El principio del ensayo es similar al de un ensayo estándar de neutralización por reducción de placas; sin embargo, la adquisición de datos automatizada del instrumento xCELLigence reduce drásticamente el tiempo de intervención y elimina la subjetividad del análisis de datos. Los dos ejemplos presentados en la Figura 8 demuestran la utilidad de este planteamiento para las aplicaciones de investigación.



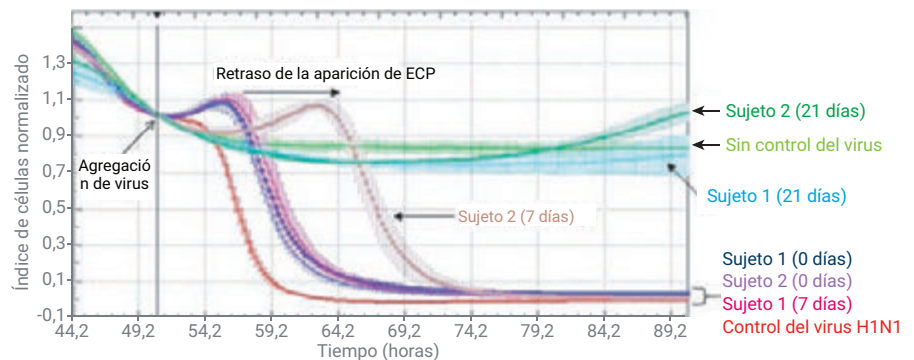
**Figura 8.** Cuantificación del título de anticuerpo neutralizante del VNO mediante el ensayo Agilent xCELLigence RTCA. (A) Se inocularon en células Vero 10<sup>6</sup> UFP de VNO que habían sido preincubadas con distintas diluciones de anticuerpo neutralizante. Ctrl = células Vero en las que no se inoculó el virus; Solo VNO = células Vero en las que se inoculó el virus sin exposición previa al anticuerpo. La línea horizontal indica el punto en el cual el índice de células disminuyó hasta el 50 % de su valor inicial (es decir, antes de la agregación del virus). El tiempo necesario para alcanzar este punto se denomina TIC50. (B) Al representar el TIC50 en función del inverso del título del anticuerpo, se obtuvo una curva patrón que puede utilizarse para evaluar la concentración de anticuerpo en suero de aves silvestres.

Figura reimpressa de *Journal of Virological Methods*, volumen 173 (2), Fang, Y. et al., "Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology", páginas 251-8. Copyright 2011, con autorización de Elsevier.

Después de cultivar células Vero hasta alcanzar la confluencia en pocillos de una E-Plate, Fang y colaboradores inocularon en cada pocillo 10<sup>6</sup> unidades formadoras de placas (UFP) de VNO que habían sido preincubadas con un anticuerpo neutralizante de concentración conocida diluido en serie<sup>1</sup>. Tal como se observa en la Figura 8A, el anticuerpo neutralizante retrasó la aparición de ECP producidos por el VNO, de tal forma que existe una dependencia directa respecto a la concentración de anticuerpo. Al representar el TIC50 (tiempo necesario para que el IC disminuya un 50 %) en función del inverso del título de anticuerpo, se obtuvo una curva patrón (Figura 8B). Esta curva podría utilizarse para cuantificar la cantidad de anticuerpo neutralizante presente en ejemplares de aves. El uso de esta curva patrón obtenida mediante el instrumento xCELLigence para determinar concentraciones de anticuerpo en aves silvestres infectadas arrojó valores correlacionados con aquellos determinados mediante un ensayo tradicional de neutralización por reducción de placas<sup>1</sup>.

De forma similar al método para el VNO, se usó el instrumento xCELLigence para cuantificar la cantidad de anticuerpo neutralizante frente al virus de la gripe A H1N1 presente en suero humano (Figura 9). Se inoculó virus H1N1 purificado (pretratado o no con suero del sujeto) en células confluentes en pocillos de E-Plate. Estas muestras de suero se recogieron antes de la vacunación y 7 o 21 días después de la vacunación, para hacer un seguimiento de la aparición de la respuesta neutralizante específica para el virus H1N1 a lo largo del tiempo. Según lo previsto, la robustez de la actividad del anticuerpo neutralizante del virus H1N1 aumentó progresivamente durante los primeros 21 días posteriores a la vacunación, lo que queda patente por el retraso en la aparición o el bloqueo completo de los efectos citopáticos.

Gracias a su flujo de trabajo sencillo y automatizado, así como a las lecturas objetivas y cuantitativas, el instrumento xCELLigence ofrece ventajas evidentes respecto a los ensayos tradicionales para la detección y la cuantificación de anticuerpos neutralizantes. Este planteamiento proporciona un método sencillo para monitorizar la eficacia de la vacunación y elucidar la cinética de aparición de resistencia al virus.



