



01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

ALTERACIONES FUNCIONALES EN LA RESPUESTA INMUNE
DE LINFOCITOS Y MONOCITOS DURANTE LA FASE INICIAL
DE LA INFECCION CON EL RUBULAVIRUS PORCINO EN
CERDOS ADULTOS

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MARIA DEL CARMEN / MERCADO GARCIA

TUTOR: HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA
COMITE TUTORAL: ANTONIO MORILLA GONZALEZ
JUAN MONROY BASILIO

MEXICO, D. F.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

2003

NOMBRE: Maria Carmen Mercado Garcia

FECHA: 12/03/03

FIRMA: [Firma]

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI MAMÁ

Ma. de la Luz García de Mercado

Por todo aquello que nunca pude decirte, pero que siempre sentí en mi corazón.

TE AMO

A MI FAMILIA

Héctor Mauricio, Luis Daniel y Héctor Luis

Por ser el motivo para superarme como profesionista, madre y esposa.

LOS AMO

A MI PAPÁ

José de Jesús Mercado Guillén.

Por todo lo que me enseñaste, aún sin proponértelo y sin decírmelo.

GRACIAS

A MIS HERMANOS

Adrián, Arturo, Jesús, Ma. de la Luz, Tere, Javier, Gabriel y Mario.

Por lo bueno y malo que nos ha tocado pasar juntos.

GRACIAS

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

Porque me han enseñado el valor de una amistad, que sobrepasa el tiempo y la distancia. GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa el esfuerzo y participación de mi familia, amigos, compañeros de trabajo, así como de grandes personas que me abrieron las puertas del conocimiento, compartiendo sus experiencias y su tiempo.

A MI FAMILIA: Mauri, Dani y Héctor. Gracias por permitirme realizar uno de mis sueños, por el tiempo que no pude estar con ustedes y por la fuerza que me dan día tras día para salir adelante.

A HUMBERTO RAMÍREZ, gracias por creer en mí, por ayudarme y darme ánimos para seguir adelante, por compartir tus experiencias, por ser mi maestro, pero sobretodo por tu amistad. GRACIAS.

A JESÚS HERNÁNDEZ, por todo lo que me enseñaste, no solo a nivel profesional, sino personal por tu valor y fuerza por salir adelante ante la adversidad.

A mis amigos y compañeros del Departamento de Producción Animal: Cerdos.

A Susy y Mario por su apoyo en el trabajo experimental.

Al Sr. Román, Lorenzo y Víctor, por su ayuda en la obtención de las muestras.

A los sementales que se utilizaron para el desarrollo de la fase experimental. Gracias por los buenos momentos, así como por las experiencias adquiridas.

A los miembros del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Especialmente a Yonathan, gracias por regalarme tu tiempo.

A Héctor Herrera por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Comité Tutorial, Dr. Antonio Morilla y Dr. Juan Monroy, gracias por su tiempo y paciencia en la realización del trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Edgar Zenteno y Dr. Jesús Hernández, por sus valiosas aportaciones para la mejor realización del presente trabajo.

GRACIAS A DIOS

COLABORADORES

Dr. Jesús Hernández López. Por capacitarme en algunas técnicas utilizadas en el análisis de las muestras.

Dr. Yonathan Garfias. Por brindarme su tiempo en forma desinteresada en la lectura de mis muestras.

MC. Susana Espinosa y MVZ Mario Solís por ayudarme con el cuidado de los sementales.

MVZ Héctor Herrera. Por apoyarme en el análisis estadístico de los datos.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Unidad de Constatación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Secretaría de Salud en México, D. F.

Este trabajo contó con apoyo de los siguientes proyectos:

DGAPA-UNAM IN 224598

CONACYT 27609M

También se contó con el apoyo de la beca de CONACYT, obtenida por la autora.

INDICE

TEMAS	PAGINAS
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Características del virus	3
Epizootiología	9
Signos por etapas	10
Lesiones	12
Inmunidad	12
Diagnóstico	13
Tratamiento	13
Control y Prevención	13
Respuesta inmune del cerdo	14
Respuesta humoral del cerdo	19
Respuesta inmune del cerdo contra enfermedades virales	19
Respuesta inmune al rubulavirus porcino	21
Hipótesis	23
Objetivos	23
Objetivos específicos	23
Justificación	24
Material y Métodos	25
Caracterización del rubulavirus porcino	26
Titulación del virus	29
Desarrollo experimental	30

ETAPA I	30
Separación de células mononucleares de sangre periférica	31
Identificación de subpoblaciones celulares de sangre periférica	31
Infección <i>in vitro</i> con el rubulavirus porcino	32
Cultivo de células mononucleares de sangre periférica con el rubulavirus porcino	32
Análisis estadístico	33
ETAPA II	33
Desafío con el rubulavirus porcino	33
Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares	34
Cultivo de células mononucleares	34
Análisis estadístico	34
ETAPA III	34
Identificación de subpoblaciones	35
Intradermoreacciones (Reacción de hipersensibilidad retardada)	35
Signología	36
Asignación de grupos	36
Aislamiento en cultivo celular del rubulavirus porcino a partir de células mononucleares de sangre periférica y suero de los animales afectados	36
Inmunofluorescencia en cultivo celular para identificar al rubulavirus porcino a partir de células mononucleares y suero de animales infectados	37
Respuesta humoral	37
Análisis estadístico	38

