

Características del efecto citopatogénico del virus de la rubeola en células RK-13

G. KOURÍ, A. AGUILERA, P. RODRÍGUEZ Y Y. SELIVANOV

Laboratorio de Virología CNIC

(Virus Rubeola en Células RK-13)

Recibido en: Marzo 1971

ABSTRACT. A morphologic study was made following the sequences of degenerative events after the inoculation of RK-13 cells with rubella virus. Phase microscopy was employed for fresh preparations and fluorescent microscopy for vital preparations using acridine orange. After 12 hours of the inoculation, the appearance of microfocus was verified and the different steps of cellular degeneration were described.

RESUMEN. Se realizó un estudio morfológico de las células RK-13 inoculadas con virus de la rubeola determinándose la secuencia de los eventos degenerativos que se llevan a cabo en las mismas. Se utilizó el contraste de fase para las preparaciones en fresco y, la microscopía fluorescente para las preparaciones vitales con naranja acridina. Se comprobó la aparición de los microfocos desde las 12 horas después de la inoculación, describiéndose las distintas etapas de la degeneración celular.

INTRODUCCION

El efecto citopatogénico (ECP) del virus de la rubeola se describió por Weller y Neva, (1962) en células de cultivo primario de amnios humano, era un efecto tardío y de difícil reconocimiento. Mc Carthy, (1963) señaló por primera vez la aparición de un ECP evidente en células de cultivo continuo de riñón de conejo (RK-13) inoculados con virus de la rubeola. Se reportó posteriormente el ECP del virus en células de cultivo continuo de córnea de conejo (SIRC) por Leerhoy, (1965); Vahery, (1965) lo describió en las células de riñón de hamster recién nacido (BHK-21) siendo ésta la línea celular en donde se obtuvieron títulos virales mas altos Liebhaber y Rhim, (1967) trabajando individualmente lo describieron en células de cultivo continuo de riñón de mono verde africano, VERO. Otros autores han reportado efecto en otras líneas celulares de uso menos frecuente. (Veronelli y Maassab, 1965 y Ginalp, 1965).

Nos proponemos en este trabajo hacer un estudio detallado, utilizando técnicas de contraste de fase para las preparaciones frescas y de fluorescencia para las preparaciones teñidas con naranja acridina, con vistas, a determinar la secuencia e interpretar los eventos que ocurren como consecuencia de la interacción del virus de la rubéola con la célula hospedero, en este caso la línea celular RK-13.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de tejidos.

Las células de cultivo continuo de riñón de conejo (RK-13) provenían de la American Type Cultures Collection y fueron pasadas en nuestro laboratorio utilizando el medio 199 suplementado con un 10% de suero de ternero para el crecimiento, y con un 2% para el mantenimiento. La penicilina y estreptomycin se utilizaron en las concentraciones habituales. Los cultivos se hicieron sobre cubreobjetos incluidos en tubos de Leighton, o en placas de Petri incubadas en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Virus

Se utilizaron la cepa Baylor recibida del Instituto Nacional de Epidemiología y Microbiología de Sofía, Bulgaria, que estaba adaptada a las células RK-13, con un título de 1.5×10^5 , dosis infectivas 50% en cultivo de tejidos (DICT₅₀) por ml, y la cepa Judith gentilmente entregada a nosotros por el Profesor K. Mc Carthy, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Liverpool, la cual tenía en el momento de usarla 2 pases en células de cultivo primario de riñón de mono y 40 pases en células RK-13 con un título de $2, 3 \times 10^5$ DICT 50/ml.

Inoculación.

La misma se realizó cuando el monolayer era confluyente habitualmente a los 3 ó 4 días después de la siembra utilizándose una multiplicidad de infección de 0,1. El tiempo de adsorción osciló entre 45 y 60 minutos a temperatura ambiente y se usó el medio de mantenimiento con un 2% de suero de ternero inactivado. No se hizo cambio de medio durante el experimento. La temperatura de incubación fue de 35°C.