**Figura 9.** Medición con el instrumento Agilent xCELLigence de la actividad del anticuerpo neutralizante en sujetos vacunados frente al virus H1N1. Se recogieron muestras de suero de dos sujetos antes de la vacunación (día 0) y 7 y 21 días después de la vacunación. Estas muestras de suero se incubaron con virus H1N1 purificado antes de añadir la mezcla de virus y suero a las células cultivadas en una Agilent E-Plate. Para ambos sujetos, el suero del día 0 (curvas violeta y azul) no proporciona ninguna protección, y el virus destruye las células con una cinética similar a la del control positivo (curva roja). Para el sujeto 2, el suero del día 7 mostró un retraso significativo de los ECP producidos por el virus H1N1 (curva marrón), lo que indica la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus H1N1. Por el contrario, para el sujeto 1, el suero del día 7 no mostró ningún efecto profiláctico (curva rosa), lo que indica que aún no existía actividad de los anticuerpos neutralizantes del virus H1N1. Sin embargo, 21 días después de la vacunación, el suero de ambos sujetos mostró una actividad robusta de los anticuerpos neutralizantes frente al virus H1N1, lo que hizo que el virus fuera completamente incapaz de producir efectos citopáticos (curvas de color verde oscuro y aguamarina). Este ensayo posibilita evaluar cuantitativamente la eficacia de una vacuna concreta, así como la cinética de la aparición de resistencia frente al virus.

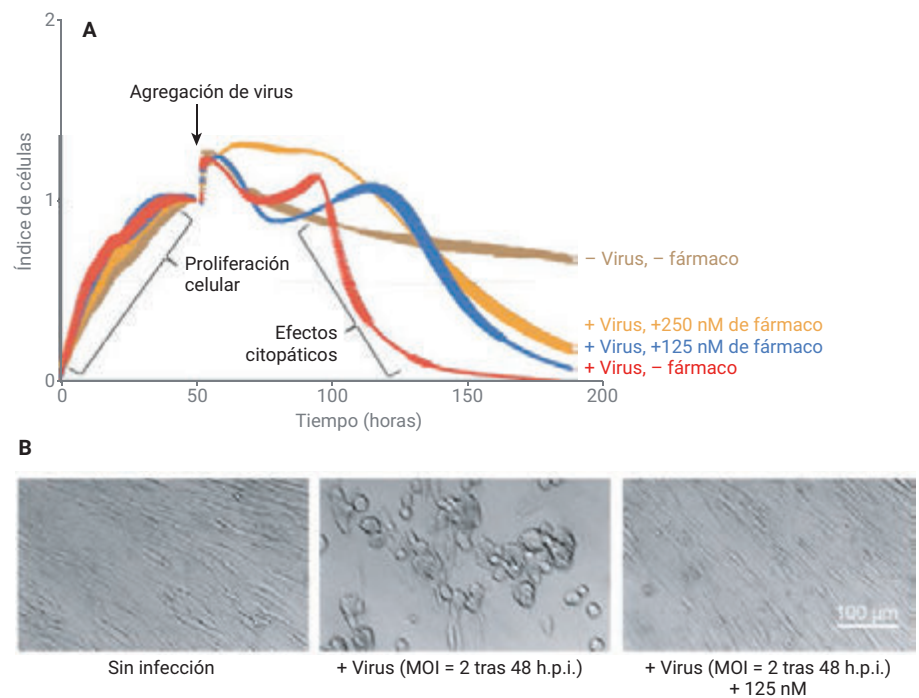
Figura adaptada de *Asia Pacific Biotech News*, volumen 14 (10), Lu, H. et al., "Label-free Real-time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success", páginas 31-32. Copyright 2010, con autorización de Asia Pacific Biotech News.

Referencias: uso del  
instrumento xCELLigence  
para detectar y cuantificar  
anticuerpos neutralizantes

1. Fang, Y. *et al.* Real-time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods.* Mayo de **2011**, 173 (2), 251-8.
2. Label-free Real-time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success. *Asia Pacific Biotech News.* **2010**, 14 (10), 31-32.
3. Teng, Z. *et al.* Real-Time Cell Analysis – a New Method for Dynamic, Quantitative Measurement of Infectious Viruses and Antiserum Neutralizing Activity. *J. Virol. Methods.* Noviembre de **2013**, 193 (2), 364-70.
4. Kashima, K. *et al.* Inhibition of Metastasis of Rhabdomyosarcoma by a Novel Neutralizing Antibody to CXCR4 Chemokine Receptor-4. *Cancer Sci.* Octubre de **2014**, 105 (10), 1343-50.
5. Tian, D. *et al.* Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *PLoS One.* **2012**, 7 (2), e31965.

## Estudio de fármacos antivirales

El instrumento xCELLigence es una herramienta excelente para identificar y caracterizar fármacos que inhiben cualquier aspecto del ciclo de vida de los virus, ya que la monitorización de la impedancia en tiempo real es sensible a los efectos citopáticos producidos por el virus. En un ejemplo, Urs Greber y colaboradores se fijaron como objetivo identificar un fármaco que pudiera atenuar los efectos de los adenovirus en sujetos ya infectados con ellos. Su ensayo de cribado consistió en cultivar células HeLa hasta alcanzar la confluencia y, a continuación, inocular adenovirus humano en presencia de distintos candidatos a fármacos. El más eficaz de entre todos ellos fue el flavopiridol, un compuesto flavonoide semisintético que se sabe que inhibe la cinasa Cdk9 asociada al ciclo celular. Como se muestra en la Figura 10A, en ausencia de fármacos, la infección por adenovirus produjo ECP robustos, lo que queda patente por la reducción de la señal de impedancia hasta cero (curva roja). Sin embargo, de una manera dependiente de la dosis, el flavopiridol fue capaz de retrasar sensiblemente la aparición de ECP (curvas azul y naranja). Estos hallazgos basados en la impedancia se corroboraron mediante un análisis microscópico (Figura 10B).

