

Determinación mediante inmunohistoquímica de la acción directa del Virus de la Inmunodeficiencia Felina en el sistema nervioso de gatos infectados naturalmente

Immunohistochemical determination of the direct action of Feline Immunodeficiency Virus on the nervous system of naturally infected cats

PASSERI, MC¹; SURANITI, A¹; BOVIEZ, J²; GERMANO P²; FONTANALS, A³; LOMBARDO, DM^{2,4}; GÓMEZ, N¹.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Clínica Médica de Pequeños Animales.

²Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Histología y Embriología. ³Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Inmunología. ⁴CONICET.

RESUMEN

El Virus de Inmunodeficiencia Felina es utilizado como modelo para el estudio de infecciones por otros lentivirus, como el de la Inmunodeficiencia Humana. Promueve una inmunodeficiencia progresiva y crónica por el agotamiento principalmente de los linfocitos TCD4+. Se ha investigado mucho esta enfermedad pero en gatos infectados experimentalmente. En este estudio se ha evaluado el cuadro neurológico producido por el virus de inmunodeficiencia felina en forma natural y en la etapa de portador asintomático sin infecciones oportunistas. Se eligió esta fase pues en ella el virus tiene un crecimiento lento y los pacientes presentan un sistema inmune aún no muy dañado. En los gatos con inmunodeficiencia felina en etapa de portador asintomático con signos neurológicos que fallecieron se efectuó un examen de necropsia tomándose muestras del sistema nervioso central. En la histopatología se encontró una encefalitis con infiltrado linfoplasmocitario de carácter leve y se identificó al Virus de Inmunodeficiencia Felina por medio de inmunohistoquímica, no solo en las células de la glía sino también en las neuronas. La inmunohistoquímica demostró la presencia del virus ubicado en relación con las lesiones histopatológicas halladas en el sistema nervioso central, esto demostraría que las lesiones son debidas a Virus de Inmunodeficiencia Felina.

Palabras clave: (VIF), (portador asintomático), (signos neurológicos), (histopatología), (inmunohistoquímica).

ABSTRACT

The Feline Immunodeficiency Virus is used as a model for the study of infections by other lentiviruses, such as Human Immunodeficiency. It promotes a progressive and chronic immunodeficiency mainly due to the depletion of TCD4 + Lymphocytes. This disease has been extensively investigated but in experimentally infected cats. In this study, the neurological picture produced by the Feline Immunodeficiency Virus has been evaluated in a natural way and in the stage of asymptomatic carrier without opportunistic infections. This phase was chosen because in it the virus has a slow growth and the patients present an immune system not yet very damaged. In cats with feline immunodeficiency in the asymptomatic carrier stage with neurological signs that died, a necropsy examination was performed, taking samples from the central nervous system. Histopathology revealed encephalitis with a mild lymphoplasmacytic infiltrate and the Feline Immunodeficiency Virus was identified by immunohistochemistry, not only in the glia cells but also in the neurons. Immunohistochemistry demonstrated the presence of the virus located in relation to the histopathological lesions found in the central nervous system, this would demonstrate that the lesions are due to Feline Immunodeficiency Virus.

Key words: (FIV), (asymptomatic carrier), (neurological signs), (histopathology), (immunohistochemistry).

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF) es un virus T-linfotrópico que pertenece a la familia Retroviridae, género Lentivirus. Sus características estructurales y fisiopatología son similares al del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Están estrechamente relacionados por producir en su huésped natural una serie de alteraciones a nivel del sistema inmunitario que promueven una inmunodeficiencia progresiva y crónica. Se ha demostrado que el VIF puede replicarse en una gran variedad de tipos celulares. Su célula blanco preferencial es el linfocito T CD4 + pero también infecta a los T CD8+, linfocitos B, macrófagos y las células del linaje neuronal. La infección por el virus se produce por el desequilibrio entre la destrucción del sistema inmune y la capacidad de respuesta de las restantes defensas antivirales del huésped para resistir el avance viral^{5,6,10}.

