

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN  
CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL  
RUBULAVIRUS PORCINO.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Presenta

**JESUS / HERNANDEZ LOPEZ**



UNAM CCH

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO D.F. 1987**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología, del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina de la UNAM; en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; y en el Laboratorio de Virología del Departamento de Producción Animal Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.**

**Esta Tesis fue dirigida por los doctores Edgar Zenteno Galindo y Julio Reyes Leyva**

**Este trabajo fue financiado por CONACyT (2151PM y F-643M9406) y PAPIIT-UNAM (IN209295).**

**Gracias a DIOS por la vida y la salud.**

**Quisiera dedicar este trabajo a alguien muy especial para mí, alguien que desde que está a mi lado, me ha brindado su amistad, su comprensión, su tiempo, su cariño, su amor. Gracias a ella, he tenido las fuerzas suficientes para luchar cada día y no detenerme frente a las adversidades de la vida. Sería difícil continuar describiendo en unas líneas todo lo que TÚ significas para mí; así que lo único que me queda por decir es, gracias OLIVIA; TE AMO.**

**A la memoria de mi MADRE, que siempre ha estado Viva en mi corazón\*; a mi PADRE, por que gracias a su esfuerzo y apoyo he logrado culminar una meta más en mi Vida; a mis Hermanos, Ricardo, Estela, Leticia y Cesar, para siempre exista en ellos el espíritu de superación.**

**A mi ABUELITA, por que en ningún momento ha dejado de creer en Mí; a mis Tíos, Ricardo, Rene y Sofia; y a toda mi Familia, Compañeros y Amigos, en especial a la Sra. Inés y a su hijo Luis, por su apoyo.**

**Agradezco a Edgar, por todo el apoyo que me ha brindado; a todos mis compañeros de laboratorio; a mi Reyna Conch (por todos sus consejos y regaños), Gina, Paty, Flor, Karina, Blanca, maricela, el Dr. Chávez (por sus valiosos comentarios en los seminarios), Ricardo, Roberto, Pedro, David, Macario y la Sra. Rosa Nieto.**

**Julio, quiero agradecerte tu amistad, y todos los comentarios que me han ayudado para superarme cada día. No creas que he olvidado lo que escribiste en la tesis que nos regalaste: "Espero que algún día logren superar a su tututo"; voy por eso!**

**Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente, en especial al Dr. Pablo Hernández-Jáuregui.**

**Al Dr. Humberto Ramírez, y a todo el laboratorio de virología del Depto. de Producción Animal Cerdos**

**Al Dr. Miguel Gaxiola, por su amistad y su apoyo en el análisis histológico.**

**A los miembros de mi Jurado:**

**Dr. Luis Felipe Montaña  
Dr. Edgar Zenteno Galindo  
Dr. Julio Reyes Leyva  
Dra. Blanca Ruiz Ordas  
Dr. Pablo Hernández Jáuregui**

**A la Asociación de Porcicultores de Tecamachalco Pue., en especial al Dr. Francisco Pérez Ponce, por brindarme todo su apoyo y amistad.**

## INDICE.

Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción	
El Rubulavirus Porcino.....	3
La Enfermedad del Ojo Azul.....	8
Aspectos generales de la respuesta inmune frente a virus.....	11
Características de la respuesta inmune del cerdo.....	13
Objetivos.....	15
Material y Métodos	
Anticuerpos.....	16
Obtención del Virus.....	16
Titulación de virus.....	17
Determinación de la actividad hehaglutinante.....	17
Animales de experimentación.....	18
Histopatología.....	18
Detección de antígeno viral mediante Inmunofluorescencia.....	18
Determinación de Anticuerpos.....	19
Inmunotransferencias.....	20
Separación de células mononucleares (CMN).....	21
Identificación de las poblaciones celulares de sangre periférica por Citometría de Flujo.....	21
Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T.....	22
Ensayos de Proliferación.....	22
Identificación de las poblaciones estimuladas <i>in vitro</i> con el RvP.....	23
Identificación de las CMN reconocidas por el virus.....	23
Susceptibilidad de las CMN.....	24
Resultados	
Infección Experimental.....	25
Respuesta Humoral.....	33
Respuesta Celular.....	37
Interacción Virus-Célula.....	48
Discusión.....	51
Conclusiones.....	60
Perspectivas.....	62
Producción obtenida en la realización de este trabajo.....	63
Referencias.....	64

## RESUMEN.

El Rubulavirus Porcino (RvP) es responsable de la enfermedad del Ojo Azul en los cerdos, que se caracteriza por provocar alteraciones respiratorias, neurológicas, reproductivas y opacidad de la córnea en animales de todas las edades. Hasta la fecha, los estudios realizados en esta enfermedad han sido enfocados a conocer las características biológicas y estructurales del virus, así como a la estandarización de pruebas para un diagnóstico rápido y oportuno. Este es el primer trabajo que describe algunas características de la respuesta inmune celular y humoral de cerdos infectados experimentalmente con el RvP.

Nuestros resultados demuestran que todos los animales desarrollaron anticuerpos contra el virus después de haber sido infectados con el RvP, e identifican a la proteína HN es la proteína inmunodominante del RvP. Los ensayos de proliferación celular utilizando mitógenos policlonales y al virus, mostraron que los cerdos con respuesta celular deficiente desarrollan granulomas en epidídimo y atrofia testicular. Estas lesiones son, aparentemente, el resultado de la multiplicación del RvP en el epitelio pseudoestratificado del epidídimo. El análisis de las poblaciones celulares indicó, que en general existe una disminución gradual de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en todos los cerdos infectados; sin embargo, observamos que los animales que poseen el mayor porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, durante las primeras semanas de infección, y con elevados porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> durante la infección, no presentan granulomas. Los estudios de susceptibilidad demostraron que el RvP es capaz de multiplicarse en la población de monocitos, y no en los linfocitos. En este trabajo se muestra que la formación del granuloma en los cerdos infectados con el RvP es el resultado de la multiplicación viral en el epitelio pseudoestratificado del epidídimo, y a una respuesta celular inadecuada. Además sugiere que el virus podría utilizar a los monocitos y linfocitos como vía de transporte a los órganos blanco. Es importante destacar que este trabajo presenta los primeros resultados del análisis de la población doble positiva en una infección experimental del cerdo.

## SUMMARY.

The Porcine Rubulavirus (PvR) is the agent responsible of the pig's blue eye disease, which provokes respiratory, neurological and reproductive disturbs, and occasionally, corneal opacity in all affected pigs. To present, reports concerning this disease, have allowed to know the biological and structural characteristics of the PvR, as well as the development of techniques for a quick and appropriate diagnosis. This work describe the first report on the cellular and humoral immune response to PvR

Ours results showed that all pigs developed antibodies against the PvR after experimental infection; we identified the HN glycoprotein as the immunodominant protein of PvR. Proliferative assays on peripheral blood mononuclear cells, showed that pigs possessing deficient cellular immune responses developed granulomas on the epididimus and showed testicular atrophy, due to viral multiplication on the pseudostratified epithelium of epididimus. Analysis of cellular populations showed a gradual CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells diminution after infection, however, those pigs with a high proportion of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells during the first weeks after infection and with high CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells percentages during the infection did not develop granuloma. From all peripheral mononuclear cells, only monocytes were highly susceptible to virus multiplication. In this work we were able to show that granuloma formation, in PvR experimentally infected pigs, was caused by viral multiplication in pseudostratified epithelium in the epididimus and a deficient cellular immune response. In addition, we suggest that the monocyte and lymphocyte populations could be the transport vehicle for PvR to the target organ. This is the first report where an analysis of the double positive lymphocytes in an experimental porcine infection has been performed.



## INTRODUCCION.

### El Rubulavirus Porcino.

En 1981 se aisló un virus con actividad hemaglutinante a partir de un brote de meningoencefalitis de cerdos (Stephano *et al.*, 1981). Este virus ocasiona problemas neurológicos, respiratorios, reproductivos e induce opacidad de la córnea a cerdos de diferentes edades, siendo los animales menores de 20 días los más susceptibles a la infección. Estas características permitieron denominar a esta enfermedad como el Síndrome del Ojo Azul de los Cerdos (Stephano *et al.*, 1983). Moreno-López *et al.*, (1986) y Stephano *et al.*, (1988) identificaron independientemente este virus y lo denominaron virus La Piedad Michoacán, (LPM, por el lugar donde se aisló) y el Paramixovirus del Ojo Azul (POA), respectivamente; este virus posee la capacidad de aglutinar eritrocitos de cerdo, bovino, equino, carnero, ratón, ave y humanos A, B y O; y también posee actividad de Neuraminidasa. El virus es capaz de multiplicarse en una amplia variedad de líneas celulares, pero el efecto citopático después de 2 días de infección es más evidente en células BT (de cometa de bovino) y PK-15 (de riñón de cerdo). En células BT el efecto se caracteriza por formar algunos sincicios y la muerte de células que se desprenden de la monocapa; en las células PK-15 se presentan células vacuoladas y un mayor número de sincicios (Moreno-López *et al.*, 1986).

Ensayos de competencia con diferentes azúcares para inhibir el efecto citopático del virus LPM en células Vero (Reyes-Leyva *et al.*, 1993a), demostraron que como otros paramixovirus, el virus LPM reconoce ácido siálico, pero su especificidad es mayor por el trisacárido sialil-alfa-3,2-lactosa, la cual podría jugar un papel en el tropismo del virus, ya que se ha demostrado una amplia distribución de este azúcar en el sistema nervioso central en comparación con otros órganos (Reyes-Leyva 1993b).

El virus presenta resistencia a la actinomicina D, lo que indica que está formado por RNA de cadena negativa, y los estudios de microscopía electrónica mostraron un virus pleomórfico, de 150 a 300 nm, que es encapsulado y con proyecciones en su membrana, características comunes de los paramixovirus (Moreno-López *et al.*, 1986). El patrón electroforético en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras fue parecido a los virus Parainfluenza-3 y al virus de la enfermedad de Newcastle, pero estudios serológicos no mostraron alguna relación con estos virus por lo que se propuso que el virus LPM podría ser un paramixovirus no descrito con anterioridad (Moreno-López *et al.*, 1986). Otros paramixovirus aislados en cerdos han sido reportados en Alemania, Estados Unidos, Israel y Japón que ocasionan problemas neurológicos y/o reproductivos pero hasta la fecha no se ha establecido ninguna relación entre el virus LPM y otros paramixovirus que infectan al cerdo (Lipkind *et al.*, 1986).

La composición de las proteínas estructurales del virus LPM fue determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoprecipitación de cultivos celulares infectados y marcados selectivamente con diversos radioisótopos (Sundqvist *et al.*, 1990). Seis proteínas fueron identificadas: la proteína Mayor (L) de 200 kDa, que posee actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (Svenda *et al.*, 1997); la Nucleoproteína (NP) de 68 kDa, es una proteína de función estructural que da origen junto con el RNA a la nucleocápside viral; la glicoproteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) de 66 kDa, encargada del reconocimiento del celular, la proteína de Fusión (F) de 59 kDa, responsable de la fusión de las membranas virales y celular; la Fosfoproteína (P) de 52 kDa, que participa en eventos de regulación de la replicación y transcripción del genoma viral; y la proteína de Matriz (M), de 40 kDa, que participa en el ensamblaje de los viriones. La tabla 1 presenta los estudios que comparan el perfil electroforético del virus LPM con dos cepas del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus Parainfluenza-3 y el virus Sendai encontrando que existe gran similitud en la movilidad relativa de las diferentes proteínas de estos virus (Sundqvist *et al.*, 1990).

La secuencia nucleotídica de la proteína M (Berg *et al.*, 1991), presentó 1,107 nucleótidos que codifican para una proteína de 369 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 41.667 kDa que coincide con la  $M_r$  obtenida por PAGE-SDS. Esta secuencia también mostró 55% de homología en la secuencia nucleotídica y 46% en la secuencia de aminoácidos con la proteína M del virus de las Paperas, así como una rica secuencia de aminoácidos básicos para dar una carga positiva neta de +17.5. La carga positiva de la proteína de proteína M favorece su afinidad por las nucleoproteínas, reduciendo el gasto energético requerido para realizar el ensamble de la nucleocápside a las zonas de la membrana celular donde se expresan las glicoproteínas virales (Morrison *et al.*, 1988).

Proteína	VIRUS				
	LPM	PIV-3	Sendai	NDV	Mumps
L	200	200	200	200	200
HN	66	68	71	72	70
NP	68	65	58	53	72
F	59	54	49	53	61
P	52	79	79	53	45
M	40	39	38	37	40

Tabla 1. Perfil Electroforético de diferentes virus de la familia Paramixovirus, los valores indican el peso molecular en kDa. LPM, virus La Piedad Michoacán; PIV-3, virus Parainfluenza-3; NDV, virus del Newcastle, Mumps, virus de las Paperas. Tomado de Sundqvist *et al.*, 1990.

El gen de la proteína P consta de 1,374 nucleótidos incluyendo la señal poly A, y al menos tres proteínas se pueden codificar: la proteína V, P y C de 249, 404 y 126 aminoácidos respectivamente. El análisis de la secuencia del gen de la proteína P mostró que el virus LPM es el único Rubulavirus que presenta un marco de lectura abierto que codifica para la proteína C. (Berg *et al.*, 1992). La presencia de un marco de lectura abierto para la proteína C se considera característico de los miembros del género *paramyxovirus* (Murphy *et al.*, 1995).

El gen de la proteína F presentó 1,845 nucleótidos de largo y está estrechamente relacionado con los virus de las Paperas y el virus Simico-5. La secuencia codifica para una proteína de un peso molecular estimado en 58,3 kDa, sin embargo el peso identificado en PAGE-SDS fue de 59 kDa para la subunidad F<sub>1</sub> y 12 kDa para la F<sub>2</sub>, lo que da un total de 71 kDa para F<sub>0</sub>. Esto sugiere diferencias en el grado de glicosilación de la proteína, ya que posee cuatro sitios potencialmente glicosilables en la subunidad F<sub>1</sub> y uno en la F<sub>2</sub>. En general esta proteína presenta 45% y 42% de homología con la secuencia de amino ácidos de los virus Simico-5 y de las Paperas, respectivamente (Berg *et al.*, 1992).