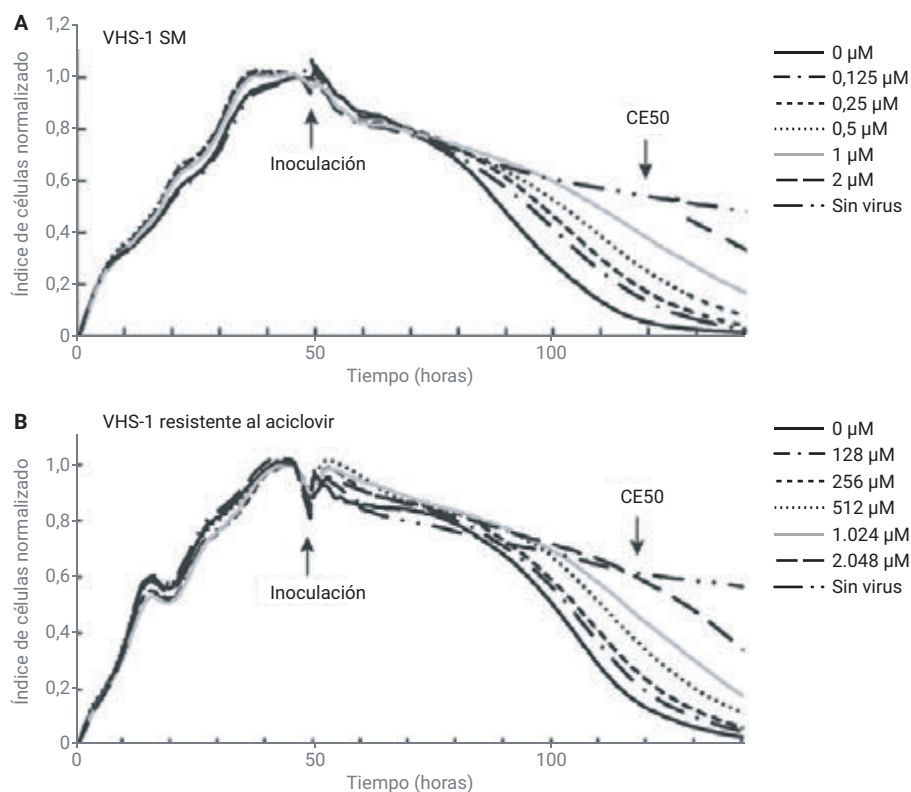


**Figura 10.** Monitorización de la actividad antiviral del flavopiridol. (A) Se cultivaron células HeLa en una Agilent E-Plate hasta alcanzar el punto de confluencia. Alrededor de 50 horas después de la siembra, se inoculó la cepa C5 de adenovirus en las células en presencia de diferentes concentraciones de flavopiridol. (B) El flavopiridol ofrece una amplia protección frente a los adenovirus. En este caso, se inoculó la cepa D37 de adenovirus humano en fibroblastos pulmonares WI38 y, cuatro horas después, se añadió o no flavopiridol. Una vez transcurridas 48 horas desde la inoculación, se observó claramente que el fármaco impidió que se produjeran efectos citopáticos.

Figura adaptada con autorización de ACS *Infectious Diseases*, volumen 3 (6), Prasad, V. et al., "Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses", páginas 398-405. Copyright 2017, American Chemical Society.

En un segundo ejemplo, Guy Boivin y colaboradores analizaron la sensibilidad del virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) sin mutaciones (SM) y mutante frente a un antiviral: el aciclovir. Después de cultivar células Vero hasta alcanzar la confluencia en E-Plates, se inoculó virus en ellas durante 90 minutos antes de añadir diferentes concentraciones del fármaco. Los ECP producidos por los virus sin mutaciones y mutante pudieron bloquearse usando aciclovir; sin embargo, se requirió una concentración de fármaco mucho mayor para bloquear la cepa mutante que la cepa sin mutaciones (Figura 11).

Al representar el valor del IC en un momento dado en función de la concentración de fármaco, se obtuvieron curvas de relación dosis-respuesta (los datos no se muestran aquí) con unos valores de CE50 de 100  $\mu\text{M}$  y 0,8  $\mu\text{M}$  para los virus mutante y sin mutaciones, respectivamente. Estos hallazgos fueron coherentes con el hecho de que esta cepa mutante específica del virus presenta una mutación en su ADN polimerasa, que es la diana del aciclovir.



