

EL VIRUS PARAINFLUENZA-3 INDUCE APOPTOSIS EN INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES¹

THE PARAINFLUENZA-3 VIRUS INDUCES APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL INFECTION OF ALVEOLAR MACROPHAGES

MARTÍN, V.²; BAGNIS, G.²; CERIATTI, S.²; SABINI, L.²; GONZÁLEZ, C.³

RESUMEN

Se desarrolló un cultivo primario de macrófagos alveolares ovinos, para el estudio de la infección experimental in vitro, con diferentes cepas del Virus Parainfluenza-3 (VPI-3) aisladas de bovinos y ovinos con enfermedad respiratoria. Mediante tinciones de Hematoxilina/Eosina y técnicas inmunohistoquímicas indirectas (Immunoperoxidasa e Inmunofluorescencia) se caracterizaron los efectos citopáticos virales. Se comprobó la capacidad de ambas cepas del VPI-3 de infectar las principales células de defensa del tracto respiratorio ovino, discutiéndose sus implicancias diagnósticas, patológicas y epidemiológicas.

KEY WORDS: Parainfluenza tipo 3, apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Parainfluenza tipo 3, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El virus parainfluenza tipo 3 (VPI-3) afecta a animales y al hombre. Se asocia a cuadros de infecciones locales del tracto respiratorio que a menudo son subclínicos, excepto cuando se complican con bacterias secundarias oportunistas, donde la neumonía y muerte suelen ser los desenlaces de la enfermedad (Cutlip, y col., 1993).

Se han caracterizado cepas del VPI-3 (humanas y bovinas) demostrándose una estrecha relación antigénica entre ellas, mediante estudios con anticuerpos monoclonales (AcMos) y análisis de secuenciación de aminoácidos (Coelingh y col., 1987). Las especies ovinas y caprinas también son afectadas por este tipo viral, habiendo sido caracterizadas antigénicamente algunas de las cepas actuantes. Los estudios comparativos con AcMos de tres aislamientos de diferentes especies anima-

les demostraron que existen proteínas que comparten epitopos, mientras que otros no reaccionaron con ninguno de los anticuerpos utilizados (Bagnis, 1997).

Una de las barreras de defensa más importantes en el huésped son los macrófagos alveolares que cumplen un rol fundamental frente a infecciones del tracto respiratorio inferior, participando en la eliminación de agentes patógenos mediante procesos de fagocitosis y mecanismos bactericidas. Por otro lado, como células presentadoras de antígeno, colaboran en el establecimiento de la respuesta inmune. Estas facultades pueden verse alteradas frente a infecciones con el VPI-3, impidiendo el desarrollo de eventos bactericidas, funciones de receptores, fagocitosis, fusión fagosoma-lisosoma y capacidad de presentación antigénica, entre otras (Martín, 1997).

Las proteínas virales son degradadas dentro de los lisosomas del macrófago, generándose polipéptidos. Estos polipéptidos derivados del virus, denominados antígenos, son expresados en la superficie celular asociados con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). De esta manera, este complejo es reconocido por un linfocito T colaborador (LTh), el cual es capaz de activarse secretando linfoquinas responsables de la migración de leucocitos adicionales y actúan

¹ Financiado por Escuela de Post-Grado de la U. de Chile: Proyecto PG 44/93. Dpto. de Patología Animal. FAV.

² Dpto. Microbiología e Inmunología. Facultad de Cs. Exactas Fís.-Quím. y Naturales. UNRC.

³ Dpto. Patología Animal. Facultad de Cs. Vet. y Pecuarias. U. De Chile

además como factores de crecimiento de células T (Interleukina-2).

El linfocito T citotóxico (LTc) virus-específico se une al macrófago, el cual expresa receptores de alta afinidad para IL-2. La IL-2 secretada por LTh se une a receptores de alta afinidad en LTc, el cual eventualmente prolifera y es capaz de matar las células infectadas por el VPI-3. Las moléculas del CMH expresadas en las células infectadas actúan como un código, guiando la célula T hacia el blanco, permitiendo que la célula afectada sea diferenciada de otros tejidos no infectados por el virus. De esta manera, la célula efectora activa un programa de "suicidio endógeno" en el macrófago infectado, produciéndole la muerte por mecanismos de apoptosis (Duke, 1991).

Debido a que los macrófagos alveolares son considerados esenciales en los mecanismos de defensa específicos contra las infecciones de microorganismos patógenos, el objetivo de este trabajo fue demostrar la capacidad de infección de cepas de VPI-3 aisladas de bovino y ovino sobre cultivos celulares de macrófagos de oveja, y determinar el efecto del virus sobre éstos.

MATERIALES Y MÉTODO

Células y virus

Se desarrollaron cultivos primarios de macrófagos alveolares ovinos, obtenidos a partir de lavados pulmonares (Burrels, 1985) de animales clínicamente sanos, sacrificados para esta experiencia. Las monocapas fueron desarrolladas en policubetas sobre cubreobjetos de vidrio, e incubadas durante 24 hs, a 37°C, con tensión de 5% de CO₂. Los cultivos se infectaron con una cepa bovina inglesa de referencia de VPI-3 (Universidad de Edinburgo), y una cepa de origen ovino: 271/90 (Berríos, 1990), utilizando una multiplicidad de infección en cada experiencia.

A las 24, 48 y 72 horas post-infección (p.i.) se recolectaron las laminillas para:

a) Observar el efecto citopático de los virus al microscopio óptico. b) Realizar tinción de Hematoxilina/Eosina. c) Desarrollar técnicas inmunohistoquímicas indirectas: Inmunoperoxidasa (IPI) e Inmunofluorescencia (IFI), siguiendo metodología convencional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó la capacidad de infección de una cepa de VPI-3 aislada de ovino y una cepa de origen bovino, caracterizándose sus efectos citopáticos (ECP) sobre cultivos primarios de macrófagos alveolares ovinos (MØAO). Comparados con controles, los MØAO infectados fueron más adherentes a la superficie de las laminillas de vidrio, demostrando la activación de estas células presentadoras de antígeno (González, 1989). En las monocapas infectadas con ambos tipos virales, y observadas a las 24 hs. p.i., se evidenciaron células abalonadas, refringentes y con aspecto multinucleadas (sincicios) (Figura 1).

La cepa ovina 271/90 produjo cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilos característicos del género Paramyxovirus. En los cultivos de macrófagos infectados con la cepa bovina de referencia se observaron ECP similares a los producidos por la infección del VPI-3 ovino, pero con la particularidad de presentar numerosas vesículas rodeadas de membrana citoplasmática y en algunos casos vertidas extracelularmente. El macrófago infectado se fragmentó en cuerpos elementales de superficie uniforme de variados tamaños y contenidos en membranas. También se evidenciaron fenómenos de fagocitosis por células vecinas (Figura 2), similar a los procesos de apoptosis que se describen *in vivo* frente a la infección por el VPI-3 (Martín, 1997). La apoptosis es un proceso fisiológico básico, que juega un rol muy importante en la regulación de las poblaciones celulares, pudiendo ser adecuadamente considerada no como una muerte programada, sino como una sobrevivencia programada (Tomel, 1991).

Esta característica patogénica diferencial entre ambas cepas podría estar asociada con las diferencias antigénicas descritas entre los virus aislados de bovino y ovino (Bagnis, 1997).

Por otra parte, el fenómeno de apoptosis observado en este ensayo implicó la inducción de muerte celular programada mediante un mecanismo independiente de la presencia de linfocitos T, ya que bajo condiciones de cultivo en monocapa, estas células no se adhieren, siendo eliminadas del sistema luego de lavados sucesivos.

El análisis de las reacciones inmunohistoquímicas evidenció respuesta positiva frente a todos los cultivos infectados, comprobándose la capacidad de replicación de cepas virales aisladas de bovino y ovino en macrófagos alveolares ovinos (Figs. 3 y 4)

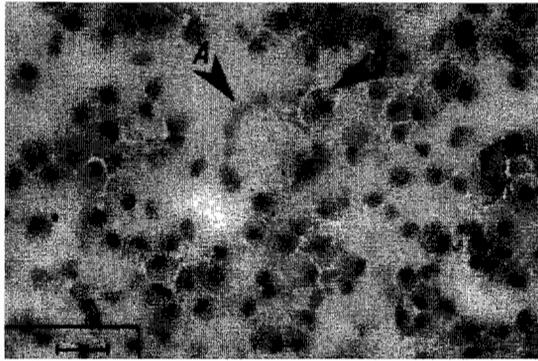


Figura 1: Monocapas 24 hs. p.i. Se evidencian células abalonadas, refringentes y con aspecto multinucleadas (sincicios). 400x

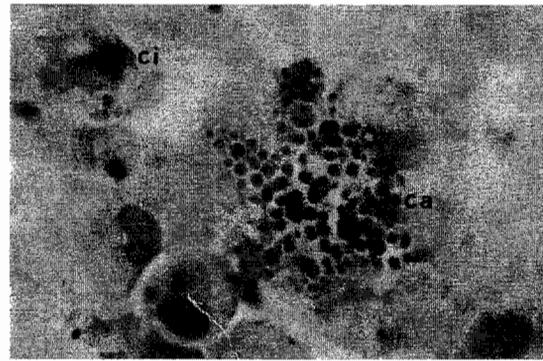


Figura 2: Cultivo infectado por VPI-3 bovino. Se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos y corpúsculos de superficie uniforme, de variados tamaños. 400x