El gen de la proteína HN codifica una proteína de 576 amino ácidos con un peso molecular estimado en 63.324 kDa, contra 66 kDa que presenta en PAGE-SDS, esta diferencia del peso molecular al igual que la identificada en la proteína F, se debe al efecto de la glicosilación ya que esta proteína posee cuatro sitios de glicosilación. La comparación en la secuencia de aminoácidos con el virus Simico-5 y el virus de las Paperas, mostró que existe una estrecha relación de homología de 43% y 41% respectivamente (Sundqvist *et al.*, 1991). En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método para purificar la proteína HN, y así poder analizar sus características físicoquímicas (Espinosa B. 1997); también se han realizado estudios con diferentes azúcares para identificar la especificidad del virus LPM (Reyes-Leyva J. 1993), y utilizando algoritmos computacionales se ha realizado la predicción y caracterización de algunos determinantes antígenicos (Zenteno R. 1997). Recientemente el virus LPM

fue clasificado dentro del género *rubulavirus*, subfamilia *paramixovirinae* y familia de *paramixoviridae* (Murphy *et al.*, 1995), debido a la estrecha relación biológica y estructural que el *Rubulavirus* Porcino presenta con el virus de la Parotiditis y el virus de la Parainfluenza (Tabla 2).

<b>FAMILIA PARAMIXOVIRIDAE</b>	
<b>Subfamilia Paramixovirinae</b>	
<b>Género Paramixovirus</b>	parainfluenza bovino 3 parainfluenza humano 1 parainfluenza humano 3 Sendai virus (parainfluenza murino 1)
<b>Género Morbillivirus</b>	distemper canino distemper del delfín sarampión virus de la peste de los pequeños rumiantes distemper de la foca distemper de la marzopa rinderpest
<b>Género Rubulavirus</b>	paramixovirus aviar 2-9 parainfluenza 2, 4a y 4b virus de la parotiditis humana virus de la enfermedad de Newcastle rubulavirus porcino parainfluenza simico 5 y 41
<b>Subfamilia Pneumovirinae</b>	
<b>Género Pneumovirus</b>	virus sincicial respiratorio bovino virus sincicial respiratorio humano virus neumónico del ratón rinotraqueítis del pavo

Tabla 2. Clasificación de la familia Paramixoviridae, tomado de Murphy *et al.*, 1995. Muestra que el virus LPM ha sido ubicado en el nuevo género Rubulavirus de la familia Paramixoviridae.

## **La Enfermedad del Ojo Azul.**

Los primeros brotes de la Enfermedad del Ojo Azul se observaron en La Piedad Michoacán en 1980 (Stephano *et al.*, 1981); en 1982 se reportó esta enfermedad en los estados de Guanajuato, Jalisco y en el Estado de México; en 1983 se observaron brotes en los estados de Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Yucatán, Tabasco, Puebla, Querétaro y D.F.; y en 1984 se identificó en Tamaulipas. Hasta la fecha la única zona libre de la enfermedad son los estados del noroeste, principalmente el estado de Sonora, y por el contrario, los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco que cuentan con la mayor población porcícola del país, representan también la zona con mayor incidencia de la enfermedad (Stephano *et al.*, 1994).

Hasta el momento se ha identificado a los cerdos como la única especie susceptible a la infección natural por el Rubulavirus Porcino; pero experimentalmente el virus puede infectar ratones, ratas, conejos, embriones de pollo y perros, sin que estos últimos lleguen a presentar signos clínicos de la enfermedad (Stephano *et al.*, 1993). La principal vía de contaminación es a través de animales infectados y de animales que permanecen asintomáticos. Las personas o vehículos que frecuentan granjas afectadas y granjas libres de la enfermedad son aparentemente una importante fuente de infección.

La infección producida por el RvP se transmite por contacto directo, posiblemente a través de secreciones. La vía natural de entrada es la oronasal (Stephano 1993). Experimentalmente se ha demostrado que el virus inicia su replicación en mucosa nasal y tonsilas, de ahí se difunde por las vías aéreas a los pulmones (Allan *et al.*, 1996), pero utiliza las terminaciones del nervio olfatorio para diseminarse en el sistema nervioso central de cerdos neonatos (Reyes-Leyva, manuscrito en preparación).

De los cerdos afectados, los menores de 20 días son los que presentan la sintomatología más severa, así como la tasa de mortalidad más alta. De los síntomas observados en estos cerdos, los signos nerviosos son los más evidentes y progresivos, caracterizados por incoordinación motora, espasmos musculares, rigidez de miembros posteriores, marcha y postura anormal, postración, hipersensibilidad, pedaleo, ceguera, nistagmos, fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado y estreñimiento. La muerte ocurre generalmente 48 horas después de la postración. En un 10% de los casos se presenta opacidad corneal unilateral, aunque se han observado casos de opacidad bilateral. Se afectan clínicamente el 20-25% de las camadas de menos de 20 días y la mortalidad en cerdos afectados con signos nerviosos es cercana al 90%. Los cerdos mayores de 20 días son menos susceptibles a la enfermedad y únicamente un 4% de los cerdos afectados presenta opacidad de la córnea. Los signos nerviosos son escasos y la mortalidad generalmente nula, a menos que se encuentre asociada a otras enfermedades o en granjas con problemas de manejo (Stephano *et al.*, 1993).

Las cerdas reproductoras en general se mantienen asintomáticas, pero en ocasiones presentan opacidad de la córnea y anorexia pasajera. Los parámetros reproductivos muestran que las cerdas infectadas retornan al estro, disminuyendo la fertilidad hasta un 20%. El porcentaje de lechones nacidos muertos es del 20% y el porcentaje de fetos momificados del 5%. Los sementales generalmente permanecen asintomáticos, observándose ocasionalmente elevación de la temperatura y baja en el consumo de alimento. El signo clínico más evidente es la disminución en la fertilidad a consecuencia de la orquitis y epididimitis unilateral, la cual muchas veces es reversible (Stephano *et al.*, 1988; Stephano *et al.*, 1990; Campos *et al.*, 1991).

Las lesiones macroscópicas son ocasionales y generalmente se presentan en cerdos menores de 20 días sin ser patognómicas de la enfermedad. Se observa congestión meníngea con aumento ocasional en el fluido cerebro-espinal, atrofia serosa de la grasa coronaria y distensión del estómago con restos de leche, neumonía con hepaticación en el vértice del lóbulo apical y cardíaco, opacidad y edema corneal

unilateral, pero se han observado casos de opacidad bilateral. También se han reportado hemorragias pericárdicas y en el riñón. En sementales infectados es común la presencia de granulomas en epidídimo y la atrofia testicular (Campos *et al.*, 1991).

Las principales lesiones histológicas que han sido identificadas en animales infectados están localizadas en el cerebro, observándose una encefalomyelitis nosupurativa que afecta principalmente al tálamo y corteza cerebral caracterizada por gliosis focal y multifocal, necrosis neural, neurofagia, meningitis y coroiditis. La severidad de la lesión generalmente es variable. Los pulmones presentan áreas localizadas de neumonía intersticial caracterizadas por engrosamiento de los septos alveolares con infiltración mononuclear. Los cambios en el ojo de animales con opacidad corneal se caracteriza por edema corneal y uveítis anterior con infiltrado de neutrófilos y mononucleares (Stephano *et al.*, 1993; Allan *et al.*, 1996)

La información que hasta ahora existe en relación a la respuesta inmune de cerdos infectados con el Rubulavirus Porcino es escasa, y únicamente existen reportes de la respuesta humoral, basada en la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes. La enfermedad por el Rubulavirus es autolimitante cuando las granjas afectadas cierran la entrada a animales de reemplazo, ya que no aparecen nuevos brotes a diferencia de producciones abiertas, donde los nuevos brotes continúan afectando principalmente las cerdas primerizas (Stephano *et al.*, 1988). De la respuesta inmune celular no existen información en la literatura.



## **Aspectos generales de la inmunidad frente a virus.**

Los virus son agentes infecciosos que se multiplican intracelularmente e inician su proceso de infección al reconocer un receptor específico en una célula blanco, la cual puede o no ser susceptible de ser infectada (Roizman *et al.*, 1990). Entendiendo por infección la capacidad de un virus por alterar las funciones metabólicas de una célula; y por permisible el que la célula cuente con todos los elementos necesarios para la multiplicación viral. Así, el primer paso en la infección viral es el reconocimiento de un receptor en una célula blanco, el cual varía de acuerdo al tipo de virus involucrado; en el caso de los paramixovirus se ha demostrado que reconocen moléculas que contienen ácido siálico. El receptor del virus del Sarampión es el CD46 (Doring *et al.*, 1993) y del Rubulavirus Porcino-LPM sabemos reconoce preferentemente moléculas que contienen sialil alfa-2,3-lactosa (Reyes-Leyva *et al.*, 1993). Una vez que el virus reconoció el receptor en la célula blanco, en el caso de los virus con envoltura, se internaliza fusionándose con la membrana plasmática, y dentro de la célula el virus inicia la transcripción de sus proteínas utilizando sus propias enzimas y las enzimas de las células infectadas, que le permiten la producción de partículas víricas capaces de infectar a nuevas células blanco (Kingsbury W.D. 1990).

Existen diferentes virus capaces de infectar células del sistema inmune y de esta manera evadir la respuesta del huésped aumentando la severidad de la infección. El mejor ejemplo que tenemos es el VIH (el Virus de la Inmunodeficiencia Humana). En el caso de los Paramixovirus, se ha reportado que el virus del Sarampión es inmunosupresor, capaz de infectar principalmente a los monocitos y a linfocitos ocasionado una inmunodeficiencia transitoria (Griffin *et al.*, 1994).

Una eficaz respuesta inmune celular y humoral son condiciones necesarias para el control y erradicación de las infecciones virales, la cual depende del tipo de virus, la vía de entrada, la dosis infectante, el tipo de célula presentadora y del estado general del huésped (Doherty *et al.*, 1995). En términos generales, la respuesta inmune frente

a virus se inicia con la producción de interferón- $\alpha$  por las células infectadas, lo que aumenta el potencial lítico de células NK y la expresión del MHC-I (Murray *et al.*, 1992). El aumento en la expresión del MHC-I facilitará la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8 (Martz *et al.*, 1989), los cuales son importantes en la erradicación del virus del Sarampión (Binnendijk *et al.*, 1990), así como de otras infecciones virales. La presencia de linfocitos T CD4 con actividad citotóxica se ha demostrado en diferentes modelos de infecciones virales, y se sugiere que juegan un papel importante para el control de la infección (Kozsinowski *et al.*, 1991).

El resultado de la actividad citotóxica de las diversas efectoras (NK, linfocitos CD8 o CD4) sobre las células infectadas provoca que se liberen antígenos virales endógenos, los cuales pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MHC-II, lo que induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4+ que responden con la producción de citocinas como la IL-2 e Interferón- $\gamma$  o IL-4 e IL-10. Durante la infección aguda no es posible discriminar entre una respuesta Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub>, ya que predomina la producción de ambas; es en los procesos crónicos que es posible identificar un patrón de producción Th<sub>2</sub>, que favorecen muchas de las infecciones persistentes (Biron A., 1994)

Como podemos observar existen diversos mecanismos efectoros que participan en el control y erradicación de las infecciones virales, pero la eficacia de cada una de ellas dependerán del virus involucrado y de la susceptibilidad del huésped. Es frecuente observar que la respuesta específica contra antígenos virales provoque daño inespecífico al tejido circundante. Este evento ha sido observado en el momento de establecerse una respuesta citotóxica específica contra el virus del Sarampión, la cual se caracteriza por producir exantema generalizado y meningitis esclerosante (Schneider-Schaulies *et al.*, 1991).

## **Características de la respuesta inmune del cerdo.**

En este apartado se describen brevemente las características más importantes de la respuesta inmune celular del cerdo, enfocándose básicamente a los linfocitos T, los cuales han mostrado diferencias importantes con lo reportado para otras especies.

Los linfocitos T se dividen en cooperadores (linfocitos CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). Los primeros regulan la respuesta inmune con la producción de citocinas como la IL-2, el INF $\gamma$ , la IL-4 y la IL-10; y en algunas infecciones virales tienen efectos citotóxicos con restricción por el MHC de clase II. Los linfocitos CD8 son citotóxicos con restricción por el MHC de clase I, sin ser una célula importante para regular la respuesta inmune. Ambos linfocitos maduran en el timo y cuando salen pierden el marcador de superficie CD1 que los identifica como linfocitos inmaduros y conservan el CD2 a diferencia de otros tipos celulares. Durante el proceso de maduración, otros marcadores de superficie se expresan en los linfocitos, tal como receptor del linfocito T (TcR $\alpha\beta$  y TcR $\gamma\delta$ ), las moléculas CD4 y CD8, entre otros. En las primeras etapas de maduración de los linfocitos se observa la coexpresión de las moléculas CD4 y CD8, pero antes de poblar los órganos linfoides secundarios se pierde una de las moléculas, y así en sangre periférica bajo condiciones normales no se observan altos porcentajes de linfocitos con doble marca en las células humanas y murinas, por el contrario, el cerdo es la única especie que expresa altos porcentajes de linfocitos dobles positivos en sangre periférica (entre 10 y 60%), así como en órganos linfoides secundarios en condiciones normales (Saalmüller *et al.*, 1987; Saalmüller *et al.*, 1994b).

Saalmüller y Pescovitz (1987) fueron los primeros en identificar la presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y en proponer dos hipótesis de sus posibles actividades biológicas; 1) que estas células podrían representar linfocitos inmaduros que emigraron del timo sin perder alguno de sus marcadores, y 2). que estas células representen linfocitos CD4 que han adquirido el marcador CD8 después de su sensibilización y lo retienen para convertirse en linfocitos pequeños. La primera hipótesis fue rechazada,

ya que estos linfocitos no expresan el marcador CD1 que identifica a timocitos; la segunda hipótesis es la más aceptada ya que los resultados indican que los linfocitos CD4<sup>+</sup> adquieren el marcador CD8 para convertirse en linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> después de una respuesta *in-vitro* a estímulos allogénicos, virales y parasitarios ((Saalmüller *et al.*, 1989; Pescovitz *et al.*, 1994, Saalmüller *et al.*,1994b); esta respuesta esta restringida al MHC-II, lo cual indica que el CD4 es la molécula responsable de la respuesta, sin descartar la posibilidad de algún papel biológico del CD8, el cual hasta la fecha no se ha identificado (Summerfield *et al.*, 1996). Estudios recientes mostraron que una población enriquecida de linfocitos CD4 provenientes de cerdos inmunizados con el virus de la enfermedad de Aujeszky, estimuladas *in vitro* durante varias semanas con el antígeno viral y con IL-2, provoca que los linfocitos CD4 adquieran y conserven el marcador CD8, convirtiéndose en linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; estos mismos linfocitos presentaron dos poblaciones de CD21, marcador que representa poblaciones de células de memoria; al igual que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, los linfocitos CD4 presentaron estas dos poblaciones de CD21, lo interesante fue observar que los porcentajes en estas dos poblaciones de linfocitos fueron inversos, es decir, por un lado la población alta de CD21 en linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> fue de 75%, mientras que en linfocitos CD4 fue solo del 23%, con lo cual los autores concluyen que un alto porcentaje de esta población doble positiva corresponde a células de memoria (Zuckermann *et al.*, 1996).

