

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Pasantía en Universidad de Calgary, Departamento de
Ecosistemas y Salud Pública: Reovirus Aviar en la zona
oeste de Canadá**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Catalina Barboza Solís

**Tutora: Aida J. Chaves Hernández, PhD.
Lectores: Carlos Jiménez Sánchez, PhD.
Martha Piche Ovares, Lic.**

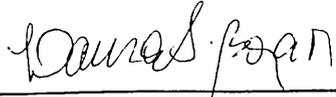
**Campus Presbítero Benjamín Núñez, Heredia
2019**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Rafael Vindas Bolaños, Lic.
Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud



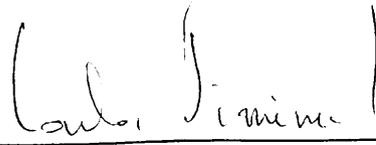
Laura Bouza Mora, MSc.
Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria



Aida Chaves Hernández, PhD.
Tutora



Carlos Jiménez Sánchez, PhD.
Lector



Martha Piche Ovarés, Lic.
Lectora



Fecha:

DEDICATORIA

A mis padres, que son mi fuente de inspiración y quienes siempre me han apoyado para perseguir mis sueños. Por siempre creer en mí y estar a mi lado tanto en los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis compañeros de internado y José por su apoyo incondicional a través de los años, cuyas palabras de aliento me motivaron a siempre ir por más.

A la Dra. Aida Chaves, el Dr. Carlos Jiménez y Martha, por su apoyo y consejo a través de esta experiencia, y por impulsarme a incurrir en esta área de la Medicina Veterinaria.

A Cristina Solís, que fue una ayuda indispensable para lograr esta pasantía. Gracias a la confianza y los consejos que me brindó, este sueño se pudo materializar.

Al Dr. Careem, Víctor Palomino y el grupo de virología de la Universidad de Calgary, que me recibieron con brazos abiertos e hicieron de mi experiencia una inolvidable. Les agradezco profundamente la confianza que depositaron en mí, además de su disposición para ayudarme en todo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2 Justificación.....	2
1.4. Objetivos.....	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1 Lugar	5
2.2 Equipo y Materiales.....	7
2.3 Metodología.....	7
2.3.1 Introducción al laboratorio	7
2.3.2 Extracciones de ARN.....	8
2.3.3 Crio-sección.....	8
2.3.4 Inmunofluorescencia indirecta	8
2.3.5. Centrifugación con Gradiente de densidad	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
3.1 Extracciones de ARN	10
3.2 PCR a tiempo real	12
3.3 Crio-sección.....	12
3.4 Inmunofluorescencia indirecta	13
3.5 Centrifugación con Gradiente de densidad.....	19

4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22
7. ANEXOS.....	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Extracciones de ARN con kit comercial	11
Cuadro 2. Extracciones de ARN en tejidos con TRIzol®	12
Cuadro 3. Resultados de qPCR.	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético #2 realizado por el “Randomized accelerated Maximum Likelihood” (RAxML).	3
Figura 2. Croquis del Foothills Medical Center.	5
Figura 3. Croquis del primer piso del Health Sciences Center.	6
Figura 4. Criostato y bloque con FSC 22 Clear Frozen Section Compound	14
Figura 5. Inmunofluorescencia en lámina de tendón.	15
Figura 6. Área fluorescente de macrófagos en tejido de tendón	16
Figura 7. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de tendón.	16
Figura 8. Área fluorescente de macrófagos en hígado	17
Figura 9. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de hígado.	17
Figura 10. Área fluorescente de macrófagos en almohadilla plantar	18
Figura 11. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de almohadilla plantar.	18
Figura 12. Área fluorescente de macrófagos en bazo	19
Figura 13. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de bazo.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de Varianza

ARN: Ácido ribonucleico

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DICC₅₀: Dosis Infecciona Cultivo Celular 50

HRIC: Health Research Innovation Center

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PIB: Producto interno bruto

RA: Reovirus aviar

RAxML: Randomized accelerated Maximum Likelihood

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

RESUMEN

Este documento comprende el informe de Trabajo Final de Graduación en modalidad de pasantía. Dicho trabajo fue realizado en la Universidad de Calgary, en la ciudad de Calgary, provincia de Alberta, Canadá, específicamente en la Facultad de Medicina Veterinaria, en el Departamento de Ecosistemas y Salud Pública. La pasantía inició el jueves 30 de agosto y finalizó el 14 de diciembre del año 2018, para un total de 608 horas. El objetivo principal fue desarrollar destrezas en diferentes técnicas de investigación en virología utilizando como modelo el reovirus aviar.

La pasantía se dividió en varias etapas: la primera fue una etapa introductoria que permitió la familiarización con el laboratorio de virología a cargo del PhD. Faizal Abdul-Careem, sus normas de seguridad, además de la participación en diferentes charlas con temas de interés en virología, inmunología y la industria aviar. En la segunda etapa se realizó un total de 257 extracciones de ARN por medio de un kit comercial y 182 extracciones de ARN utilizando TRIzol®. En la tercera etapa se entrenó en la técnica de criosección, por medio de la cual se procesó un total de 36 muestras. Las muestras obtenidas luego fueron utilizadas para la detección de macrófagos y linfocitos T CD4+ y CD8+, por medio de la técnica de inmunofluorescencia. Finalmente, se procesaron seis muestras por medio de la ultracentrifugación con gradiente de densidad, que luego serían utilizadas para secuenciación de genoma completo.

ABSTRACT

This document comprises the Final Graduate Work in the internship modality. Said work was performed at the University of Calgary in the city of Alberta, Canada, specifically, in the Veterinary Medicine Faculty in the Department of Ecosystems and Public Health. This internship began the 30th of August and ended the 14th of December of the year 2018, with a total of 608 hours. The main objective was to develop skills in different research techniques using avian reovirus as a model.

The internship was divided in different stages: the first was an introductory stage which allowed the familiarization with the laboratory of virology of the PhD. Faizal Abdul-Careem, its security norms, and participation in different talks with different interest in virology, immunology and the avian industry. In the second stage, a total of 257 RNA extractions where done with a commercial kit and 182 RNA extractions using TRIzol®. In the third stage, cryosection was performed in a total of 36 samples. This samples where then used for the detection of macrophages and lymphocytes T CD4+ and CD8+, by performing immunofluorescent stains. Finally, six samples where processed for ultracentrifugation with density gradient. Later this samples would be used to perform complete genome sequencing.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Reovirus aviar (RA) es un patógeno ubicuo que ha sido clasificado taxonómicamente como miembro de la familia Reoviridae, subfamilia Spinareovirinae, género Orthoreovirus. Su genoma consiste de una doble hebra de ARN, dividida en diez segmentos de genoma (tres grandes, tres medianos y cuatro pequeños) (Palomino-Tapia et al. 2018). Es un virus ampliamente distribuido que afecta a varias especies de aves incluyendo pollos, faisanes, pavos, patos, gansos, palomas, aves psitácidas, entre otras (Lu et al. 2015). El RA se puede hallar en el sistema digestivo y sistema respiratorio de pollos y pavos, clínicamente normales. Sin embargo, se estima que más del 80% de los reovirus aislados en pollos no son patogénicos (Jones 2013).

La enfermedad clínica, en aves de producción, se llega a observar mayoritariamente en pollos de engorde y reproductoras pesadas (Lu et al. 2015). El RA es la causa más frecuente de artritis, y es el agente más frecuentemente aislado en casos de tenosinovitis en pollos de engorde jóvenes, afectando principalmente las articulaciones que más soportan peso (como el corvejón) (Ayalew et al. 2017). En las parvadas afectadas, es usual observar retardo en el crecimiento, baja uniformidad, infecciones secundarias, mortalidad y baja calidad de la carne (Jones 2013; Palomino-Tapia et al. 2018). Los RAs emergentes puede llegar a causar un 20-40% de morbilidad y un 10% de mortalidad en pollos de engorde, lo que resulta en grandes pérdidas económicas (Ayalew et al. 2017).

