¿QUÉ SE COMPROBÓ 34 AÑOS DESPUÉS?

Dra. Teresita Rodríguez Obaya
Centro de Inmunología Molecular
La Habana 2014

TESIS DE DOCTORADO

INTERACCIÓN DEL VIRUS DE LA RUBEOLA CON CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL ORGANISMO

CENIC AÑO 1980

Introducción

1.- La rubéola es una enfermedad exantemática benigna típica de la niñez, que generalmente cursa sin presentar complicaciones y confiere inmunidad protectora de por vida.

2.-La infección en la mujer embarazada en cambio constituye un grave riesgo para el feto, especialmente durante el primer trimestre de gestación, por la capacidad teratogénica del virus.

3.- El virus rubéola (RUB) puede inducir un amplio rango de anomalías congénitas, en conjunto denominadas síndrome de rubéola congénita (SRC). Mientras la infección postnatal es limitada por la respuesta inmune del hospedador y se resuelve en el corto plazo, la rubéola congénita es persistente.

5.-El mecanismo de persistencia viral en la rubéola congénita no se conoce, pero la infección persistente se resuelve usualmente entre 1 y 2 años después del nacimiento existiendo una Paradoja Inmunológica.

Hipótesis de trabajo

El virus de la rubéola produce alteraciones ultraestructurales en algunas células que participan en los mecanismos de defensa, ocasionando alteraciones que llevan a la incapacidad funcional o a la lisis total de las mismas, con lo cual se explicarían algunos factores celulares que pudieran intervenir en el establecimiento y persistencia de la infección en el Síndrome Rubeólico.

Objetivos

1.- Comprobar el efecto del virus de la rubéola sobre linfocitos y macrófagos de los órganos hematopoyéticos de fetos de conejos cuyas madres se inocularon con el virus durante el embarazo.

2.- Demostrar la acción "in vivo" del virus de la rubéola en la ultraestructura de células polimorfonucleares y macrófagos peritoneales de ratas recién nacidas y adultas, determinado la citocronología, así como las posibles diferencias en el comportamiento de estas células frente al virus cuando provienen de animales recién nacidos con relación a la de los animales adultos.

Objetivos

3.- Determinar los cambios ultraestructurales que ocasiona el virus en cultivo de macrófagos peritoneales de ratas con el fin de demostrar la susceptibilidad de estas células a ser infectadas por el virus "in vitro".

4.- Comprobar los efectos de la infección viral tanto "in vivo" como "in vitro" en las células antes referidas cuando provienen de animales previamente inmunizados.

PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL

Estudio del efecto de virus en embriones de conejas infectadas con el virus de la rubéola

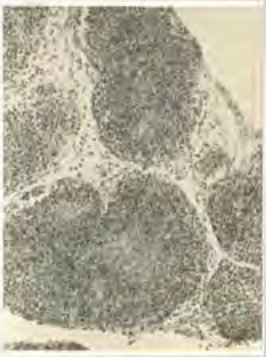
Inoculación de la cepa M23 del virus a los 7 días de embarazo.

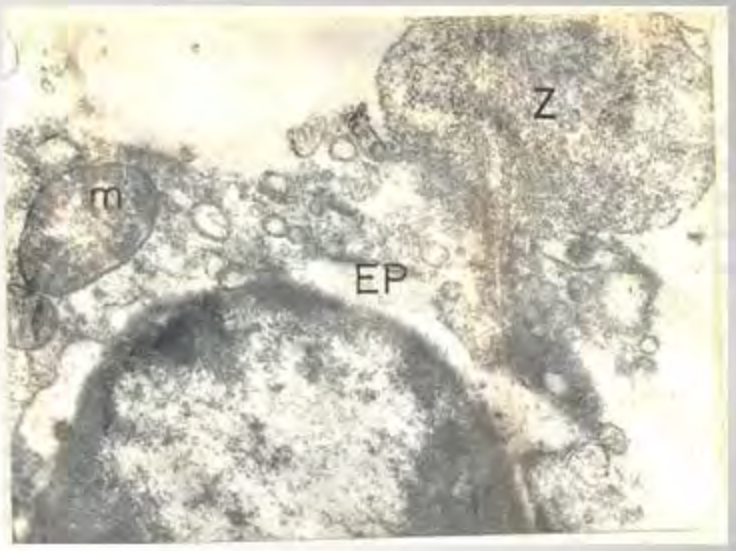
Extracción de hígado, bazo y timo de acuerdo al desarrollo embrionario (15, 21 y 29 días)