## **OBJETIVO GENERAL.**

**Evaluar la respuesta inmune celular y humoral de cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus Porcino.**

### **Objetivos Especificos.**

- **Evaluar la respuesta humoral al RvP.**
- **Estudiar la respuesta proliferativa *in vitro* de células mononucleares al RvP y a lectinas mitogénicas.**
- **Evaluar los valores de las poblaciones celulares de sangre periférica por citometría de flujo.**
- **Estudiar la interacción y susceptibilidad de las diferentes poblaciones celulares con el RvP.**

## MATERIAL Y METODOS.

### Anticuerpos.

Para la caracterización fenotípica de las diferentes poblaciones celulares del cerdo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón obtenidos de VMRD Inc. (Washington, USA): anti-CD2, IgG<sub>2a</sub> (MSA4); anti-CD4, IgG<sub>2b</sub> (74.12.4); anti-CD8, IgG<sub>2a</sub> (76-2-11); anti-M1, IgG<sub>1</sub> (CAM36A) y anti-IgM, IgM (PG145A). Como segundos anticuerpos se utilizaron: un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (-FITC) de Becton & Dickinson (Mountain Cal, USA), un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG<sub>2a</sub> de ratón conjugado a Ficoeritina (-PE) de Zymed Laboratories Inc (USA) y un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG<sub>1</sub> de ratón-PE de Serotec (Reino Unido). La presencia del virus en CMN se realizó utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-RvP-PAC3 y un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC de Sigma Chemicals Co. (San Luis Missouri, USA).

**Obtención del Rubulavirus Porcino-PAC3 (RvP-PAC3) para la infección experimental, la proliferación de células mononucleares y las Inmunotransferencias.**

La cepa PAC3 (Jalisco, 1992) del RvP fue aislada a partir del cerebro de un lechón con meningoencefalitis durante un brote de la enfermedad del ojo azul en una granja reproductora (Ramírez 1994). Dicho virus fue donado gentilmente por el Dr. Humberto Ramírez de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM, para la realización de este trabajo. El virus se multiplicó en cultivos de la línea celular PK-15 (Riñón de cerdo), sembrados en botellas de poliestireno de 600 ml durante 4 días a 37°C (Nunclon) en presencia de MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino y 50µg/ml de gentamicina. Las células infectadas se sometieron a tres choques térmicos (congelación y descongelación), y el sobrenadante se centrifugó a 3200 rpm durante 40 min. Al sobrenadante se le determinó el título de hemaglutinación y el efecto citopático en cultivos

celulares y fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en la infección experimental de cerdos adultos. Para los ensayos de proliferación de las células mononucleares (CMN) y para las inmunotransferencias, el antígeno viral fue concentrado por centrifugación a  $100,000 \times g$  durante 6 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente, el botón fue resuspendido en medio de cultivo RPMI 1640, alícuotado y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La concentración de proteína y el título de hemaglutinación fueron determinados en muestras similares antes y después del almacenamiento. El control de antígeno para dichos ensayos fue preparado de la misma manera con células PK-15 sin infectar (Kimman *et al.*, 1993).

#### **Titulación del antígeno viral.**

Las células PK-15 se ajustaron a  $1.5 \times 10^6$  células por ml en medio mínimo esencial suplementado con 10% de suero fetal bovino y se cultivaron en una placa de microcultivo de 96 pozos adicionando 200  $\mu\text{l}$  por pozo de la suspensión celular, más 50  $\mu\text{l}$  de diferentes diluciones decuples (de  $10^1$  hasta  $10^8$ ) del RvP-PAC3. Después de 72 horas de incubación se colectó la mitad del sobrenadante y se determinó su actividad hemaglutinante. Los resultados se expresan como el 50% de la dosis infectante en cultivo celular (DICC<sub>50</sub>) usando el método de Karber.

#### **Determinación de la actividad hemaglutinante.**

En una placa de microensayo de 96 pozos con fondo en U, se hicieron diluciones dobles seriadas del virus PAC3 en 50  $\mu\text{l}$  de PBS (pH 7.2), después se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos de bovino al 0.5 %, incubando durante 45 min a temperatura ambiente. Los resultados se expresan en unidades hemaglutinantes (UHA), que representan el inverso de la última dilución en la cual el virus aglutinó los eritrocitos.

### **Animales de experimentación.**

Se utilizaron cerdos híbridos convencionales, machos sin castrar de seis meses de edad, provenientes de una granja libre de anticuerpos y sin antecedentes de la enfermedad del Ojo Azul. Los animales se infectaron por vía intra-nasal (5 ml) utilizando la cepa PAC3 del RvP (RvP-PAC3) con un título de  $10^4$  DICC<sub>50</sub>; todos los días los animales fueron evaluados clínicamente y semanalmente se tomaron muestras sanguíneas de la vena cava superior utilizando tubos Vacutainer con y sin heparina. Los cerdos se alojaron en el área de aislamiento del Departamento de Producción Animal Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

### **Histopatología.**

Al término del experimento los animales fueron sacrificados, se tomaron muestras de diferentes tejidos para fijarlos en formol al 10%. Posteriormente las muestras fueron procesadas en el Lab. de Investigación en Morfología, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

### **Detección de antígeno viral mediante Inmunofluorescencia.**

Muestras de tejido nervioso, respiratorio y reproductivo fueron tomadas durante la necropsia, cortadas en fracciones menores de 1 mm, colocadas en el conservador de tejidos Tissue Tek dentro de papel parafinado y conservadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron cortadas en criostato, colocadas en portaobjetos y fijadas en acetona fría durante 10 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los cortes fueron incubados con solución de bloqueo PBS, BSA (0.2%), SFB (1%) durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . La detección del antígeno viral se realizó mediante inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos policlonales de conejo específico contra el RvP-PAC3 conjugado a FITC, incubando 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Las muestras se



lavaron en PBS, BSA (0.2%), Tritón X-100 (0.03%) y se protegieron con cubreobjetos en glicerol-PBS (V/V) para observar posteriormente al microscopio de fluorescencia (Karl Zeiss). Algunas muestras fueron contrastadas antes de cubrir las en solución de Evans (0.1%) en PBS. Los cortes positivos fueron fotografiados utilizando una película blanco y negro Kodak plus-x pan400 o con película de color Kodak gold asa 400.

#### **Determinación de anticuerpos contra el RvP.**

Las muestras de sangre obtenidas sin anticoagulante fueron utilizadas para separar el suero, el cual fue centrifugado a 400 x g durante 30 min a 4°C para eliminar el resto de células. La presencia de anticuerpos séricos se determinó mediante ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y de Neutralización Viral (NV). Para realizar la técnica de IH, el complemento de los sueros fue inactivado 30 min a 56°C, después los sueros se absorbieron con caolín durante 30 min y se incubaron con eritrocitos de bovino al 5% durante 30 min para eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. Al final, los sueros tratados se centrifugaron a 1500 x g durante 15 min y se colectó el sobrenadante.

#### **Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación.**

La titulación de los anticuerpos se llevó al cabo en placas de microensayo de 96 pozos con fondo en U, realizando diluciones dobles seriadas de los sueros tratados en 50 µl de PBS. A cada pozo se le agregaron 50 µl de sobrenadante viral con título de 8 UHA, incubando las placas durante 60 min en agitación ligera a temperatura ambiente. Después de esto, se adicionaron 50 µl de una suspensión de eritrocitos de bovino al 0.5% y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente. El título de IH se expresó como el inverso de la máxima dilución del suero que inhibió completamente la actividad hemaglutinante del virus.

### **Ensayo de Neutralización Viral.**

La determinación de anticuerpos neutralizantes del efecto citopático del virus se llevo al cabo en placas de microcultivo de 96 pozos realizando diluciones dobles seriadas de las muestras de suero en 50 µl de MEM; después se agregaron 50 µl del RvP-PAC3 con un título de 300 DICC<sub>50</sub>, incubando las placas en agitación durante 60 min. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de una suspensión de células PK-15 ( $1.5 \times 10^6$  células/ml) y se incubaron durante 72 horas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se colectó la mitad del sobrenadante y se le determinó la actividad hemaglutinante. El efecto citopático o su inhibición fue determinada tiñendo las placas con colorante de Wright. El título se expresó como el inverso de la máxima dilución que inhibió completamente el efecto citopático del virus.

### **Inmunotransferencias.**

Las proteínas del RvP virus se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras con 10% de duodecil sulfato de amonio (PAGE-SDS). Posteriormente, las proteínas fueron electrotransferidas del gel a membranas de nitrocelulosa utilizando una fuerza de 0.6 Volts, durante 1 h y 30 min; después las membranas se bloquearon con PBS (pH7.2) conteniendo 5% de leche descremada, durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, se lavaron 3 veces con PBS (pH7.2)-BSA (5%)-TWEEN (0.1%) y tres veces con PBS (pH7.2)-TWEEN (0.1%). Una vez bloqueadas las membranas se cortaron en tiras de 0.5 cm de ancho y se incubaron con los sueros de los cerdos; posteriormente se incubó con un anticuerpo de conejo anti-gamaglobulinas totales del cerdo conjugado a biotina; y finalmente se incubaron con estreptavidina-peroxidasa. Las tiras se revelaron con el sustrato que contenía peróxido de hidrogeno y 3,3'-diaminobenzidina y la reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua. Todas las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante, los sueros utilizados fueron diluidos previamente en PBS (pH7.2)- BSA(5%)-

**TWEEN(0.1%); y entre cada incubación las tiras se lavaron tres veces de 5 min cada una con PBS (pH7.2)-BSA (5%)-TWEEN (0.1%) y tres veces con PBS (pH7.2)-TWEEN (0.1%).**

#### **Separación de células mononucleares.**

La sangre de los cerdos con heparina se mezcló con el mismo volumen de medio de cultivo RPMI-1640 (25 mM de HEPES,  $5 \times 10^{-6}$  M de 2-mercaptoetanol, 2 mM de glutamina y 50 mg/ml de gentamicina) y fue centrifugada 30 min a  $800 \times g$  a  $4^\circ C$  en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphopaque, Pharmacia, Upspsala Sweden). Las CMN se colectaron de la interfase, se lavaron dos veces con RPMI-1640, se determinó su viabilidad celular con azul tripan y se ajustaron a una concentración final de  $1.5 \times 10^6$  células viables ( $\geq$  a 95%) por ml de medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (Rose *et al.*, 1992).

#### **Identificación de las poblaciones celulares de sangre periférica por Citometría de Flujo.**

Las CMN se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células viables ( $\geq$  a 95%) por ml de Buffer de lavado (PBS, pH7.2; BSA, 0.4%;  $Na_2N$ , 0.1%; EDTA, 0.01%). El método para identificar células con un marcador se realizó en dos incubaciones. En la primera incubación se utilizaron los anticuerpos anti-CD2, anti-monocitos o anti-IgM; y en la segunda un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con FITC. Las concentraciones óptimas de cada anticuerpo fueron determinadas previamente. Todas las incubaciones fueron de 15 min a  $4^\circ C$  y entre cada incubación las células se lavaron dos veces; para los lavados y para las diluciones de los anticuerpos, se utilizó el la solución de lavado mencionada anteriormente. Las células se analizaron por Citometría de Flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal. USA) (Zuckermann *et al.*, 1996).

### **Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T por Citometría de Flujo.**

Las CMN se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células viables ( $\geq$  a 95%) por ml de solución de lavado (PBS, pH7.2; BSA, 0.4%;  $\text{Na}_3\text{N}$ , 0.1%; EDTA, 0.01%). El método para identificar células con dobles marcas se realizó en cuatro incubaciones. En la primera incubación se usan anticuerpos de isotipo IgG<sub>2a</sub>, en la segunda un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con FITC, en la tercera incubación un anticuerpo de isotipo IgG<sub>2a</sub>, y en la cuarta incubación un anticuerpo de rata anti-IgG<sub>2a</sub> de ratón con PE. Las concentraciones óptimas de anticuerpos para la realización de este estudio fueron determinadas previamente. Todas las incubaciones fueron de 15 min a 4°C y entre cada incubación las células se lavaron dos veces; para los lavados y para las diluciones de los anticuerpos, se utilizó el la solución de lavado mencionada anteriormente. Las células se analizaron por Citometría de Flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal, USA) (Zuckermann *et al.*, 1996).

### **Ensayos de proliferación de CMN en presencia del RvP-PAC3, PHA y ConA.**

Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en placas de microcultivo de 96 pozos. A cada pozo se adicionaron 100  $\mu$ l de la suspensión de CMN (0.15  $\times 10^6$  células/100 $\mu$ l) y de 10-12  $\mu$ g/ml del RvP-PAC3; posteriormente las células se mantuvieron en cultivo durante 6 días a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas antes de cosechar las células, se marcaron con 1 $\mu$ Ci de timidina tritlada (<sup>3</sup>HdTR) por pozo. Las células se cosecharon con un cosechador múltiple (Cell Harvester, Brandel, USA) y el papel filtro (Brandel, USA) que se deshidrató durante 48 horas a temperatura ambiente. Para determinar la incorporación de <sup>3</sup>HdTR, el papel filtro se colocó en viales de centelleo y se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo. Los viales se leyeron en un contador de radiación beta, y los resultados se expresan en cuentas por minuto (c.p.m.) y se analizan por el método de t de student. La proliferación de CMN con PHA (8  $\mu$ g/ml) y ConA (1  $\mu$ g/ml) se realizaron como se describió anteriormente, pero la estimulación fue de 72 h.

### **Identificación de las Subpoblaciones de linfocitos que proliferan al estímulo *in-vitro* con el RP-PAC3.**

En tubos eppendorf se incubaron  $1 \times 10^6$  CMN con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%, más 12 $\mu$ g/ml del RvP-PAC3. Después de 5 días de cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, las células se incubaron en primer lugar con un anticuerpo anti-CD4, en el segundo lugar con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con FITC, en tercer lugar con un anticuerpo anti-CD8, y en cuarto con un anticuerpo de rata anti-IgG<sub>2a</sub> de ratón con PE. Las incubaciones fueron de 15 min a 4°C y entre cada incubación las células se lavaron dos veces; para los lavados y las diluciones de los anticuerpos, se utilizó el la solución de lavado mencionada anteriormente. Las células se analizaron por Citometría de Flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal, USA) (Zuckermann *et al.*, 1996).