El reovirus no causa síntomas patognomónicos, y muchas de las lesiones en articulaciones pueden ser similares a las que son causadas por *Mycoplasma synoviae*, staphylococos y otras bacterias. Por ello es necesario hacer la detección del agente en el material colectado de casos sospechosos durante la necropsia (Jones 2013).

El virus es altamente resistente en el ambiente y se puede transmitir tanto, horizontal como verticalmente, lo cual complica su eliminación de las parvadas comerciales. Por ello se ha recurrido al control de la enfermedad mediante la vacunación (Jones 2013). Tradicionalmente se ha utilizado un stock de vacunas vivas modificadas e inactivadas desarrolladas en los finales de los 70s y principios de los 80s (Palomino-Tapia et al. 2018). Las vacunas más utilizadas consisten de derivados de la cepa S1133 que ha demostrado ser bastante eficaz en la mayor parte del mundo. Sin embargo, las cepas de campo han logrado sobrepasar la inmunidad vacunal por medio de mutaciones. Ante lo cual se ha propuesto como alternativa el uso de vacunas autógenas que puede conferir protección ante diferentes serotipos (Jones 2013).

Un plan vacunal típico en gallinas reproductoras pesadas consiste en aplicar al día de edad, una vacuna viva modificada altamente atenuada crecida en cultivo celular, seguido de dos aplicaciones durante la crianza. Además, se utiliza una vacuna en base oleosa inactivada junto con una revacunación con una viva de baja atenuación, de una cepa de RA crecida en huevos embrionados (Palomino-Tapia et al. 2018). Como se mencionó anteriormente, a pesar de los esfuerzos que se hacen para ofrecer protección con estos planes vacunales, la protección ha resultado ser insuficiente debido a la aparición de variantes antigénicas. Es así como en Norteamérica en los últimos cuatro años se ha aislado cepas más virulentas, aún en parvadas consideradas bien vacunadas (Lu et al. 2015; Farkas et al. 2016; Goldenberg et al. 2016; Tang et al. 2016). Por esta razón, los estudios sobre la caracterización molecular de estas nuevas variantes se han intensificado (Palomino-Tapia et al. 2018).

1.2 Justificación

A nivel mundial, la avicultura continúa creciendo e industrializándose. La carne de pollo sigue siendo la principal proteína de origen animal comercializada a nivel global. En el 2000, las exportaciones mundiales ascendían hasta alrededor de 8.79 millones de toneladas de carne de pollo. En el 2014 se reportó que la exportación mundial se duplicó en comparación a los últimos 15 años (Davis 2015). A nivel nacional, la avicultura es una de las actividades más relevantes para la economía, ya que se estima que genera empleo directo para 12500 personas e indirecto para 100000 personas en todo el país. Según el Sistema de información del Sector Agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en el año 2008 la actividad avícola aportaba el 0.56% del producto interno bruto (PIB), un 8.65% del producto agropecuario del país y el 31.8% aproximado del PIB pecuario (SENASA 2015). En Costa Rica el reovirus se asocia a casos de artritis y tenosinovitis con relativa frecuencia. Sin embargo, no existen estudios sobre su prevalencia, ni se han hecho estudios moleculares para caracterizar las cepas.

Con relación a la zona específica donde se realizó la pasantía, en el otoño del 2011 en la zona oeste de Canadá, se detectó un brote de artritis viral a causa de Reovirus en pollos de engorde. Desde entonces la industria ha sufrido gran impacto económico. Durante enero del 2012 a mayo del 2017 un total de 94 casos han sido diagnosticados por Poultry Health Services en Airdie, Alberta. Los casos se presentaron en progenie de reproductoras pesadas vacunadas (Palomino et al. 2018). Así mismo, existen reportes de un aumento de incidencia de reovirus asociado a artritis y tenosinovitis a pesar de la vacunación en otras regiones de Canadá, tales como Saskatchewan. Desafortunadamente, la información está incompleta en cuanto al estatus de RA circulando actualmente en Canadá (Ayalew et al. 2017). En Estados Unidos, específicamente en Pensilvania, las infecciones por reovirus en pollos de engorde y pavos ha aumentado, solamente desde el 2011 hasta el 2014 se dieron 301 casos (Lu et al. 2015).

En relación con la situación de Canadá, un estudio realizado en la Universidad de Calgary, por el laboratorio de PhD. Faizal Abdul-Careem, demostró que las variantes encontradas en las provincias del oeste de Canadá tienen un bajo porcentaje de identidad cuando se comparan con las cepas utilizadas actualmente en vacunas comerciales (Palomino et al. 2018). Por tal motivo se planteó darle continuidad a este estudio por medio del proyecto de doctorado del Msc/DVM. Víctor Palomino Tapia, en el cual se participó como pasante. Dicho proyecto se titula “Characterization Challenge model and protection study of avian Reovirus in Western Canada”.

Este proyecto constaba de tres partes. La primera, que había sido concluida a inicios del 2018, consistió en la caracterización molecular de los RAs aislados en las provincias del oeste de Canadá. En la Figura 1 se puede observar el árbol filogenético donde se encuentran clasificadas las variantes de reovirus presentes en la zona oeste de Canadá.

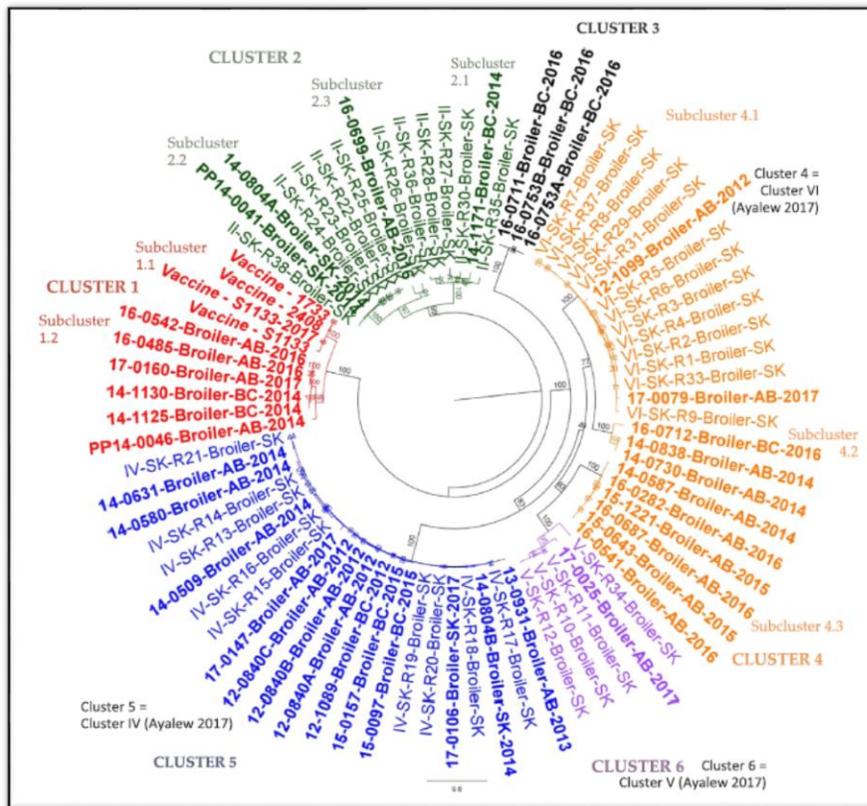


Figura 1. Árbol filogenético #2 realizado por el “Randomized axelerated Maximum Likelihood” (RAXML).

