

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN LÁSER AL ESTUDIO DE LA PATOGENIA Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN DIFERENTES ESPECIES HOSPEDADORAS

¹Marcaccini, A.; Quiroga, M.; López, M.; Nieto, J. ²Alemañ, N.

¹Cátedra de Histología II y Embriología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario (Argentina). Dpto. de Ciencias Clínicas Veterinarias y ²Dpto. de Anatomía y Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. (España). amarcac@unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los estudios moleculares a nivel de ADN, ARN o proteínas de células o tejidos han revolucionado en gran medida la investigación y el diagnóstico en el campo de la medicina. La heterogeneidad celular que presentan los órganos o tejidos puede afectar la interpretación o el resultado final de estos estudios. La microdisección láser (MDL) ha posibilitado superar este obstáculo ya que permite el aislamiento de células o grupos de células específicos mediante corte y captura a partir de tejidos complejos. La posibilidad de combinar la MDL con otras técnicas ha ampliado aún más sus aplicaciones, permitiendo la identificación de secuencias de ácidos nucleicos, la determinación de la expresión de productos génicos determinados o el estudio de alteraciones genómicas que se aplican en campos muy diversos como estudios en patología molecular, biología celular, genómica, inmunología y virología entre otros. En el presente trabajo hemos optimizado una técnica que combina MDL, inmunohistoquímica (IHQ) y PCR aplicada al estudio de la patogenia y diagnóstico del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) en diferentes especies hospedadoras. Los objetivos fueron: 1- Poner a punto la técnica de MDL, IHQ y PCR combinadas para aislar células de interés y amplificar secuencias específicas de genes del VEA a partir de secciones de tejidos procedentes de diferentes especies hospedadoras. 2.- Aplicar la combinación IHQ, MDL y PCR al estudio de la patogenia y diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky.

METODOLOGÍA

Se utilizaron muestras de ganglio trigémino (GT) y tonsilas de cerdos vacunados contra el VEA, y sistema nervioso central (SNC) de visones, perros, cabras y zorros infectados de forma natural o experimental con el VEA. Las mismas fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Sobre secciones de 5 µm se realizó una tinción de H-E para evaluar lesiones, además una técnica IHQ indirecta para identificar células infectadas empleando un anticuerpo policlonal anti-VEA. Las células inmunorreactivas se aislaron de las secciones de tejido utilizando MDL y a continuación se analizó mediante PCR el ADN extraído, utilizando iniciadores específicos para las glucoproteínas gE y gD del VEA. Se empleó ADN mitocondrial porcino como control positivo de la reacción.

RESULTADOS

En los animales infectados las lesiones provocadas por el VEA consistieron en ganglioneuritis y encefalomiелitis no purulentas de grado variable. En los visones la reacción inflamatoria fue casi inexistente, siendo la lesión más llamativa una vasculopatía no inflamatoria que afectó las arteriolas leptomeníngicas y sobre todo los capilares corticales

cerebrales y cerebelares, con engrosamiento de la pared, depósito de material fibrinoide en el espacio perivascular, licuefacción del tejido nervioso adyacente y ocasionalmente células inflamatorias intra y/o perivasculares.

Animales infectados: en las secciones de GT y tronco del encéfalo (TE) de perro, cabra y zorro se identificaron y aislaron selectivamente células inmunorreactivas al virus. En la reacción de PCR se emplearon iniciadores para los genes gE y gD del VEA. Los resultados obtenidos demostraron la especificidad de los iniciadores, amplificando los dos productos con el tamaño esperado.

Cerdos vacunados: a partir de secciones de GT se aislaron de forma separada por un lado neuronas ganglionares y por otro las células satélite. De las secciones de tonsila se aislaron independientemente el epitelio estratificado de revestimiento y los folículos linfáticos. Debido a que la cepa empleada para vacunar los cerdos presentaba una delección en el gen que codifica gE, para analizar el ADN obtenido se utilizaron los iniciadores para gD. La reacción de PCR demostró que los iniciadores fueron específicos, al amplificar un único producto con el tamaño esperado en todas las muestras evaluadas.

Visones infectados: a partir de las secciones procedentes de TE se identificaron y aislaron mediante MDL vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre que mostraban una morfología bien definida. Por otra parte de la corteza cerebral se identificaron y aislaron solo los vasos sanguíneos lesionados. El material obtenido de ambas zonas fue procesado de manera independiente para la extracción de ADN. La reacción de PCR permitió confirmar la presencia del VEA en los vasos sanguíneos de la región del TE y vasos lesionados de la corteza cerebral de los visones infectados en la mayoría de las muestras analizadas.

DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

(1) Hemos optimizado la combinación IHQ, MDL y PCR para identificar las células infectadas y tras su captura amplificar los genes gD y gE del VEA. (2) La amplificación por PCR de gD a partir de ADN de secciones de cerdos vacunados permitió identificar la cepa vacunal latente en dos de los lugares más frecuentes de establecimiento de latencia. (3) La demostración de la infección de los endotelios vasculares del SNC refuerza la hipótesis de algunos autores respecto a que la disfunción endotelial podría ser la base del deficiente desarrollo de la respuesta inmunitaria frente al VEA en los visones. Finalmente podemos concluir que la posibilidad de seleccionar células o grupos de células a partir de secciones de tejidos confiere a la MDL un potencial de trabajo muy amplio dentro del campo de la Histología e histopatología veterinaria.