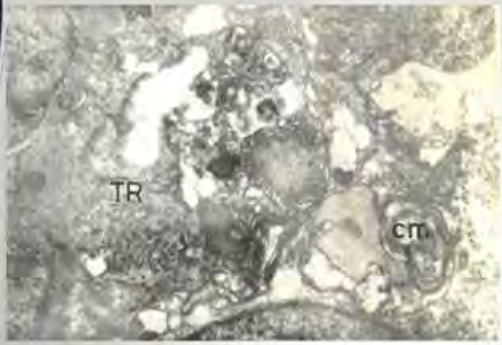
Microscopia óptica y electrónica

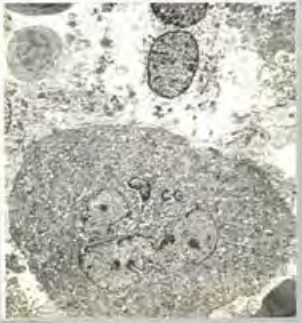
Aislamiento Viral

RESULTADOS




Z
m
EP


TR
cm



Conclusiones de este bloque experimental.

1. Se demostró por primera vez partículas semejantes al virus de la rubéola en el timo de los embriones de los conejos comprobándose la acción lítica del mismo sobre los timocitos

Se discute la posibilidad de que esto sea la causa de la persistencia del virus con altos títulos de IgM, sugiriéndose que esto puede deberse a la falta de cooperación de los linfocitos T en los mecanismos de la respuesta inmune celular, la cual es timo dependiente, mientras que la producción de IgM no depende de esta células.

Simons M J. Congenital rubella: an immunological paradox? Lancet; 1968, 2:1275-1278.

SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL

Interacción del virus de la rubéola con células de la cavidad peritoneal de ratas Wistar.

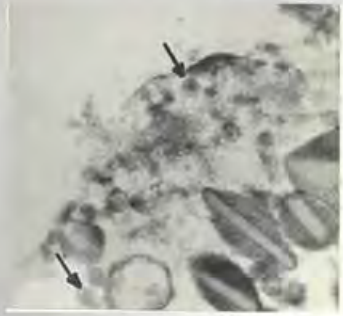
- Implantación de láminas de Epon en la cavidad peritoneal

No inmunizadas con el virus

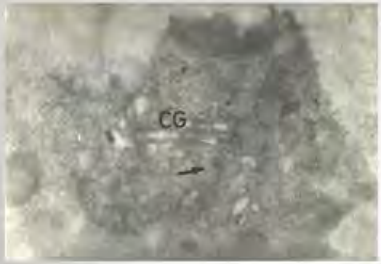
Inmunizadas con el virus

Inoculación con la cepa M23 del virus de la rubéola

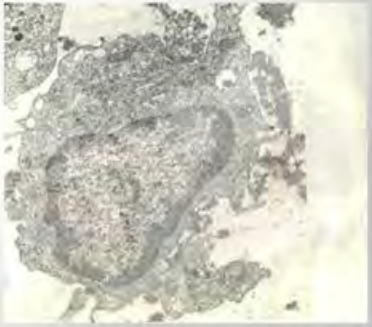
Extracción de las láminas de Epon a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación del virus



V
L


CG

Z



Conclusiones de este:

1.-La partículas virales son capaces de infectar tanto a neutrófilos como a eosinófilos.

2.-Los macrófagos sufren un efecto lítico producto de la acción del virus durante las primeras 72 horas post inoculación.

3.-Se produce una recuperación de la cavidad pasadas las 72 horas predominando los fibroblastos.

4.- No hay efecto del virus en las células proveniente de ratas inmunizadas previamente con el virus de la rubéola.

Se discute la posibilidad de la penetración del virus mediante las vacuolas fagociticas y ensamblaje de las partículas maduras del mismo en el aparato de Golgi

TERCER BLOQUE EXPERIMENTAL

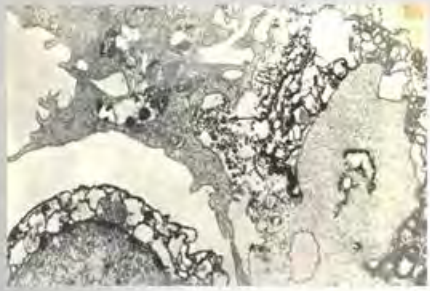
Estudio de la acción del virus de la rubeola sobre cultivo de macrófagos peritoneales de ratas Wistar adultas.