### **Identificación de CMN reconocidas por el RP-PAC3.**

Las CMN se ajustan a  $1 \times 10^6$  células viables ( $\geq 95\%$ ) por ml de solución de lavado (PBS, pH7.4; BSA, 0.4%; Na<sub>2</sub>N, 0.1%; EDTA, 0.001%). Este ensayo se realizó en cuatro incubaciones. En la primera las CMN se incuban con 150  $\mu$ l del RvP-PAC3 con un título de 1:16 UA; en la segunda con un anticuerpo de conejo anti-RvP-PAC3 FITC; en la tercera con los anticuerpos anti-CD2, anti-CD4, anti-CD8, anti-linfocitos B o anti-monocitos; y en la cuarta un anticuerpo de rata anti-IgG de ratón con PE. Todas las incubaciones se realizaron durante 15 min a 4°C, excepto la incubación del virus que fue de 30 min a temperatura ambiente; entre cada incubación las células se lavaron dos veces; para los lavados y las diluciones de los anticuerpos se usó la solución de lavado mencionado anteriormente. Las células se analizaron por Citometría de Flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, Mountain, Cal, USA).

### **Susceptibilidad de CMN adherentes y no adherentes.**

A partir de las CMN se separaron las células adherentes y no adherentes incubando durante 1 h a 37°C  $1 \times 10^5$  CMN, posteriormente se lavó cuidadosamente para separar las dos poblaciones en un volumen final de 600  $\mu$ l de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días en una placa de microcultivo de cuatro pozos, adicionando 300 DICC<sub>20</sub> del RvP-PAC3. Diariamente se colectaron 50  $\mu$ l del sobrenadante para determinar su actividad aglutinante.

## RESULTADOS.

### Infección experimental.

La infección experimental de los cerdos con la cepa PAC-3 del Rubulavirus Porcino (RvP-PAC3) se realizó aplicando 5 ml por vía intra-nasal y 3 ml por vía intramuscular con un título de  $10^4$  DICC<sub>50</sub>. Los primeros signos clínicos que presentaron los cerdos infectados se observaron en el tercer día posinoculación (pi), éstos fueron: aumento de la temperatura corporal hasta 40°C, disminución en el consumo de alimento, conjuntivitis ligera y estornudos. Entre la segunda y tercera semana de infección se observó un incremento considerable en el tamaño de los testículos y del epidídimo en tres de los siete cerdos infectados; después de la cuarta semana en estos animales el tamaño de los testículos sufrió una notable atrofia testicular.

En la séptima semana pi se realizó la eutanasia de todos los animales para identificar los cambios macroscópicos durante la necropsia y para tomar muestras de tejidos para el análisis histopatológico. La mayoría de los órganos y tejidos de los cerdos infectados no presentaron cambios aparentes durante la necropsia; salvo los tres cerdos que *in vivo* mostraron lesiones perceptibles en los órganos reproductores, los cuales consistieron en atrofia testicular y granulomas de 1-2 cm localizados principalmente en la región de la cabeza del epidídimo. El análisis histopatológico reveló que los siete animales infectados presentaron alteraciones histológicas en los testículos y el epidídimo, aunque la severidad fue mayor en los animales con granulomas (tabla 3). El testículo presentó zonas de vacuolización y destrucción de las células germinales, aumento en el número de células de Leydig, infiltrado de células mononucleares y lesiones granulomatosas en el tejido intersticial (figura 1). En epidídimo se observó la presencia de granulomas bien definidos localizados principalmente en la cabeza, caracterizados por un infiltrado mononuclear, con bordes delimitados por una densa zona de macrófagos y en el centro cavidades conteniendo

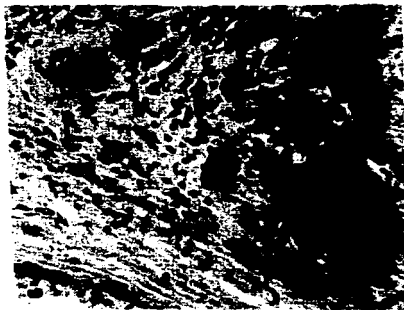
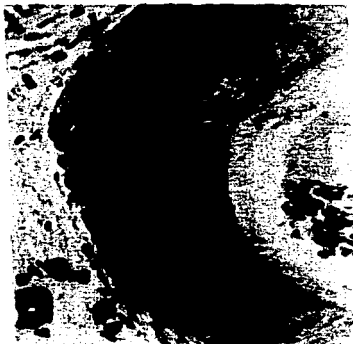
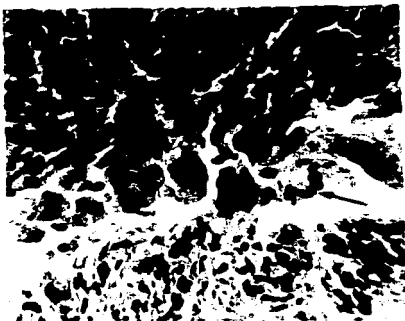
células gigantes multinucleadas, células necróticas y espermatozoides, algunos de ellos fagocitados por macrófagos y células gigantes. Además de encontrarse dentro de los límites del granuloma, los espermatozoides fueron localizados en el tejido intersticial que separa los conductos epididimarios (figura 2). En las zonas cercanas al granuloma pudieron observarse túbulos destruidos con pérdida del epitelio pseudoestratificado.

Figura 1. Lesiones histológicas de testículo (pag 27). Después del sacrificio se tomaron muestras de testículos, las cuales se fijaron en formol al 10% y se procesaron para su evaluación histopatológica. A, testículo normal; B, testículo con lesión granulomatosa (flecha corta) y con vacuolización y destrucción de las células germinales (flecha larga), aumento 75x; y C, testículo con aumento en el número de células de Leydig (flecha corta), y con vacuolización y destrucción de las células germinales (flecha larga), aumento 300x.

Figura 2. Lesiones histológicas de epidídimo (pag 28). Después del sacrificio se tomaron muestras de epidídimo las cuales se fijaron en formol al 10% y se procesaron para su evaluación histopatológica. A, epidídimo normal; B, epidídimo con lesión granulomatosa, aumento 40x; C, epidídimo con lesión granulomatosa (flecha corta) y con células gigantes (flecha larga), aumento 75x; y D, epidídimo con lesión granulomatosa y presencia de espermatozoides (flecha larga), aumento 300x.







Alteración	Testículo		Epidídimo	
	Cerdos sin granuloma <sup>1</sup>	Cerdos con granuloma	Cerdos sin granuloma	Cerdos con granuloma
Edema	+	+++	-	++
Necrosis epitelial	+	+++	+	+++
Infiltrado mononuclear	+	+++	+	+++
Lesión granulomatosa	-	+ <sup>2</sup>	+	+++
Células gigantes multinucleadas	-	-	+	++
Destrucción tubular	-	-	-	++
Salida de espermatozoides	-	-	-	+++
Detección del antígeno viral por IFD	-	-	+ <sup>3</sup>	+

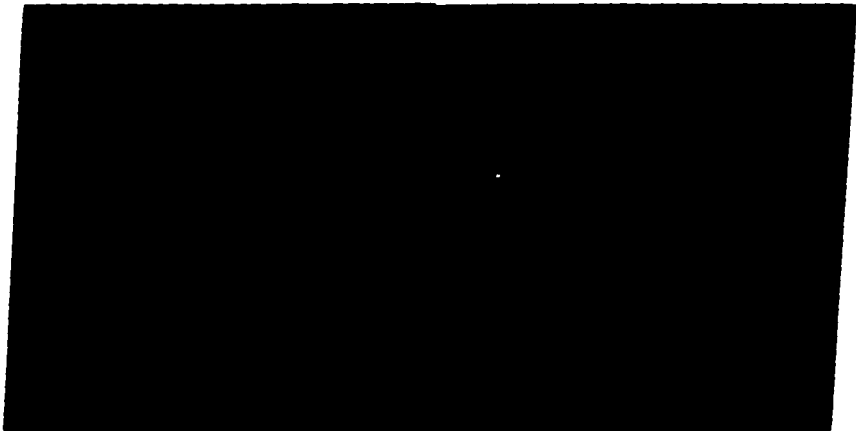
Tabla 3. Lesiones histopatológicas del testículo y epidídimo. Después del sacrificio se tomaron muestras de los testículo y epidídimo las cuales se fijaron en formol al 10% y se procesaron para su evaluación histopatológica e inmunofluorescencia directa (IFD). 1, sin granuloma a la necropsia; 2, presencia de lesión granulomatosa difusa en el tejido intersticial del testículo; 3, sólo en uno de los cerdos de este grupo se detectó antígeno viral.

#### **Detección del antígeno viral mediante Inmunofluorescencia.**

Después de analizar las lesiones histológicas del epidídimo y del testículo, se determinó la presencia del antígeno viral en los tejidos con lesiones, utilizando un suero de conejo anti-RvP conjugado a FITC. Cuatro de los cerdos infectados mostraron reacción positiva en la cabeza del epidídimo, lo cual se observó como una reacción citoplasmática focal en el epitelio de los túbulos adyacentes al granuloma (figura 3), en la pared tubular cercana a vasos sanguíneos y en las células mononucleares del tejido intersticial (figura 4). No se detectó antígeno viral en zonas del epidídimo.



**A** **B**  
**Fig. 3** Identificación de antígeno viral en el epididimo. Cortes de tejidos analizados mediante inmunofluorescencia indirecta con IgG de conejo anti-rubulavirus porcino más conjugado fluoresceinado de cabra anti-conejo. **A.** Cerdo testigo no infectado. **B.** Cerdo infectado, nótese la abundancia de antígeno viral en las proximidades de los vasos sanguíneos y en la membrana basal del epitelio. Aumento 10x.



**A** Fig. 4 Identificación de CMN antígeno-positivas. Cortes de epidídimo de cerdos infectados fueron analizados mediante inmunofluorescencia. **B** A. En el epitelio se observan células portadoras de antígeno viral infiltrando la membrana basal, nótese además la presencia de antígeno en las células epiteliales (flecha). B. En el tejido intersticial se observan abundantes células antígeno-positivas. Aumento 40x.

## RESPUESTA HUMORAL

### Determinación de Anticuerpos contra el RvP-PAC 3

La respuesta humoral al Rubulavirus Porcino se evaluó determinando el título de anticuerpos por inhibición de la hemaglutinación (IH) y neutralización viral. Antes del experimento se comprobó que ninguno de cerdos tenía anticuerpos contra el RvP. Los resultados muestran que la infección experimental con el RvP-PAC3 induce la presencia de anticuerpos neutralizantes a partir de la primera semana de infección e inhibidores de la aglutinación a partir de la segunda semana (figura 5). El análisis de los títulos de anticuerpos se realizó en base al grado de lesión que presentaron los cerdos infectados experimentalmente, es decir, los animales con granuloma macroscópico y sin granuloma; identificando dos tipos de respuesta que correspondía con el tipo de lesión. Los cerdos 1, 4 y 6, que desarrollaron granulomas, presentaron los títulos de anticuerpos IH más elevados, 128 y 256 unidades inhibidoras de la hemaglutinación (UIH); estos títulos se mantuvieron en las siguientes semanas y disminuyeron en la séptima semana de infección a 64 UIH. Por el contrario los cerdos 2, 3, 5 y 7 (que no desarrollaron lesiones macroscópicas) presentaron títulos bajos de IH, los cuales se mantuvieron constantes durante todo el experimento, mostrando como títulos máximos 32 y 64 UIH. En los ensayos para identificar los anticuerpos neutralizantes se observó el mismo comportamiento, es decir, es decir un grupo con títulos altos (cerdos 1, 4 y 6) y otro con bajos (cerdos 2, 3, 5, y 5). Los cerdos del primer grupo mostraron anticuerpos neutralizantes desde la primera semana de infección, alcanzando los títulos más elevados durante la tercera semana, 1024 y 2048 unidades neutralizantes (UN); los cuales permanecieron altos hasta la séptima semana de infección en que disminuyeron a 512 y 256 UN. El segundo grupo de cerdos mostró títulos bajos de anticuerpos neutralizantes, presentando como máximo 128 y 64 UN. Con base en estos hallazgos decidimos realizar el análisis de los resultados en correlación a la presencia o no de granuloma aparente en los cerdos infectados.

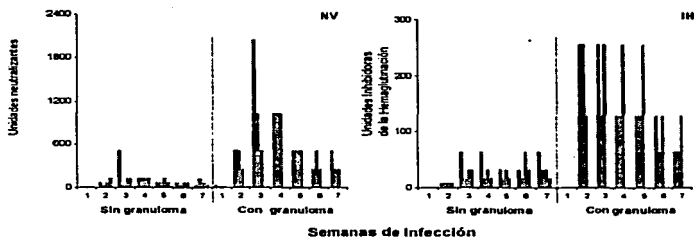


Figura 5. Título de anticuerpos. Antes y después de la infección se tomaron muestras de sangre para separar el suero se determinar el título de anticuerpos por Neutralización Viral (NV) e Inhibición de la Hemaglutinación (HN). 1-7, las semana de infección y cada barra representa los títulos de anticuerpos por animal.

**La glicoproteína HN es el antígeno reconocido durante la infección por el Rubulavirus Porcino.**

Además de identificar la respuesta de anticuerpos en los cerdos infectados, se identificó la cinética de reconocimiento de las proteínas virales durante las diferentes semanas de infección; para esto se realizaron electroforesis de en gels de poliacrilamida y posteriormente las proteínas virales fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa; se cortaron en y tiras se incubaron con los anticuerpos séricos obtenidos de cerdos con diferentes tiempos de infección. Los resultados mostraron que la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) es inmunodominante en relación con las demás proteínas del Rubulavirus Porcino, ya que a partir de la segunda semana de infección y en las siguientes, esta proteína fue reconocida por todos los sueros, mientras que los anticuerpos de seis cerdos reconocieron la proteína M y sólo cinco reconocieron a la proteína NP a partir de la quinta semana de infección (figuras 6 y 7).



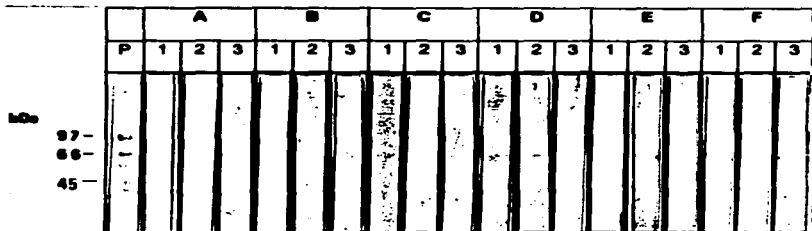
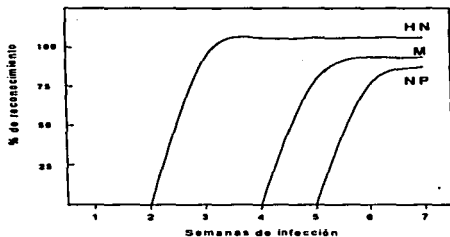


Fig. 6. Inmunotransferencias. Se hicieron corrimientos electroforéticos del RVP-PAC3 en gels de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa; se cortaron tiras de 0.5 cm de ancho, se bloquearon con PBS-LECHE y se incubaron con los diferentes sueros de los cerdos infectados experimentalmente. Posteriormente se incubó con un anticuerpo de conejo anti-gamaglobulinas totales con biotina y después con estreptavidina-peroxidasa; las tiras se revelaron con diaminobenzidina y la reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua. 1, 2 y 3, tres sueros de cerdos infectados tomados al azar; A-E, semanas 1-5 posinfección; y F, semana 7 posinfección.



