La infección in vitro por el virus maedi visna afecta a la expresión de tres moléculas de la membrana celular ovina

E. Monleón[a], M.C. Pacheco[a], L. Luján[b], R. Bolea[b], D. Fernández de Luco[b], M.A. Vargas[b], J.J. Badiola[b] y B. Amorena[a]

[a]CSIC - Unidad de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agraria (DGA), Aptdo. 727, 50018 Montañana, Zaragoza; [b]Departmento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, 50013 Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS. En mastitis bacterianas, frecuentemente estafilocócicas en rumiantes, la adherencia bacteriana favorece la colonización de la glándula. La adherencia, específicamente la estafilocócica, está promovida por el exopolisacárido slime producido por algunas células bacterianas (2; 5) y está mediada por moléculas como la fibronectina (Fn), sirviendo ésta como puente de unión bacteriana a los tejidos (3). Podría esperarse que la expresión de la Fn y de otras moléculas de la superficie celular tales como las de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se viera alterada en las células mamarias tras una infección vírica (concretamente, por el retrovirus ovino maedi visna, VMV), dado que otras moléculas como las de clase II del MHC aumentan su expresión en monocitos y macrófagos de animales infectados por VMV (6). Dicho aumento va acompañado de una proliferación de células T que conduce a la mastitis intersticial bilateral, una de las principales formas de la enfermedad por VMV (7) que puede simultanearse con infecciones bacterianas. El propósito de este estudio es determinar el efecto in vitro de la infección por VMV sobre la expresión de moléculas que pueden estar implicadas en la adherencia bacteriana (Fn) y en la respuesta inmune (clases I y II de los antígenos del MHC).

MATERIAL Y MÉTODOS. *Cepas de VMV y estafilocócicas.* Se propagaron en células del plexo coroideo (CPC) dos cepas de VMV (K180 del Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK y WLC-1, amablemente suministrada por el Dr. F. Tolari, Turín, Italia). Se utilizaron 15 cepas bacterianas (12 *Staphylococcus aureus* y 3 *Staphylococcus epidermidis).* Las cepas se clasificaron como productoras de slime (SP) o no productoras (NSP), según los procedimientos descritos para *S. aureus* (2) y para *S. epidermidis* (3). La cepa A de *S. aureus* fue amablemente suministrada por el Dr. K. Yoshida (University of St. Marianna, Japón).

Fibronectina de la superficie celular y receptor de fibronectina. Tanto la Fn endógena (Fnen) como receptor para la Fn (RFn) libre de Fn se encuentran en la superficie de los fibroblastos (1), el tipo celular de las CPC. Para el cálculo de RFn se aplicó la formula RFn = Fn total - Fnen, siendo la Fn total la detectada por anti-Fn tras añadir Fn al medio de cultivo (el anticuerpo detectará la Fnen de la superficie celular y la Fn que, tras ser añadida, se una a los RFn). Para la detección de Fn se aplicó el método descrito (3). Se infectaron las CPC 7, 5 y 3 días antes del test con 2 $TCID_{50}$ de cepas VMV Weybridge K180 y WLC-1. Tras su fijación con 0,05% de glutaraldehído y bloqueo con BSA, se añadió Fn (para estimar la Fn total) o solo medio DMEM (para estimar la Fnen). Tras la incubación con anticuerpo anti-Fn, con un

segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y adición de sustrato, se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O.) a 450 nm.

ELISA para adherencia a células del plexo coroideo. Se llevó a cabo un ELISA de adherencia con el fin de determinar si los resultados obtenidos con la Fn se correspondían con los observados para la adherencia bacteriana. Para el test de adherencia utilizado (9), las CPC fueron infectadas con la cepa K180 del VMV en frascos de cultivo, dejando un número equivalente de frascos sin infectar. Los cultivos se examinaron los días 1, 3, 5, 7 y 9 tras la inoculación in vitro para observar efecto citopático y expresión vírica. El test ELISA se realizó los días 0, 3, 5, 7 y 9, transfiriéndose para el test 10^4 células/pocillo. Tras su adherencia a la placa y bloqueo con albúmina sérica bovina, se añadieron 100 μl de bacterias biotinadas ($7x10^8$ UFC/ml; A_{540}), incubándose la mezcla 2 h a 37°C. Tras el marcaje con streptavindina-peroxidasa y la adición de ABTS como cromógeno, se determinó la D.O. a 410 nm.

Expresión de proteína p25 y de MHC. Se cuantificaron mediante técnicas inmunocitoquímicas standard la proteína p25 en CPC y las moléculas de clases I y II del MHC en CPC y macrófagos de los alvéolos pulmonares (MAP; véanse métodos en Monleón et.al, en estas Jornadas). Se utilizaron preparaciones de citocentrífuga con células fijadas, anticuerpos monoclonales frente a las tres especies moleculares (del Dept. of Veterinary Pathology, Universidad de Edimburgo) y los segundos anticuerpos conjugados para observación de la reacción. Para el estudio, los MAP y CPC se despegaron de los pocillos de cultivo a los días 3, 5 y 7 tras la infección in vitro con VMV previamente a la citocentrifugación. Dado que los antígenos de clases I y II del MHC se expresan constitutivamente en ambos MAP y CPC, la intensidad de la reacción fue estudiada utilizando un procesador de análisis de imagen (Quantimed®). Se estudiaron 10 campos/extensión (a 400x), determinándose la intensidad de gris en una escala numérica inversamente proporcional al color, entre negro=0 y blanco=225.