**Figura 11.** Comparación de la sensibilidad al aciclovir de los virus VHS-1 sin mutaciones y mutante. Se cultivaron células Vero en una Agilent E-Plate hasta alcanzar el punto de confluencia. Una vez transcurridas 48 horas desde la siembra, se inoculó virus VHS-1 sin mutaciones o mutante en las células y se dejó actuar durante 90 minutos. Después, se añadieron diferentes concentraciones de aciclovir y se monitorizó la impedancia cada 30 minutos durante otras 100 horas. Cabe reseñar que fue necesario usar concentraciones mucho más elevadas del fármaco para evitar efectos citopáticos en el caso del virus mutante.

Datos adaptados de *Journal of Clinical Microbiology*, volumen 54 (8), Piret, J. et al., "Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus". Copyright 2016, con autorización de la American Society for Microbiology.

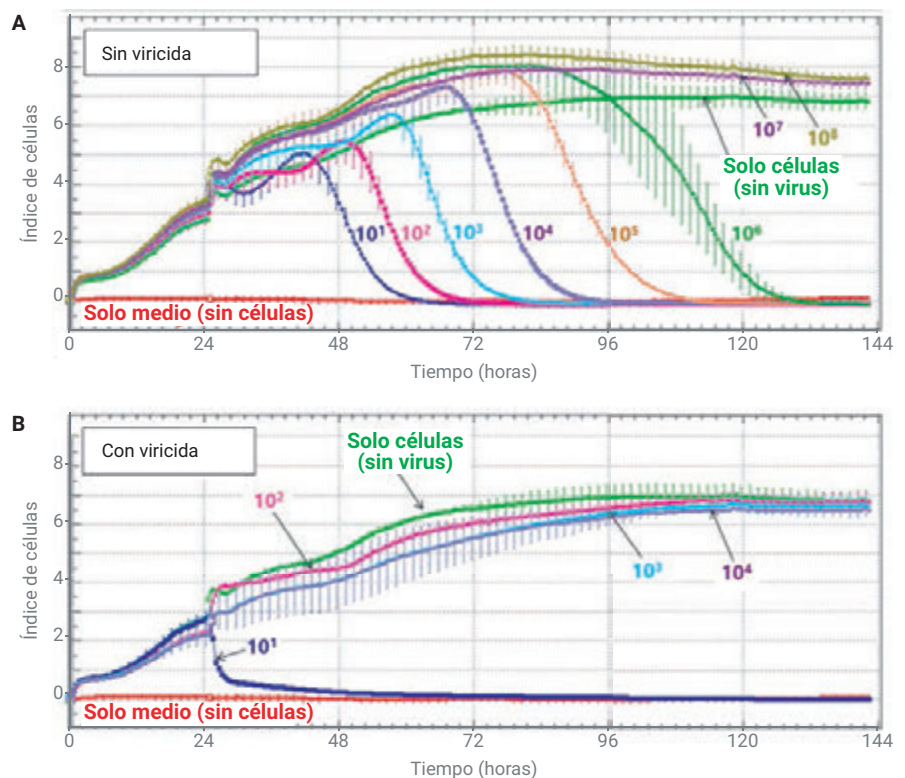
Referencias: uso del  
instrumento xCELLigence  
para el cribado de fármacos  
antivirales

1. Watterson, D. *et al.* A Generic Screening Platform For Inhibitors of Virus Induced Cell Fusion Using Cellular Electrical Impedance. *Sci. Rep.* 15 de marzo de **2016**, *6*, 22791.
2. Zandi, K. A Real-Time Cell Analyzing Assay for Identification of Novel Antiviral Compounds against Chikungunya Virus. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1426*, 255-62.
3. Sharma, B. N. *et al.* Antiviral Effects of Artesunate on Polyomavirus BK Replication in Primary Human Kidney Cell. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (1), 279-89.
4. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8 de octubre de **2010**, *401* (1), 37-41.
5. Piret, J. *et al.* Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* Agosto de **2016**, *54* (8), 2120-7.
6. Cymerys, J. *et al.* Primary Cultures of Murine Neurons for Studying Herpes Simplex Virus 1 Infection and Its Inhibition by Antivirals. *Acta Virol.* **2013**, *57* (3), 339-45.
7. Prasad, V. *et al.* Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses. *ACS Infect. Dis.* 9 de junio de **2017**, *3* (6), 398-405.

## Ensayo de viricidas

Los viricidas evitan las infecciones mediante la desactivación inespecífica de los virus presentes en superficies sólidas (por ejemplo, encimeras) o disoluciones. Esto contrasta con los fármacos antivirales, que atenúan la infección mediante la inhibición específica de proteínas virales críticas. El uso de viricidas es extremadamente habitual, sobre todo en entornos agropecuarios, veterinarios y hospitalarios. Para comprobar la eficacia de una formulación viricida existente frente a un determinado virus y la identificación de nuevos viricidas se suele recurrir a un ensayo de ECP producidos por virus (por lo general, un ensayo de placas).

