RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA IN VITRO FRENTE AL VIRUS OVINO MAEDI-VISNA: ESTUDIOS METODOLÓGICOS

S. Andrés,[1] B. González,[1] M.C. Pacheco,[1] E. Monleón,[2] R. Varea,[2] J.J. Badiola,[2] L. Luján,[2] A. Vargas,[2] B. Blacklaws,[3] y B. Amorena[1]

[1] *CSIC-SIA (DGA), Unidad de Sanidad Animal. Car. Montañana, 177, 50016 Zaragoza*
[2] *Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza. M. Servet, 177, 50013 Zaragoza*
[3] *Dpto. de Medicina Veterinaria, Universidad de Cambridge. Madingley Road, Cambridge, CB3 OES*

INTRODUCCIÓN

Para investigar uno de los efectos de la infección por el virus Maedi-visna (VMV) sobre la inmunidad mediada por células, se analizó la respuesta proliferativa in vitro de linfocitos de sangre periférica en presencia de antígenos víricos. En este estudio, se compararon dos métodos de detección de dicha linfoproliferación, uno radiactivo y otro colorimétrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del antígeno y del control de antígeno.- Se emplearon dos métodos diferentes: **a)** a partir de explantes de piel, se obtuvieron cultivos de fibroblastos, de los cuales una parte se infectaron con la cepa EV1 del VMV. El sobrenadante se recogió cuando se observó un efecto citopático claro (normalmente, transcurridos 5-7 días) y se empleó como antígeno en el caso de que el título del VMV que contenía fuera $\geq 10^7$ $TCID_{50}$ / ml. El sobrenadante recogido del mismo modo a partir de los cultivos de fibroblastos no infectados se utilizó como control carente de antígeno vírico (Thorsteinsdóttir et al., 1992); **b)** como en el primer caso, se infectaron cultivos de fibroblastos y, cuando se observó el máximo efecto citopático, se recogieron las células y el medio. Se centrifugaron a 10000 x *g* durante 20-30 min a 4ºC para posteriormente recoger el sobrenadante y centrifugarlo durante toda la noche en las condiciones arriba indicadas. Después de decantar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en solución salina tamponada (PBS) a una proporción 1000:1. El control sin antígeno se obtuvo siguiendo el mismo proceso a partir de cultivos de fibroblastos sin infectar (Bird et al., 1993). Para medir el contenido en proteína se utilizó el ensayo de Biorad. Las concentraciones obtenidas fueron, para el caso del antígeno, 1.2 µg/ml y para el caso del control, 2.5 µg/ml.

Ensayo de linfoproliferación.- Los linfocitos se obtuvieron con heparina a partir de sangre periférica fresca, procedente de animales infectados por VMV. En una placa de 96 pocillos con fondo en U se prepararon diluciones seriadas dobles por cuadruplicado, tanto del virus como del control de antígeno. Igualmente, se prepararon cuatro pocillos sólo con medio AIM-V (control de medio) y otros cuatro con el mitógeno Concanavalina A (control positivo). Finalmente, se añadió la suspensión celular, para obtener una concentración final de 1×10^5 células por pocillo. La placa así preparada, se incubó durante 5 días a 37ºC y en una atmósfera con 5% de CO_2.

Cuantificación de la respuesta linfoproliferativa.- **I) Método no radiactivo (MTT).-** Después de centrifugar la placa y eliminar el medio de los pocillos, se añadió a las células la solución stock de MTT (sal de tetrazolium de color amarillo cuando se encuentra en solución, y que se convierte en un compuesto insoluble de color violeta por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas). El cambio a color violeta se midió por espectrofotometría, siendo la absorbancia función de la concentración del colorante violeta en la muestra problema. Para poder llevar a cabo dicha medición se incubó la mezcla durante 90 min a 37ºC y 5% de CO_2 y se solubilizó el colorante con dimetilsulfóxido, midiéndose la absorbancia (A_{590}) en un lector ELISA. **II) Método radiactivo (Timidina tritiada).-** Se añadió a cada pocillo de la placa 1 µCi de timidina tritiada (^3H), que fue incorporada por el ADN de los linfocitos activados. Tras una incubación de 5 h a 37ºC y en una atmósfera de 5% de CO_2, se recogieron las células (Tomtec Harvester 96® automático). La radiactividad se midió con líquido de centelleo en un contador Beta (Wallac 1450 Microbeta) (Blacklaws et al, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) *Diferencias en el grado de estimulación linfocitaria dependientes del método de marcaje para la detección de linfoproliferación:* Como se observa en las Figuras 1 a) y 2 a), para ambos métodos de cuantificación, los controles produjeron respuestas significativas. Sin embargo, el método colorimétrico (MTT) no permitió detectar mayor estimulación por el virus en relación al control (Fig. 1b), diferencia que sí pudo detectarse con la timidina tritiada (Fig. 2b).