De un total de 79 secuencias parciales de σC (posición aa 16-300). El análisis incluye 75 RA aislamientos canadienses de campo y cuatro cepas de vacunas comerciales. Los 75 aislamientos de campo estuvieron compuestos de 38 aislamientos en el oeste de Canadá (2012-2017) y 37 asilamientos de Saskatchewan, Canadá (2013-

2015) que empieza con la numeración romana utilizada en este artículo (Ayalew et al. 2017). Las cuatro RA de vacunas comerciales incluyen tres secuencias previamente publicadas (Lu et al. 2015) y una secuencia (Vacuna S1133-Seq) obtenida de procesar una vacuna S1133. Las cepas vacunales son mostradas en negrita.

La segunda parte del proyecto, en la cual se centró la mayor parte del trabajo como pasante en el laboratorio, tenía como objetivo encontrar un título viral de un virus de campo del “cluster” 1.2, que desarrollara signos clínicos con la menor posibilidad de consecuencias indeseadas al final del experimento. Por último, utilizando los resultados de la parte anterior, se realizaron pruebas para dos variantes distintas (4 y 5.2) con el objetivo de determinar su virulencia, ya que no existían datos previos sobre este tema.

La principal motivación para optar por la modalidad de pasantía, como Trabajo Final de Graduación, fue poder visitar una universidad de alto renombre e interactuar con destacados profesionales considerados puntos de referencia en sus áreas a nivel mundial. El área de investigación con énfasis en virología e inmunología es un ámbito no tan desarrollado en el país. Por ende, para lograr obtener una perspectiva más amplia con conocimientos más avanzados, la oportunidad de haber sido parte de un laboratorio como el del Dr. Careem fue única. Esto no solo generó nuevas destrezas y conocimientos, sino además fue un primer paso para adentrarse y en el área de la investigación. En el Anexo 1 se muestra una carta realizada por el supervisor en cuanto al desempeño de la pasante.

1.4. Objetivos

Objetivo General

Realizar una pasantía en la Universidad de Calgary, en el Departamento de Ecosistemas y Salud Pública con el fin de desarrollar destrezas en diferentes técnicas virales utilizando como modelo el reovirus aviar.

Objetivos Específicos

1. Adquirir práctica en técnicas de virología moderna para la detección de reovirus aviar.
2. Adquirir práctica en técnicas inmunobiológicas y de biología molecular para el desarrollo de investigaciones en el área de virología e inmunología utilizando como modelo reovirus aviar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar

La pasantía se realizó en la Universidad de Calgary en la ciudad de Calgary, Alberta, Canadá. Específicamente en la Facultad de Medicina Veterinaria, en el Departamento de Ecosistemas y Salud Pública. La facultad está ubicada en el Foothills Medical Center, señalado en la Figura 2 con el número 8.

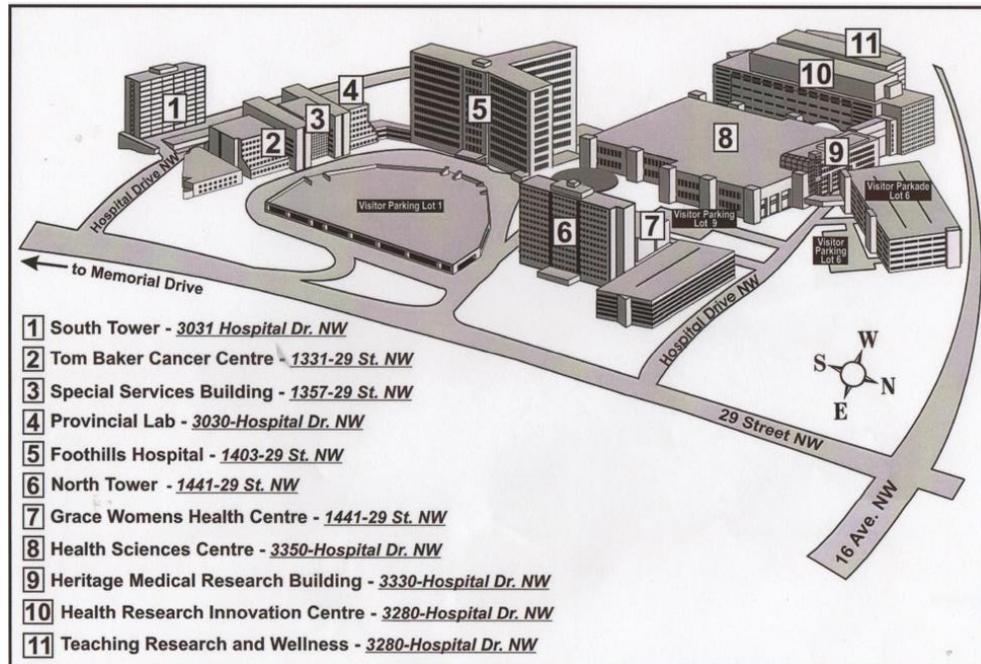


Figura 2. Croquis del Foothills Medical Center.

El laboratorio en el cual se realizó la pasantía está a dirigido por PhD. Faizal Abdul-Careem y está ubicado en el Health Research Inovation Center (señalado con un círculo rojo en la Figura 3).

2.2 Equipo y Materiales

El Departamento de Ecosistemas y Salud Pública está conformado por seis laboratorios, cada uno dirigido por un investigador principal. Cada laboratorio cuenta con una gran variedad de equipo para su uso y además se comparten ciertos equipos entre todos los laboratorios. El equipo con el que se tuvo mayor contacto y uso comprende: refrigeradoras, congeladores, centrifugas, balanzas, cabinas de flujo laminar vertical y horizontal, cabina de humos, cabina para PCR, homogeneizador de tejidos, mini-homogeneizador de tejidos, baño maría, criostato, microscopio de fluorescencia, computadoras, termocicladores, agitadores vortex, cámara de electroforesis, pinzas, tijeras, Nanodrop 1000, incubadora de huevos, ultracentrífuga, pipetas, pipeteadores eléctricos, cristalería y material plástico desechable. En cuanto a los reactivos y materiales utilizados se hizo uso del Kit E.Z.N.A® Viral RNA Kit R6874-02 de Omega biotek, además de los reactivos necesarios para extracción de ARN por medio de TRIzol® y para la tinción de láminas por medio de inmunofluorescencia para detectar macrófagos, linfocitos T CD4+ y CD8+.

2.3 Metodología

La pasantía inició el jueves 30 de agosto y finalizó el 14 de diciembre del año 2018, para un total de 608 horas. Durante la estancia, se llevó un registro de los procedimientos en los cuales se participó por medio de una bitácora. El trabajo realizado constó de las siguientes etapas:

2.3.1 Introducción al laboratorio

En la primera semana, se realizaron cursos en línea y presenciales sobre la seguridad en el laboratorio y se familiarizó con el equipo y proceso de extracción de ARN que estaría realizando en la primera mitad de la estancia. Además, se observó y participó en algunas de las etapas de diferentes técnicas como, qPCR a tiempo real, extracción de ADN en vacunas y preparación de cultivo celular primario con células de hígado de embriones de pollo.

Además de la capacitación del laboratorio, se asistió a varias charlas sobre enfermedades infecciosas, una reunión sobre la industria aviar en Canadá y clases de inmunología celular. Semanalmente, el departamento se reúne para escuchar a los estudiantes de maestría, doctorado e internacionales que hacen una breve exposición sobre el proyecto en el cual están trabajando. De igual forma, como estudiante internacional, tuve la oportunidad de realizar una pequeña presentación sobre el proyecto en el cual estuve involucrada.

