

## Acción del virus de la rubéola sobre eosinófilos peritoneales de rata. Estudio ultraestructural

E. DOVALE, T. RODRÍGUEZ Y S. BARCELONA

*Dptos. de Biología Celular y Virología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba*

*Recibido: 31 de marzo de 1978*

**ABSTRACT.** A diminishing of eosinophils and neutrophil leukocytes in haematologic and viral studies has been stated but the way that virus acts has not been determined up-to-date. Because of this an electronical microscopic study on rat peritoneal eosinophils which received wild-type strain of the rubella virus has been done after several times post-inoculation. Destroyed eosinophils with great quantities of virus-like particles were found, at 24 and 48 hours but not in controls; being stated that one of the causes of diminishing to this cellular type in Rubella Syndrome was the direct destruction of eosinophils by the virus.

**RESUMEN.** En estudios hematológicos y virales del síndrome de la rubéola se ha planteado una disminución de los leucocitos eosinófilos y neutrófilos, sin que hasta el presente se haya determinado cómo actúa el virus para causar este hecho; por lo que se realizó el estudio al microscopio electrónico de eosinófilos peritoneales de rata, inoculados con el virus salvaje de la rubéola en diferentes tiempos post-inoculación. Se encontraron eosinófilos destruidos con gran número de partículas morfológicamente similares al virus, a las 24 y 48 horas, hecho que no fue observado en los controles, por lo que pudiera plantearse que una de las causas de la disminución de este tipo celular en el síndrome de la rubéola fuera por destrucción directa de los eosinófilos por el virus.

### INTRODUCCION

Los polimorfonucleares eosinófilos están presentes en todos los mamíferos, siendo muy abundantes en los roedores (*Miller y cols., 1966*).

Su función exacta no se conoce aunque se sabe que intervienen en los mecanismos de defensa pues se les encuentra en las mucosas respira-

toria e intestinal, sitios estos expuestos a antígenos y por tanto, de frecuente interacción antígeno anticuerpo (*Burnet, 1971*). Aunque se ha encontrado incremento de los eosinófilos en procesos alérgicos, parasitismo intestinal y en algunas neoplasias; su participación en los mismos no se conoce a pesar de que se ha demostrado su actividad fagocítica (*Cline y cols., 1968; Cotran y Litt, 1969*), así como la presencia de mieloperoxidasa y fosfatasa ácida en sus gránulos (*Archer y Hirsh, 1963*). Se ha reportado una disminución de los eosinófilos en el síndrome rubeólico, (*Cooper y cols., 1965; y Zinkham y cols., 1967*) sin que se conozca la causa de la misma, por lo que nuestro objetivo ha sido el estudio ultraestructural de eosinófilos peritoneales, durante una infección rubéolica provocada.

### MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, con un peso que osciló entre 200 y 250 g.

*Virus.* Se empleó la cepa de laboratorio M-23 del virus de la rubéola con cinco pases en células Vero y con un título de  $10^{5-8}$  DICT 50/ml. Como inóculo control se utilizó el medio sobrenadante que resultó de la centrifugación de células Vero de 10 días de sembradas, sometidas a congelación y descongelación.

*Técnica de Inoculación.* Mediante operación bajo anestesia, se implantaron dos láminas de Epon en la cavidad peritoneal de rata (*Kouri y cols., 1970*). Se realizaron tres series de experimentos y en cada uno las ratas fueron separadas en tres grupos: a las 24 horas de efectuada la operación, se inoculó en la cavidad peritoneal en un grupo de ratas, 10 ml de la cepa M-23, a otro grupo 10 ml de sobrenadante de células Vero y el grupo no recibió tratamiento.

*Microscopia Electrónica.* El material se extrajo a las 1, 24, 48 y 96 horas post-inoculación. Se fijó en glutaraldehído al 2.5% 1 hora a 4°C se lavó y post-fijó en OsO<sub>4</sub> al 1% durante 1 hora. Se deshidrató con alcoholes en concentraciones crecientes y se incluyó en Araldita. Los bloques se cortaron en el ultramicrotomo LKB, Ultratome III con cuchillas de cris-

tal, se montaron en rejillas de 400 mesh, se post-contrastaron con uranyl acetato y citrato de plomo, observándose en el microscopio electrónico Hitachi HS-7.

## RESULTADOS

Los eosinófilos de los controles no presentaron alteraciones, mostrando su núcleo polilobulado con la cromatina rechazada hacia la envoltura nuclear en forma de banda ancha, el citoplasma abarrotado de sus gránulos típicos (con su cristaloide central), microvesículas dispersas y escasas filopodias. (Fig. 1). A la hora de inoculados se encontró en algunos eosinófilos vacuolas fagocíticas (Fig. 2), mientras que otros fueron similares a los controles.