E. H. Venter y colaboradores evaluaron el ensayo de ECP xCELLigence como nuevo método para comprobar la eficacia de los viricidas. Tal como reseñaron: "Un problema importante de los ensayos de eficacia de viricidas basados en los protocolos actuales es que la valoración de los efectos citopáticos producidos por los virus depende de la interpretación visual subjetiva mediante microscopía óptica". Un desinfectante/viricida comercial se incubó con virus de la bursitis infecciosa (VBI) durante 20 minutos. Después, el virus se sometió a diluciones en serie y estas se añadieron a células Vero confluentes en E-Plates. El virus sin tratar provocó efectos citopáticos, y el momento de aparición de los ECP dependió del factor de dilución del virus (cuanto mayor fue la dilución, más tiempo tardó en producirse la destrucción de las células, tal como se muestra en la Figura 12A). Sin embargo, el pretratamiento del VBI con viricida redujo sensiblemente la capacidad de infección. Una dilución 1:10 del virus consiguió producir ECP; sin embargo, con diluciones iguales o superiores a 1:100, el virus no provocó efectos en las células Vero (Figura 12B).



**Figura 12.** Protección de las células Vero frente al VBI mediante un viricida. Se inocularon en células Vero diluciones en serie del VBI sin pretratamiento con viricida (A) o con pretratamiento con viricida (B). Tras la exposición al viricida, únicamente la solución más concentrada del virus fue capaz de producir efectos citopáticos. Las concentraciones del virus se representan como múltiplos de dilución (es decir,  $10^1$  = dilución 1:10,  $10^2$  = dilución 1:100, etc.).

Reimpreso de *Journal of Virological Methods*, volumen 199, Ebersohn, K. et al., "An Improved Method for Determining Virucidal Efficacy of a Chemical Disinfectant Using an Electrical Impedance Assay", páginas 25-28. Copyright 2014, con autorización de Elsevier.

**Nota:** Es probable que la rápida eliminación observada para la dilución 1:10 del virus tratado con viricida se deba al efecto combinado de la acción de los viriones activos y el viricida residual sobre las células diana, lo que indica que, a altas concentraciones, el viricida es tóxico para las células Vero.

Tomando como base los datos anteriores, los autores concluyeron lo siguiente: "Aunque en el ensayo modificado [del viricida] con el sistema xCELLigence se obtuvieron resultados idénticos a los del ensayo tradicional [del viricida], el sistema permite medir la eficacia y la citotoxicidad del viricida de forma más precisa y reproducible".

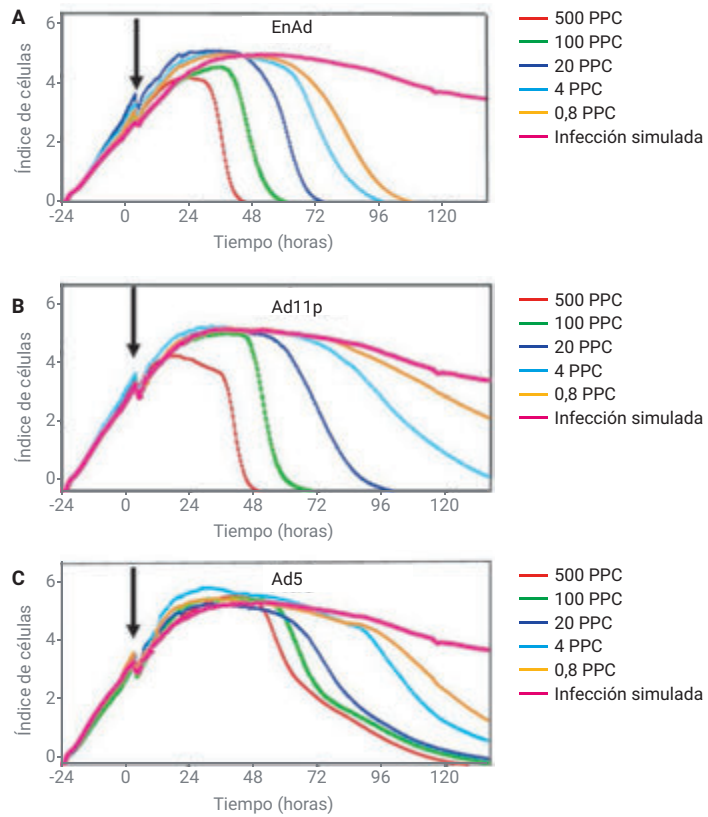
1. Ebersohn, K.; Coetzee, P.; Venter, E. H. An Improved Method for Determining Virucidal Efficacy of a Chemical Disinfectant Using an Electrical Impedance Assay. *J. Virol. Methods*. Abril de **2014**, *199*, 25-8.

## Virus oncolíticos

La viroterapia oncolítica es una prometedora opción de tratamiento del cáncer en la que se utiliza un virus capaz de reproducirse para infectar y eliminar de forma selectiva las células cancerosas. Aunque este planteamiento permite utilizar virus sin mutaciones, se está realizando una importante labor de investigación con virus diseñados genéticamente para incrementar la especificidad o la eficacia. Un ejemplo de esto es el diseño de un adenovirus oncolítico para expresar una forma segregada de un acoplador biespecífico de linfocitos T para enviar linfocitos T citotóxicos a células cancerosas residuales<sup>1</sup>.

Gracias a la capacidad de monitorizar la destrucción de células cancerosas de forma continua y con alta sensibilidad, los instrumentos xCELLigence son herramientas eficientes para la evaluación cuantitativa de la eficacia de los virus oncolíticos en solitario o combinados con otros tipos de tratamiento.