El proyecto de doctorado en el cual se participó estaba organizado en tres etapas, de las cuales la primera ya había sido concluida antes de mi llegada. El objetivo de esta primera fase fue secuenciar, por medio del método Sanger, muestras de campo para determinar cuáles eran las cepas existentes y circulantes en la zona oeste de Canadá.

La nomenclatura utilizada en este trabajo fue basada en el árbol filogenético previamente presentado. La segunda etapa, que aún estaba en desarrollo y en la cual comenzó mi trabajo en el laboratorio, consistió en realizar una serie de ensayos utilizando un virus de campo del serotipo 1.2 en dos concentraciones distintas. El objetivo de esto fue determinar la concentración en la que el virus funcionaría mejor como control positivo para otros ensayos. Por último, la tercera etapa tuvo como objetivo trabajar con dos cepas adicionales (4.2 y 5), y determinar si estas eran virulentas.

2.3.2 Extracciones de ARN

Las muestras procesadas fueron hisopados cloacales y de tendón obtenidos de pollos de engorde utilizados para la segunda y tercera etapa del proyecto. El ARN se extrajo usando el kit E.Z.N.A Viral RNA Kit, código R6874-02, según el protocolo descrito por la casa fabricante. Una vez obtenido el ARN se procedió a cuantificar y calificar la muestra utilizando el Nanodrop 1000 espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Si esta tenía una buena calidad (mayor a 1,7), se procedía a sintetizar ADN complementario. Siguiendo el protocolo descrito por ThermoFisher, por medio del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNAase Inhibitor código 4374966, se utilizaron 200ng de ARN junto con “random primers” para sintetizar el ADN complementario. Las temperaturas y tiempos utilizados fueron: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos y 85°C por 5 minutos y un último paso de 4° C por tiempo infinito. Posteriormente, se procedió con la extracción de ARN en tejidos (tendón, hígado y almohadilla plantar). El método empleado fue la extracción por medio de Trizol LS[®] reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) según la descripción por Abdul-Careem et al. (2006). Seguidamente, se procedía de la misma manera que con las otras muestras, pero para el ADN complementario se utilizaron 2000ng de ARN. El material extraído fue utilizado para realizar qPCR.

2.3.3 Criosección

En la segunda mitad de la estancia se procesaron en el criostato muestras de tejido (hígado, almohadilla plantar, bazo y tendón) preservadas en FSC 22 Clear Frozen Section Compound de la compañía Leica. Las secciones se cortaron a un grosor de 5 micrómetros. Las láminas luego fueron utilizadas para el ensayo de inmunofluorescencia, con el objetivo de cuantificar macrófagos y linfocitos T CD8+ y CD4+. Dicha información fue utilizada para evaluar el grado de daño en los tejidos y compararlo entre los diferentes grupos.

2.3.4 Inmunofluorescencia indirecta

Para identificar los macrófagos, el anticuerpo primario utilizado fue el Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB, código 8420-09 de la empresa Southern Biotech. El anticuerpo secundario utilizado fue el Goat anti-Mouse IgG (H+I) Secondary Antibody, DyLight 550 de Thermo Fisher Scientific, código 84540. Una vez teñida se procedía observar bajo el microscopio de fluorescencia para comprobar la efectividad del

procedimiento en los controles. En caso de observar positividad en las muestras de campo, se procedía a tomar cinco fotografías distintas de cada tejido con dos filtros diferentes. Un filtro permitía observar la fluorescencia provocada por el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que es selectivo al ADN. Debido a la alta permeabilidad de la célula esto permite una eficiente tinción del núcleo con poca interferencia del citoplasma (Kubista et al. 1987). El segundo filtro permitía ver la fluorescencia generada por el anticuerpo secundario. Estas fotografías se procesaban por medio del programa ImageJ software (National Institute of Health Bethesda, Maryland, USA) para calcular el porcentaje de macrófagos obtenidos en comparación al porcentaje de células nucleadas teñidas. Una vez obtenido este resultado, se procedía a usar el Graphpad Prism software 5 (La Jolla, USA, CA) para graficar la información obtenida y ver el grado de significancia estadística. Para detectar linfocitos CD8+ T, como antígeno primario se utilizó el Mouse Anti-chicken CD8a-UNLB y como antígeno secundario se utilizó Goat anti-Mouse IgG (H+I) Secondary Antibody, DyLight 550 de Thermo Fisher Scientific. Mientras que la tinción para linfocitos CD4+, como antígeno primario se usó el Mouse Anti-Chicken CD4-UNLB y como antígeno secundario se utilizó Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody de Vector Laboratories. Finalmente, se incubó con DyLight 488 Streptavidin. El protocolo utilizado se basa en el protocolo descrito por Abdul-Careem et al. (2009). En el caso de estas últimas dos tinciones, solo se realizaron una vez en láminas de cortes de tendón. Esto debido a que cantidad de células teñida era tan baja que no justificaba su uso.

2.3.5. Centrifugación con Gradiente de densidad

Para realizar este procedimiento se procesaron muestras de bazo infectadas con reovirus. Se tomaron 0.3g de muestra positiva en PCR e histopatología, y se procedió a homogenizar con 5ml de PBS estéril, utilizando el Bio-Gen PRO200 Homogenizer de la empresa PRO Scientific. Luego, dicha muestra fue filtrada utilizando Acrodisc 13mm Syringe Filter 0,45 μ m Supor Membrane Low Protein Binding de la empresa Life Sciences. Seguidamente, se preparó un gradiente discontinuo de ioxidanol al diluir OptiPrep™ Density Gradient Medium con PBS estéril para producir soluciones al 25%, 20%, 15% y 10%. Una solución al 30% fue preparada al combinar 350ml del material homogenizado con 350ml del OptiPrep Density Gradient Medium. El gradiente fue hecho al añadir secuencialmente con cuidado capas de 700ml de la solución al 30%, seguida de 650ml de cada solución al 25%, 20%, 15% y 10%. El gradiente fue centrifugado a 10°C en una Otima MAX-XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) usando un rotor MLS-50 por 4 horas a 168 000 x g con una lenta aceleración (setting siete por tres minutos) y una desaceleración lenta (setting nueve por diez minutos). Luego se colectaron en doce fracciones de 250ml y finalmente una fracción de 300ml. Las fracciones tres, cuatro, cinco y seis luego serían utilizadas para la extracción de ADN o ARN según el virus utilizado. Estas muestras luego serían utilizadas para obtener una secuenciación de genoma completo, y así poder idear un nuevo protocolo de qPCR a tiempo real para variantes de RA.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Extracciones de ARN

El objetivo primordial de la pasantía fue desarrollar destrezas en diferentes técnicas virales utilizando como modelo el RA, para así poder participar en estudios similares que involucren el diagnóstico laboratorial y la participación en grupos de investigación sobre patógenos virales que afecten las aves.

Durante la pasantía se participó en la ejecución de 257 extracciones de ARN, en hisopados, con un kit comercial y 182 extracciones de ARN, en tejidos, por medio de TRIzol®. Todas las muestras fueron analizadas con el Nanodrop 1000 para obtener la calidad y la cantidad de material que se obtuvo de la extracción. Este procedimiento se realizó tanto para muestras de la segunda y tercera fase del proyecto. En el Cuadro 1 se muestra un resumen de los resultados de las extracciones por el kit comercial, están divididos por el “cluster” al que el virus extraído pertenece.

Cuadro 1. Extracciones de ARN con kit comercial. Clasificación del virus según Palomino et al. 2018

Grupo	Tipo de muestra	Número de muestras	Número de muestras con baja calidad (>1,7)
1.2	Hisopado cloacal	80	3
1.2	Hisopado de tendón	20	0
1.2	Hisopado de almohadilla plantar	24	0
4.2	Hisopado cloacal	36	7
4.2	Hisopado de tendón	8	0
5	Hisopado cloacal	32	3
5	Hisopado de tendón	9	1
Control negativo	Hisopado cloacal	36	0
Control negativo	Hisopado de tendón	12	0

En el Cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos por medio de las extracciones de TRIzol®.