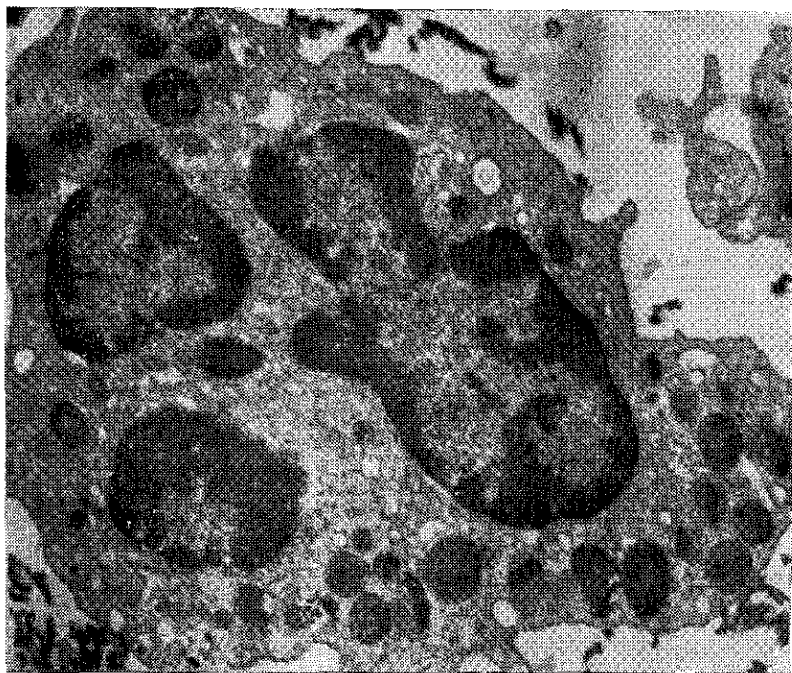


Fig. 1. Control de 24 horas. Eosinófilos de núcleo polilobulado, con sus granulaciones típicas. 13200 x.

tal, se montaron en rejillas de 400 mesh, se post-contrastaron con uranyl acetato y citrato de plomo, observándose en el microscopio electrónico Hitachi HS-7.

## RESULTADOS

Los eosinófilos de los controles no presentaron alteraciones, mostrando su núcleo polilobulado con la cromatina rechazada hacia la envoltura nuclear en forma de banda ancha, el citoplasma abarrotado de sus gránulos típicos (con su cristaloiide central), microvesículas dispersas y escasas filopodias. (Fig. 1). A la hora de inoculados se encontró en algunos eosinófilos vacuolas fagocíticas (Fig. 2), mientras que otros fueron similares a los controles.

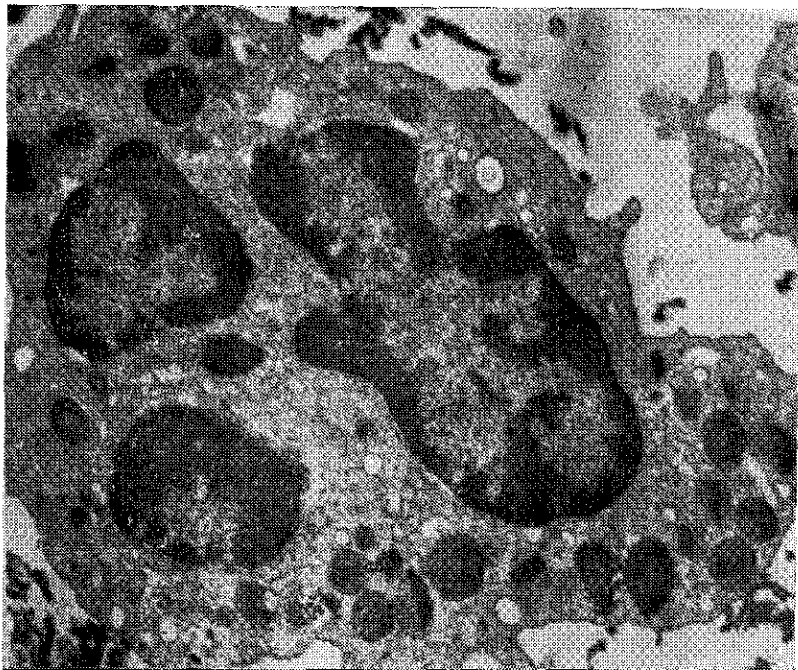


Fig. 1. Control de 24 horas. Eosinófilos de núcleo polilobulado, con sus granulaciones típicas. 13200 x.