En la Figura 13, se usó un instrumento xCELLigence para monitorizar la destrucción de células cancerosas pulmonares A549 mediante un adenovirus quimérico (enadenotucirev, o EnAd), que infecta las células uniéndose a la desmogleína o el receptor CD46 (ambos se expresan en diversos carcinomas). En un análisis de potencia, la citotoxicidad (cinética de destrucción) del EnAd con un determinado rango de concentración se comparó con la de los adenovirus Ad11p y Ad5 sin mutaciones. Con la concentración máxima (línea roja; 500 partículas por célula (PPC)), tanto el EnAd como el Ad11p provocaron la destrucción completa de las células (reducción del IC hasta cero) entre 36 y 48 horas después de la inoculación. Sin embargo, con concentraciones virales más bajas (0,8-20 PPC), la potencia del EnAd fue sensiblemente mayor que la del Ad11p, mostrando un inicio más temprano de la citotoxicidad y una obtención más rápida de la citólisis. En una comparación con el EnAd y el Ad11p, el virus Ad5 sin mutaciones ofreció una eficiencia mucho menor a la hora de destruir las células cancerosas, ya que fueron necesarios cinco días para conseguir la destrucción completa de las células, incluso con la concentración viral máxima. En conjunto, estos datos destacan la capacidad de los ensayos xCELLigence para detectar cuantitativamente diferencias de potencia entre distintos virus oncolíticos.



**Figura 13.** Destrucción de células cancerosas pulmonares A549 mediante diferentes adenovirus. Las flechas negras indican el momento en el que se agregó el virus. Las concentraciones virales se expresan como PPC.

Figura adaptada de *Molecular Therapy Oncolytics*, volumen 10 (4), Dyer, A. et al., "Oncolytic Group B Adenovirus Enadenotucirev Mediates Non-Apoptotic Cell Death with Membrane Disruption and Release of Inflammatory Mediators", páginas 18-30. Este elemento se ha elaborado bajo licencia conforme a la licencia Reconocimiento 4.0 Internacional de Creative Commons.

Para consultar una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> o envíe una carta a Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042 (EE. UU.).

Referencias: uso del  
instrumento xCELLigence  
para el estudio de virus  
oncolíticos

1. Freedman, J. D. *et al.* Oncolytic Adenovirus Expressing Bispecific Antibody Targets T-Cell Cytotoxicity in Cancer Biopsies. *EMBO Mol. Med.* Agosto de **2017**, 9 (8), 1067-1087.
2. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* 15 de abril de **2017**, 77 (8), 2052-2063.
3. Dyer, A. *et al.* Oncolytic Group B Adenovirus Enadenotucirev Mediates Non-Apoptotic Cell Death with Membrane Disruption and Release of Inflammatory Mediators. *Mol. Ther. Oncolytics.* 10 de diciembre de **2016**, 4, 18-30.
4. Ellerhoff, T. P. *et al.* Novel Epi-Virotherapeutic Treatment of Pancreatic Cancer Combining the Oral Histone Deacetylase Inhibitor Resminostat with Oncolytic Measles Vaccine Virus. *Int. J. Oncol.* Noviembre de **2016**, 49 (5), 1931-1944.
5. Lacroix, J. *et al.* Oncolytic Effects of Parvovirus H-1 in Medulloblastoma are Associated With Repression of Master Regulators of Early Neurogenesis. *Int. J. Cancer.* 1 de febrero de **2014**, 134 (3), 703-16.
6. El-Andaloussi, N. *et al.* Generation of an Adenovirus-Parvovirus Chimera with Enhanced Oncolytic Potential. *J. Virol.* Octubre de **2012**, 86 (19), 10418-31.
7. Fecker, L. F. *et al.* Efficient and Selective Tumor Cell Lysis and Induction of Apoptosis in Melanoma Cells by a Conditional Replication-Competent CD95L Adenovirus. *Exp. Dermatol.* Agosto de **2010**, 19 (8), e56-66.