Cuadro 2. Extracciones de ARN en tejidos con TRIzol®. Clasificación del virus según Palomino et al. 2018

Grupo	Tejido	Número de muestra	Número de muestras con baja calidad (>1,7)
Control negativo	Hígado	24	3
Control negativo	Tendón	11	0
Control negativo	Almohadilla plantar	8	0
4.2	Hígado	9	3
4.2	Tendón	9	0
4.2	Almohadilla plantar	11	0
5	Hígado	8	0
5	Tendón	8	2
5	Almohadilla plantar	8	0
1.2	Hígado	32	7
1.2	Tendón	9	1
1.2	Almohadilla plantar	9	0

El primer aspecto importante recalado por los investigadores fue la calidad de la muestra y el ARN que se extrae de las mismas, ya que es de los métodos más cruciales utilizados en la biología molecular. Es el punto de inicio de una serie de procesos y desarrollo de un producto. El ARN puede ser extraído de cualquier material biológico. El ácido nucleico diana debería ser libre de contaminantes como proteínas, carbohidratos, lípidos y otros ácidos nucleicos, en este caso ARN libre de ADN. La calidad e integridad del ácido nucleico aislado va a afectar directamente el resultado de cualquier investigación científica (Tan y Yiap 2013). Cuando se utiliza el Nanodrop 1000, el radio de absorbancia a 260nm y 280nm es usado para evaluar la pureza del ADN y ARN. Un rango de ~2.0 es generalmente aceptado como puro para ARN. Si este es inferior a esta cifra puede indicar presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que se absorben fuertemente a 280nm o cerca (Wilfinger et al. 1997).

El ARN es una molécula inestable, y tiene una vida media corta una vez extraída de la célula o el tejido. Este es especialmente inestable debido a la presencia de ARNasas, que son enzimas presentes en sangre y todos los tejidos, así como bacterias y hongos en el ambiente. La extracción de ARN se basa en una buena técnica de laboratorio. Los tejidos que son altos en nucleasas o tejido adiposo y con contenido alto de inhibidores, pueden representar un problema para obtener muestras de calidad (Tan y Yiap 2013).

En el caso de la extracción por medio de TRIzol®, se logró observar que en las muestras de hígado se obtuvo un mayor número de muestras de baja calidad. Esto puede deberse a que para procesar las muestras de hígado se utilizó un minihomogenizador,

con el cual controlar la temperatura se vuelve más difícil, conduciendo a degradación del ARN.

3.2 PCR a tiempo real

Los siguientes resultados fueron datos generados por el laboratorio. Dichos datos no han sido publicados y fueron elaborados por Msc/DVM. Víctor Palomino Tapia. La información presentada corresponde a la segunda parte del proyecto y las muestras utilizadas fueron las mencionadas anteriormente. Esta constó en probar dos títulos virales del “cluster” 1.2 con el objetivo de determinar un modelo de infección, en el cual el ave mostrara síntomas clínicos, pero no tan severos que se tuviese que recurrir a la eutanasia antes de llegar al final del experimento. Se utilizaron tres grupos con seis aves cada uno, un grupo control negativo al cual se le inoculó PBS, otro fue inoculado con una dosis infectante de 10^4 DICC₅₀ (Dosis Infectiva Cultivo Celular 50) y otro inoculado con una dosis infectante de 10^5 DICC₅₀. Los grupos inoculados con el virus fueron rotulados como tratamiento 1 y tratamiento 2 respectivamente. El experimento tuvo una duración de 14 días con una toma de muestras a la mitad y al final de este periodo.

En la Cuadro 3 se puede observar los resultados obtenidos con PCR a tiempo real, estos datos están presentados como positivos o negativos y no de manera cuantitativa.

Cuadro 3. Resultados de qPCR.

Grupo	Lesión en almohadilla plantar		qPCR positivos en hisopados cloacales	
	7 días post inoculación	14 días post-inoculación	7 días post inoculación	14 días post-inoculación
Control	0/12	0/12	0/12	0/12
10⁴. DICC₅₀/ave	12/12	12/12	4/12	3/12
10^{5.0} DICC₅₀/ave	12/12	12/12	7/12	0/12

3.3 Criosección

Este procedimiento es rápido y relativamente fácil de preparar previamente a la fijación, además, provee un buen sistema de visualización a detalles finos de la célula (Son et al. 2013). A pesar de que la criosección es físicamente menos estable que la parafina, generalmente es superior en la preservación de antigenicidad y por ende a la detección de antígenos mediante la microscopía. Sin embargo, la habilidad para obtener

criosecciones de alta calidad es usualmente un proceso difícil y laborioso que requiere cierto grado de experiencia. Las muestras obtenidas mediante esta técnica pueden ser utilizadas en varios procedimientos como la inmunohistoquímica (Fischer et al. 2008). Durante la estadía en el laboratorio se procesaron nueve muestras de tendón, nueve muestras de hígado, nueve muestras de bazo y nueve muestras de almohadilla plantar. Los cortes fueron realizados con cinco micrómetros de grosor. En la Figura 4 se puede observar el criostato y una muestra de los bloques procesados.

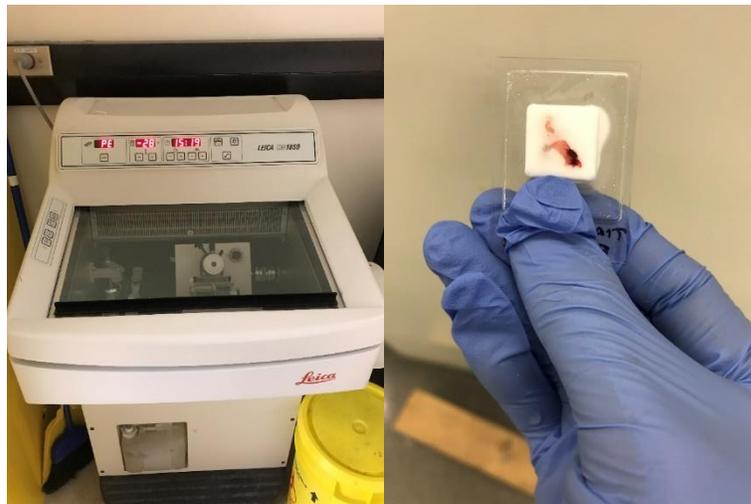


Figura 4. Criostato y bloque con FSC 22 Clear Frozen Section Compound

3.4 Inmunofluorescencia indirecta

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta son usados para la detección y cuantificación de linfocitos CD4+ y CD8+. Las láminas son leídas con un microscopio de fluorescencia (MacLachlan y Dubovi 2017). Durante la pasantía se realizaron tinciones en 27 láminas de las cuales tres fueron para linfocitos CD8+T y tres para CD4+T. En la Figura 5 se puede observar el resultado de estas tinciones. Debido a la baja cantidad de células teñidas se decidió no realizar estas tinciones para los demás tejidos.

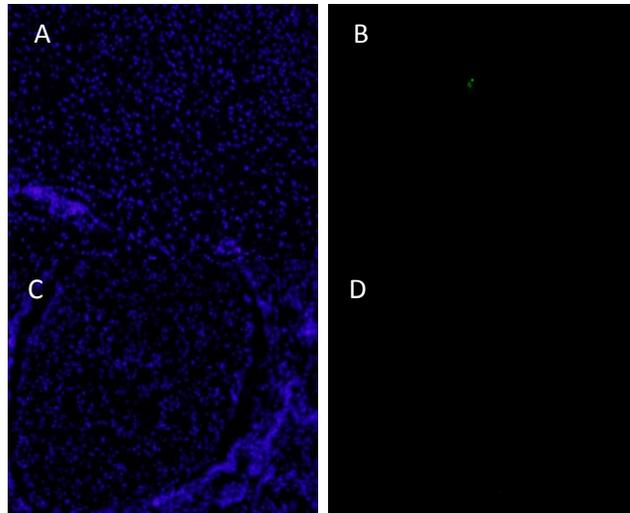


Figura 5. Inmunofluorescencia en lámina de tendón. La tinción nuclear utilizada fue DAPI (A, C), para detectar linfocitos CD4+T se utilizó Mouse Anti-Chiken CD4 UNLB (B) y para detectar linfocitos CD8+T se utilizó el Mouse Anti-chicken CD8a-UNLB (D)

Para la tinción para macrófagos se realizaron tres láminas de tendón, seis láminas de almohadilla plantar, seis láminas de bazo y seis láminas de hígado. Todas las láminas fueron analizadas con el ImageJ software (National Institute of Health Bethesda, Maryland, USA), para determinar el porcentaje de macrófagos con respecto al número total de células teñidas. Con los datos obtenidos, por medio del programa Graphpad Prism software 5, La Jolla, USA, CA, se realizaron gráficos. Para la elaboración de estos se promediaron los resultados y luego se aplicó el error estándar de la media. Para el análisis estadístico se usó el Análisis de Varianza (ANOVA por sus siglas en ingles) y el test de Tukey para determinar el grado de significancia. En la Figura 6 se puede observar los resultados obtenidos para las muestras de tendón.

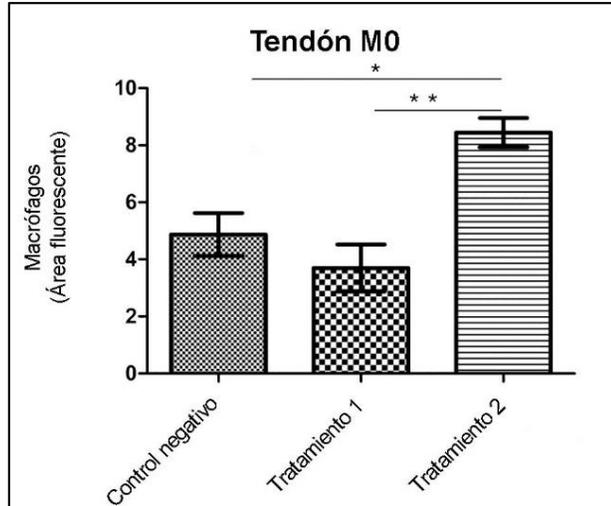


Figura 6. Área fluorescente de macrófagos en tejido de tendón

De acuerdo con la Figura 6, existe una diferencia significativa entre el control y el tratamiento 2, y hay una diferencia altamente significativa entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2. En la Figura 7 se puede observar imágenes representativas de los resultados obtenidos.

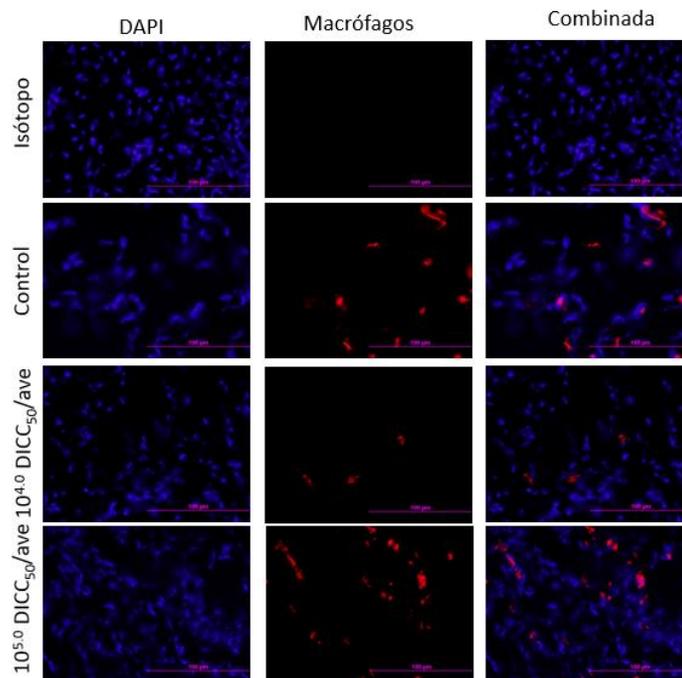


Figura 7. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de tendón. La tinción nuclear utilizada fue DAPI, para detectar los macrófagos se utilizó el Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB.

En la Figura 8, se evidencia que existe una diferencia altamente significativa entre el control y el tratamiento 1.

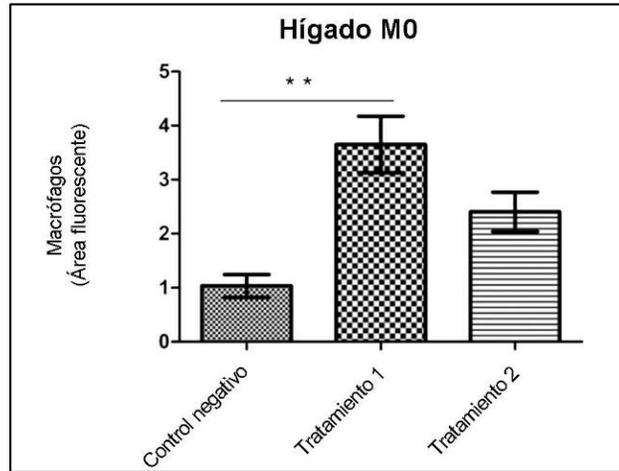


Figura 8. Área fluorescente de macrófagos en hígado.

En la Figura 9 se puede observar las imágenes representativas de la Figura 8.

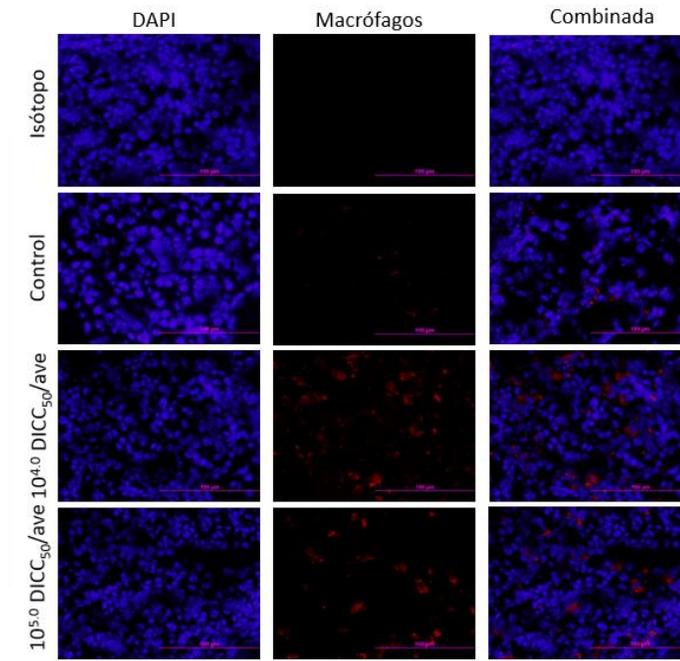


Figura 9. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de hígado. La tinción nuclear utilizada fue DAPI, para detectar los macrófagos se utilizó el Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB

En el caso de la almohadilla plantar, como se muestra en el Figura 10 no se encontraron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

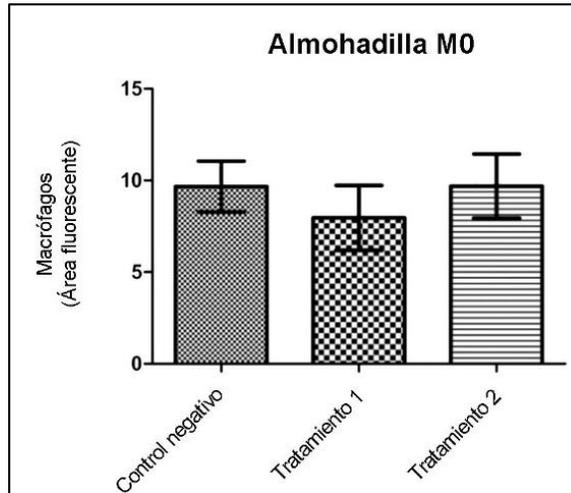


Figura 10. Área fluorescente de macrófagos en almohadilla plantar.