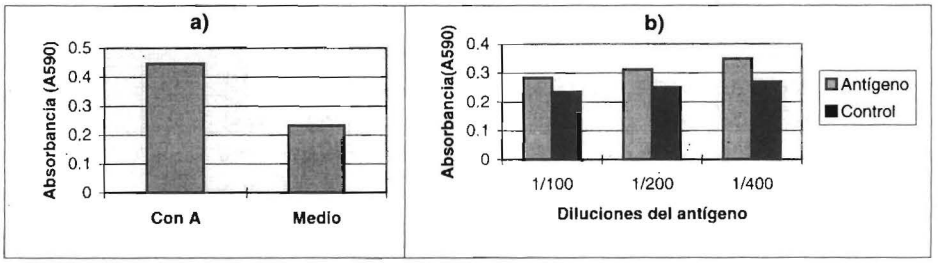


Figura 1.- Grado de linfoproliferación utilizando el método colorimétrico de MTT: a) Control positivo (Concanavalina A) y control de medio; b) Estimulación utilizando sobrenadante de cultivos celulares infectados por Maedi-visna (Antígeno) o no infectados (Control).

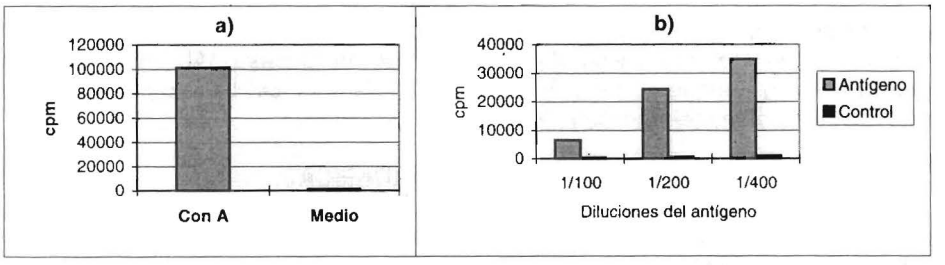


Figura 2.- Grado de linfoproliferación utilizando el método radiactivo de Timidina Tritiada: a) Control positivo (Concanavalina A) y control de medio; b) Estimulación utilizando sobrenadante de cultivos celulares infectados por Maedi-visna (Antígeno) o no infectados (Control).

Los datos muestran las medias de las absorbancias y de las cuentas por minuto (cpm). La comparación de dichos datos se realizó mediante un test *t* de Student.

El método convencionalmente usado por distintos laboratorios es el método radiactivo, que ha resultado de utilidad en este estudio, si bien se intentan mejorar en distintos laboratorios los métodos no radiactivos, por su interés en la salud, ecología y facilidad de utilización, simplificándose las instalaciones necesarias.

2) *Diferencias en la respuesta proliferativa dependientes del método de obtención del antígeno utilizado:* Como puede apreciarse en la Figura 3, utilizando el método **a)** para la obtención del antígeno, a mayor concentración vírica se produjo una mayor respuesta colorimétrica, lo que evidenciaba la proliferación de linfocitos; sin embargo, utilizando el método **b)** cuanto más diluído estaba el antígeno, mayor respuesta se obtenía. Esto pudo deberse a que en el primer caso, a pesar de que el título vírico era alto, la concentración en proteína era baja, lo que suponía una baja concentración de antígeno, y por eso, al diluirlo, la respuesta proliferativa era menor; sin embargo, en el segundo método, para un título vírico similar, había mayor concentración proteica que pudo inhibir la respuesta. Esto nos llevaría a pensar que la respuesta proliferativa sigue una distribución de Gauss, de manera que, a altas concentraciones, la proteína de envuelta puede resultar tóxica para los linfocitos, de ahí que la respuesta aumente al diluir el antígeno; mientras que, a bajas concentraciones, las mayores respuestas se obtengan a diluciones bajas del antígeno.

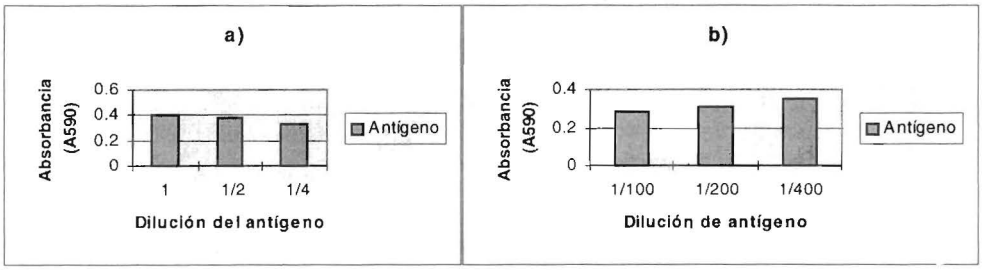


Figura 3.- Obtención de antígeno para estimulación linfocitaria utilizando directamente el sobrenadante de cultivos infectados (a), o tras su posterior concentración (b). El método de marcaje utilizado para ambos casos fue el colorimétrico.

Agradecimientos.- Financiado por INIA proyecto SC95-036 y Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA). Sincero agradecimiento a Enrique Morago, Miguel Angel Tejero y Fidel Lahoz, por su ayuda incondicional en el manejo de los animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bird et al., 1993. Journal of Virology Sept. 1993, 5187-5197.
2. Blacklaws et al, 1995. Journal of Virology (Submitted) 69, 1400-1407.
3. Thorsteinsdóttir et al., 1992. Journal of Neuroimmunology 41, 149-158.