El estudio realizado por el investigador Dow con gatos infectados experimentalmente con VIF, mediante inoculación intracerebral y periférica, fue el primero en describir la infección neurológica viral a nivel del cerebro felino¹. Los resultados de este estudio demostraron lo mucho que se asemejan los efectos patógenos del virus a nivel del SNC, en la infección por VIH en seres humanos y en la infección por VIF en el gato. Sin tener discernida totalmente la fisiopatología de la infección viral en el sistema nervioso central (SNC), estas similitudes en la enfermedad aguda neu-

rológica de ambos lentivirus, reforzó aún más el uso de felinos VIF+ como modelo animal de investigación⁸.

Los principales signos neurológicos que se describen en los estudios incluyen nistagmo, ataxia, convulsiones, temblores de intención, anisocoria, disminución del reflejo pupilar, aumento de la agresividad, comportamientos anormales y déficits en la función motora cognitiva^{1,4,5,6,8,11,12}. Los cambios en el comportamiento del sueño y la disminución de la capacidad cognitiva en los gatos son alteraciones muy sutiles muchas veces difíciles de apreciar clínicamente. Mediante PCR se identificó el VIF en los tejidos del núcleo caudado, el mesencéfalo, tronco cerebral rostral y caudal^{1,8} corteza cerebral, cerebelo y del líquido cefalorraquídeo. El estudio histopatológico de las lesiones a nivel del SNC muestra la presencia de peri-infiltrados vasculares de células mononucleares y nódulos gliales (astrogliosis y microgliosis)⁸.

VIF invade al SNC desde la etapa temprana después de la entrada periférica del virus⁷. La infección es acompañada por la producción inmediata de niveles constantes de progenie viral en el cerebro incluso en presencia de una respuesta inflamatoria local. La eliminación ineficaz del virus en el tejido nervioso por la respuesta inmune antiviral local establece la formación de un depósito de virus en el cerebro, vital para la dinámica viral. El animal infectado persistentemente y en ausencia de signos clínicos de infección, permite una distribución eficiente por todo el parénquima del SNC y en las etapas fina-

les de la enfermedad las altas cargas virales determinan una mayor lesión neuronal. En consecuencia, las terapias convencionales anti-retrovirales reducen la carga viral sistémica pero no afectan la carga viral a nivel cerebral. El SNC actúa como un compartimiento único de replicación continua de lentivirus que puede dar lugar a cepas con distinto neurotropismo y/o neurovirulencia y actúa como reservorio viral⁷.

El principal objetivo de este trabajo consiste en la demostración de la acción de VIF en el sistema nervioso de pacientes infectados en forma natural. Este enfoque es original y también primordial pues los aportes valiosos de muchos investigadores que han trabajado en animales infectados experimentalmente, requieren la demostración acerca de si en los pacientes espontáneos se producen los mismos signos. Asimismo, por medio de los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos se pueden establecer el tipo de lesiones inducida por VIF. Para evitar las confusiones que pueden generar los agentes oportunistas, los que también provocan signos neurológicos, es que se descartaron los pacientes que transitan la etapa final de la enfermedad. El modo elegido para seleccionar los pacientes en estudio fue la estadificación, tal como se puede apreciar en materiales y métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

La población en estudio estuvo representada por gatos infectados naturalmente con VIF, diagnosticados mediante la técnica de inmunocromatografía y confirmados por PCR, atendidos en el Servicio a Terceros de Enfermedades infecciosas felinas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. Con el objetivo de determinar en qué fase de la enfermedad estaba el gato infectado, se usó la determinación de la relación CD4+/CD8+ por medio de Citometría de flujo ^{4,6}. Esta es la prueba de oro para estadificar a los pacientes.

Las muestras de sangre con las células ya marcadas (Mouse anti cat CD4+-FI-, Serotec y Mouse anti Feline CD8+-ALPHA/BETA, RPE) son analizadas a través de un citómetro de flujo Becton Dickinson FAC-Scalibur y dan información sobre el porcentaje de los tipos celulares CD4+, CD8+. Cuando de los resultados obtenidos de la muestra, el valor de la relación CD4+/CD8+ resulta menor de 0,7 se considera que el paciente está transitando la eta-

pa de SIDA. Los pacientes con una relación CD4+/CD8+ menor a 0,7 fueron descartados de este estudio. También fue una condición previa la exclusión de aquellos pacientes con infecciones oportunistas dado que en su patogenia podrían causar signos neurológicos. Se buscaron los oportunistas de mayor frecuencia: *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma haemofelis*. Los animales afectados por oportunistas también fueron separados del estudio.