Resultados	39
Discusión	68
Conclusiones	87
Referencias	90

LISTA DE CUADROS**PÁGINA**

1. Principales citocinas y su función en el cerdo. 16
2. Diferencias en los valores promedio de identificación del Rp en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación a partir de células mononucleares de cerdos infectados. 55
3. Respuesta inflamatoria cuando se inoculó PHA, Rp y MEM por vía intradérmica de 5 cerdos infectados con el Rp 59
4. Longitud del testículo derecho posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp. 60
5. Longitud del testículo izquierdo posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp. 60
6. Diámetro del testículo derecho posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp. 61
7. Diámetro del testículo izquierdo posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp. 61
8. Diferencia en longitud y diámetro de los testículos antes y después de la infección con el Rp. 62
9. Identificación del Rp en suero y células mononucleares de cerdos infectados por medio de aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia. 66
10. Título de anticuerpos séricos identificados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación de 5 cerdos infectados con el Rp 67

IX

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- | | |
|---|----|
| 1. Efecto citopático producido por el Rp después de 96 horas de infección. | 39 |
| 2. Inmunofluorescencia en cultivo celular a partir de monoestratos de células VERO infectados con el Rp después de 24 horas de incubación. | 40 |
| 3. Observación de estructuras virales correspondientes al Rp a través de microscopía electrónica utilizando la técnica de tinción negativa. | 41 |
| 4. Lecturas realizadas en el citómetro de flujo correspondientes a la identificación de linfocitos T CD4+CD8+, linfocitos T CD3 y células B a partir de células mononucleares de sangre periférica de cerdos sanos. | 44 |
| 5. Valores promedio de las subpoblaciones celulares evaluadas de los 5 cerdos, previos al desafío con el Rp. | 45 |
| 6. Lecturas de subpoblaciones celulares efectuadas en el citómetro de flujo a partir de linfocitos T CD4+ sin virus y con virus, linfocitos T CD8+ sin virus y con virus y de monocitos sin virus y con virus. | 47 |
| 7. Valores promedio de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ que son reconocidos por el Rp en células infectadas y sin infectar en el tiempo 0. Estudio <i>in vitro</i> . | 48 |
| 8. Valores promedio de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ que son reconocidos por el Rp en células infectadas y sin infectar, que fueron incubadas durante 24 horas posterior a la infección <i>in vitro</i> . | 50 |
| 9. Comparación de las lecturas obtenidas de las células infectadas con el Rp al tiempo 0 y a las 24 horas. | 51 |
| 10. Valores promedio de la identificación del Rp en subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de cerdos infectados con el Rp. | 53 |
| 11. Valores promedio de subpoblaciones de 5 cerdos infectados con el Rp. | 57 |

X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12. Intradermoreacciones.	58
13. Dimensiones testiculares del cerdo 1 posterior a la infección con el Rp.	62
14. Dimensiones testiculares del cerdo 2 posterior a la infección con el Rp.	63
15. Dimensiones testiculares del cerdo 3 posterior a la infección con el Rp.	63
16. Dimensiones testiculares del cerdo 4 posterior a la infección con el Rp.	64
17. Dimensiones testiculares del cerdo 5 posterior a la infección con el Rp.	64

RESUMEN

La Enfermedad de ojo azul en cerdos es una enfermedad viral que sólo ha sido diagnosticada en México a partir de 1980. Se caracteriza por producir signos nerviosos en lechones, retraso en el crecimiento, además de problemas reproductivos en cerdas y verracos. El trabajo se dividió en 3 etapas, estudio *in vitro*: Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de 5 cerdos adultos sanos que fueron infectadas *in vitro* con el rubulavirus porcino, identificando al virus por medio de anticuerpos fluorescentes, a través de citometría de flujo, en subpoblaciones preferentemente de monocitos (33.17%) y linfocitos T CD8+ (30.49%), mientras que en los linfocitos T CD4+ la identificación fue no significativa. Cuando las células eran infectadas y cultivadas durante 24 horas el mayor reconocimiento fue en los linfocitos T CD8+ (17.04%). La segunda etapa del estudio se realizó en animales infectados, donde se llevó a cabo la identificación del virus en las mismas subpoblaciones en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 postinfección. Los resultados muestran que el virus reconoce preferentemente a los monocitos los días 2 (5.14%), 16 y 18 postinfección (5.06 y 8.62% respectivamente). En la última etapa se evaluó la respuesta inmune celular en subpoblaciones de sangre periférica y a través de intradermoreacciones, la respuesta humoral, la presencia de alteraciones a nivel testicular y el aislamiento del virus a partir de células mononucleares y suero, de los animales infectados. Los principales cambios en las subpoblaciones analizadas se presentaron en los días 2 y 18 postinfección. Los niveles de anticuerpos se comenzaron a detectar a partir del día 7 postinfección, sin embargo en los animales que desarrollaron orquitis severa la identificación de anticuerpos fue hasta el día 16 postinfección. Cuatro de los cinco animales inoculados desarrollaron orquitis. Además de que se logró aislar al virus a partir de células mononucleares y suero de los animales infectados. Se concluye que durante la fase inicial de la infección, las principales alteraciones se llevan a cabo el día 2 y alrededor de la tercer semana postinfección.