## Caracterización de la calidad/aptitud de los virus

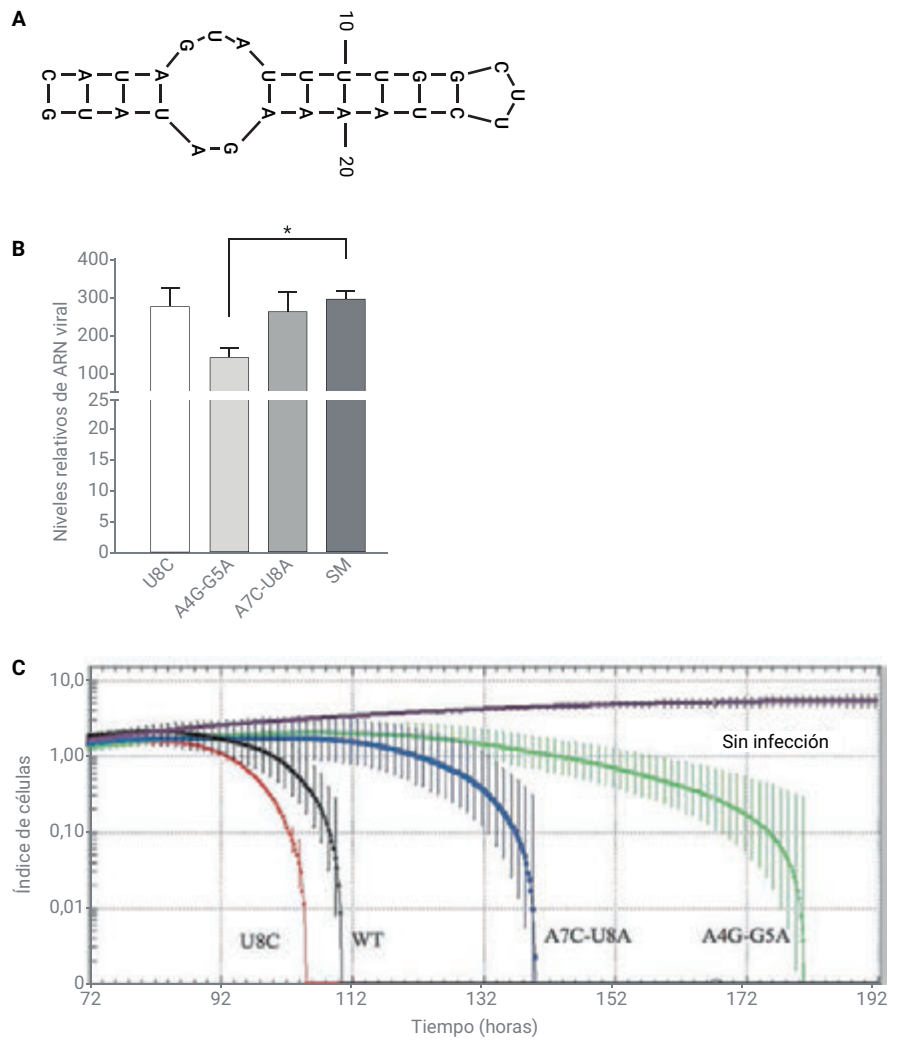
A la hora de evaluar el grado de atenuación de una vacuna elaborada con virus vivos mediante la comparación de las propiedades citolíticas de dos colonias aisladas en campos diferentes o el estudio de la capacidad funcional de un gen viral, las comparaciones de aptitud resultan esenciales tanto para el desarrollo de vacunas como para la investigación virológica básica. Aunque la definición de "aptitud" puede variar en función del contexto, a menudo se refiere a la eficiencia con la que un virus puede recorrer todo su ciclo de vida; esto abarca todas las etapas, desde la unión inicial a los receptores de la superficie de la célula hasta la replicación del genoma, la formación de la cápside y la liberación de los virus descendientes de la célula para iniciar un nuevo ciclo de infección. Los ensayos basados en el uso del instrumento xCELLigence resultan idóneos para los estudios de aptitud de los virus, ya que pueden detectar cambios en la célula anfitriona a lo largo de la duración íntegra de los ECP producidos por un virus y hacer un seguimiento de dichos cambios en tiempo real.

El virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV) tiene un genoma de ARN de hebra negativa que contiene una secuencia bien conservada de nucleótidos en el extremo 3'. La previsión era que esto diera lugar a una estructura de horquilla (Figura 14A). Øystein Evensen y colaboradores buscaban comprender si esta secuencia afectaría a la replicación del VSHV y a su transcripción en células epiteliales de pez. Usando un panel de mutantes del VSHV, se cuantificaron los niveles totales de ARN de hebra positiva mediante qPCR dos días después de la inoculación. La Figura 14B muestra que, mientras que los mutantes U8C y A7C-U8A no produjeron un efecto detectable en los niveles de ARN viral de hebra positiva, el mutante A4G-G5A redujo sensiblemente los niveles de ARN viral. A continuación, se usó el instrumento xCELLigence para evaluar la aptitud relativa de los diferentes mutantes (Figura 14C; el virus se añadió a las células después de 72 horas). De forma coherente con la reducción de los niveles de ARN, el mutante A4G-G5A (curva verde) necesitó un tiempo mucho mayor que el virus sin mutaciones (curva negra) para destruir por completo las células diana.

Un aspecto interesante es que para el mutante A7C-U8A (curva azul) también se observó un inicio retardado de los ECP, a pesar de que los niveles de ARN fueron equivalentes a los del virus sin mutaciones. Además, el mutante U8C (curva roja) fue en realidad más eficiente que el virus sin mutaciones a la hora de destruir las células diana, a pesar de los niveles de ARN fueron similares en ambos casos.

Este ejemplo del VSHV demuestra que la cuantificación mediante un biomarcador (como el ARN) en un único punto temporal puede resultar engañosa a la hora de evaluar la aptitud viral. También pone de manifiesto la utilidad de un ensayo funcional que permite hacer un seguimiento durante todo el ciclo de vida del virus.