Se conformó un grupo de doce gatos VIF+, infectados naturalmente, en fase asintomática⁴ con signos neurológicos manifiestos. El nombre de la fase "asintomática" no implica que no hay signos, generalmente son apenas perceptibles o muy sutiles y no son detectados fácilmente por los tenedores responsables de los gatos y por los clínicos no especializados en el tema. A veces se requieren pruebas neurológicas y electrofisiológicas (Potenciales evocados auditivos y visuales) para detectarlos. De los gatos fallecidos de este grupo se tomaron muestras del SNC y se acondicionaron apropiadamente hasta su procesamiento en el laboratorio de Histopatología del Hospital Escuela y luego en el de Inmunohistoquímica, del área de Histología de la FCV. UBA.

Histopatología

Se efectuaron los procedimientos habituales de inclusión en parafina, cortes de 4µm y las tinciones de hematoxilina-eosina para todas las muestras de biopsia. Las muestras para el estudio histopatológico y para inmunohistoquímica fueron conservadas en formol bufferado.

Técnica de Inmuno-Histoquímica (IHQ)

Para confirmar la localización del virus de inmunodeficiencia felina en las neuronas del SNC de los gatos VIF+ se utilizó la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ). La proteína p24 del VIF es una proteína que se localiza en la envoltura del virus y es útil en el diagnóstico de la enfermedad. La técnica de IHQ consiste en incubar tejido nervioso de los gatos VIF+ con el anticuerpo primario específicos contra la proteína p24 viral con una molécula marcadora cromógena. El fundamento de esta técnica se basa en la reacción enzima-sustrato que transforma un cromógeno incoloro en un producto final coloreado. La presencia de determinada coloración en la muestra de tejido

parafinado permite la confirmación de la presencia viral en las células del tejido nervioso.

La técnica de IHQ que se implementó en este estudio es el Método de la Estreptavidina-Biotina Marcada (Labelled Streptavidina Biotin: LSBA). Es una técnica de método indirecto. Para identificar al antígeno, en la muestra de tejido, se incubó con el Ac primario específico monoclonal (FIV p24 PAK3-2C1, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La reacción Ag-Ac es incolora y para poder demostrar su presencia se lo enfrenta con un anticuerpo secundario Anti Ac primario que está conjugado con Biotina. Este Ac secundario posteriormente forma un complejo con moléculas de Estreptavidina marcada con peroxidasa. La enzima peroxidasa que se utiliza para catalizar la inmunoreacción es el peróxido de rábano picante. Al adicionar la diaminobencidina, sustrato cromógeno de la enzima peroxidasa, da como resultado de esta interacción un precipitado coloreado insoluble revelando su presencia. Esta inmunomarcación positiva es fácilmente observable al microscopio como un precipitado color marrón que permite identificar el lugar donde se depositaron los complejos Ag Ac primario.

Evaluación ética

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL Protocolo 2017/17). Los propietarios dieron su consentimiento firmado.

RESULTADOS

Observaciones histopatológicas

En las muestras histopatológicas del SNC de los gatos VIF+ en etapa asintomática con signos neurológicos, la principal lesión patológica inducida por VIF fue una encefalitis similar a lo reportado en pacientes infectados por VIH-1. Estas lesiones eran muy sutiles.

Se observó proliferación de la microglia y astrocitos (gliosis). También se detectaron procesos degenerativos en la mielina. Estas infiltraciones se observaron con mayor frecuencia en los leptomeninges, cerca del plexo coroideo.

En la figura 1a se observa la infiltración de células mononucleares perivasculares en el cere-

bro. En la figura 1b se observan: Hiperemia y gliosis difusas. Focos de satelitosis peri neuronal. Focos de desmielinización, edema perivascular y moderada vacuolización tisular de sustancia blanca. Ocasionales focos de infiltrado linfocitario perivascular. Neuronas con picnosis nuclear, tigrolisis y acúmulos intracitoplasmáticos de lipofuscina. Las lesiones eran consistentes con una encefalitis no supurativa moderada, con cambios degenerativos crónicos secundarios.