**Figura 7.** Porcentajes de reconocimiento de las proteínas del Rubulavirus Porcino. Después de realizar la electroforesis en gels de poliacrilamida al 10% con SDS, las proteínas virales se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se bloquearon y cortaron en tiras de 0,5cm de ancho. Las tiras se incubaron con los sueros de los cerdos con diferentes tiempos de infección y con un anti-IgG de cerdo biotinilado, posteriormente se incubaron con extravidina-peroxidasa y se revelaron con 4-cloroanilol; la reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua.

## RESPUESTA CELULAR

### **Respuesta proliferativa de células mononucleares a lectinas mitogénicas y al Rubulavirus Porcino.**

Después de separar las CMN con gradientes de Ficoll-Hipaque, el número de células se ajustó a  $1 \times 10^5$ /ml, se estimularon con las lectinas Con A ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) o con PHA ( $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se marcaron con  $1 \mu\text{C}$  de  $^3\text{HdTR}$ ; la incorporación de marca radioactiva se determinó en un contador de centelleo beta. Los resultados se expresan en c.p.m. y representan la media  $\pm$  la desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. La estimulación basal se determinó con las c.p.m. de células sin estimular, las cuales siempre fueron menores a 1000 c.p.m. (datos no mostrados).

**Proliferación celular inducida por Con A. Los ensayos de proliferación de las CMN en presencia de Con A en los cerdos testigos (no infectados) mostraron índices de estimulación comprendidos entre 80,000 y 95,000 cpm durante todo el experimento. Cuatro de los 7 cerdos infectados experimentalmente con el RvP (2, 3, 5 y 7) no presentaron diferencias en la respuesta a Con A con respecto a los cerdos control; sin embargo los cerdos 1, 4 y 6 que también fueron infectados experimentalmente mostraron una disminución en la su respuesta. La disminución en la respuesta del grupo de cerdos que desarrollo granuloma se presentó en la primera y segunda semana de infección con menos de 20 000 c.p.m. ( $p < 0.001$ ), en la tercera semana este grupo mostró un incremento en la respuesta (60 000 c.p.m.); y en la cuarta semana la incorporación de  $^3\text{HdTR}$  no presentó diferencias con respecto a los cerdos control y los cerdos con granulomas. Durante las siguientes semanas de infección la respuesta se mantuvo sin diferencias entre los cerdos control e infectados sin granulomas y con granulomas por el resto del experimento (figura B).**

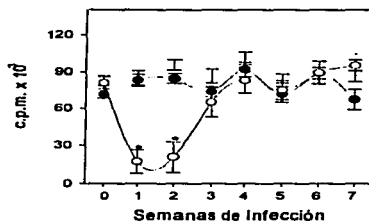


Figura 8. Respuesta proliferativa de células mononucleares a Con A. Semanalmente se separaron células mononucleares y se estimularon durante 72h con la lectina Con A (1 $\mu$ g/ml); se marcaron con 1 $\mu$ C de  $^3$ HdTR durante 18h. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de las c.p.m. de ensayos realizados por triplicado. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar; ●, cerdos 2, 3, 5 y 7 infectados con el RvP sin lesiones granuloma; ○, cerdos 1, 4 y 6 infectados con el RvP con granuloma.

**Proliferación celular inducida por PHA.** En los ensayos de estimulación de CMN con PHA los cerdos controles mostraron índices de proliferación comprendidos entre 80,000 y 110,000 cpm a lo largo del experimento. En los cerdos infectados no se observó un comportamiento homogéneo en sus valores de estimulación con PHA durante todo el experimento, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los cerdos con y sin granulomas, ni de éstos con los cerdos testigos (figura 9).

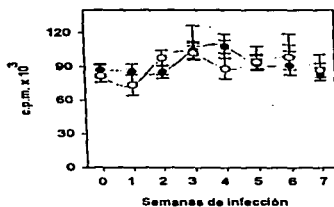


Figura 9. Respuesta proliferativa de células mononucleares a PHA. Semanalmente se separaron células mononucleares, se estimularon durante 72h con la lectina PHA (8µg/ml) y se marcaron con 1µC de <sup>3</sup>HdTTR durante 18h. Los resultados representan la media ± la desviación estándar de las c.p.m. de ensayos realizados por triplicado. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar; ●, cerdos 2, 3, 5 y 7 infectados con el RvP sin granuloma; y ○, cerdos 1, 4 y 6 infectados con el RvP con granuloma.

**Proliferación celular inducida por el RvP.** Para la evaluación de la respuesta proliferativa al RvP, las CMN se estimularon en presencia del antígeno viral concentrado del sobrenadante de células PK-15 infectadas con el RvP-PAC3 (10-12µg/ml) y un control de antígeno negativo, que consistió en un sobrenadante de células PK-15 sin infectar (10-12µg/ml); las CMN se marcaron durante 18 horas con 1µC de <sup>3</sup>HdTTR y la incorporación de la marca se determinó en un contador de centelleo beta; los resultados se expresan en c.p.m. y representan la media ± la desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. La estimulación inespecífica se determinó en las células sin antígeno (medio de cultivo), la cual en todos los ensayos fue menor a 1000 c.p.m; de la misma manera, la presencia del antígeno negativo no indujo la proliferación de las CMN de los animales infectados ni testigos (datos no mostrados). En experimentos previos determinamos que se requieren 5 días de

estímulo antigénico para identificar los niveles máximos de incorporación de  $^3\text{HdTR}$  durante la respuesta inducida por el RvP (datos no mostrados), por lo tanto los datos siguientes se obtuvieron en experimentos realizados con 5 días de incubación con el virus.

Los resultados de la estimulación con el virus en las CMN de los animales infectados mostraron un comportamiento bimodal similar al que observamos con la Con A: las CMN de los cerdos 2, 3, 5 y 7 presentaron índices de estimulación comprendidos entre 15,000 y 25,000 cpm; mientras que los cerdos 1, 4 y 6 desarrollaron valores de estimulación entre 3,500 a 10,000 cpm. En ambos casos la respuesta inducida por el virus fue perceptible a partir de la segunda semana de infección, con una tendencia ascendente que alcanzó su punto máximo en la cuarta semana, disminuyendo gradualmente en las siguientes semanas del experimento (figura 10). La estimulación de CMN de cerdos testigos con el antígeno viral no indujo incremento alguno en los valores basales de proliferación.

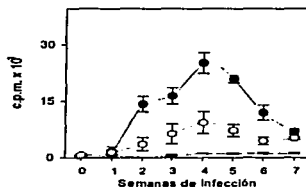


Figura 10. Respuesta proliferativa de células mononucleares a CMN. Semanalmente se separaron células mononucleares, se estimularon durante 72h con el Rubulavirus Porcino (10-12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se marcaron con  $1\mu\text{C}$  de  $^3\text{HdTR}$  durante 18h. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de las c.p.m. de ensayos realizados por triplicado. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar; ●, cerdos 2, 3, 5 y 7 infectados con el RvP sin granulomas; ○, cerdos 1, 4 y 6 infectados con el RvP con granulomas.

### Identificación de poblaciones celulares en sangre periférica.

La identificación de poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales contra las moléculas porcinas CD2 (linfocitos T), IgM (linfocitos B) y M1 (monocitos y macrófagos) y segundos anticuerpos conjugados a FITC. Para determinar la intensidad de la fluorescencia de cada marcador las células se analizaron con histogramas (figura 11).

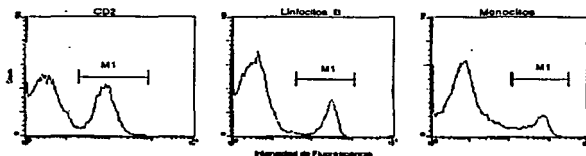


Figura 11. Histogramas de las poblaciones CD2+, Linfocitos B y monocitos. Después de marca las células monocitares antes y después de la infección con los anticuerpos anti-CD2, anti-IgM y anti-monocitos/macrófagos, y con segundos anticuerpos conjugados con FITC. Posteriormente las células se analizaron por citometría de flujo.

**Determinación de Linfocitos T.** En los cerdos infectados la proporción de poblaciones celulares sufrió modificaciones importantes. Las células CD2+ de los cerdos 2, 3, 5 y 7 (sin granulomas) se incrementaron durante la primera y segunda semana de infección, 40 y 16%, respectivamente; mientras que los animales con granulomas (1,4 y 6) no presentaron cambios en ese momento. En la tercera semana ambos grupos de animales presentaron una reducción cercana al 20% en las células CD2+; sin embargo, en la cuarta semana ambos grupos mostraron una recuperación que ascendió 16% sobre los valores del grupo control (figura 12-A).

**Determinación de linfocitos B.** En los cerdos infectados 2, 3, 5 y 7 (sin granulomas) se observó una tendencia decreciente irregular, ya que los porcentajes de células IgM+ disminuyeron 26% en la primera semana, regresaron a los valores normales en la segunda, y volvieron a disminuir en la tercera y cuarta semana: 30 y 25% respectivamente, todo esto en relación al valor de los cerdos testigos. Mientras que en los cerdos con granulomas (1, 4 y 6) se presentó un ligero aumento en las dos primeras semanas de 6 y 12%; pero en la tercera y cuarta semanas los valores de esta población bajaron 30 y 45% respectivamente (figura 12-B).

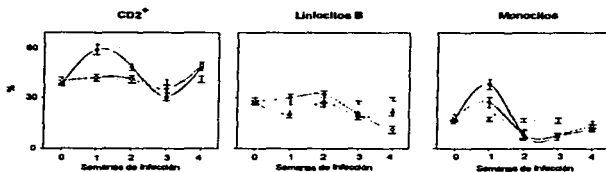


Figura 12. Porcentajes celulares CD2<sup>+</sup>, de linfocitos B y Monocitos/macrófagos. Semanalmente se separaron las CMN, se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD2, anti-IgM o anti-monocitos/macrófagos, y se analizaron por citometría de flujo. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar; ●, cerdos 2, 3, 5 y 7 infectados con el RvP sin granulomas; y ○, cerdos 1, 4 y 6 infectados con el RvP con granulomas.

**Determinación de Monocitos.** A diferencia de lo observado en la determinación de linfocitos T y B, los valores de monocitos y macrófagos (M1+) presentaron una tendencia similar en los dos grupos de cerdos infectados. Durante la primera semana de infección, la población M1+ aumento 123% en los cerdos sin granulomas y 59% en los cerdos con granulomas; en las siguientes semanas esta población disminuyó drásticamente (aproximadamente 55% por abajo del control) en todos los cerdos infectados. En la cuarta semana los valores de células regresaron a la normalidad sin



observarse diferencias significativas con respecto a los cerdos sin infectar (figura 12-C).

#### **Identificación de subpoblaciones de linfocitos T.**

Además de analizar los porcentajes de las poblaciones celulares CD2<sup>+</sup>, de linfocitos B y de monocitos, se determinó el comportamiento de tres de las subpoblaciones de linfocitos T del cerdo: los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, las cuales se analizaron en una gráfica de contorno (figura 13) graficando en el eje de las ordenadas a las células CD4<sup>+</sup>, y en el eje de las abscisas a las células CD8<sup>+</sup>; en esta gráfica se pueden distinguir cuatro regiones: 1) localizada en la parte superior izquierda que muestra los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; 2) localizada en la parte inferior izquierda que muestra las células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; 3) localizada en la parte superior derecha que muestra los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; y 4) localizada en la región inferior derecha que muestra los porcentajes de linfocitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. En los cerdos no infectados los valores de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> de linfocitos T correspondieron al 25, 16 y 7% respectivamente, con ligeras variaciones no significativas a lo largo del experimento (figura 14).

**Determinación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.** Los resultados de este análisis muestran una tendencia decreciente muy parecida entre los dos grupos de cerdos infectados, siendo ligeramente menor la reducción en los cerdos sin granuloma. Así, los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> disminuyeron gradualmente desde la primera semana de infección, alcanzando el pico más bajo en la tercera semana, 62 y 68% en relación al control, en los cerdos con y sin granulomas, respectivamente. En la cuarta semana la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> regresó a valores de normalidad únicamente en los cerdos sin granuloma, permaneciendo bajos en los cerdos con granulomas (figura 14-A).

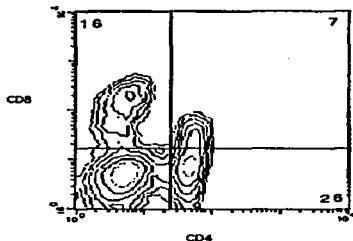


Figura 13. Gráfica de contorno. Después de marcar las células mononucleares antes y después de la infección con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, y con segundos anticuerpos conjugados con FITC y PE, las células se analizaron por citometría de flujo.

**Determinación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.** El comportamiento en esta población fue casi similar en los dos grupos de cerdos infectados. La población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aumentó 33% durante la primera semana de infección en los cerdos que no presentaron granulomas y 17% los cerdos con granulomas. En las siguientes semanas la población disminuyó, y en la tercera semana se observó una disminución del 19% en los cerdos sin lesiones y 12% en los cerdos con granuloma. En la cuarta semana la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> incrementó 23% todos los cerdos infectados (figura 14-B).

**Determinación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.** La población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> durante todo el experimento presentó un aumento gradual mayor al grupo control, con excepción de la tercera semana. En la primera semana la población aumentó 57% en todos los cerdos infectados; en la segunda semana el aumento fue mayor en los cerdos sin granulomas (100%), que en los cerdos con granulomas (71%). En la tercer semana, como ocurrió con las otras poblaciones de linfocitos T, las células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuyeron 45% con respecto al grupo control y en la cuarta semana esta población

aumento 60% en los cerdos sin granulomas y 20% en los cerdos con granulomas con respecto a los cerdos sin infectar (figura 14-C).

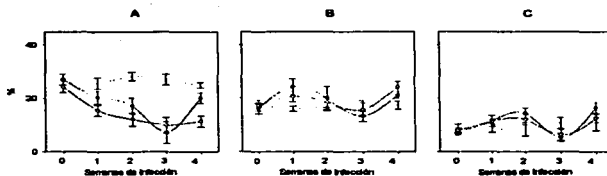


Figura 14. Porcentajes celulares de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B) y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C). Semanalmente se separaron las CMN, se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 y anti-CD8, y se analizaron por citometría de flujo. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar; ●, cerdos 2, 3, 5 y 7 infectados con el RvP sin granulomas; y ○, cerdos 1, 4 y 6 infectados con el RvP con granulomas.

**Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T que predominan durante el estímulo con el Rubulavirus Porcino.**

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> que predominan después de estimular las CMN ( $1 \times 10^5$  /pozo) durante 5 días con el RvP (10-12µg/ml); utilizando como testigo positivo de la proliferación celular la PHA (8µg/ml) y como testigo negativo medio de cultivo sin antígeno. Las células se analizaron por citometría, graficando el tamaño de las células (eje de las ordenadas) contra la granularidad (ejes de las abscisas), distinguiendo dos subpoblaciones: una población de linfocitos pequeños (R1) y una población de linfoblastos (R2) (figura 15). Con este análisis observamos que las células control que no fueron estimuladas, la mayor parte correspondió a los linfocitos pequeños; mientras que en las células estimuladas con el virus, observamos un aumento en la población de linfoblastos; y en las células estimuladas con PHA, la mayor proporción celular

correspondió a los linfoblastos (figura 15). Los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> fueron determinados en las poblaciones de linfocitos pequeños y de linfoblastos obtenidos después de la estimulación con el RvP o con PHA (figura 16).

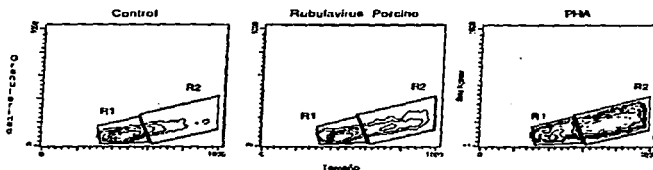


Figura 15. Gráfica de tamaño celular. Después de estimular las células mononucleares con el virus, con PHA o sin estimular, fueron analizadas por citometría graficando el tamaño contra la granularidad celular.

**Determinación del fenotipo de linfocitos pequeños.** El análisis de la población de linfocitos pequeños mostró que al estimular las células con PHA se incrementaban 123% los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (de 17% a 38%), los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no mostraron cambios importantes, y los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuyeron 57% (de 7% a 4%). En las células estimuladas con el virus observamos un incremento del 88% (de 17 a 32%) en los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no presentaron cambios importantes y la disminución en los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> fue similar a las células estimuladas con la PHA.

**Determinación del fenotipo de linfoblastos.** La población de linfoblastos presentó los cambios más interesantes, ya que al estimular las células con PHA, el incremento en los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> fue de 190% (del 20% al 58%); mientras que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aumentaron 15% (de 19 a 22%) y los linfocitos

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuyeron 20% (de 10% a 8%). En las células que fueron estimuladas con el virus, se observó que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> incrementaron 95% (de 20 a 39%), los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> disminuyeron 26% (de 19 a 14%) y los linfocitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> se incrementaron 110% (de 10 a 21%), es decir 25% más que los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Este cambio en el fenotipo de los linfoblastos hacia células doble positivas inducido por la estimulación con el RvP no fue observado en las células testigo estimuladas con PHA.

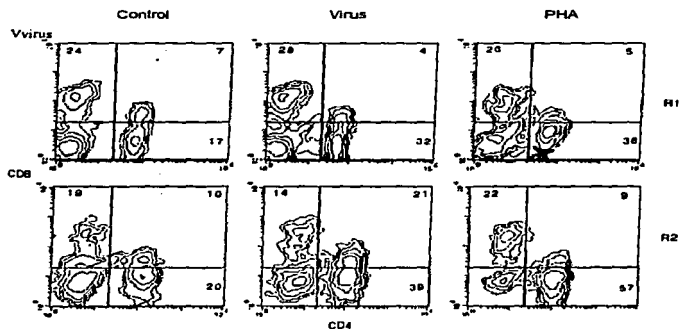


Figura 16. Gráfica de contorno. Después de estimular las células mononucleares con el virus, con PHA o sin estimular, las células mononucleares se marcaron con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, y con segundos anticuerpos conjugados con FITC y PE, y las células se analizaron por citometría de flujo. R1, Corresponde a la población de linfocitos pequeños; y R2, corresponde a la población de linfoblastos, determinadas en la gráfica 15.

## **ESTUDIO DE LA INTERACCION VIRUS-CELULAS**

### **Población de CMN reconocida por el RvP-PAC3.**

Para determinar la población celular que el virus reconoce y que podría ser utilizada como medio de transporte y/o como blanco para la multiplicación, las CMN se incubaron RvP y después con los anticuerpos monoclonales específicos para las diferentes poblaciones celulares del cerdo y con anticuerpos policlonales contra el RvP-PAC3, analizando las células por citometría de flujo. Los resultados muestran que el virus es capaz de reconocer a monocitos y macrófagos (M1+), linfocitos B (IgM+) y a linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>). La interacción del RvP fue diferente con cada una de las poblaciones celulares analizadas, reconociendo en orden decreciente: 43% de los monocitos y macrófagos, 30% de los linfocitos B y 19% de los linfocitos T totales (CD2<sup>+</sup>); y de estos últimos 21% de las células CD8<sup>+</sup> y 17% de células CD4<sup>+</sup> (figura 17).

### **Susceptibilidad de células adherentes y no adherentes.**

Como el hecho de reconocer una población en especial no indica necesariamente que esta pueda ser blanco de la infección, se realizaron infecciones experimentales de células adherentes y no adherentes, para determinar mediante la actividad aglutinante de los sobrenadantes, e identificar si el virus es o no capaz de multiplicarse en ellas. Las poblaciones adherentes y no adherentes se separaron en una placa de microcultivo, se infectaron con 300 DICC<sub>50</sub> del RVP-PAC3 y se tomaron muestras del sobrenadante a diferentes tiempos para determinar su actividad aglutinante con eritrocitos de bovino al 0.5%. Los resultados mostraron la presencia de actividad hemaglutinante en los sobrenadantes de las células adherentes después de 48 h de infección, además de observar la formación de sincicios y lisis celular a partir de las 72 h de infección, la viabilidad de estas células se redujo 50% a las 118 h. En la población de células no adherentes infectadas, no se identificó actividad hemaglutinante en los sobrenadantes, sin embargo a partir de las 24 h de infección la

viabilidad celular fue disminuyendo hasta el 20% (pérdida del 80% de la población celular) después de 118 h de infección en que se detuvo el experimento (figura 18).

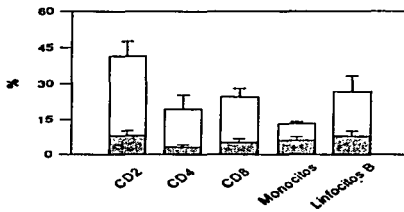


Figura 17. Porcentajes de CMN reconocidas por el Rubulavirus Porcino. Las CMN se ajustaron a  $1 \times 10^7$ /ml y se incubaron 30 min con el RvP-PAC3, después con anticuerpos específicos contra las diferentes poblaciones celulares, y finalmente con un anticuerpo contra el RvP; posteriormente las células analizaron por citometría de flujo. Cada barra representa la media  $\pm$  la desviación estándar de cuatro cerdos. La barra blanca indica el porcentaje de la población, y la barra con líneas diagonales el porcentaje de la población que es reconocida por el virus.

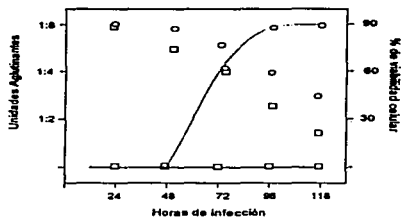


Figura 16. Susceptibilidad de células adherentes y no adherentes. Después de separar las poblaciones de células adherentes y no adherentes en placas de microcultivo, se infectaron con  $300 \text{ DIC}_{50}$  y se mantuvieron en cultivo durante 118 h. Cada día se tomaron muestras para determinar la actividad aglutinante con eritrocitos de bocado al 0.5%; línea continua, curva de actividad aglutinante; línea discontinua, viabilidad celular; círculos, células adherentes; y cuadrados, células no adherentes.



## DISCUSION.

En este trabajo se evalúan diversos parámetros para conocer algunos aspectos de la respuesta inmune celular y humoral de cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus Porcino (RvP), agente causal de la enfermedad del Ojo Azul de los cerdos. Esta enfermedad se caracteriza por afectar animales de todas las edades provocando alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas (Stephano *et al.*, 1981; Stephano *et al.*, 1988), estas últimas presentan la formación de granulomas en epidídimo y atrofia testicular (Campos *et al.*, 1991).

Desde los primeros brotes de la enfermedad del Ojo Azul de los cerdos en 1981 (Stephano *et al.*, 1981), distintos reportes han permitido conocer algunas características biológicas del Rubulavirus Porcino (Stephano *et al.*, 1983; Moreno-López *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1991; Sundqvist *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1992a; Reyes-Leyva *et al.*, 1993a; Reyes-Leyva *et al.*, 1997), así como algunos aspectos de las lesiones que provoca el virus en cerdos infectados natural y experimentalmente (Stephano *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1988; Campos *et al.*, 1991; Allan *et al.*, 1996). Sin embargo, se desconocen las características de la respuesta inmune de tipo humoral o celular al RvP, así como las lesiones histológicas de cerdos adultos con granulomas en epidídimo y con atrofia testicular.

En este estudio se infectaron experimentalmente 7 cerdos machos de seis meses de edad provenientes de una granja libre de RvP y sin antecedentes de la enfermedad. La infección experimental se realizó por vía intranasal, y fue posible reproducir los signos clínicos reportados previamente en animales infectados en forma natural (Campos *et al.*, 1991); los cuales se caracterizan por la formación de granulomas en epidídimo, apreciables a partir de la segunda semana de infección, y la atrofia testicular después de 7 semanas de infección. La presencia de los granulomas se observó macróscópicamente sólo en tres de los siete cerdos infectados, en los cuales, el análisis del eyaculado mostró una gradual disminución en la concentración de espermatozoides a tal grado que llega a ser imposible identificarlos en el eyaculado, sin embargo, el volumen total del eyaculado y el libido del animal permanecieron sin

cambios (Ramírez en preparación). Estos resultados explican la disminución en los porcentajes de fertilidad observados en brotes naturales de la enfermedad (Campos 1991, CONASA 1995). Realizando el análisis histológico del testículo y el epidídimo logramos identificar lesiones semejantes a las identificadas por otros investigadores en cerdos de 8 meses de edad infectados experimentalmente (Ramírez en preparación); en nuestros resultados se observó que la severidad de la lesión fue menor en los cerdos sin granuloma en comparación con los cerdos que sí presentan granuloma. Las características de las lesiones histológicas como la vacuolización, destrucción e hiperromatismo de las células germinales; así como la destrucción del epitelio pseudoestratificado, sugiere que estas células son el sitio de multiplicación viral. Un cuadro histopatológico similar ha sido observado en los testículos y epidídimos de jóvenes infectados en forma natural con el virus de la parotiditis humana (Robbins *et al.*, 1984).

El RvP ha sido aislado a partir de diferentes órganos de lechones infectados natural y experimentalmente (Stephano *et al.*, 1988; Allan *et al.*, 1996); mostrando una amplia multiplicación en el sistema nervioso central, pulmón y órganos linfáticos asociados al tracto respiratorio; se ha confirmado la presencia del antígeno viral mediante inmunofluorescencia en esos tejidos; sin embargo, en estos animales no se ha demostrado la presencia del virus en órganos reproductores (Allan *et al.*, 1996). En cerdos adultos infectados experimentalmente se ha logrado aislar al RvP a partir del semen y de diversos órganos reproductivos, como son el epidídimo, los testículos y las glándulas bulbouretrales (Ramírez en preparación). En este trabajo se identificó la presencia del antígeno viral en cortes histológicos solamente de los epidídimos que mostraban las lesiones descritas con anterioridad, lo que confirma que dichas lesiones son el resultado de la multiplicación viral en estos tejidos. Reyes-Leyva *et al.*, (1993a) realizaron ensayos de competencia con diferentes azúcares con el objeto de estudiar el tropismo tisular del RvP; observando que, como en otros paramixovirus, el RvP reconoce moléculas ricas en ácido siálico, siendo el oligosacárido sialil $\alpha$ 2,3lactosa el único capaz de inhibir las actividades hemaglutinante y formadora de sincicios del virus. Nuestro grupo ha demostrado que la expresión de la molécula sialil $\alpha$ 2,3lactosa

en la membrana celular es determinante en la susceptibilidad de células Vero al RvP (Reyes-Leyva *et al.*, 1997). Recientemente, se ha identificado la presencia de sialil $\alpha$ 2,3lactosa en diferentes tejidos de cerdos sanos; sobre todo en el sistema nervioso central, principal órgano blanco de la infección en animales neonatos. En cerdos adultos, la expresión de este oligosacárido disminuye considerablemente en el sistema nervioso central, observándose por el contrario un notable incremento de su expresión en el epidídimo y testículo de estos animales (Reyes-Leyva en preparación). Todo estos datos indican que el oligosacárido sialil $\alpha$ 2,3lactosa es importante en la determinación del tropismo viral y la susceptibilidad tisular a la infección. La identificación del virus en órganos reproductivos de cerdos adultos y el tipo de lesiones observadas en este trabajo sugieren que el RvP es responsable de la formación del granuloma.

En cuanto a la respuesta humoral al Rubulavirus porcino, la implementación de técnicas para detectar anticuerpos específicos contra el RvP (Gay 1989; Hernández-Jáuregui *et al.*, 19929; Ramírez *et al.*, 1996) ha permitido realizar estudios epidemiológicos para conocer la distribución de la enfermedad en la República Mexicana (Carreón *et al.*, 1989). En la respuesta inmune a otros paramixovirus como el virus de parainfluenza 3, se ha reportado que los anticuerpos dirigidos contra la proteína HN se identifican desde el primer contacto con el virus y aumentan progresivamente con las reinfecciones; mientras que los anticuerpos contra la proteína F se detectan solo después de múltiples infecciones. En el caso del virus parainfluenza, se ha observado que el título de anticuerpos séricos dirigidos contra las glicoproteínas virales se correlaciona con el nivel de protección contra la infección (Ray *et al.*, 1990). Este trabajo demuestra que la inoculación experimental del RvP fue capaz de inducir la presencia de anticuerpos neutralizantes a partir de la primera semana de infección e inhibidores de la hemaglutinación después de la segunda semana; los cuales presentaron los títulos más elevados después de la formación del granuloma (tercera y cuarta semana de infección). El análisis de la especificidad de los anticuerpos, realizado mediante ensayos de inmunotransferencia, reveló que durante las primeras semanas de infección los anticuerpos están dirigidos contra la

glicoproteína HN; siendo hasta la cuarta y quinta semanas cuando se detecta la presencia de anticuerpos contra otras proteínas como son la M y la NP, respectivamente. No obstante que otras proteínas fueron reconocidas, la glicoproteína HN se mantuvo como inmunodominante durante todo el experimento; a diferencia de la glicoproteína F que no fue posible identificarla debido probablemente a la pobre inmunogenicidad de esta proteína (Ray *et al.*, 1990). Con base en estos resultados, se propone a la proteína HN como un buen candidato para la elaboración de vacunas que ayuden al control de la enfermedad en el país; por lo que en nuestro laboratorio se ha realizado la síntesis de algunos epitopes inmunogénicos de la proteína HN, los cuales se han determina por medio de algoritmos computacionales, los cuales son reconocidos por sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el RvP (Zenteno *et al.*, en preparación).