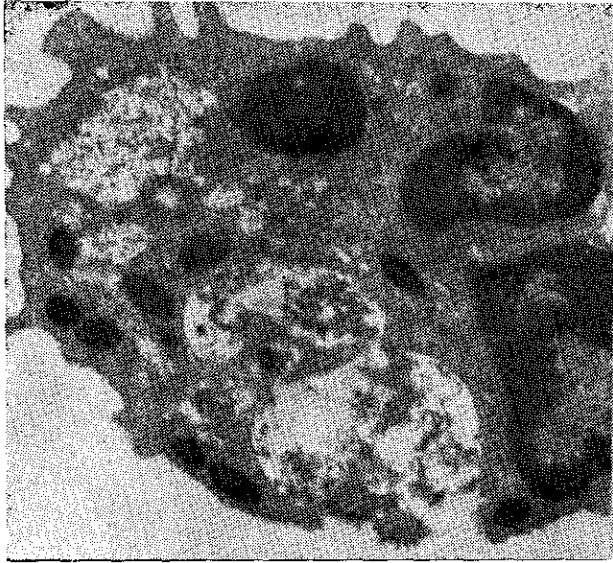
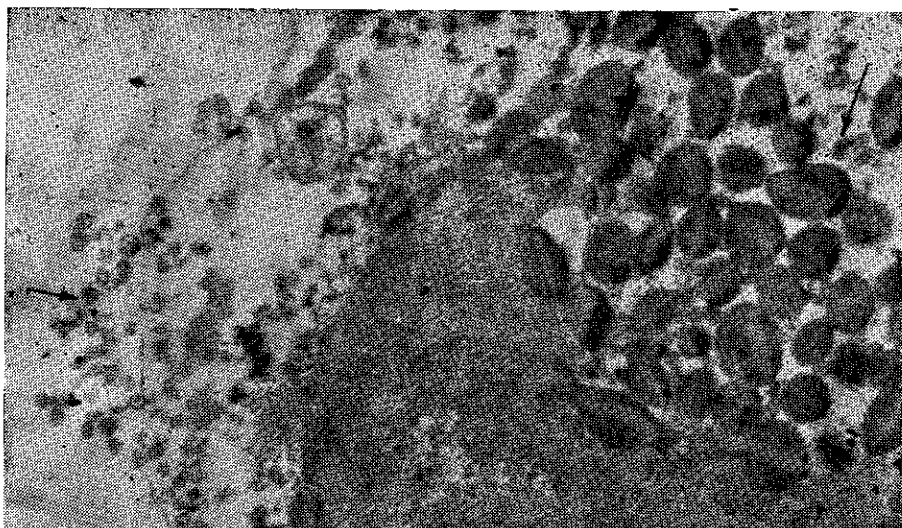


Fig. 2. Eosinófilo en el que se observa una vacuola fagocítica. Fotografía correspondiente a una inoculación con virus de la rubéola M-23, 1 hora post-inoculación. 13250 x.

A las 24 horas aunque se observaron eosinófilos con pocas alteraciones, muy similares a la Fig. 1, otros presentaron un alto grado de degeneración, destacándose en los mismos un gran número de partículas en su citoplasma, las cuales presentaron un núcleo denso y una zona clara rodeada por una membrana; las dimensiones de estas partículas variaron de 52,4 nm, las más pequeñas, a 77,1 nm las mayores. En zonas donde existía destrucción de la membrana plasmática, se podían observar partículas saliendo al exterior (Figs. 3 y 4). En estas células parcialmente destruidas, las granulaciones eosinófilas típicas se polarizaban hacia una zona perinuclear. El núcleo presentaba zonas de destrucción de su envoltura y lisis de la cromatina.

A las 48 horas se encontraron restos de eosinófilos dentro de vacuolas fagocíticas de macrófagos peritoneales y eosinófilos bien conservados.



tividad de partículas morfológicamente similares al virus, nos hace suponer que son éstas las causas de la destrucción ya que un aspecto similar de los eosinófilos no se observa en los controles. Estos resultados corroboran uno de los planteamientos de Zinkham y cols., (1967) que al realizar un estudio hematológico y viral de niños con el síndrome de la rubéola encuentran entre otras alteraciones disminución de los eosinófilos, planteando sin poderlo demostrar, que podía ser por destrucción de dicha célula.