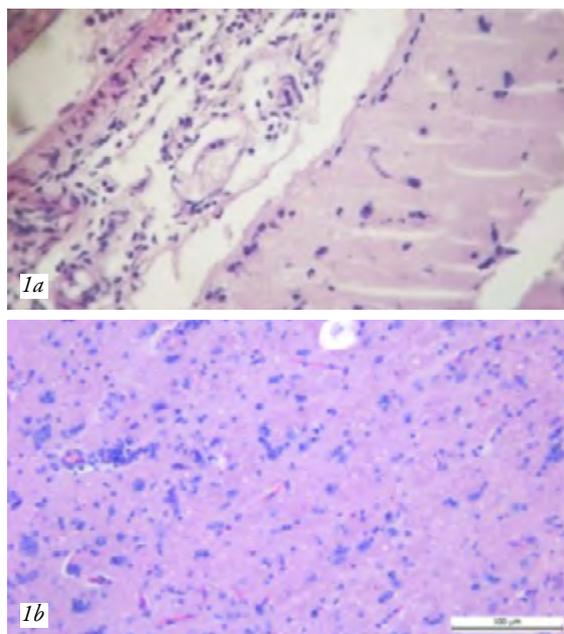


Figura 1: Corte histológico del Cerebro de gato VIF+ en etapa de portador asintomático con signos neurológicos, tinción de HE 10x. 1a: Encefalitis con manguito perivascular en el centro. 1b: Encefalitis no supurativa.

Resultados de IHQ en el SNC

En las muestras de tejido del SNC las neuronas (de diferentes tipos y tamaños) presentaron inmunomarcación (IM) citoplasmática positiva y nuclear negativa. Esta marca se mantuvo en aquellas células que estaban sufriendo neuronofagia. Se encontraron células de la glía: cantidad variable, según la zona de IM nuclear positiva. En zonas con presencia de gliosis, la mayoría de los componentes celulares presentaban IM nuclear positiva, habiendo presencia también de células negativas. El mismo patrón se observó en las imágenes de satelitosis. En la sustancia blanca con presencia de células de la glía se detectó marcación específica de localización nuclear, sin marca específica ni fondo (background) en la pared de los vasos sanguíneos ni en neuropilo. (Fig. 2)