Otro ejemplo de uso del sistema xCELLigence para la evaluación cuantitativa de la aptitud viral es el del virus de la lengua azul, que genera una enfermedad hemorrágica que afecta a los rumiantes silvestres y domésticos (vacas, ovejas y cabras) y tiene importantes consecuencias económicas. El virus de la lengua azul tiene un genoma de ARNbc dispuesto en 10 segmentos lineales diferentes. Debido a la naturaleza de esta arquitectura genómica y al hecho de que varias cepas del virus pueden infectar una célula a la vez, el virus de la lengua azul presenta un reagrupamiento genético sustancial a lo largo del tiempo. Una cuestión importante es cómo afecta este reagrupamiento genético a la citopatogenicidad del virus.

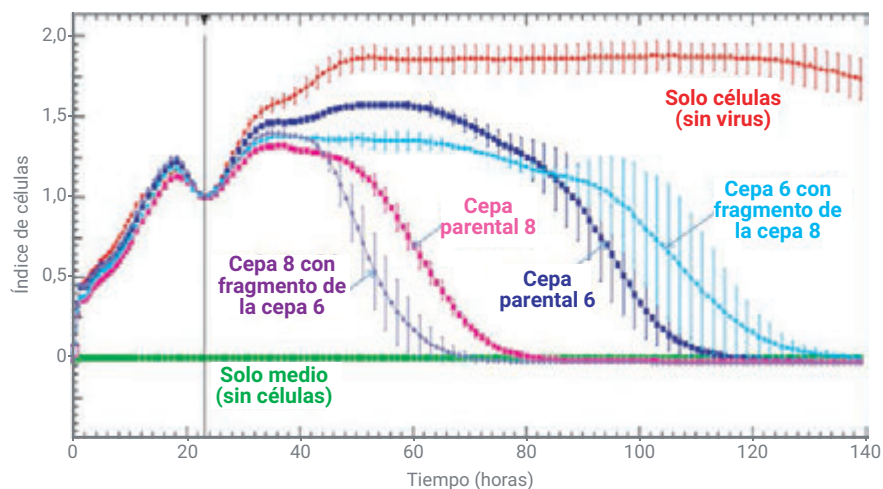


**Figura 14.** La secuencia del extremo 3' del genoma del VSHV influye en la aptitud viral y los niveles de ARN. (A) Estructura secundaria prevista del extremo 3' del genoma del VSHV. (B) Niveles totales de ARN de hebra positiva del VSHV dos horas después de la inoculación. (C) Cuantificación de la aptitud relativa de mutantes del VSHV con el instrumento Agilent xCELLigence.

Figura adaptada de *Virology*, volumen 476, Kim, S. H. *et al.*, "Specific Nucleotides at the 3'-Terminal Promoter of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus are Important for Virulence In Vitro and In Vivo", páginas 226-32. Copyright 2015, con autorización de Elsevier.

Estelle Venter y colaboradores lo investigaron; para ello, generaron variantes del virus en las que la parte principal del genoma se obtuvo a partir de una cepa. También incluyeron un fragmento de otra cepa diferente. Después, el equipo monitorizó en tiempo real la capacidad de destrucción de células Vero de estas cepas reagrupadas. Tal como se observa en la Figura 15, la cepa parental 8 destruyó las células diana de forma mucho más eficiente que la cepa parental 6. La combinación de la cepa 6 con un fragmento de la cepa 8 no mejoró su citopatogenicidad, ya que la cinética de destrucción de esta quimera es más lenta (línea de datos de color azul claro). En cambio, la combinación de la cepa 8 con un fragmento de la cepa 6 generó un virus con una capacidad destructiva superior (línea de datos de color violeta).

La capacidad de hacer un seguimiento preciso de estos fenotipos virales distintos permitió a los autores extraer importantes conclusiones acerca de cómo es probable que se comporte el virus de la lengua azul en la naturaleza. Un aspecto muy importante es que, si se utilizara una cepa viva atenuada del virus de la lengua azul para vacunar animales, podría reagruparse con otras cepas del virus *in vivo* e ir más allá del fenotipo atenuado, generando cargas víricas lo suficientemente altas como para, a pesar de las *buenas intenciones*, producir la enfermedad.



**Figura 15.** El reagrupamiento del genoma del virus de la lengua azul produce diferencias de citopatogenicidad. Se cultivaron células Vero hasta alcanzar el punto de confluencia y, a continuación, se llevó a cabo la inoculación (después de 23 horas) de cepas parentales o cepas con reagrupamiento genético con multiplicidades de infección (MOI) idénticas.

Figura reimpressa de *Veterinary Microbiology*, volumen 171 (1-2), Coetzee, P. et al. "Viral Replication Kinetics and In Vitro Cytopathogenicity of Parental and Reassortant Strains of Bluetongue Virus Serotype 1, 6 and 8", páginas 53-65. Copyright 2014, con autorización de Elsevier.

## Referencias: uso del instrumento xCELLigence para el estudio de virus oncolícticos

1. Sung-Hyun, K. et al. Specific Nucleotides at the 3'-Terminal Promoter of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus are Important for Virulence *In Vitro* and *In Vivo*. *Virology*. Febrero de 2015, 476, 226-32.
2. Coetzee, P. et al. Viral Replication Kinetics and *In Vitro* Cytopathogenicity of Parental and Reassortant Strains of Bluetongue Virus Serotype 1, 6 and 8. *Vet. Microbiol.* 25 de junio de 2014, 171 (1-2), 53-65.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.