Hasta la fecha, los reportes relacionados con la respuesta inmune celular al Rubulavirus Porcino refieren observaciones clínicas que sugieren que la enfermedad es autolimitante, después de algún tiempo desaparecen los signos clínicos y no es posible detectar anticuerpos contra el virus en los animales que se conservaron en la granja (Stephano *et al.*, 1993). Sin embargo, no se han realizado estudios que permita identificar la participación de la respuesta celular como determinante de la autolimitación de la infección. En este trabajo se analizó la respuesta proliferativa de las células mononucleares (CMN) de cerdos infectados y testigos a las lectinas fitohemaglutinina (PHA) y Concanavalina A (Con A), las cuales son mitógenos que estimulan la proliferación policlonal de los linfocitos T; la PHA estimula a las células T cuando reconoce a la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  y del receptor del linfocito T (TCR) sin reconocer el complejo CD3 (Chilson *et al.*, 1989); por otro lado la Con A estimula los linfocitos T cuando reconoce complejo CD3 y las cadenas del TCR (Licastro *et al.*, 1993).

El análisis de la respuesta proliferativa de CMN a PHA en los cerdos infectados y testigos no mostró diferencias significativas entre ellos; por el contrario, en la respuesta proliferativa a Con A se observó que los cerdos con granulomas macroscópicos presentaron una disminución significativa en sus índices de proliferación, durante las dos primeras semanas de infección en comparación con los

cerdos infectados que no presentaron granulomas visibles y con el grupo de cerdos sin infectar, en los cuales no se observaron cambios en la respuesta. A partir de la tercera semana la respuesta a Con A no mostró cambios en ninguno de los grupos. Alteraciones similares se han reportado en otras infecciones virales tales como el virus del Sarampión o con el virus de la enfermedad del Aujeszky. En el caso del virus del Sarampión, se ha propuesto que el defecto se presenta debido a la ausencia de citocinas coestimuladoras como la IL-2 ya que la administración *in vitro* de esta citocina restaura la proliferación de las CMN (Ward *et al.*, 1993; Griffin *et al.*, 1986); en la enfermedad del Aujeszky, además se ha propuesto la presencia de algunos factores solubles inducidos por el virus que inhiben la proliferación de las CMN (Chinsakchai *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha demostrado que la infección de los monocitos con el virus del Sarampión puede ser otra causa para que se presente una disminución en la respuesta proliferativa a lectinas mitogénicas (Esolen *et al.*, 1993; Griffin *et al.*, 1994), debido a que las lectinas mitogénicas como la PHA necesitan la presencia de células presentadoras de antígeno, ya que anticuerpos dirigidos contra el MHC suprimen la respuesta proliferativa inducida por esta lectina (Kimura and Ersson, 1981; Licastro *et al.*, 1993). En nuestros resultados se observó que los cerdos que presentan una disminución en la respuesta proliferativa a Con A, responden correctamente a la lectina PHA, lo que sugiere que la alteración en la respuesta que presentan los animales infectados con el RVP, es diferente a la que se presentan con el virus del Sarampión o con el virus de la enfermedad de Aujeszky, que provocan disminución en la respuesta de CMN a Con A. Se ha demostrado que en la respuesta proliferativa del linfocito porcino a Con A requiere la participación activa de la porción  $\epsilon$  del CD3, así como algunos mecanismos de activación intracelular como la p72<sup>th</sup> (Takeuchi *et al.*, 1993). Considerando que se aprecia una deficiente respuesta a la Con A en los linfocitos de algunos animales infectados principalmente en la primera y segunda semana de la infección, sería importante evaluar los mecanismos de activación celular mediados por el CD3 o la p72<sup>th</sup>, en la infección con el Rubulavirus porcino.

La respuesta proliferativa de las CMN frente al Rubulavirus Porcino se identificó a partir de la segunda semana de infección, semana en que se presentan los

granulomas en epidídimo. La mejor respuesta proliferativa de las CMN al RvP se presentó en la cuarta semana de infección y en la siguiente semana disminuyó gradualmente. Estos resultados confirman que la enfermedad de Ojo Azul es autolimitante como se había propuesto (Stephano *et al.*, 1988), y sugiere que el proceso se inicia a partir de la cuarta semana de infección, después de que se han desarrollado las lesiones de la enfermedad, debido a la eliminación del virus mediante mecanismos celulares. Además, podemos proponer que las tres primeras semanas de infección son críticas para el desarrollo de la infección, ya que los animales con una pobre respuesta inmune celular durante este tiempo desarrollan granulomas en epidídimo y atrofia testicular.

La presencia de linfocitos T dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) es un evento único en los cerdos, que se presenta en condiciones normales en sangre periférica y en tejidos linfoides (Saalmüller *et al.*, 1987; Zuckermann *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996); a diferencia del humano que en condiciones normales expresa <3% de linfocitos dobles positivos, y en algunos procesos patológicos expresa hasta un 15% (De Maria *et al.*, 1987). Resultados recientes sugieren que la población doble positiva del cerdo podría representar una estirpe de células de memoria, ya que estas células expresan altos porcentajes de la integrina  $\alpha 4/\beta 1$ , que en humanos se ha relacionado con células de memoria, en comparación con los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Zuckermann *et al.*, 1996). Además, esta población de linfocitos es capaz de responder al estímulo antigénico *in vitro*, predominantemente después del estímulo con virus, bacterias o parásitos sobre otras poblaciones celulares (Pescovitz *et al.*, 1994; Kimman *et al.*, 1995; Zuckermann *et al.*, 1996). Ese trabajo muestra que tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> como los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> son capaces de responder al estímulo *in vitro* con el virus, pero en nuestros resultados observamos que el incremento en los porcentajes de las células dobles positivas fue mayor al de las CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> en comparación con el control, y en base a los antecedentes de esta población, podemos suponer que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> podrían estar jugando un papel importante en la respuesta secundaria frente al RvP.

Estudios realizados en cerdo infectados con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS) (Shimizu *et al.*, 1996), con el virus de la Fiebre Porcina

Africana (FPA) (Ramiro-Ibáñez *et al.*, 1997) y con el virus de la enfermedad de Aujeszky (Wang *et al.*, 1988; Kimman *et al.*, 1995), han mostrado los cambios en las poblaciones celulares de sangre periférica debidos a la infección; los resultados de estos estudios revelaron una disminución en los porcentajes de linfocitos CD4 y aumento de los linfocitos CD8; es importante hacer notar que ninguno de estos estudios ha evaluado la población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, debido probablemente a la dificultad de su análisis. En los cerdos infectados con PRRS, los autores además de analizar los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, determinaron la proporción de linfocitos CD4/CD8, observando que esta proporción disminuye debido a la disminución de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y al aumento de CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, por lo que los autores sugieren la existencia de ciertos estímulos fisiológicos en los cerdos infectados con PRRS que inducen el incremento en los linfocitos CD8 (Shimizu *et al.*, 1996); esta deducción la basaron en el hecho de que el virus no fue capaz de eliminar la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> o que el virus fuera capaz de estimular la proliferación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Por el contrario, en los cerdos infectados con el virus de la FPA que presentaron la misma tendencia en las poblaciones celulares, disminución de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y el aumento de los CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> en la infección aguda y el aumento de ambas poblaciones en la infección crónica; los autores sugieren que en la infección aguda la actividad citotóxica de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no requieren la participación de los linfocitos cooperadores, como sucede con la infección por citomegalovirus en roedores donde la eliminación de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no afecta el control del virus por la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Jonjic *et al.*, 1989); mientras que en la infección crónica, es necesaria la participación de ambas poblaciones celulares. Un dato interesante obtenido en este trabajo, fue la determinación de la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> durante infección por el RvP, la cual no ha sido reportada previamente en otra infección del cerdo.

Los cambios en las poblaciones celulares durante la infección del RvP fueron similares a otras infecciones virales del cerdo; en las cuales se presenta un aumento en la población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y una disminución en la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Nuestros resultados indicaron que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> se incrementaron 40% en la primera semana y 16% en la segunda semana, en los cerdos sin granuloma; mientras

que los porcentajes de CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuyen gradualmente durante la infección en los cerdos con y sin granuloma. Una posible explicación a la disminución de los CD4 sería que el virus estuviera eliminando esta población celular, como sucede con el virus del SIDA ( ); pero después de analizar la susceptibilidad de las células no adherentes y observar que únicamente el RvP es capaz de reconocer el 19% de esta población sin multiplicarse en ella, podemos asegurar que este fenómeno no se presenta en la infección por el RvP, por lo que podríamos pensar que la disminución de esta población podría deberse a un reclutamiento celular en los órganos blanco de la infección del RvP, como se ha propuesto en otras infecciones virales del cerdo (Page *et al.*, 1992). Por otro lado, el mayor aumento de la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en los cerdos sin granuloma en comparación con los cerdos que desarrollaron granuloma durante las primeras semana de infección, nos sugiere que la actividad citotóxica es importante en el control de la multiplicación viral en el epidídimo y testículo. En cuanto a la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> el incremento gradual durante la infección por el RvP, en primer lugar podría deberse a un reflejo normal de esta población, ya que previamente se ha reportado que esta población incrementa con la edad del animal (Saalmueller *et al.* 1994) poco probable ya que los cerdos infectados presentaron mayor aumento que los no infectados; otra posibilidad es que el incremento refleje mayor memoria inmune frente al RvP y en consecuencia mejor control de la enfermedad.

La población de monocitos ha mostrado ser un importante sitio para la multiplicación del virus del Sarampión (Solonen *et al.*, 1988; Esolen *et al.*, 1993) y el virus de la enfermedad de Aujeszky (Chinsakchai *et al.*, 1994), entre otras infecciones virales. Nuestros resultados indican que el RvP también reconoce preferencialmente a los monocitos; los ensayos de susceptibilidad en las células adherentes de cerdos sanos mostraron que el RvP reconoce el 43% de los monocitos y forma sincicios, provocando lisis celular, detectándose la presencia del RvP en el líquido de cultivo después de 72 h incubación. Por otro lado, aunque el RvP también reconoce linfocitos no es capaz de multiplicarse en su interior, lo cual sugiere un posible papel de los linfocitos (y células mononucleares en general) en el transporte sanguíneo del virus hacia sus órganos blanco.



Este trabajo presentó los primeros reportes de la respuesta celular y humoral al Rubulavirus Porcino; posteriores estudios serán necesarios para determinar: cuales son los mecanismos que determinan que respuesta celular eficaz que capaz de controlar la multiplicación del virus en los órganos blanco y en consecuencia evite lesiones granulomatosas. Además, será interesante identificar cómo se encuentra la distribución de las poblaciones celulares de linfocitos en el sitio del daño, analizar el posible papel de los linfocitos en el transporte de virus y la participación de la glicoproteínas virales en el transporte o en actividades reguladoras de la respuesta inmune.

## CONCLUSIONES

1. Los signos clínicos y las lesiones en órganos sexuales fueron reproducidos experimentalmente en cerdos adultos inoculados por vía intranasal con el Rubulavirus Porcino-PAC3; aunque la severidad y la formación del granuloma fue más evidente en tres de los siete animales infectados. Los granulomas se forman entre la segunda y tercera semana de infección.
2. El análisis de la respuesta humoral y celular se realizó en base a la severidad de las lesiones que presentaron los cerdos, identificando que:
  - a) los cerdos sin granulomas y con ligeras lesiones en los órganos blanco, no presentaron cambios en la respuesta a las lectinas PHA y Con A con respecto a los cerdos control; la respuesta proliferativa *in vitro* al RvP fue mayor que en los cerdos con granulomas y presentaron títulos bajos de anticuerpos contra el RvP-PAC3.
  - b) los cerdos con granulomas y con severas lesiones en los órganos blanco, presentaron una disminución en la respuesta a Con A en las primeras semanas de infección y títulos altos de anticuerpos.
3. El análisis de los porcentajes de las poblaciones celulares de sangre periférica permitió identificar que :
  - c) este es el primer trabajo que analiza la población de linfocitos  $CD4^+CD8^+$  durante una infección experimental del cerdo.
  - d) los cerdos sin granuloma, presentaron los porcentajes más elevados de linfocitos  $CD4^+CD8^+$  y de monocitos en las primeras semanas de infección.
  - e) los cerdos con granuloma, presentaron los porcentajes más elevados de linfocitos B.

- f) los porcentajes de linfocitos  $CD4^+CD8^-$  disminuyeron durante la infección en ambos grupos de cerdos, pero esta disminución fue más notable en las primeras semanas en los cerdos con granulomas.
  - g) los porcentajes de linfocitos  $CD4^+CD8^+$  presentaron una tendencia ascendente en ambos grupos, pero en la cuarta semana de infección los cerdos sin granulomas presentaron los porcentajes más elevados.
4. El análisis de la respuesta humoral y la especificidad de los anticuerpos séricos por inmunotransferencia demostraron que :
- d) es posible identificar anticuerpos séricos contra el RvP a partir de la primera semana de infección; presentando sus títulos más elevados después de la formación del granuloma (tercera y cuarta semana)
  - e) la proteína HN puede ser considerada como el antígeno inmunodominante del RvP, y por lo tanto como un potencial antígeno para la elaboración de una vacuna.
5. Los ensayos de susceptibilidad mostraron que:
- e) el RvP utiliza como célula blanco para la multiplicación viral a los monocitos.
  - f) el RvP es capaz de reconocer un 19% de los linfocitos, lo que junto con la disminución que se presenta en la infección experimental de los cerdos, podría sugerir que el virus utiliza esta población como medio de transporte para alcanzar sus órganos blanco.
  - g) la infección de linfoblastos in vitro induce la expresión del marcador  $CD8+$  en células  $CD4+CD8-$ .

## **PERSPECTIVAS.**

- Identificar los mecanismos de transporte que utiliza el Rubulavirus Porcino para alcanzar el testículo y el epidídimo
- Estudiar los mecanismos involucrados en la modulación de la respuesta inmune al Rubulavirus Porcino.
- Estudiar los mecanismos de la expresión del CD8 en la población de linfocitos CD4, y su posible efecto modulador, cooperador o citotóxico en la infección del Rubulavirus Porcino.