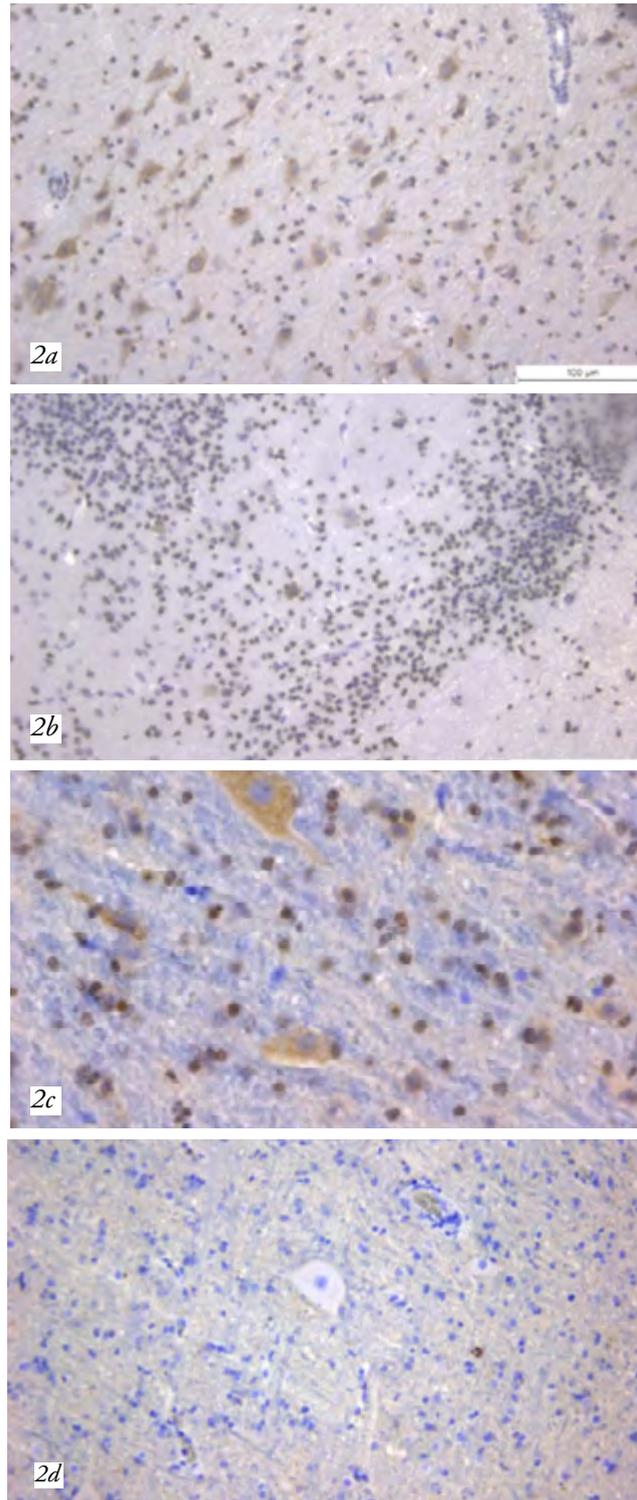


Figura 2. Corte histológico de encéfalo de gato VIF+ infectado naturalmente con inmunohistoquímica (Labelled Streptavidina Biotin para p24 de VIF), contratinción HE. Bar = 100µm. **2a:** Se visualiza la inmunomarcación celular y además los vasos sanguíneos del encéfalo. **2b:** se detecta inmunomarcación celular nuclear y gliosis. **2c:** se observa la inmunomarcación positiva, infiltrado inflamatorio y neuronas con inmunomarcación citoplasmática positiva. **2d:** control negativo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El gato VIF+, en la etapa asintomática de la enfermedad, puede presentar alteraciones neurológicas¹. En esta investigación los gatos VIF+ en la etapa asintomática de la enfermedad con signos neurológicos presentaron a nivel histológico del SNC una encefalitis con infiltrado linfoplasmocitario de carácter leve y se demostró la presencia viral en el sistema nervioso central por medio de inmunohistoquímica.

En la histopatología, al igual que en estudios previos,^{2, 3, 8} se observó la presencia de infiltrados celulares compuestos por linfocitos pequeños y células plasmáticas. Estos se detectan acompañados de infiltrados perivasculares, en el cerebro, el cerebelo y en las meninges. El cuadro celular caracteriza a la neuroinflamación generando cuadros de encefalitis crónicas no granulomatosas y/o meningitis, las que producen signos neurológicos leves o nulos en los pacientes y hay también un daño neurodegenerativo con disminución del número de neuronas^{12,15}.

Si bien el compromiso neuronal ha sido encontrado previamente reportado por otros investigadores en gatos infectados en forma experimental^{3,8} en el presente estudio se han hallado similares lesiones en gatos infectados en forma natural.

Del mismo modo que ocurre en los humanos infectados por VIH, en el caso de VIF se produce una activación neuroinmune, activación de la microglia y de los astrocitos, infiltración con leucocitos y producción de citoquinas y proteasas. En consecuencia, se detectaron cambios neuroinflamatorios en el SNC^{11, 12, 15}. Los mencionados cambios producen lesiones neuronales en el cerebro, en los ganglios basales y a nivel de la corteza².

En este estudio la técnica de IHQ se ha usado con el fin de identificar el VIF en cortes de tejido nervioso procesado de forma rutinaria y para mejorar la comprensión de la neuropatogenicidad de la enfermedad^{9,13}. La técnica de IHQ es utilizada en numerosas investigaciones para determinar la presencia del VIF en los gatos domésticos a nivel del miocardio¹⁴, en las células inmunes de los centros germinales y en las regiones paracortical de los linfonódulos, en el infiltrado periarteriolar linfático del bazo, en las células mononucleares de la lámina propia del intestino, en la mucosa asociada a tejido linfoide en el íleon, en el timo, la médula ósea y el hígado¹³.

Los resultados de la IHQ revelaron desde mínimos cambios neuropatológicos del SNC hasta inflamación con activación microglial y degeneración-apoptosis neuronal lo que podría depender de la cepa de VIF^{9,11,12}.

Los resultados de este estudio demuestran la presencia del Ag viral a nivel del SNC. Esto se fundamenta en que se detectaron neuronas con IM citoplasmática positiva y nuclear negativa. Se encontraron células de la glía con IM nuclear positiva. En zonas con presencia de gliosis, la mayoría de los componentes celulares presentaban IM nuclear positiva. El mismo patrón se observó en las imágenes de satelitosis. En la sustancia blanca con presencia de células de la glía se detecta marcación específica de localización nuclear.