Preparaciones microscópicas

Las preparaciones en fresco se montaron con una gota del mismo medio de cultivo. En las vitales se utilizó la naranja acridina con una concentración de 1:1 000 del colorante en solución salina fisiológica a pH 6,8. Como montante se utilizó una solución de hidroquinina al 1:100 en suero fisiológico a pH 6,5, para estabilizar la fluorescencia. El tiempo de coloración fue de 5 minutos a temperatura ambiente y los cubreobjetos fueron sellados con parafina. Las observaciones se realizaron entre 10 y 20 minutos después de terminada la coloración.

Observaciones microscópicas

Se hicieron utilizando el Fotomicroscopio de la Karl Zeiss. Para la microscopía fluorescente se utilizó la lámpara HBO-200.

Las observaciones se hicieron cada 12 horas hasta las 24 horas y a partir de este momento cada 24 horas hasta las 240 horas. El esquema de observaciones se determinó realizando experimentos preliminares con el fin de escoger el mejor régimen.

RESULTADOS

En las observaciones correspondientes a las 12 horas después de la inoculación, pudimos observar una tendencia de las células a la formación de conglomerados, así como la aparición de algunos cuerpos refringentes en el monolayer (Fig. 1). En la coloración vital estos conglomerados fueron muy evidentes (Fig. 2). A las 48 horas se observaron algunas células desprendidas, existía evidencia de destrucción celular dada por la aparición de detritus celulares en el medio, se pudieron observar algunos espacios vacíos en el monolayer y los conglomerados celulares eran muy evidentes (Fig. 3). Los mismos estaban constituidos por un número variable de células (entre 10 y 50) y formaban verdaderos microfocos (Fig. 4), en su centro los límites celulares y nucleares no se precisaban, apareciendo como masas granulosas sin forma definida que se levantaban sobre el monolayer. Los cuerpos refringentes aumentaron en número y estaban constituidos por células redondas individuales o a veces fusionadas que presentaban signos de degeneración. A las 72 horas en los microfocos se observó destrucción y desprendimiento

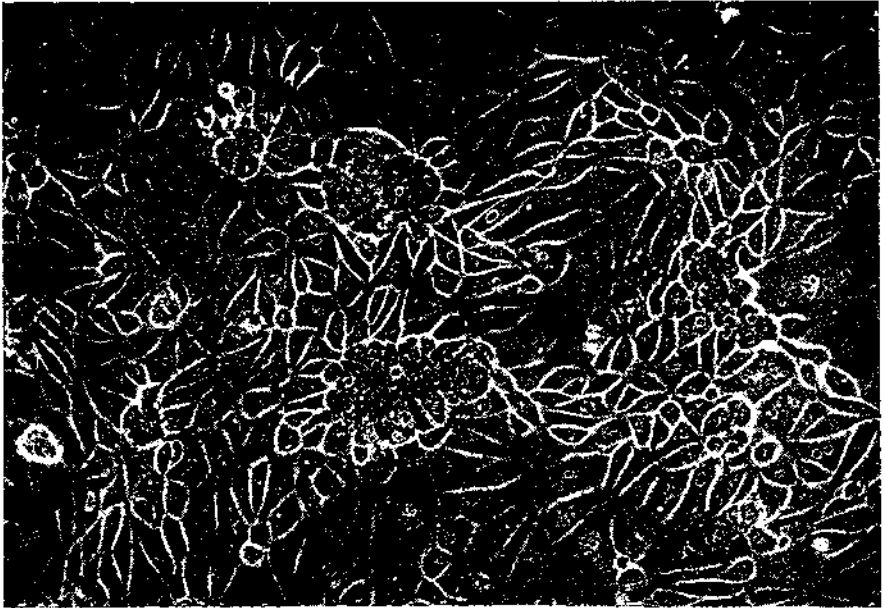


FIG. 1. Contraste de fase (160 x) microfocos (→) 12 horas después de la inoculación.

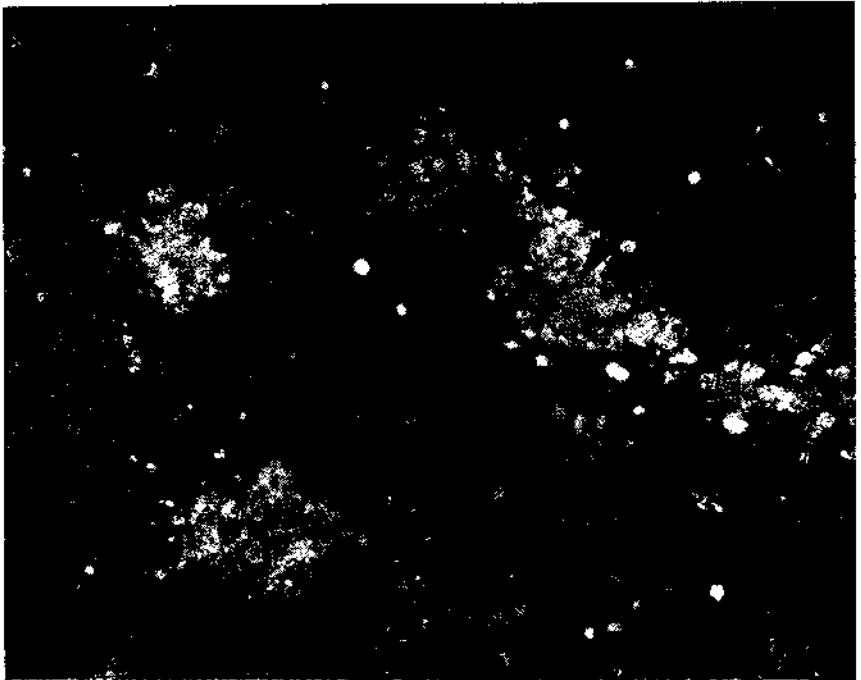


FIG. 2. Naranja acridina coloración vital (160 x) microfocos (→).

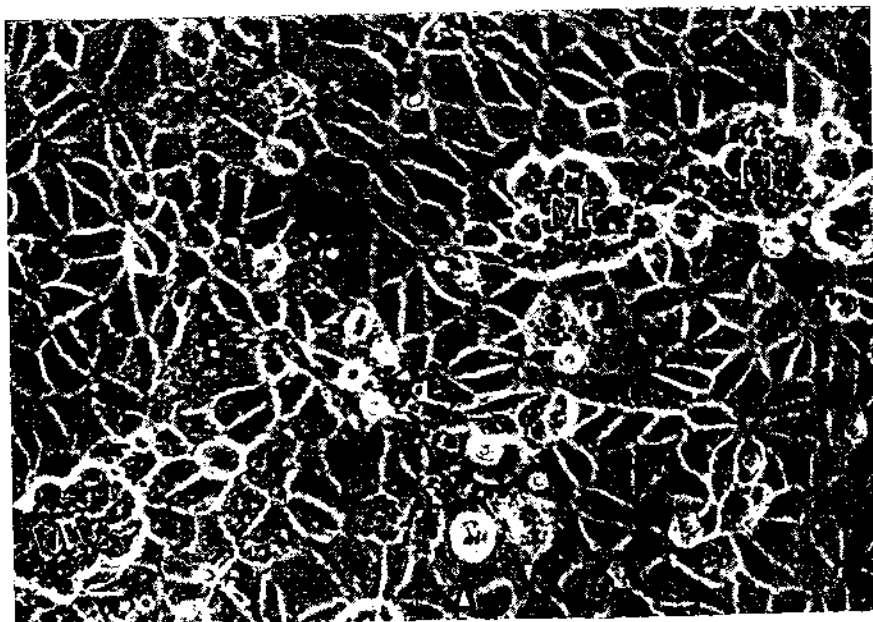


FIG. 3. Contraste de fase (256 x) se observan microfocos (Mf) así como células refringentes (→). 48 horas después de la inoculación.

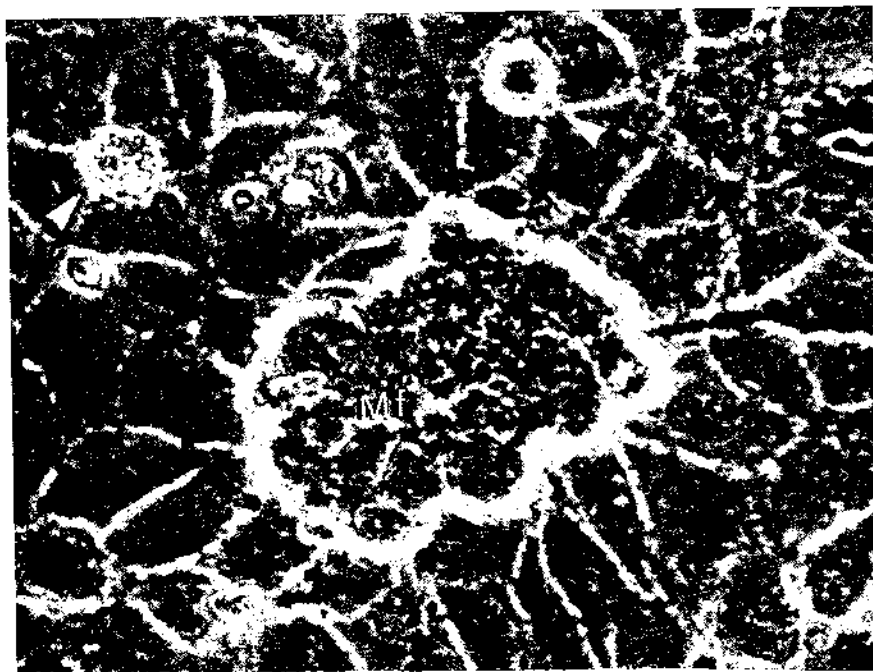


FIG. 4. Contraste de fase, (640 x) se puede observar un microfoco típico (Mf) en donde los límites celulares se han perdido. Células refringentes (→). 48 horas después de la inoculación.

celular, granulación intensa de las células, se hizo evidente la aparición de nucléolos anulares o la ausencia de los mismos (Fig. 5). Se comenzó a ver alteraciones nucleares que consistían fundamentalmente en una redistribución del material nuclear, el núcleo apareció con bordes irregulares y retraído, observándose ocasionalmente un halo claro alrededor del mismo, estos cambios nucleares se observaron en células con marcada degeneración citoplasmática (Fig. 6). Entre los microfocos existían células con distintos grados de alteración y se veían aún células normales. En las preparaciones con naranja acridina los microfocos se hicieron bien evidentes, en los mismos las células estaban cargadas de granulaciones de gran tamaño que tomaban el color rojo naranja intenso.

En las observaciones siguientes pudimos comprobar que las alteraciones hasta aquí señaladas se extendieron al resto del monolayer hasta que, a las 120 horas más del 50% de las células aparecían afectadas. A las 240 horas se terminaron las observaciones existiendo entonces degeneración celular marcada y extensa, caracterizada tanto por alteraciones citoplasmáticas como nucleares, siendo estas últimas menos frecuentes. Se observaron células completamente destruidas y otras en las cuales se comprobó gran número de masas citoplasmáticas refringentes, aisladas o confluentes. Algunas de estas masas tenían límites bien precisos, en ocasiones rechazaban al núcleo (Fig. 9), mientras otras presentaron límites difusos con tamaño a veces mayor al del núcleo celular (Fig. 7).

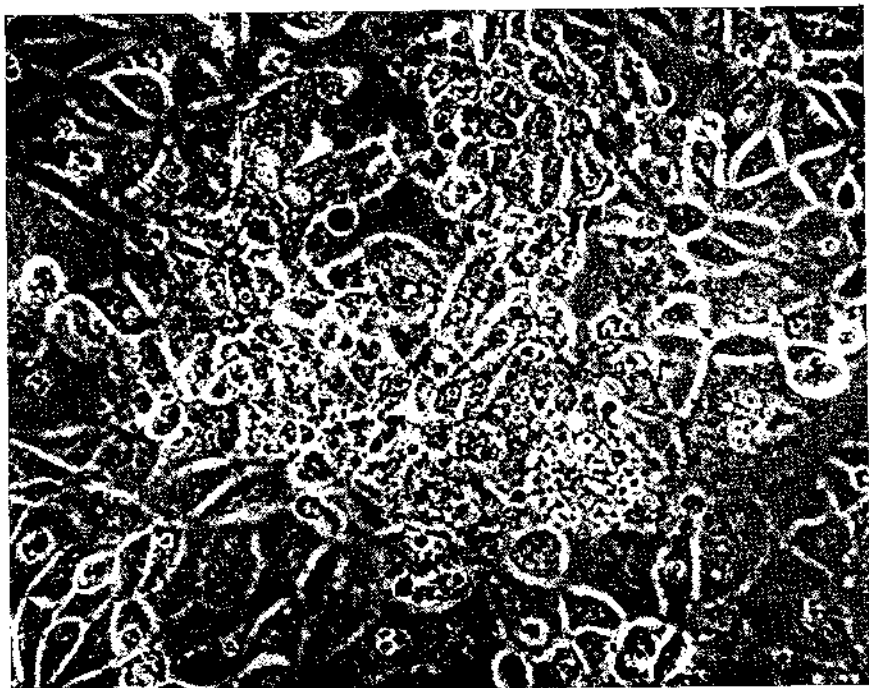
En la coloración vital también se comprobaron estas masas citoplasmáticas que tomaron color rojo naranja intenso (Fig. 9). En los controles celulares este tipo de masa citoplasmática se veía sólo ocasionalmente y por lo general, eran de menor tamaño.

Debemos señalar que debido al asincronismo de la infección viral en cualquier etapa del experimento nos fue posible encontrar células individuales o grupos de células en distintas fases del proceso de degeneración; desde aquellas que estaban prácticamente normales hasta las que como las descritas a las 240 horas presentaban un avanzado EPC.

No comprobamos diferencias entre los resultados obtenidos con las dos cepas empleadas.

FIG. 5. Contraste de fase (256 x) destrucción celular marcada a las 72 horas después de la inoculación en una zona del monolayer. Se observan espacios vacíos, y la aparición de nucléolos anulares (→).

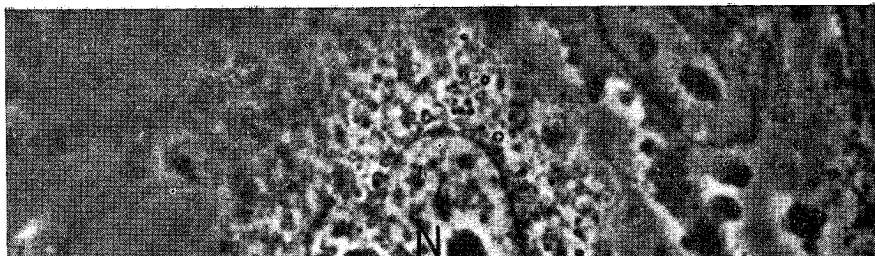
FIG. 6. Contraste de fase (1,600 x) marcada alteración celular, observándose cambios nucleares que consiste en retracción e irregularidad del núcleo. (N) y redistribución del material nuclear se ven nucléolos anulares (→).