## PRODUCCION OBTENIDA EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO

### Congresos:

Hernández J, Ramírez H, Zenteno R, Espinosa B, Hernández P, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E y Reyes J (1996). "Determinación por Citometría de Flujo de Subpoblaciones de Linfocitos de cerdos infectados con el Rubulavirus Porcino LPM". V Reunión Nacional de Investigación Médica, Septiembre 25-27, Oaxtepec Mor.

Garfias Becerra Y, Hernández J, Reyes J y Zenteno E. (1995) "El Paramixovirus Porcino, prototipo para estudiar enfermedades causadas por Paramixovirus". Gaceta Médica de México, vol 131, suplém 1, p52.

Hernández López J, Espinosa Mancilla B, Zenteno Cuevas R, Reyes Leyva J, Hernández Jáuregui P y Zenteno Galindo E. (1994) "Características patológicas y estructurales de diferentes aislamientos del Paramixovirus Porcino ". III Reunión Nacional de Investigación Médica, IMSS, Oaxtepec, Mor.

Hernández J, H Ramírez, R Carreón, C Mercado, R Lascrain, P Hernández-Jáuregui, J Reyes-Leyva and E. Zenteno. (1994) "Several isolates of the Porcine Paramixovirus can be sorted into two groups with different behavior". 3rd International Congress of Veterinary Virology Interlaken, Suiza.

Hernández J, Ramírez H, Carreón R, Mercado C, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J y Zenteno E. (1994) "Diferencias biológicas y estructurales definen dos grupos de Paramixovirus Porcino". XXIX Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC), Puerto Vallarta, Jalisco.

Hernández J, Ramírez H, Carreón R, Zenteno R, Reyes J, Hernández-Jáuregui P y Zenteno E (1995). "Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en cerdos infectados con el Paramixovirus porcino". Jornadas de Médicos Residentes de IMSS, Puebla, Pue.

Hernández J, Ramírez H, Zenteno R, Espinosa B, Hernández JP, Reyes LJ, and Zenteno E. "Immune response to porcine rubulavirus". Enviado al congreso de la Sociedad Europea de Virología Veterinaria, que se celebrará en el mes de Agosto del presente en Escocia.

### Publicaciones

Reyes-Leyva J., Espinosa B., Hernández J., Zenteno R., Vallejo V., Hernández P. and Zenteno E. (1997) NeuAc<sub>2</sub>3Gal- glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. Aceptado Comp. Biochem. Physiol.

## REFERENCIAS.

- Allan GM., McNeilly. Walker I, Linne T, Moreno-López J, Herna'ndez P, Kennedy, Carrol BP, Herron B, Foster JC and Adair B. (1996) A sequential study of experimental porcine parainfluenza virus (PPV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Invest.*, **8**: 405-413.
- Berg M., Sundqvist A., Moreno-López J. And Linne T. (1991) Identification of the porcine parainfluenza virus (PPV) matrix protein gene: comparative sequence with other parainfluenza viruses. *J Gen Virol.*, **72**: 1045-1050.
- Berg M., Hjertner B., Moreno-López J. And Linné T. (1992) The P gene of the porcine parainfluenza virus encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol.*, **73**: 1195-1200.
- Binnendijk R., Poelen M., Kuijpers K., Osterhaus A. and Uytendaele F. (1990) The predominance of CD8+T cells after infection with Measles virus suggest a role for CD8+ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. *J Immunol*, **144**: 2394-2399.
- Biron AC. (1994) Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol*, **6**: 530-538.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.*, **72**: 248-259.
- Campos H. y Carbajal F. (1991) Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de Ojo Azul. XXVI Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, Manzanillo Col, pp 62-64.
- Carreón R., Fuentes M., Stephano A. y Rampirez H. (1989) Estudios preliminares del parainfluenza virus del Ojo Azul en la República Mexicana. En: Doperto J y Pérez F (Eds) *Memorias del curso de actualización de las enfermedades del Cerdo*. Ed. UNAM-AMVEC., México p78-82.
- Chilson P. and Kelly-Chilson. (1989) Mitogenic lectins binds to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol.*, **19**: 389-395.
- Chinsakchai S and Molitor T. (1994) Immunobiology of pseudorabies virus infection in swine. *Vet Immunol and Immunopathol.*, **43**: 107-116.

- De María A., Malnati M. and Moreta A. (1987) CD3+4-8- w31- (T cell receptor  $\gamma\delta$ +) cells and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin-2 responsive T lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.*, **17**: 1815.
- Doherty P. (1995) Anatomical environment as a determinant in viral immunity. *J Immunol.*, **155**: 1023-1027.
- Doring RE, Marcil A. Chopra A. and Richardson CD (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.*, **75** : 295-305
- Esolen L., Ward B., Moench T. and Griffin D. (1993) Infection of monocytes during Measles. *J Infect Dis.*, **168**: 47-52.
- Forthal D., Aarnaes S., Blanding J., Maza L. and Tilles J. (1992) Degree and length of viremia in adults with Measles. *J Infect Dis.*, **166**: 421-24.
- Fuentes M., Carreón R., Stephano A. and Trujillo M. (1990) Frequency of Blue Eye paramixovirus in México pigs. Proceedings 11<sup>th</sup> Congress, International Pig Veterinary Society., Lausanne, Suiza.
- Gay M. J. (1989) Pruebas de laboratorio para el diagnóstico del Ojo Azul. Memorias del curso sobre actualización de enfermedades virales del cerdo. UNAM-AMVEC-ROUSEEL, 83-84.
- Griffin D., Ward B. and Esolen L. (1994) Pathogenesis of Measles virus infection: An hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis.*, **170** (Suppl 1): S24-31.
- Hernández J, Ramírez H, Carreón R, Mercado C, Lascurain R, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J and Zenteno E. (1994) " Several isolates of the Porcine Paramixovirus can be sorted into two groups with diferents behavior ". 3rd International Congress of Veterinary Virology Interlaken, Suiza
- Hernández-Jáuregui P., Sundqvist A., Fuentes M., Diaz A., Reyes J., Hernández Eliseo y Moreno-López J. (1992) Correlación entre las pruebas de Virus Neutralización, Inhibición de la Hemaglutinación y ELISA en sueros de cerdos vacunates y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del síndrome del Ojo Azul de los cerdos. *Vet Mex.*, **23**: 217-221.
- Kearsey J. and Stadnyk A. (1996) Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods.*, **194**: 35-48.

- Kimman T., Bianchi A., Wensvoort G., Bruin T. and Meliefste C. (1993) Cellular immune response to Hog Cholera Virus (HCV): T cell of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelop glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J Virol*, **67**: 2922-2927.
- Kimman T., Bruin T., Voermans J., Peeters B and Bianchi A. (1995) Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell response. *Immunology*, **86**: 372-378.
- Kingsbury W.D. (1990): Paramixoviridae and their replication. In Fields B.N., Knipe M.D. (Ed.), *Virology*. Raven Press, New York, pp 945-961
- Koszinowski U., Reddehase M. and Jonjic S. (1991) The role of CD4 and CD8 cells in viral infections. *Curr Opin Immunol.*, **3**: 471-475.
- Laemmli. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**: 680-685.
- Licastro F., Davis L. and Morini M. (1993) Lectines and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int J Biochem*, **25**: 845-852
- Linné T., Berg M., Bergvall A., Hjertner B., Moreno-López J. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet Microbiol.*, **33**: 263-273.
- Moreno-López J., Girón-Correa P., Martínez A and Ericsson A. (1986) Characterisation of a paramyxovirus isolated from brain of a piglet in México. *Arch Virol*, **91**: 221-231.
- Morrison G. (1988) Structure, function and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.*, **10**: 113-136.
- Mosley R., Styre D. and Klein J. (1990) CD4+CD8+ murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Int Immunol.*, **2**: 361-365.
- Murray N and McMichael A. (1992). Antigen presentation in virus infection. *Curr Opin Immunol*, **4**: 401-407.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. Gavrrial S.A., Jarvis A., Martell W.G.P., Mayo M.A. and Summers M.D. (Eds) (1995) *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the international committee on taxonomy of virus. Viena-Nueva York, Springer-Verlag.
- Ortolani C., Forti E., Radin E., Cibin R. and Cossarizza A. (1993) Cytofluorometric identification of two populations of double positive (CD4+CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Comm* **191**: 601.



Page G., Wang F. and Hahn E. (1992) Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes. *J Leukocyte Biol*, 52: 441-448.

Pauly T., Weiland E., Hirt W., Dreyer-bux C., Maurer S., Summerfield A. and Saalmueller A. (1996) Differentiation between MHC-restricted and non-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology*, 88: 238-246.

Pérez F., Stephano A y Gay M. (1988) Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del Ojo Azul. XXIII Reunion de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. León Gto. México p 81-83.

Pescovitz M., Lunney J., Sachs D. (1985) Murine anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic cells. *J Immunol*, 134: 37-44.

Pescovitz M., Sakopoulos A., Gaddy J., Husmann R. and Zuckermann F. (1994) Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet Immunol and Immunopathol.*, 43: 53-62.

Ramírez H., Carreón R. and Mercado C (1996). Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino, através de la identificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. México.*, 27: 257-259.

Ramírez H en preparación (1997).

Ramiro-Ibañes F., Ortega A., Ruiz-Gonzalvo F., Escribano J. and Alonso C. (1997) Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. *Virus Res*, 47: 31-40

Ray R., & Compans R. (1990) In Regenmotel M and Neurath A. (Ed.) *Immunochemistry of virus*, II. The basis for serodiagnosis and vaccines. Elsevier Science Publishers B.V. pp 217-236.

Reyes-Leyva J., Hernández-Jáuregui P., Montañón L. and Zenteno E. (1993a) The porcine paramixovirus LPM specifically recognize sialyl ( $\alpha$  2,3) lactosa-containing structures. *Arch Virol*, 133: 195-200.

Reyes Leyva J. (1993b) Caracterización de receptores celulares del paramixovirus porcino LPM. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, UNAM, México

Reyes-Leyva J., Espinosa B., Hernández J., Zenteno R., Vallejo V., Hernández P. and Zenteno E. (1997) NeuAc $\alpha$ 2,3-Gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Aceptado Comp Biochem Physiol*

**Robbins S. L. and Cotran R. S. (1984) Aparato Reprodutor Masculino. In Patología Estructural y Funcional., 2a. Edición, Editorial Interamericana.**

**Roizman B. (1990) Multiplication of viruses, an overview. In: Fields BN, Knipe DM et al. (Eds) Virology, 2<sup>nd</sup> Ed., Raven Press, New York, p 87-94.**

**Rosales F., Martínez A. y Correa P. (1988) Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociados al "síndrome del Ojo Azul". Tec Pac Mex., 28: 304-311.**

**Rose R. Noel et al. (1992): Manual of clinical laboratory immunology. American Society of Microbiology.**

**Saalmüller A., Hirt W. And Reddehase M., Bühring H., Jonjic S., and Koszinowski U. (1987) Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. Eur J Immunol., 17: 1297-1301.**

**Saalmüller A., Hirt W. And Reddehase M. (1989) Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. Eur J Immunol., 19: 2011-2016.**

**Saalmüller A., Hirt W., Maurer S. and Weiland E. (1994a) Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. Immunology., 81: 578-583.**

**Saalmüller A. and Bryant J. (1994b) Characteristics of porcine T lymphocytes and T cell lines. Vet Immunol and Immunopathol., 43: 45-22.**

**Schneider-Shaulies S, Kreth HW, Hofmann G, Billeter M and Meulen Ter V. (1991) Expression of Measles Virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. Virology., 182: 703-711.**

**Schnittman S., Lana H., Greenhouse J., Justement J., Baseler M. and Fauci A. (1990) Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective t-cell functional defects observed in infected individuals. Pro. Natl. Acad. Sci (USA), 87: 6158-6062.**

**Shimizu M., Yamada S., Kawashima K., Ohashi S., Shimizu S. and Ogawa T. (1996) Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vet Immunol Immunopathol., 50: 19-27.**

**Solonen R., Llonén P. and Salmi A. (1988) Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells in vitro: antigen expression and virus production preferentially in monocytes. Clin Exp Immunol, 71: 224-228.**

Stephano A., Gay M., Ramirez C y Maqueda J. (1981) Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. XVII Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Ixtapa-Zihuatanejo, México p 97.

Stephano A. y Gay M. (1983) El síndrome del Ojo Azul, estudio experimental. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México D.F. p 523-526

Stephano A., Gay M. and Ramirez C. (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (Blue Eye) in pigs, associate with a paramixovirus infection. *Vet Rec.*, 122: 6-10.

Stephano A., Hernández D., Pérez C., González T., Ramírez H. AND Cervantes A. (1990) Boar infertility and testicular atrophy associated with Blue Eye paramixovirus infection. Proceedings 11<sup>th</sup> Congress, International Pig Veterinary Society.. Lausane, Suiza. p 99.

Stephano A. (1994) Blue Eye diseases. In: Mengeling (Eds.) *Swine Diseases*, 237-241.

Summerfiel A., Rziha H.J and Saalmüller A. (1996) Functional characterisation of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes. *Cell Immunol*, 168: 291-296

Sundqvist A., Berg M., Hernández-Jáuregui P., Linne T and Moreno-López J. (1990) The structural proteins of porcine paramixovirus (LPMV). *J Gen Virol*, 71: 609-613.

Sundqvist A., Berg M., Moreno-López J and Linné T. (1991) The Haemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of the porcine paramixovirus LPMV: comparison with other paramixovirus revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol*, 122: 331-340.

Takeuchi F., Taniguchi T., Maeda H., Fujii C., Takeuchi N and Yamamura H. (1993) The lectine Concanavalina A stimulate a protein-tyrosine kinase p72syk in peripheral blood lymphocytes. *Bioch Bioph Res Commun.*, 194: 91-96.

Wang F., Pang V. and Hahn E. (1988) Flow cytometric analysis of porcine peripheral blood leukocytes infected with pseudorabies virus. *J Leukoc Biol.*, 43: 256-264.

Ward B., Jhonson R., Vaisberg A., Jauregui E. and Griffin D. (1990) Spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells in natural Measles virus infection: Identification of dividing cells and correlation with mitogen responsiveness. *Clin Immunol and Immunopathol.*, 55: 315-326.

Yang H. and Parkhouse M.E. (1996) Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*, 89: 76-83.

Zenteno R. Tesis de Maestría (1997). Universidad Nacional Autonoma de México.

Zuckermann F. and Gaskins H. (1996) Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology*, **87**: 493-499.

Zuckermann F.A. and Husmann R.J. (1996) Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*, **87**: 500-512.