Como conclusión de este estudio podemos establecer que el virus produce, básicamente, una encefalitis con infiltrado linfoplasmocitario de carácter leve, que se traduce en signos clínicos leves a inexistentes, los que a veces necesitan ser confirmados por estudios neurológicos y electrofisiológicos. La IHQ demuestra la presencia del virus ubicado en relación con las lesiones histopatológicas halladas en el SNC. Esto indicaría que las lesiones y las manifestaciones clínicas neurológicas en los gatos VIF + en etapa asintomática son debidos a la acción directa de VIF.

La originalidad de los resultados de este estudio, en cuanto a la identificación de VIF por IHQ, se fundamenta en que es la primera vez que se reportan estos resultados en pacientes infectados en forma natural, con signos neurológicos y cambios de comportamiento y que la identificación viral se concreta en relación con las lesiones histopatológicas de dichos pacientes. Esto permite corroborar la semejanza, en este aspecto, entre la enfermedad experimental y la natural o espontánea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dow, S.W.; Dreitz, M.J.; Hoover, EA. Feline immunodeficiency virus neurotropism: Evidence that astrocytes and microglia are the primary target cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 35(1-2):23-35.
2. Fletcher, N. F.; Brayden, D. J.; Brankin, B.; Callanan, J. J. Feline immunodeficiency virus infection: a valuable model to study HIV-1 associated encephalitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 123(1-2):134-137
3. Fletcher, N. F.; Meeker, R. B.; Hudson, L. C.; Callanan, J. J. The neuropathogenesis of feline immunodeficiency virus infection: barriers to overcome. *Vet J.* 2011; 188(3):260-269.
4. Gómez N. V.; Castillo, V. A.; Gisbert, M. A.; Pisano, P.; Mira, G.; Fontanals, A.; Cabrera Blatter, M. F. Immune-endocrine interactions in treated and untreated cats naturally infected with FIV. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011. 43 (3-4):332-337.
5. Hartmann, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143: 190-201.
6. Hartmann K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses* 2012; 4(11): 2684-2710.
7. Hein, A.; Schuh, H.; Thiel, S.; Martin, J. P.; Dörries R. Ramified feline microglia selects for distinct variants of feline immunodeficiency virus during early central nervous system infection. *J Neurovirol.* 2003; 9(4):465-476.
8. Meeker, R. B.; Hudson, L. Feline Immunodeficiency Virus Neuropathogenesis: A Model for HIV-Induced CNS Inflammation and Neurodegeneration. *Vet Sci.* 2017; 4(1):14.
9. Miller, C.; Bielefeldt-Ohmann, H.; MacMillan, M.; Huitron-Resendiz, S.; Henriksen, S.; Elder, J.; VandeWoude, S. Strain-Specific Viral Distribution and Neuropathology of Feline Immunodeficiency Virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143(3-4):282-291.
10. Mohammadi, H.; Bienzle D. Pharmacological Inhibition of Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Viruses*, 2012. 4: 708-724.
11. Poli, A.; Abramo, F.; Di Iorio, C.; Cantile, C.; Carli, M.A.; Poltera, C.; Vago, L.; Tosoni, A.; Costanzi, G. Neuropathology in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus: a morphological, immunocytochemical and morphometric study. *J Neurovirol.* 1997; 3(5):361-368.
12. Power, C. Neurologic disease in feline immunodeficiency virus infection: disease mechanisms and therapeutic interventions for NeuroAIDS. *J Neurovirol.* 2018; 24(2):220-228.
13. Rogers, A. B.; Mathiason, C. K.; Hoover, E. A. Immunohistochemical localization of feline immunodeficiency virus using native species antibodies. *Am J Pathol.* 2002; 161 (4):1143-1151.
14. Rolim, V. M.; Casagrande, R. A.; Wouters, A. T. B.; Driemeier, D.; Pavarini, S. P. Myocarditis caused by Feline Immunodeficiency Virus in Five Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Comp Pathol.* 2016; 154(1):3-8.
15. Ryan, G.; Grimes, T.; Brankin, B.; et al. Neuropathology associated with feline immunodeficiency virus infection highlights prominent lymphocyte trafficking through both the blood-brain and blood-choroid plexus barriers. *J Neurovirol.* 2005; 11(4):337-345.