5



6



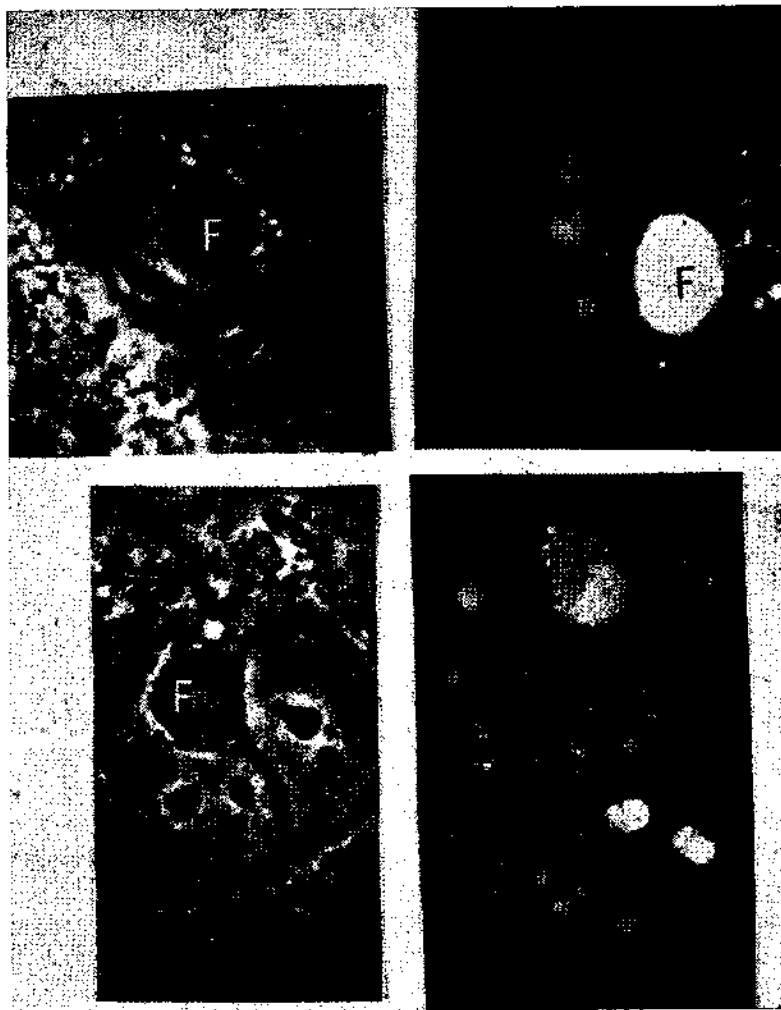


FIG. 9. Se pueden observar en esta composición fotográfica el aspecto de los fagosomas (F) en contraste de fase y en coloración vital con naranja acridina a las 240 horas de la inoculación. (1,600 x).

FIG. 7. Contraste de fase (1,600 x). 168 horas después de la inoculación. Se observa una masa amorfa (m) que rechaza a los núcleos (N) de dos células vecinas.

FIG. 8. Contraste de fase (1,600 x) 240 horas después de la inoculación. Tres células con citoplasma literalmente lleno de masas amorfas (m), dos de los núcleos se ven rechazados por las mismas.

DISCUSION

En nuestras observaciones hemos comprobado la aparición de los microfocos descritos por Mc. Carthy, utilizando la microcinematografía (Mc. Carthy, 1969), el cual hizo un estudio detallado de la aparición y evolución de los mismos hasta las 70 horas después de la inoculación. En nuestro caso y después de repetir 6 veces la experiencia hemos encontrado que los microfocos, aunque efectivamente, son bien evidentes a las 40 horas aparecieron en momentos tan iniciales de la infección viral como son las 12 horas después de la inoculación. El proceso de degeneración celular se inicia por el citoplasma celular siendo más tardío el efecto sobre los nucléolos y núcleos.

La replicación del virus de la rubeola en este sistema celular, al menos, es evidentemente lenta pues pudimos comprobar en nuestros experimentos preliminares que al hacer cambios de medio el ECP se detenía y aún llegaba a desaparecer, reapareciendo posteriormente. Este fenómeno se puede interpretar en relación al estímulo que para la multiplicación celular constituye un medio de cultivo fresco, frente a una replicación viral lenta, siendo en este caso positivo el balance de las células que se dividen con respecto a las células que se destruyen, además al cambiar el medio estamos eliminando todo el virus libre que ya se ha producido. Esta interpretación está de acuerdo con los estudios realizados por Mc. Carthy, el cual comprobó que las células vecinas a las zonas afectadas, se extendían y dividían para ocupar los espacios vacíos dejados por las células desprendidas. También nos permite este fenómeno entender la posibilidad señalada por otros autores (Hoskins y Plotkin, 1967 y Svedmyr, 1965) de establecer cultivos crónicamente infectador por el virus de la rubeola mediante pases frecuentes de las células inoculadas. Este ritmo lento de la replicación del virus se evidencia también por el tiempo prolongado que es necesario para lograr un efecto citopatogénico que afecte casi todo el monolayer, aún con cepas virales bien adaptadas al sistema celular.