Análisis estadístico. El efecto de la infección in vitro por VMV se determinó mediante un ANOVA (SUPERANOVA). El modelo Tipo III de la suma de cuadrados incluyó, como efectos fijos, el estado de infección (infectado o no), el día de la infección y su interacción. Las medias de mínimos cuadrados fueron comparadas dentro de cada día mediante la *t* de Student. Para comparaciones de la expresión de las moléculas de clases I y II del MHC, se aplicó el test de Mann-Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. *Fibronectina endógena de la superficie celular y receptor para la fibronectina.* La cantidad de Fnen y Fn total aumentó significativamente ($P<0.01$) los días 5 y 7 cuando se compararon con los días 0 y 3 de la infección por VMV. Así, la D.O. fue, para la cepa Weybridge K180 de 0,94 el día 0; 0,97 el día 3; y 1,17 el día 5; y 1,24 el día 7. Para la cepa WLC-1, la D. O. fue de 1,21 el día 0; 1,29 el día 3; y 1,40 los días 5 y 7. La expresión del RFn no experimentó cambios.

Adherencia bacteriana in vitro a CPC. Los cambios observados en la expresión de Fnen y Fn total, se correlacionaron con los observados en la adherencia bacteriana. Esta se estudió en 15 cepas estafilocócicas NPS (12 *S. aureus* y 3 *S. epidermidis*) y 2 cepas PS de *S. aureus*. En

las 15 cepas, se observó un aumento ($P<0.01$) de adherencia los días 5, 7 y 9 tras la infección por el VMV, siendo las diferencias en densidad óptica entre las células infectadas y las no infectadas > 0,1 en estas tres fechas. Este aumento se correspondía con la producción de proteínas víricas (p25) y con la aparición de sincitios en CPC. Asimismo, se observó una tendencia a una mayor adherencia en las cepas PS frente a las NPS y una muy escasa adherencia de la cepa altamente encapsulada, con una D.O. de ~ 0,3, frente a D.O. de > 0,9 para las cepas NPS y de > 1,0 para las PS.

Expresión de clases I y II en células (macrófagos y CPC) infectadas con VMV. Las diferencias en la intensidad de la tinción entre el control y las células infectadas in vitro con VMV fueron significativas ($P<0.001$) para ambos tipos celulares a los días 5 y 7 post-infección (valor > 128 en el control y < 117 a 5 o 7 d.p.i). El aumento para la clase II fue detectado en el mismo período pero solo fue significativo ($P<0.001$) en el caso de MAP = 117 en el control y < 97 a 5 o 7 d.p.i).

Los resultados de este trabajo demuestran que a partir del quinto día de la infección in vitro por el VMV, se detecta un incremento significativo en la expresión de las tres especies moleculares estudiadas: Fn (en CPC), correspondiéndose con un aumento en la adherencia bacteriana; y las moléculas del MHC de clase I (en MAP y CPC) y clase II (en MAP), ambas implicadas en la presentación de antígenos y respuesta inmunitaria, tan desorbitada en cuanto al acúmulo de células T en la afección mamaria de las ovejas con VMV. Es evidente que las células infectadas con VMV in vitro se vuelven más "pegajosas", adhiriéndose más a los estafilococos, aumentándose con ello la capacidad colonizante de estos, algo parecido al aumento de adherencia que ocurre en infecciones por el virus de la influenza A in vitro (10) e in vivo (11). Dado que las moléculas de clase I están implicadas en la presentación de antígeno y en el contacto celular entre los linfocitos T citotóxicos CD8+ y las células diana infectadas con virus (12), es posible que el aumento de la expresión de la clase I esté relacionado con el aumento de linfocitos CD8+ observado en lesiones por VMV (8).

AGRADECIMIENTOS. Trabajo financiado por los proyectos CICYT GAN 91-0940, INIA SC95-036 y UE AIR3 CT94-1492).

1. Alberts B., Bray, D. Lewis, J. et al., 1989. Molecular biology of the cell. . Garland Publishing, Inc., New York, pp. 871-873.
2. Baselga, R., Albizu, I., de la Cruz, M. et al., 1993. Infect. Immunity, 61: 4857-4862.
3. Cheung , A.L.; Krishnan, M.; Jaffe, E.A. et al., 1991. J. Clin. Invest. 87: 2236-2245.
4. Christensen , G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J. et al., 1985 J. Clin. Microbiol., 22:996-1006.
5. Iturralde , M.; Aguilar, B.; Baselga, R. et al., 1993 Vet. Microbiol., 38: 115-127.
6. Kennedy , P.G.E., Narayan, O., Ghotbi, Z. et al., 1985 J. Exp. Med., 162:1970-1982.
7. Molen, , E.J. van der; Vecht, U., Houwers, D.J. 1985. Vet. Quarter., 7: 112-119.
8. Luján , L., Begara, I., Collie D.D.S. et al., 1993 Clin.Exp. Immunol., 91: 272-276.
9. Olmsted, S., Norcross, N.L. 1992 Infec. Immunity, 60: 249-256.
10. Sanford, B.A., Davison, V.E., Ramsay, M. A. 1986 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 181: 104-111.
11. Sanford, B.A. and Ramsay, M.A. 1988 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 191: 163-169.
12. Tyzard, I. 1992. Veterinary Immunology. Saunders, London, pp. 165-175.