Implantación de cubreobjetos en cavidad peritoneal

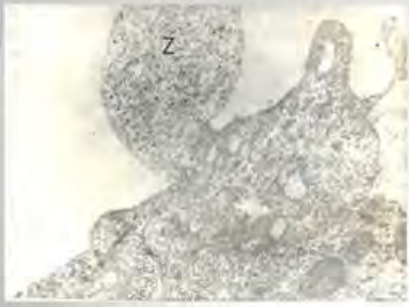
Extracción de los cubreobjetos a las 66 horas.

A las 72 horas de cultivo se inocularon con la cepa M23 del virus de la rubeola

Extracción de los cubreobjetos a las 1, 6 , 24, 48 y 72 horas, el tejido obtenido de la lámina se proceso para microscopía electrónica



M
M
M


Z

V

Conclusiones:

1.-Los efectos de virus se manifiestan de manera mas lenta en los cultivos de macrófagos, las mayores alteraciones son observadas a las 72 horas posterior a la inoculación del virus.

2.. Se pone en evidencia que el mecanismo de penetración del virus es a través de endocitosis y la liberación del mismo al citoplasma celular se produce por fusión del mismo con la membrana de la vacuola fagocitica.

3,. Existen alteraciones de los microfilamentos y microtúbulos relacionado con la infección viral.

4.- Los macrófagos proveniente de las ratas previamente inmunizadas no presentan alteraciones.

Se discute la posibilidad de que el efecto retardado de infección del virus se deba a que haya una activación de los macrófagos por le implantación de la lámina cubreobjeto en la cavidad peritoneal y que en el caso de las ratas inmunizadas, exista una cooperación linfocito-macrófago para la producción de interferón, lo cual evita la infección viral.

CUARTO BLOQUE EXPERIMENTAL

Estudio de la acción "in vivo" del virus de la rubeola con células de la cavidad peritoneal de ratas Wistar recién nacidas.

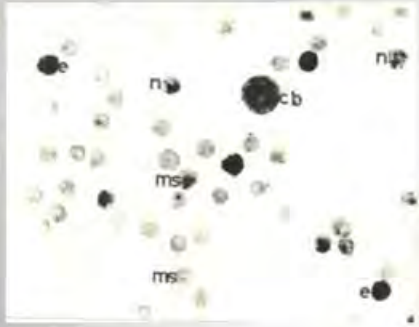
Madre no inmunizada

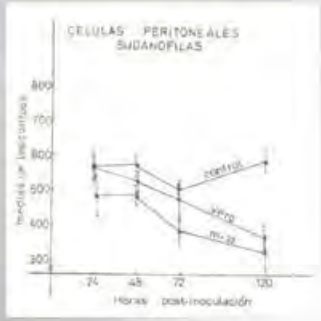
Madre inmunizada

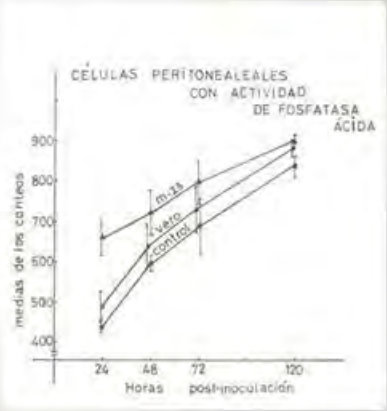
Inoculación con la cepa M23 al día de nacida

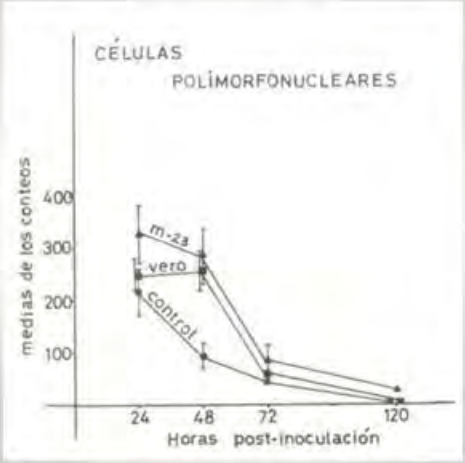
Lavado de la cavidad peritoneal a los 24, 48, 72 y 120 horas de inoculados