Palabras clave: Rubulavirus porcino, respuesta inmune, células mononucleares, inmunofluorescencia.

ABSTRACT

Blue eye disease is a viral infection first diagnosed in México in 1980. It is characterized for producing nervous signs in piglets, retarded growth in pigs and reproductive problems in sows and boars. This study was divided in 3 phases being the first one an; *In vitro* study: where peripheral blood mononuclear cells of five adult pigs was used, identifying porcine rubulavirus in swine subpopulations, mainly of monocytes (33.1%), and CD8+ T lymphocytes (30.4%) when the cells were infected *in vitro* and the identification was carried out through of immunofluorescence detected by flow cytometry. When the cells were infected and cultured for 24 hours, the results obtained 17.04% for CD8+ lymphocytes with porcine rubulavirus. The second phase of the study was done with infected animals, where the virus was identified in the same subpopulations, but on days 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 and 18 postinfection. The results showed that the virus continues recognizing monocytes (5.14%) on day two, 5.06% and 8.62% on days 16 and 18 postinfection, respectively. In the third phase of the study, cellular immune response was evaluated in subpopulation of peripheral blood through flow cytometry and intradermal reactions, humoral response, testicular alterations and virus isolation of mononuclear cells and sera from infected animals. The most relevant changes in the analyzed blood subpopulations were observed on days 2 and 18 postinfection. The detectable antibodies levels by hemagglutination inhibitions test were found from day 7 postinfecton, however these observation were only detected until day 16 postinfection in the animals with severe orchitis. Four out of five inoculated animals presented orchitis. The virus was also isolated from mononuclear cells and sera of the affected animals. It is concluded that during the initial phase of the infection with the porcine rubulavirus, the main alterations take place on day 2 and around the third week postinfection.

Key words: Porcine rubulavirus, immune response, mononuclear cells, immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que afectan al sistema nervioso central de los cerdos han estado presentes desde que se inició la porcicultura cobrando importancia en los últimos años, ya que alcanzan hasta un 30% de mortalidad en algunas granjas¹. En 1980 apareció en México una nueva enfermedad en los cerdos, que se caracterizaba por producir encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la cornea, por lo que se le designó como Síndrome de ojo azul^{2,3,4,5,6,7}. Estudios posteriores demostraron la existencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en sueros porcinos colectados en los años 1972 a 1979¹. Las lesiones observadas indicaban que se trataba de un problema de origen viral, sin embargo, fue en 1982 que se demostró que esta enfermedad era producida por un nuevo Paramixovirus^{3,5,6}. La enfermedad de ojo azul tiene un importante impacto para la porcicultura nacional, ya que durante los brotes de la enfermedad se afectan los parámetros productivos y reproductivos de las granjas afectadas⁸. Desde 1994 se ha reportado que la única zona libre de la enfermedad son los estados del noroeste (Sonora y Sinaloa), y por el contrario, los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco representan la zona con la mayor incidencia de la enfermedad⁷. Esta tendencia no ha cambiado a la fecha.

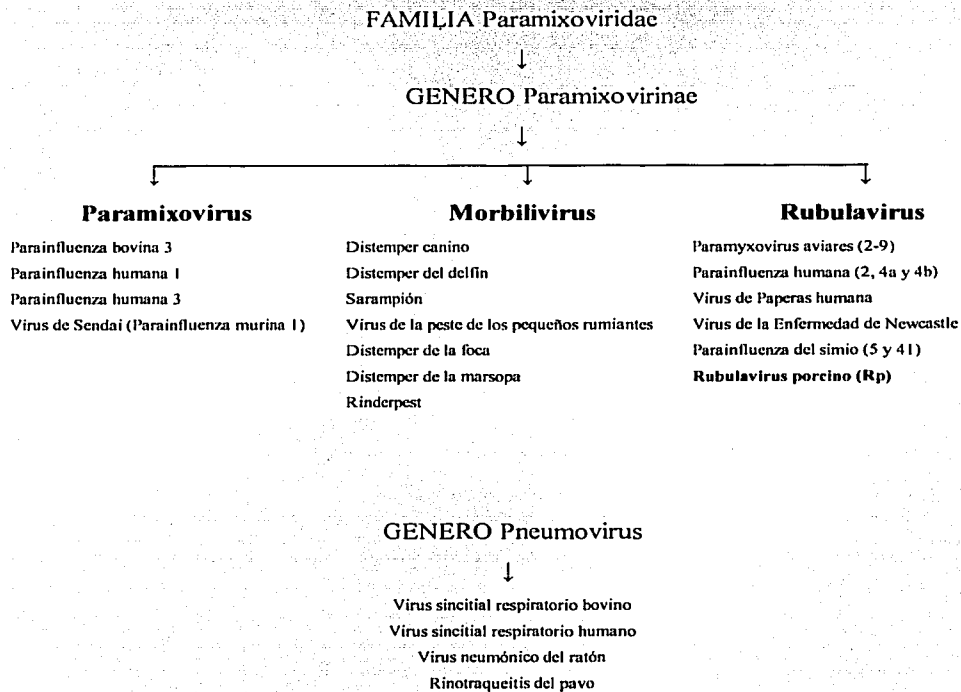
Características del Virus

El virus responsable de la enfermedad de ojo azul es denominado rubulavirus porcino (Rp). Este virus del género Paramixovirinae es un virus de una cadena de RNA negativa que tienen un modelo estructural común, con una envoltura lipoproteica, en una nucleocápside helicoidal simétrica. El tamaño y forma de las nucleocápsides dentro de los viriones y células infectadas son la principal característica que distingue a los paramixovirus de todas las otras familias de virus⁹. Existen 3 géneros que derivan de esta subfamilia: *Paramyxovirus*, *Morbillivirus* y *Rubulavirus*. Las propiedades biológicas que permitieron la definición de estos tres géneros fueron:

1. Reactividad cruzada antigénica entre los miembros de cada género.

2. Diferencias entre miembros de cada género en 2 actividades de superficie de las partículas virales: hemaglutinación y neuraminidasa.

A continuación se presenta la clasificación de la familia Paramixoviridae¹⁰:



Tomado de Murphy *et al* 1995.

Los paramixovirus poseen una glicoproteína de superficie que se une a las células por el reconocimiento de receptores que contienen ácido siálico. Esta afinidad por residuos de ácido siálico le permite aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales, incluidos de

mamíferos y de aves. Esta glicoproteína tiene actividad de neuraminidasa por lo que se define como HN (hemaglutinina-neuraminidasa). Esta proteína es común en los géneros Paramixovirus y Rubulavirus. El género Morbillivirus carece de neuraminidasa, por lo que esa glicoproteína se define como H⁹.

Después del ataque de un paramixovirus a una célula huésped, el siguiente paso en la infección es la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma. Este paso es mediado por una glicoproteína de superficie, la cual ha sido designada como F y es el mejor factor en la fusión de la envoltura lipoproteica del virus con la lipoproteína de superficie de la membrana de la célula huésped. Todos los miembros del género paramixovirus tienen una proteína no glicosidada, la proteína M (membrana) que podría estar involucrada en el reconocimiento de la envoltura de la nucleocápside durante el ensamblaje del virión, y que puede participar en la formación de la envoltura. Las proteínas HN, H y G intervienen en el ataque del virus a la célula y reconocen al ácido siálico en el receptor glicoproteico o glicolípido. La nucleocápside del virus está equipada con todas las proteínas auxiliares que forman el aparato transcripcional activo, el cual es liberado dentro del citoplasma por la fusión mediada por la proteína F de la envoltura del virión con la membrana de la superficie celular⁹.

El ataque realizado por las proteínas HN, N y G junto con la proteína de fusión (F) son de gran importancia para inducir anticuerpos neutralizantes del virus y en la inmunidad contra reinfecciones. Varias proteínas han sido reportadas que sirven como antígenos para la citotoxicidad o para las células T cooperadoras⁹.

Los Paramixovirus se han identificado en vertebrados y casi exclusivamente en mamíferos y aves. Muchos de estos virus tienen un estrecho rango de huéspedes específicos en la naturaleza, pero en cultivo pueden afectar un amplio rango de células huésped. La transmisión es horizontal. No tienen vectores conocidos. La primera replicación del virus es principalmente en el tracto respiratorio. Generalmente la infección es citolítica, pero la temperatura e infecciones persistentes son comunes. Otras características de la infección

incluye la formación de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y sincitios. Las moléculas de superficie celular reportadas que sirven como receptores para el ataque de los paramixovirus incluye sialoglicoproteínas y sialoglicolípidos⁹.

Todas las especies del género Rubulavirus tienen actividad hemaglutinina-neuraminidasa. La actividad es de nivel intermedio de homología en sus respectivas secuencias de proteínas. Algunos miembros contienen un gen extra (SH) entre los locis F y HN.

El Rp presenta resistencia a la actinomicina D, lo que indica que está formado por cadenas negativas de RNA. Estudios de microscopía electrónica mostraron un virus pleomórfico, de 150 a 300 nm, encapsulado y con proyecciones en su membrana, características comunes de los paramixovirus. Las proteínas estructurales del Rp fueron determinadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoprecipitación de cultivos celulares infectados y marcados selectivamente con diversos radioisótopos. Fueron identificadas seis proteínas:

Mayor (L) de 200 kDa la cual posee actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA.

Nucleoproteína (NP) de 68 kDa, posee función estructural que da origen a la nucleocápside viral junto con el RNA

Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) de 66 kDa que se encarga del reconocimiento celular.

Proteína de fusión (F), de 59 kDa, la cual es responsable de la fusión de membranas virales y celular.

Fosfoproteína (P) de 52 kDa que participa en eventos de regulación de la replicación y transcripción del genoma viral.

Proteína de matriz (M) de 40 kDa la cual participa en el ensamblaje de los viriones¹¹.

El Rp aglutina una gran variedad de eritrocitos de aves y mamíferos. Posterior a la actividad aglutinante se observa elusión a 37°C entre 30 y 60 minutos posteriores a que se presentó la actividad aglutinante, debido a la presencia de neuraminidasa viral. Produce hemadsorción de eritrocitos en células PK15 infectadas 72 horas antes. Se replica con facilidad en cultivos primarios y líneas celulares, donde causa efecto citopático con formación de sincitios, también se replica en embriones de pollo y ratón y es sensible a solventes de lípidos^{3,4,6,12,13}. Serológicamente no tiene relación con otros Paramixovirus ni con diversos virus de parainfluenza^{4,14}. Otros paramixovirus aislados han sido reportados en Alemania, Estados Unidos, Israel y Japón en cerdos con problemas neurológicos y/o reproductivos, sin embargo no se ha establecido ninguna relación con el Rp¹⁴.

En las infecciones virales, la expresión de receptores celulares que son reconocidos por las proteínas de adherencia viral, representa uno de los eventos principales para que se de el proceso infeccioso. Las proteínas que intervienen en este proceso son las de adherencia (HN) y de fusión (F). En los rubulavirus la proteína HN se une a receptores celulares que contienen ácido siálico, lo que les permite aglutinar eritrocitos de mamíferos y aves, e infectar una gran variedad de células.

Los ácidos siálicos son monosacáridos que se localizan en la posición más externa de las cadenas sacarídicas de glicolípidos y glicoproteínas. La diversidad de los ácidos siálicos es regulada por la especie celular y por el desarrollo, lo que implica un importante papel en los fenómenos de reconocimiento intercelular^{15,16}.

El Rp reconoce al ácido siálico, pero su especificidad es mayor por el oligosacárido sialilalfa2. 3lactosa (NeuAcalfa2, 3GalB1, 4Glc), el cual juega un papel importante en el tropismo del virus. Reyes *et al.* (1993) demostraron que la expresión de este oligosacárido en la superficie celular permite la infección del Rp en cultivos celulares, mientras que las modificaciones en su expresión inhiben la infectividad viral. De hecho, el bloqueo de su isómero NeuAcalfa2, 6Gal no afectó el proceso de infección. En estudios posteriores Reyes *et al.*, (1997) utilizando ensayos histoquímicos con las lectinas *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) principalmente, mostraron que las células en cultivo expresan una gran cantidad de ácido neuramínico en forma de sus enlaces alfa2, 3 y su isómero alfa 2, 6. En los ensayos de competencia entre las lectinas encontraron que la lectina MAA es específica para NeuAca2, 3Gal, ya que se inhibió casi completamente la infectividad del virus, corroborando la especificidad viral.

La mayor parte de los tejidos expresan ácido siálico, sin embargo existen diferencias importantes en el tipo de ácido siálico expresado en cerdos neonatos y en adultos. En cerdos neonatos, el sistema nervioso central mostró una mayor expresión del oligosacárido NeuAcalfa2, 3Gal en bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo, médula oblonga y corteza cerebral, que el de su isómero NeuAcalfa2, 6Gal. Mientras que en cerdos adultos, se incrementa la expresión de moléculas de ácido siálico con enlace NeuAcalfa 2, 6Gal en la mayor parte del sistema nervioso central, y se disminuye la expresión de NeuAcalfa2, 3Gal. Los cambios en la expresión de ambas moléculas parecen tener relación directa con la maduración del tejido nervioso y con la susceptibilidad a la infección con el Rp en cerdos neonatos y lactantes, menores a 20 días de edad ^{16,17}.

En cerdos adultos, la baja expresión del NeuAcalfa2, 3Gal es probablemente el mecanismo de resistencia del sistema nervioso central. Sin embargo, en órganos reproductores se presenta una mayor expresión del receptores NeuAcalfa2, 3Gal, por lo que los cerdos adultos muestran lesiones características de la infección con el Rp en esos órganos. En el epidídimo de cerdos neonatos se expresan bajos niveles de NeuAcalfa2, 3Gal, mientras que en el mismo tejido de cerdos adultos se expresa abundantemente este

azúcar. Estos datos sugieren que la expresión del oligosacárido NeuAcalfá2, 3Gal, y por lo tanto, la susceptibilidad a la infección tisular, están reguladas por el desarrollo oncogénico del cerdo. Las hormonas esteroideas pueden también estar participando en la diferente expresión de estas moléculas durante el desarrollo de los animales. Esto último, también es apoyado por lo que sucede en el caso de la infección con parotiditis humana, donde la susceptibilidad de los tejidos reproductores está relacionada con el nivel de hormonas presentes en él^{15,16}.

Epizootiología

Los primeros brotes de la enfermedad se observaron en La Piedad, Michoacán en 1980. En 1982 la enfermedad se reportó en los estados de Guanajuato, Jalisco y Estado de México. En 1983 se presentaron brotes en los estados de Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Yucatán, Tabasco, Puebla, Querétaro y Distrito Federal. En 1984 se identificó en Tamaulipas. Hasta la fecha los estados del noroeste del país están libres de la enfermedad, mientras que los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco representan la zona con mayor incidencia de la enfermedad^{7,18}. En condiciones naturales la enfermedad sólo afecta al cerdo, en los cuales hay manifestaciones respiratorias, trastornos nerviosos, retraso en el crecimiento, falla en el ciclo reproductivo de la cerda y orquitis unilateral o bilateral en el 14 a 40% de los verracos^{4,8}. El cerdo es la única especie que se infecta en forma natural con el Rp. Experimentalmente el virus puede infectar ratones, ratas, conejos, embriones de pollo, perro, gatos, sin que se lleguen a observar signos de la enfermedad¹⁹.

La principal forma de infección es a través de los animales infectados que pueden presentar o no signología clínica. Las personas o vehículos que entran a granjas afectadas son una importante fuente de infección para las granjas libres. La infección producida por el Rp se transmite por contacto directo a través de secreciones. La forma de entrada en forma natural es la oronasal¹⁹. Experimentalmente se ha demostrado que el virus inicia replicación en mucosa nasal y tonsilas difundiéndose posteriormente a los pulmones²⁰. El

virus utiliza las terminaciones del nervio olfatorio para diseminarse en el sistema nervioso central de los cerdos neonatos.

Signos por etapas

Lechones. Los cerdos menores de 20 días son los que presentan la sintomatología más severa, así como la tasa de mortalidad más alta¹³. Se afectan clínicamente el 20-25% de las camadas y la mortalidad de los cerdos afectados con signos nerviosos es cercana al 90%¹ en lechones de 1 a 3 semanas de edad, que va progresando hasta ocasionarles la muerte, también se puede observar opacidad de cornea uni o bilateral en 10% de los animales afectados. Los signos se presentan súbitamente, los animales aparecen postrados, deprimidos y con signos nerviosos. Inicialmente se observa fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, constipación y en ocasiones diarrea. Posteriormente ocurre la signología nerviosa, la cual incluye incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Finalmente la muerte se presenta 30 a 48 horas después de la postración.

En **cerdos de más de 30 kilos** el cuadro nervioso es ocasional y la opacidad puede presentarse de 1-4% de los animales afectados en esta etapa, lo que generalmente se presenta es retraso en el crecimiento y baja en el consumo de alimento. La mortalidad es nula, a menos que se encuentre asociada a otras enfermedades o a problemas de manejo en la granja^{19,21}.

En el **pie de cría** el principal problema que ocasiona es la falla reproductiva que puede durar entre 2 y 9 semanas. En los nacimientos ocurridos durante el brote hay una morbilidad del 20-65% y la mortalidad va del 87 al 99%^{1,2,22}. 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 puede llegar al 20% y el porcentaje de fetos momificados al 5%²².

Sementales. Generalmente permanecen asintomáticos. Ocasionalmente se presenta fiebre y disminución en el consumo de alimento. El signo más evidente es la disminución en la fertilidad a consecuencia de la orquitis, epididimitis y atrofia testicular, generalmente unilateral^{23,24}.

Lesiones

Las lesiones macroscópicas son ocasionales y generalmente se presentan en cerdos menores de 20 días. Las lesiones más frecuentemente observadas son congestión meníngea, además de aumento ocasional del fluido cerebro-espinal, neumonía (1-5%) y atrofia serosa de la grasa coronaria y distensión del estómago con restos de leche, opacidad y edema corneal generalmente unilateral. Pueden también presentarse hemorragias en pericardio y riñón. En sementales infectados es común la presencia de granulomas en epidídimo y atrofia testicular^{4,24}.

Histológicamente principalmente en animales jóvenes y ocasionalmente en cerdos adultos, hay encefalitis no supurativa principalmente en tálamo y corteza cerebral caracterizada por gliosis focal y multifocal, necrosis neural, neuronofagia, meningitis y coroiditis. En pulmón, se observan zonas de neumonía intersticial caracterizada por engrosamiento de los septos alveolares con infiltración de células mononucleares^{4,21}. En ojo se observa edema corneal y uveitis anterior con infiltrado de neutrófilos y células mononucleares^{19,20}.

En verracos infectados, los cambios histológicos muestran procesos degenerativos e inflamatorios, principalmente en testículo y epidídimo. Los cambios en este último incluyen vacuolización citoplásmica, cromatina granular en el núcleo y pérdida parcial de estereocilios, además de la presencia de espermatozoides en vasos sanguíneos, áreas de necrosis licuefactiva rodeadas de un infiltrado de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos y plasmocitos. En testículo, se puede presentar degeneración de túbulos seminíferos con infiltración intersticial de células mononucleares. Los túbulos

pueden contener células de Sertoli. Escasa presencia de espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, así como de espermátides. En los animales que desarrollan granulomas se pueden observar cambios reparativos consistentes en la formación de una cápsula fibrinosa con la proliferación de fibroblastos²⁵.

Inmunidad

Una vez que se presenta la infección, el pie de cría desarrolla una sólida inmunidad que se puede prolongar hasta por 15 meses, por lo que esta respuesta es de gran importancia en el control de la enfermedad ya que se transmite la protección de las hembras a los lechones y una vez que se establece una inmunidad sólida de hato, la enfermedad se autolimita, siempre y cuando no entren animales nuevos durante este proceso^{4,6,24}. En contraste, en granjas con producciones abiertas los brotes continúan afectando principalmente a cerdas primerizas²².