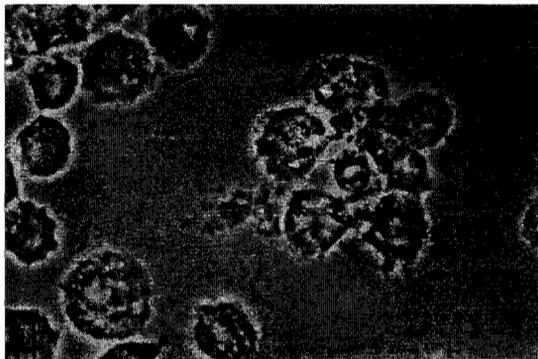


Figura 3: Inmunoperoxidasa indirecta detectando presencia de antígeno viral en superficie. 400x

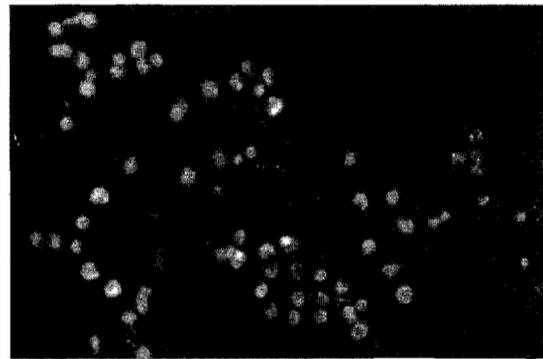


Figura 4: Inmunofluorescencia indirecta positiva evidenciando replicación del virus. 400x

Estas observaciones sugieren la presencia de receptores en los macrófagos del ovino, capaces de reconocer, además de su propia cepa específica (271/90), la cepa bovina de referencia. De ser así, esto implicaría un riesgo epidemiológico para las explotaciones mixtas, donde conviven ambas especies. Si estos resultados fueran extrapolables a lo que acontece *in vivo*, indicarían la necesidad de implementar medidas de manejo y control apropiadas, a efectos de minimizar la transmisión de patógenos respiratorios virales entre ambas especies domésticas.

CONCLUSIONES

La cepa 271/90 del virus PI-3 aislado de ovino y la cepa bovina de referencia fueron capaces de infectar, replicar y de producir daño en los cultivos primarios de macrófagos alveolares ovinos.

Ambos tipos virales indujeron la formación de ECP, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, pero se diferenciaron en la capacidad de producir fenómenos de apoptosis.

REFERENCIAS

- BAGNIS, G. 1997. *Caracterización antigénica del Virus Parainfluenza-3 Ovino mediante anticuerpos monoclonales: Estudio de la expresión de Proteínas Virales en sistemas de cultivos para infección de tipo citolítico*. Tesis de Magister. U de Chile.
- BERRÍOS, P.; CELEDÓN, M.O.; LORCA, L. 1990. *Caracterización de dos cepas de virus Parainfluenza-3 aisladas de bovinos con problemas respiratorios*. Arch Med Vet XXII (2): 169-174.
- BURRELS, C. 1985. *Cellular and humoral elements of the lower respiratory tract of sheep. Immunological examination of cells and fluid obtained by bronchoalveolar lavage of normal lungs*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 10: 225-243.

- DUKE, R.C. 1991. *Apoptosis in cell-mediated immunity*. In: *Apoptosis: The molecular Basis of cell Death*. pp. 209-226.
- COELINGH, K.L.V.W.; WINTER, C.C.; JORGENSEN, E.D.; MURPHY, B.R. 1987. *Antibody responses of human and non human to individual antigenic sites of the haemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins after primary infection or reinfection with parainfluenza type 3 virus*. *J Virol* 61:1473-1477.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; BROGDEN, K.A. 1993. *Chronic effects of coinfection in lambs with parainfluenza-3 virus and Pasteurella haemolytica*. *Small-Rum-Res* 11: 2, 171-178.
- GONZÁLEZ, C. 1989. *Characterisation of sheep macrophage differentiation antigens by monoclonal antibodies*. *Thesis (MPhil) University of Edinburgh, Edinburgh, UK*.
- MARTÍN, V. 1997. *Expresión de Antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en macrófagos alveolares ovinos infectados con el virus Parainfluenza-3 in vitro*. Tesis de Magister. U de Chile.
- TOMEL, L.D. 1991. *Apoptosis: A program for Death or Survival?* In: *Apoptosis: The molecular Basis of cell Death*. pp. 279-315