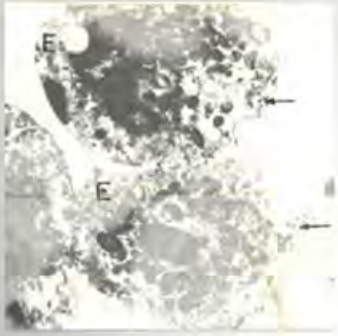
-Sudan negro
-Fosfatasa ácida
-Microscopia Elect.

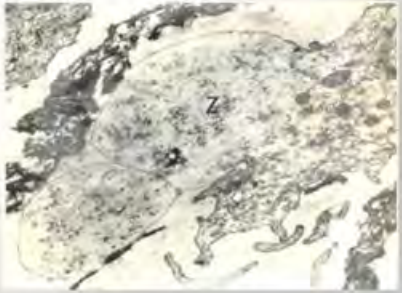

nl
cb
ms
ms
e

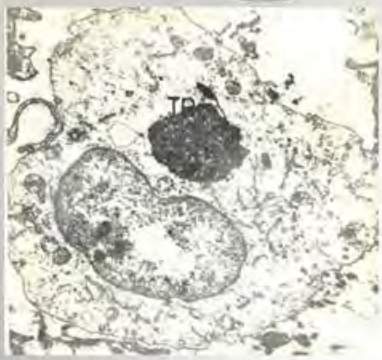

CELULAS PERITONEALES
SUDANOFILAS
medias de recuentos
800
700
600
500
400
300
control
vivo
m-38
24
48
72
120
Horas post-inoculación

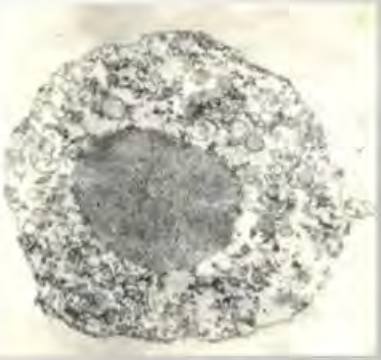

CELULAS PERITONEALEALES
CON ACTIVIDAD
DE FOSFATASA
ACIDA
medias de los conteos
900
800
700
600
500
400
m-38
vivo
control
24
48
72
120
Horas
post-inoculación

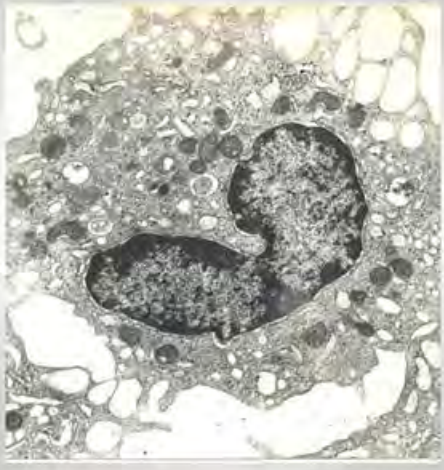

CÉLULAS
POLIMORFONUCLEARES
medias de los conteos
400
300
200
100
m-23
vero
control
24
48
72
120
Horas post-inoculación


E
E


Z







Conclusiones:

1. Las células polimorfonucleares aumenta la actividad fosfatasa por presencia del virus, así como por las células Vero y el medio de cultivo, por lo que se plantea que existe una activación tanto inespecífica como específica por las diferencia estadística encontrada.
2. En esta activación se consume energía a expensa de los lípidos acumulados en el citoplasma celular.
3. Las afectación provocadas por el virus en las ratas recién nacidas son semejantes a las encontradas en las células de la cavidad peritoneal de las adultas.
4. Las ratas recién nacidas proveniente de madres previamente inmunizadas no presentan alteraciones por lo que se plantea que no son infectadas por el virus.

Se discute la posibilidad de la cooperación linfocito-macrófago en este caso aumentado la actividad fagocítica de estos últimos como mecanismo para la eliminación de la infección viral.

¿QUÉ HA SIDO CONFIRMADO POSTERIOR A LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS?