

RESPUESTA INMUNE AL RUBULAVIRUS PORCINO (RvP).

\*HERNANDEZ J., RAMIREZ H., ZENIENO R., ESPINOSA B., HERNANDEZ-JAUREGUI P., REYES-LEYVA J. y ZENIENO E.

LAB. DE INMUNOLOGIA, DEPTO DE BIOQUIMICA, FAC DE MEDICINA; LAB DE VIROLOGIA, DEPTO DE PRODUCCION ANIMAL CERDOS, FAC DE MVZ, UNAM; y DEPTO DE BIOQUIMICA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER).

\* Email: jhdez @ laguna.fmedic.unam.mx

### Introducción.

Dentro de la familia paramixoviridae, subfamilia paramixovirinae y género rubulavirus se clasifica el Rubulavirus Porcino (RvP), responsable de la enfermedad del Ojo Azul de los cerdos que se caracteriza por afectar a cerdos de todas las edades provocando en los lechones problemas neurológicos y respiratorios, mientras que en los cerdos adultos afectados se presentan problemas respiratorios y reproductivos caracterizados estos últimos por la presencia de granulomas en el epidídimo y atrofia testicular. A la fecha los estudios realizados en torno a esta enfermedad ha permitido identificar algunas características biológicas y estructurales, pero desafortunadamente no se conocen cuales son las características de respuesta inmune de cerdos infectados con este virus. El objetivo de este trabajo es determinar algunos parámetros de la respuesta inmune humoral y celular al Rubulavirus Porcino.

### Material y Métodos.

**Infección experimental y toma de muestras.** 7 cerdos machos de 6 meses de edad se infectaron por vía intranasal con 5ml del Rubulavirus porcino cepa PAC3 (RP-PAC3) con un título de  $10^8$  DICC<sub>50</sub>. Esta cepa fue aislada a partir de un brote de la enfermedad del Ojo Azul por el Dr. Ramírez. Después de siete semanas de infección los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diferentes tejidos para su evaluación histopatológica y la detección del antígeno utilizando un anticuerpo fluorescente.

**Determinación de Anticuerpos.** Antes y después de la infección se tomaron muestras de sangre para separar el suero y determinar la presencia de anticuerpos contra el RvP por Neutralización Viral (NV) y por Inhibición de la hemaglutinación (IH).

**Identificación de las proteínas inmunodominantes del RvP.** Después de la electroforesis del RvP en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, el virus fue transferido a papel nitrocelulosa, se bloqueó con PBS-Leche y se incubó con los sueros de los cerdos infectados. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo anti-gamas de cerdo acoplado a Biotina, y finalmente con extravidina-peroxidasa. Para revelar se utilizó diaminobenzidina parando la reacción con agua.

**Ensayos de proliferación.** Antes y después de la infección se tomaron muestras de sangre con anticoagulante para separar células mononucleares (CMN) y ajustarlas a  $1.5 \times 10^6$ /ml; 100µl de la suspensión celular se estimuló por 5 días con el RvP-PAC3 (10µg/ml) y 3 días con Con A (1µg/ml) o PHA (8µg/ml); 18h antes de cosechar las CMN se marcaron con 1µC de timidina tritiada (<sup>3</sup>HdTR).

**Determinación de poblaciones celulares.**  $1 \times 10^6$ /ml se incubaron con los anticuerpos anti-M1, anti-IgM o anti-CD2 y determinar monocitos, linfocitos B y linfocitos T, respectivamente. Después se incubaron con anti-IgG (FITC) o con un anti-IgM (Cy5). Los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, se determinaron incubando las CMN con un anti-CD4 (IgG2b) y anti-CD8 (IgG2a), y después con un anti-IgG2a (FITC) y un anti-IgG2b (PE). Las CMN marcadas se analizaron por Citometría de Flujo. Las poblaciones que predominan después del estímulo viral se realizó con el mismo procedimiento, pero en este caso utilizando las células estimuladas.

**Susceptibilidad de células adherentes y no adherentes.** Las poblaciones que reconoce el RvP se realizó incubando las CMN con el virus y un anti-RvP con FITC, después se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Las células adherentes y no adherentes se separaron incubando las CMN 1h a 37°C. Las poblaciones se ajustaron a un volumen final de 600 µl con medio RPMI adicionando 300 DICC<sub>50</sub> del RvP-PAC3. Diariamente se colectaron 50 µl del sobrenadante para determinar su actividad aglutinante.

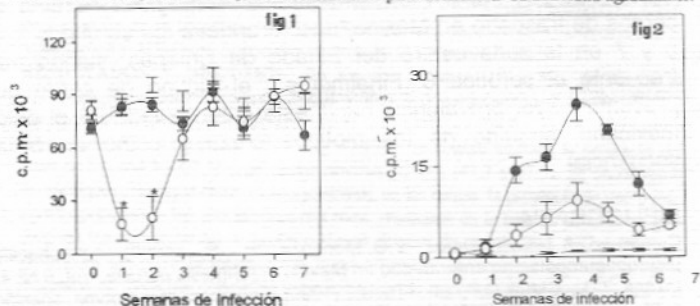


Figura 1 y 2. Respuesta proliferativa de células mononucleares a Con A y al Rubulavirus Porcino-Pac3, respectivamente. Los resultados representan la media ± la desviación estándar de las c.p.m. de ensayos realizados por triplicado. Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar, ●, cerdos sin-G; ○, cerdos con-G.

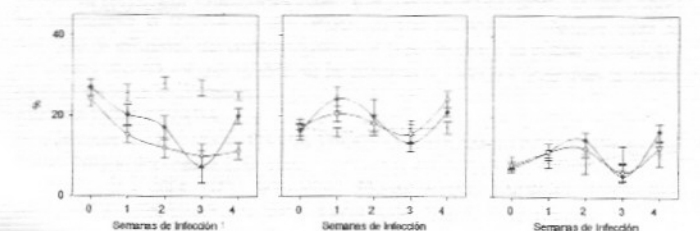


Figura 3. Porcentajes celulares de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (A), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B) y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (C). Línea discontinua, 3 cerdos control sin infectar, ●, cerdos sin-G; ○, cerdos con-G.

### Resultados.

**Infección experimental.** Después de la infección experimental los cerdos infectados aumentaron su temperatura corporal, conjuntivitis y tos. Entre la segunda y tercera semana pi, tres de los animales infectados presentaron aumento del volumen testicular y fue posible percibir la presencia del granuloma en la cabeza de epidídimo al tacto. El daño histológico fue mayor en los cerdos con granuloma, en los cuales se identificó el antígeno viral.

**Respuesta Humoral.** La técnica de NV identificó anticuerpos anti-RvP en la primera semana pi, mientras que por IH los anticuerpos se identificaron en la segunda semana pi. Los títulos de anticuerpos fueron más elevados en los cerdos con granulomas, y al comparar los títulos neutralizantes e inhibidores, se observó que los primeros fueron más elevados. En los ensayos para identificar las proteínas que son reconocidas por el RvP se observó que la proteína HN es reconocida por los sueros de todos los cerdos infectados a partir de la segunda semana de infección, mientras que la proteína M y la NP se identifican a partir de la cuarta y quinta semana pi, respectivamente.

**Respuesta celular.** Los ensayos de proliferación con la lectina PHA no presentaron cambios en la incorporación de <sup>3</sup>HdTR (datos no mostrados). La respuesta a Con A disminuyó (<1000 c.p.m.) durante las primeras semanas pi en los cerdos con granulomas (con-G), mientras que en los cerdos sin granulomas (sin-G) se mantuvo sin cambios (fig 1). La respuesta proliferativa al RvP-PAC3 presentó un comportamiento bimodal similar a la Con A (fig 2). En los cerdos sin-G la respuesta se presentó a partir de la segunda semana pi alcanzando la máxima incorporación de <sup>3</sup>HdTR (>25000 c.p.m.) en la cuarta semana pi. Los cerdos con-G mostraron la misma tendencia, con menor incorporación de <sup>3</sup>HdTR (10000 c.p.m.). El análisis de las poblaciones que proliferan en presencia del RvP mostró que en las CMN estimuladas con el RvP los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aumentaron 110% con respecto a las células sin estimular, mientras que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> aumentaron 95%. En las CMN estimuladas con PHA, los únicos linfocitos que predominaron fueron los CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (190%). La determinación de las poblaciones celulares mostró los linfocitos T totales (CD2<sup>+</sup>) aumentaron 40% y 16% en los cerdos sin-G, y en los cerdos con-G permanecieron sin cambios. Los linfocitos B mostraron una tendencia irregular; en las dos primeras semanas pi aumentaron 6 y 12% respectivamente en los cerdos con-G. Los monocitos presentaron un comportamiento homogéneo en todos los cerdos infectados, con tendencia decreciente después de un incremento en la primera semana pi. Las subpoblaciones de linfocitos T mostraron que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> disminuyeron gradualmente hasta la tercera semana pi; los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> incrementaron 33% en los cerdos sin-G y del 17% en los cerdos con-G durante la primera semana pi. Finalmente, la población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aumentó durante la infección, alcanzando en la cuarta semana pi 60 y 20% en los cerdos sin-G y con-G, con respecto a los cerdos sin infectar (fig 3). Los ensayos de susceptibilidad mostraron que el RvP reconoce el 43% de los monocitos, y además es capaz de multiplicarse en esta población. En las infecciones experimentales de linfocitos T no fue posible identificar virus.

### Discusión.

Este estudio identificó las primeras características de la respuesta humoral y celular al Rubulavirus Porcino-PAC3 (RvP-PAC3). Este trabajo demuestra que los anticuerpos neutralizantes contra el virus se pueden identificar en la primera semana pi, y en la segunda semana los inhibidores de la Hemaglutinación. La proteína HN mostró ser la proteína inmunodominante del RvP, lo que sugiere que esta proteína podría ser un buen candidato para la elaboración de una vacuna para el control de la enfermedad del Ojo Azul de los cerdos.

En la respuesta celular, este trabajo identificó que los cerdos infectados presentan respuesta proliferativa de CMN al RvP-PAC3, la cual está ausente en cerdos sin infectar. Fue interesante identificar que los cerdos que presentaron granulomas, desarrollaron una menor respuesta proliferativa tanto a la Con A como al RvP, a diferencia de los cerdos que no presentaron granulomas. Estos resultados sugieren que la respuesta celular es importante en el control de la infección evitando la formación del granuloma. El análisis de las poblaciones que predominan después del estímulo *in vitro* con el RvP-PAC3, fue similar a otras infecciones virales del cerdo, en las que se predominan los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. El análisis de las poblaciones celulares durante la infección demostró, que los linfocitos T y monocitos son las poblaciones encargadas del transporte del virus a los órganos blanco, siendo esta última la que permite la multiplicación del virus. Por otro lado, los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> presentaron la misma tendencia que se ha observado en la FPC y en el PRRS, en los cuales durante la infección disminuyen los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e incrementan los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y como resultado se invierte la relación CD4/CD8. En nuestro trabajo a diferencia de estos trabajos, nosotros analizamos el comportamiento de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> los cuales se incrementaron 60% en los cerdos que no presentaron granulomas y 20% en los cerdos con granulomas.

### Referencias.

- 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.
- Linné T., Berg M., Bergvall, Hjerner B. and Moreno-López J. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. Vet Microbiol., 33: 263-273.
- Stephano A., Gay M., Ramírez 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.
- Zuckermann F.A. & Husmann R.J. (1996) Functional and Phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. Immunology, 87, 500-