En la Figura 11 se puede observar las imágenes representativas del Figura 10.

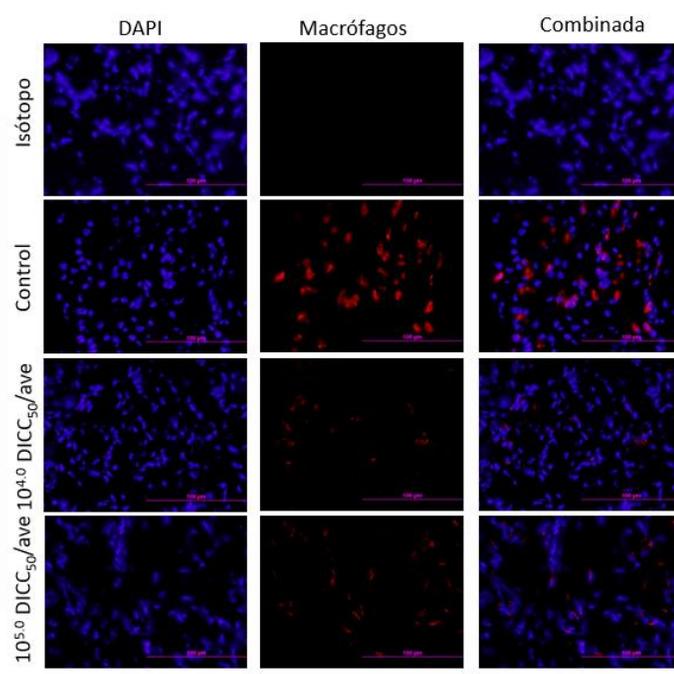


Figura 11. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de almohadilla plantar. La tinción nuclear utilizada fue DAPI, para detectar los macrófagos se utilizó el Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB

Por último, se analizó las muestras de bazo. De acuerdo con la Figura 12, no se halló una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

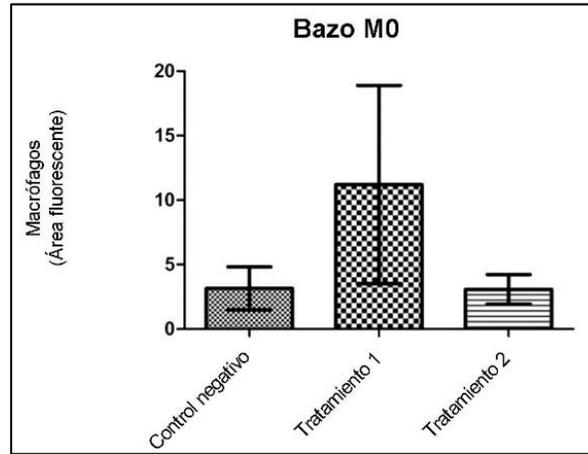


Figura 12. Área fluorescente de macrófagos en bazo.

En la Figura 13 se puede observar las imágenes representativas de la Figura 12.

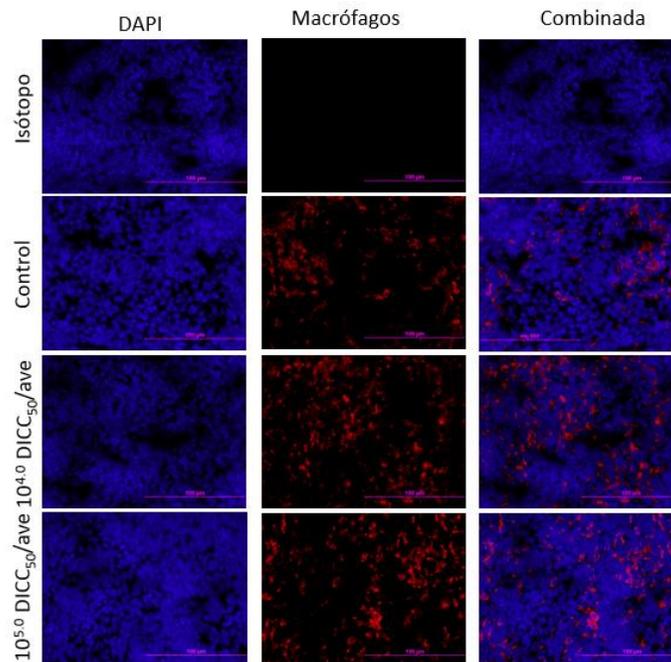


Figura 13. Identificación de macrófagos por microscopia de fluorescencia secciones congeladas de bazo. La tinción nuclear utilizada fue DAPI, para detectar los macrófagos se utilizó el Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB

Otro aspecto importante en el desarrollo de la investigación fue adquirir destrezas en diferentes técnicas inmunobiológicas, y como relacionar los resultados obtenidos con los datos generados en otros ensayos. En este caso, relacionando los datos obtenidos en ambos ensayos in vivo, se pudo observar que con ambos tratamientos se continúan detectando lesiones en las almohadillas plantares a los 14 días post inoculación. Sin embargo, entre estos tratamientos y el grupo control no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la inmunohistoquímica. Con relación a los hisopados cloacales, al finalizar el experimento se observó que con el tratamiento 1, aún después de los 14 días, tres aves seguían marcando positivas al qPCR, mientras que con el tratamiento 2 ningún ave era positiva. En el caso de las tinciones, se observó que había una diferencia estadística altamente significativa entre el tratamiento 1 y 2, siendo el primero el que cuenta con un mayor porcentaje de macrófagos. Según esta información, se podría hipotetizar que con el tratamiento 1 la infección sigue activa, por lo que el virus aún se encuentra circulando en órganos y hay excreción de este. Por el contrario, las aves con el tratamiento 2 resolvieron más rápido la enfermedad, sugiriendo la posibilidad de que a mayor carga viral habría una respuesta inmune aún más severa, resolviendo el problema más rápido.

3.5 Centrifugación con Gradiente de densidad

Cuando se utiliza el método clásico para la extracción del genoma de un virus, las partículas virales deben ser purificadas inicialmente. La ultracentrifugación juega un rol importante en este proceso. Al purificar las partículas virales se hace posible asegurarse desde el inicio que el virus con el que estamos tratando es efectivamente el que pensamos (Lawrence y Steward, 2010). Para este procedimiento se procesaron seis muestras distintas de RA. Los “clusters” a los que pertenecía fueron 1.1, 1.2, 4.1, 4.2, 4.3 y 6.