Los cuerpos granulosos que se observan en contraste de fase como masas irregulares grisáceas y refringentes se corresponden a nuestro entender con las masas eosinófilas de gran tamaño que Dudgeon describió en esta línea celular a los 7 u 8 días después de la inoculación (Dudgeon y col., 1964) y que nosotros interpretamos como material fagocitado por las células viables, que en su actividad para ocupar los espacios vacíos encuentran detritus celulares que engloban en sus citoplasmas.

El color rojo naranja en la coloración vital es determinado por la concentración que alcanza el fluorocromo dentro de las vacuolas fagocíticas o fagosomas, de

acuerdo a la interpretación que de esta reacción histoquímica hacen otros autores (Allinson, 1967, Allinson y Young, 1969).

Este trabajo lo estamos complementando con trabajos en microscopía electrónica que nos permitirán alcanzar una mayor comprensión de la patología celular producida por el virus de la rubeola.

REFERENCIAS

- ALLINSON A. Lysosomes in Virus Infected Cells. *Perspectives in Virology* 29-61. Academic Press, London-New York, 1967.
- DINGLE J. T. y FELL H. B. Lysosomes in Biology and Pathology. Vol. 2. North Holland Research Monographs Frontiers of Biology, London-Amsterdam, 1969.
- DUDGEON J. A., BUTTER N. R. AND PLOTKIN S. A. Further Serological Studies on the Rubella Syndrome. *Brit. Med. J.*, 2, 155, 1964.
- GÜNALP A. Growth and Cytopathic Effect of Rubella Virus in a Line of Green Monkey Kidney Cells. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* (NY), 118, 85, 1965.
- HOSKINS J. M. y PLOTKIN S. A. Behaviour of Rubella Virus in Human Diploid Cells Strains. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21, 283, 1967.
- LEERHOY J. Cytopathic Effect of Rubella Virus in a Rabbit-cornea Cell Line. *Science*, 149, 633, 1965.
- LIEBHARER II., RIORDAN J. T. y HORSTMANN D. M. Replication of Rubella Virus in a Continuous Line of African Green Monkey Kidney Cells (VERO). *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* (NY), 125, 636, 1967.
- MC. CARTHY K., TAYLOR ROBINSON C. H. y PILLINGER S. E. Isolation of Rubella Virus from Cases in Britain. *Lancet III*, 592, 1963.
- MC. CARTHY K. Cell Cultures Useful for the Study of Rubella. *Amer. J. Dis. Child.*, 118, 78, 1969.
- RHIM J. S. y SCHELL, K. Cytopathic and Plaque Assay of Rubella Virus in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (VERO). *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* (N.Y.) 125,602, 1967.
- SVEDMYR A. Persistent Infection with Rubella Virus in RK-13 Cells. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 16, 464, 1965.
- VAHERI A., SEDWICK W. D., PLOTKIN S.A., MAES R. Cytopathic Effect of Rubella Virus in BHK-21 Cells and Growth to High Titers in suspension Cultures. *Virology*, 27, 239, 1965.
- VERONELLI, J. A., MAASSAB, H. F. Characterization of Growth of Rubella Virus in LLC-MK2 Cells. *Arch. Ges. Virusforsch.* 16, 426, 1965.
- WELLER T. H., NEVA F. A. Propagation in Tissue Culture of Cytopathic Agents from Patients with Rubella-like Illness. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* (NY), 111, 215, 1962.