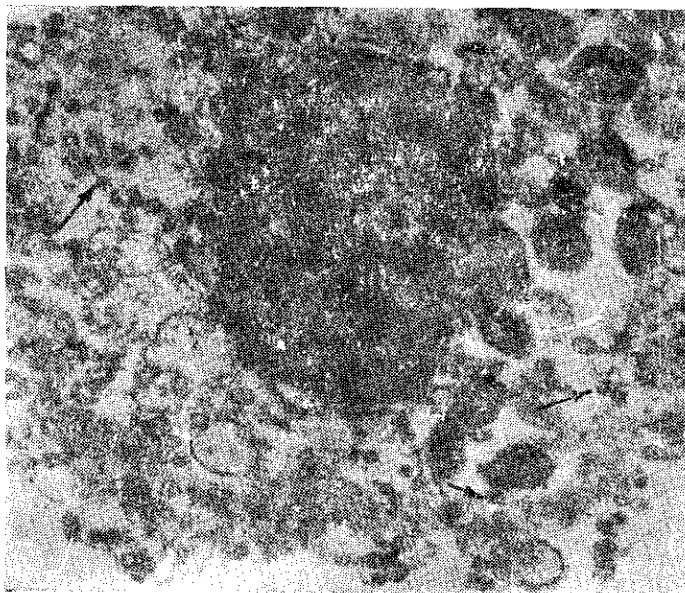


Fig. 4. Eosinófilo del exudado peritoneal a las 24 horas post-inoculación. Partículas similares al virus son señaladas con flechas. 32400 x.

La aparición de eosinófilos con una morfología normal en todos los tiempos estudiados puede deberse a que este virus se multiplica en forma de microfocos, descrito en cultivo de tejidos por Mc Carthy, (1969) con una técnica similar a la nuestra por Barcelona y cols., (1977); o a un aflujo de nuevos eosinófilos a la cavidad peritoneal.

A las 96 horas se encuentran restos de eosinófilos dentro de las vacuolas fagocíticas de los macrófagos, y los eosinófilos que están en el medio no presentan signos de alteración; lo que pudiera explicarse por una recuperación de las células de la cavidad peritoneal, ya que el aislamiento viral demostró sus títulos máximos al quinto día post-inoculación (*Barcelona y cols., 1977*).



Fig. 5. Eosinófilo del exudado peritoneal a las 96 horas post-inoculación, se observa una relación íntima con fibras colágenas.

### CONCLUSIONES

Se demuestra por primera vez la presencia de gran número de partículas similares al virus de la rubéola en eosinófilos peritoneales de ratas, muchos de los cuales son destruidos a las 24 horas post-inoculación, liberándose al exterior las partículas. A las 48 y 96 horas se observaron eosinófilos cuya estructura fue similar a los controles, además de encontrarse algunos restos dentro de vacuolas fagocíticas de macrófagos.

## RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración técnica de las compañeras Amelia Capote y Ma. Elena Ramos y al compañero Frank Pino por las fotografías realizadas.

## REFERENCIAS

- ARCHER G. T. AND HIRSH J. G. Isolation of granules from Eosinophil leukocytes and study of their enzyme content. *J. Exp. Med.* 118, 277, 1963.
- BARCELONA S. A., KOURÍ G. Y DOVALE E. Interacción del virus de la rubéola con los macrófagos peritoneales de ratas "in vivo", *Revistas CENIC, Ciencias Biológicas* (en imprenta).
- BURNET M. Cellular Immunology. 148-160. Melbourne University Press. Great Britain. 1971.
- CLINE M. J., HANIFIN J. AND LEHRER R. I. Phagocytosis by human eosinophile. *Blood*, 32, 922, 1968.
- COOPER L. L., GREEN R. H., KRUGMAN S., GILES J. P. AND MIRICK G. S. Neonatal Thrombocytopenic purpura and other manifestations of Rubella Contracted in utero. *Amer. J. Dis. Child.* 110, 416, 1965.
- COTRAN R. S. AND LITT M. The entry of granule-associated peroxidase into the phagocytic vacuoles of Eosinophils. *J. Exp. Med.* 129, 1291, 1969.
- KOURÍ J., STOYANOV J., VALENTI J. Y ANCHETA O. Método para el estudio en microscopía electrónica de macrófagos peritoneales en capa unicelular. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 2, 111, 1970.
- MC CARTHY K. Cell Cultures Useful for the Study of Rubella. *Amer. J. Dis. Child.* 118, 78, 1969.
- MILLER F., DE HARVEN E. AND PALADE G. The structure of eosinophil leukocytes granules in rodents and in man. *J. Cell Biol.* 31, 349, 1966.
- ZINKHAM W. H., MEDEARIS D. N. JR. AND ORBORU J. E. Blood and Bone-marrow finding in congenital rubella. *J. Peatr.* 71, 512, 1967.