4. CONCLUSIONES

1. Se desarrollaron destrezas en diferentes técnicas de virología moderna e inmunobiológicas con un acompañamiento teórico de las mismas. Los datos generados serán presentados en la conferencia internacional de American Association of Avian Pathologist en la cual la pasante será mencionada como coautora.
2. Se realizó la extracción de ARN de 257 muestras de hisopados cloacales y de tendones con un kit comercial y 182 muestras de tejido por medio de TRIzol®, mejorando las destrezas y habilidades de la pasante.
3. Se practicaron técnicas como la criosección y la inmunofluorescencia. Por medio de la criosección, se procesaron nueve muestras de tendón, nueve muestras de hígado, nueve muestras de bazo y nueve muestras de almohadilla plantar. Dichas, muestras luego fueron utilizadas y examinadas por medio de la inmunofluorescencia.

5. RECOMENDACIONES

1. Instar a la Escuela de Medicina Veterinaria a crear lazos y vías de comunicación con universidades fuera del país, de manera que pueda haber un intercambio de conocimiento además de oportunidades para los estudiantes.
2. Promover en los estudiantes de Medicina Veterinaria a realizar pasantías en el ámbito de virología y la industria aviar, ya que son campos con mucha oportunidad y crecientes a nivel mundial.
3. Instar a la Universidad Nacional y a la Escuela de Medicina Veterinaria en informar y acompañar a sus estudiantes durante los procesos necesarios para realizar este tipo de trabajos fuera del país, de manera que estos se tornen más sencillos y se pueda acortar el tiempo para cumplir con los plazos.
4. Enfatizar en los estudiantes la importancia del componente práctico y en la adquisición de destrezas en su campo de elección.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Careem MF, Huntere BD, Sarson AJ, Mayameei A, Zhou H, Sharif S. 2006. Marek's disease virus-induced transient paralysis is associated with cytokine gene expression in the nervous system. *Viral Immunol.* 19: 167-176

Ayalew LE, Gupta A, Fricke J, Ahmed KA, Popowich S, Lockerbie B, Tikoo SK, Ojkic D, Gomis S. 2017. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. *Sci. Rep.* 7, 3565.

Davis CG. 2015. Factors Influencing Global Poultry Trade. *IFAMA.* 18:1-12

Farkas SL, Marton S, Dandar E, Kugler R, Gal B, Jakab F, Balint A, Kecskemeti S, Banyai K. 2016. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *Sci. Rep.* 6, 36960.

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, and Zeller R. 2008. Fixation and permeabilization of cells and tissues. *CSH Protocols* doi: 10.1101/pdb.top36.

Goldenberg D, Lublin A, Rosenbluth E, Heller ED, Pitcovski J. 2016. Optimized polypeptide for a subunit vaccine against avian reovirus. *Vaccine* 34, 3178–3183.

Jones RC. 2013. Reovirus infections. In: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 13th ed. John Wiley & Sons, Ames, Iowa, pp. 351–373.

Kubista M, Aakerman B, Norden B. 1987. Characterization of interaction between DNA and 6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26 (14): 4545-4553

Lawrence JE, Steward GF. 2010. Purification of viruses by centrifugation. *MAVE* 17: 166-181

Lu H, Tang Y, Dunn PA, Wallner-Pendleton EA, Lin L, Knoll EA. 2015. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Sci. Rep.* 5, 14727.

Maclachlan NJ y Dubovi EJ. 2017. *Fenner's Veterinary Virology*. 5ed. Elsevier, London, United Kingdom.

Palomino-Tapia V, Mitevski D, Inglis T, van der Meer F, Abdul-Careem MF. 2018. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012-2017 based on partial sigma (σ)C gene. *Virology* 522: 138-146

SENASA[Internet] 2015. 3ed. Heredia. Departamento de Epidemiología; [citado 20 de marzo 2018]. Disponible en: www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/110215040050.docx

Son AI, Sokolowski K, Zhou R.2013. Cryosectioning.Neural Development 1018:301-311

Stewart CR, Keyburn AL, Deffrasnes C, Tompkins SM.2013. Potential directions for chicken immunology research. DCI. 41: 463-468.

Swayne DE. 2013. Diseases of Poultry. 13th Ed. Wiley & Sons, Iowa, USA.

Tang Y, Lin L, Sebastian A, Lu H, 2016. Detection and characterization of two coinfection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS). Sci. Rep. 6, 24519.

Tan SC y Yiap BC. 2013 DNA, RNA and Protein Extraction: The Past and The Present. J Biomed Biotechnol. 2013:628968

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynki P. 1997. Effect of pH and Ionic Strenght on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. Biotechniques 22:474-481

7. ANEXOS

Anexo 1. Carta de resumen de tareas y desempeño en el laboratorio del Dr. Careem.



Health Research Innovation Center 2C58
3330 Hospital Drive NW
Calgary, Alberta, T2N 4N1
CANADA

Phone: (+1)-403-220-4462
Cell: (+1)-403-401-4227
FAX: (+1)-403-210-9740
Email: faizal.abdulcareem@ucalgary.ca

December 11, 2018

To whom it may concern:

Re: Catalina Barboza Solis

It is with immense enthusiasm that I write this reference letter in support of Catalina Barboza Solis attached to the Universidad Nacional de Costa Rica. I am serving as an Associate Professor (Virology) at the University of Calgary Faculty of Veterinary Medicine (UCVM) and a Special Graduate Faculty at the University of Guelph. I have known Catalina since 2017 initially as a potential visiting student at the University of Calgary, then as an Academic Researcher (NOC 4012) enrolled at the University of Calgary under the Global Skills Strategy program for the period from September-December 2018. I closely, almost daily basis, interacted with her in the lab and had a chance to observe her skills.

Catalina worked in a biosafety level two environment (labs with human immunodeficiency virus, Hepatitis B and C viruses, influenza virus and animal viruses). She strictly followed safety protocols understanding the gravity of breach of biosafety. When required Catalina was seeking advice from her mentors as well as from others in the group particularly relevant to experimental techniques. She patiently listens to comments and was willing to incorporate critical information into her work. I was very impressed with maintenance of her lab note book - it is legible and very descriptive. I also observed that she was hardworking and trust worthy. She usually comes early, leave late if required, complete the tasks in a timely manner and understands the value of putting adequate time to be productive. All these work ethics reflect her honesty and integrity at the work place.

Catalina produced data for one coauthor international conference (American Association of Avian Pathologists) presentation during her short stay in my group. Her work was based on analysis of tissues originated from experimental avian reo virus infection in broiler chickens. Her findings were based on real-time polymerase chain reaction done to quantify reo virus infection and immunofluorescent assay performed for the quantification of macrophages and T cell sub sets in tendon, footpad and liver. Although this presentation will happen in August 2019, I have seen Catalina presenting her work in the virology group meeting. She has great communication skills, her presentation was above average and she was very organized and insightful when responding to questions from the audience.

Catalina showed respect to everyone in the group no matter what the background and origin are. Catalina moved very well with groups with various backgrounds-they consisted of culturally

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Bringing innovation and community together
to advance animal and human health





Health Research Innovation Center 2C58
3330 Hospital Drive NW
Calgary, Alberta, T2N 4N1
CANADA

Phone: (+1)-403-220-4462
Cell: (+1)-403-401-4227
FAX: (+1)-403-210-9740
Email: faizal.abdulcareem@ucalgary.ca

diverse individuals and I noted that Catalina respects individual religious and cultural perspectives. I have not witnessed Catalina in a situation that has required any conflict resolution. She got along very well with members of my research group and neighboring research groups. Furthermore, she has a nice and warm personality, which makes her an enjoyable person to work with.

Please contact me if you require clarification of any aspect of this reference letter or if you require further information.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Faizal Abdul-Careem".

M. Faizal Abdul-Careem, BVSc, MVM, PhD
Diplomate American College of Poultry Veterinarians (ACPV)
Diplomate American College of Veterinary Microbiologists (ACVM)
Associate Professor (virology), U of Calgary Faculty of Veterinary Medicine

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Bridging innovation and community together
to advance animal and human health