Los títulos máximos de anticuerpos se han detectado en madres recuperadas y en sus lechones lactantes, descendiendo al valor mínimo entre los 2 y 3 meses de edad⁴. En lechones infectados experimentalmente con diferentes dosis del Rp, en los animales que sobrevivieron se lograron detectar títulos de anticuerpos a partir del día 10 postinoculación^{26,27}.

La hemaglutinina se presenta como una de las proteínas más inmunogénicas y es responsable de la infectividad del virus en las células blanco. Los cerdos infectados con este virus desarrollan altos niveles de anticuerpos contra la hemaglutinina²⁸.

Algunos autores consideran que títulos mayores a 1:64 Unidades Inhibidoras de la Hemaglutinación (UIH) reflejan un contacto con el virus. Sin embargo, algunos otros autores reportan títulos hasta de 1:1280 UIH encontrados en brotes de la enfermedad contrastando con títulos de hasta 32 UIH empleando una vacuna experimental inactivada²⁸.

Diagnóstico

Para el diagnóstico del agente etiológico de la enfermedad se realizan las pruebas de aislamiento viral (AV), Inmunofluorescencia (IF), microscopia electrónica (ME) a partir de encéfalo, tonsila y pulmón. La IF Y ME también pueden efectuarse a partir de monoestratos de células infectadas. Para la detección de anticuerpos se utilizan técnicas como la Inhibición de la Hemaglutinación (IH), virus-sueroneutralización (VN), ELISA 4,5,6,8,,28,29,30,31,32

Tratamiento

No hay tratamiento específico que pueda utilizarse contra el virus, sin embargo, la medicación contra infecciones bacterianas concurrentes ayuda a reducir la mortalidad y un posible retraso en el crecimiento.

Control y Prevención

Lo más importante es evitar la entrada de la enfermedad siguiendo medidas sanitarias preventivas, para reducir al mínimo el riesgo de adquirir la enfermedad. Existen algunas vacunas comerciales contra el Rp, con resultados variables, además de varias que aún están en proceso de experimentación⁶.

Algunos autores sugieren la producción de anticuerpos contra el Rp mediante la inmunización de gallinas y la obtención posterior de los mismos a partir de la yema de huevo. Una vez obtenidos los anticuerpos se propone su uso como medida de prevención a través de inmunidad pasiva²⁸.

Martínez y col.^{33,34,35} han probado una vacuna inactivada contra el Rp con resultados favorables al ser aplicada en cerdos de diferentes edades, hembras gestantes y lechones. En cerdos de engorda se probaron dos tipos de vacunas inactivadas contra ojo

azul, una de tipo oleoso y otra preparada con un gel de OH_2Al_3 . Ambas vacunas fueron inactivadas con radiación gamma. Obteniendo una mejor respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y seroneutralizantes con el uso de la vacuna oleosa que con la preparada con el gel de OH_2Al_3 . Para las hembras gestantes y lechones utilizaron una vacuna oleosa.

Zenteno y col. elaboraron una vacuna para evitar la enfermedad del ojo azul a partir de epitopes antigénicos de la hemaglutinina neuraminidasa del Rp. Los epitopes fueron sintetizados químicamente y unidos a albúmina sérica bovina (BSA) además, por técnicas de biología molecular, el gene para uno de estos péptidos fue incorporado a la proteína OmpC de *Salmonella typhi* y expresado en bacterias *E. coli*. Posteriormente se evaluó su reconocimiento por anticuerpos de cerdo infectado con el Rp que produce la enfermedad del ojo azul (LPMV), así como la respuesta inmune que estos conjugados generaron en ratones y conejos. Los resultados comprobaron que tanto los péptidos unidos a BSA como la proteína recombinante generaron una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer y bloquear la actividad de la HN y en consecuencia la actividad citopática del Rp, por lo que proponen el empleo de estos péptidos acoplados a BSA u OmpC como vacunas recombinantes contra el Rp³⁶. Cabe señalar que hace falta la evaluación en cerdos de estas vacunas.

Respuesta inmune del cerdo

En el cerdo, así como en otras especies domésticas, existe un conjunto de barreras mecánicas, químicas y biológicas que limitan en gran medida el ingreso de agentes infecciosos al organismo. Cuando estas barreras son superadas, las células del sistema inmune innato y del sistema inmune adquirido se encargan del control. De las células que participan en la respuesta inmune innata se encuentran: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células presentadoras de antígenos (CPA) (macrófagos y células dendríticas), células NK (importantes en infecciones virales). Otros mecanismos importantes dentro del sistema

innato de defensa son el complemento, las citocinas e interferones siendo estas dos últimas de gran importancia en la “comunicación” del sistema inmune.

El sistema inmune adquirido está compuesto por los linfocitos B y T. Los primeros se encargan de la producción de anticuerpos importantes para neutralizar virus y toxinas bacterianas. Los segundos se dividen en linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores. Ambos se activan una vez que las CPA han procesado los diferentes antígenos y los presentan asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I para el caso de los linfocitos citotóxicos o a la clase II para los linfocitos cooperadores. La inmunidad adquirida es muy importante en todos los animales domésticos ya que presenta la característica de tener “memoria inmunológica”.

MHC. Importante para la presentación de antígenos proteicos a los linfocitos T. El MHC clase I se expresa prácticamente en todas las células nucleadas del organismo. En el cerdo existen 3 haplotipos: SLA-A, B y C. Esta molécula se encarga de presentar antígenos endógenos sintetizados por la misma célula (p.e.: proteínas virales) o bacterias intracelulares. El MHC clase II se expresa únicamente en las CPA (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B). El cerdo únicamente expresa en la superficie de estas células los haplotipos SLA-DR y DQ y no el DP como en otras especies domésticas. El MHC clase II presenta principalmente antígenos exógenos. Por lo tanto, los antígenos primero tienen que ser fagocitados y procesados para ser presentados y reconocidos por los linfocitos T cooperadores. Una vez que son presentados los antígenos el linfocito T cooperador produce una serie de citocinas que favorece la regulación de la respuesta inmune.

CITOCINAS. Comprenden un gran grupo de proteínas sintetizadas por varios tipos celulares, que participan en: procesos inflamatorios, en las fases efectoras de la respuesta inmune y en la hematopoyesis (Cuadro 1)

Cuadro 1. Principales citocinas y su función en el cerdo

Citocina	Células que la producen	Función	Cerdo	Identificación
IL-1	Macrófagos	Aumenta la temperatura en las reacciones inflamatorias agudas.	2 tipos: IL α e IL β	PCR y por ensayos biológicos.
IL-2	Linf. T cooperadores y citotóxicos, y por las células NK	Activa macrófagos, aumenta la capacidad lítica de las células NK y de los linfocitos CD8, favorece la formación de anticuerpos.	Secuencia similar a la de otras especies.	Líneas celulares de ratón dependientes de IL-2 o por PCR
IL-4	Linf. T cooperadores Th ₂ , mastocitos	Respuesta Th ₂ , reacciones alérgicas, infecciones parasitarias.	Gran homología con la IL-4 bovina	PCR
IL-6	Macrófagos, linfocitos T y B, células del estroma de la médula ósea, endotelios vasculares, fibroblastos, queratinocitos, células del mesanglio.	Aumenta la producción de IL-2, participa en la diferenciación de las células T, cofactor de IL-1 para la síntesis de IgM, y de IL-5 en la síntesis de IgA. Participa en las reacciones inflamatorias agudas.	Proteína de 212 aminoácidos	PCR y con líneas celulares dependientes de IL-6
Interferones		Controlar las infecciones virales, aumentar la actividad citotóxica de las células NK y de los linfocitos CD8+, activar macrófagos.	Importante en infecciones como: rotavirus, fiebre porcina clásica, influenza, gastroenteritis transmisible, enfermedad de Aujeszky.	

INF I (α, β)	Células infectadas con virus, linfocitos, monocitos, macrófagos y fibroblastos.	Importante en la respuesta a infecciones virales, inhibe el crecimiento viral y activan macrófagos.		
INF II (γ)	Linf. T cooperadores y citotóxicos y por las células NK.	Favorece la respuesta Th1 e inhibe la respuesta Th2, activa células NK y macrófagos.		
Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα)	Macrófagos	Procesos inflamatorios, induce fiebre, libera proteínas de fase aguda del hígado, favorece la síntesis de IL-1 e IL-6.		PCR, líneas celulares y anticuerpos monoclonales.
Factor transformante del crecimiento-beta (TGF-β)	Linfocitos T, macrófagos	Inhibe la activación y proliferación celular, regula el crecimiento celular.	En el cerdo no se conoce su efecto.	PCR

37,38

En el cerdo, además de los linfocitos CD4+CD8- y los linfocitos CD4-CD8+, se tienen algunos linfocitos maduros que expresan ambos receptores: linfocitos CD4+CD8+. Por lo que es posible distinguir en el cerdo 4 tipos de linfocitos T: CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4+CD8+ y CD4-CD8-.

Los linfocitos CD4+ o cooperadores comprenden una población celular responsable de regular la respuesta inmune con la producción de citocinas, las cuales son capaces de activar a diferentes tipos celulares como macrófagos, linfocitos B y linfocitos T. Estos linfocitos pueden ser Th1 o Th2. Los linfocitos cooperadores Th1 producen principalmente las citocinas IL-2 e INF γ , que se encargan de modular la respuesta inmune mediada por células. Los linfocitos cooperadores Th2 producen IL-4 e IL-10 que regulan la respuesta mediada por anticuerpos. En el cerdo todo hace suponer que se presenta de esta forma³⁷.

Los linfocitos T-CD4+ tienen la capacidad de activar a las células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), principalmente a las células dendríticas³⁹.

En los linfocitos CD8+ o citotóxicos su función está restringida al MHC-I y son importantes para el control de las infecciones intracelulares. Presentan también una población Th1 y Th2 con el mismo patrón de citocinas. La población citotóxica del cerdo se demostró que es CD5+CD6+CD4-CD8+. Estos linfocitos no neutralizan virus circulantes, pero son potentes células efectoras y pueden controlar infecciones virales matando a las células infectadas o por medio de citocinas que regulan el crecimiento de los virus³⁹.

Los linfocitos CD4+CD8+ o dobles positivos son una población única del cerdo que se presenta en condiciones normales en sangre periférica y ganglios linfáticos^{40,41}. Esta población corresponde a células maduras que van aumentando con la edad del animal³⁷. A estos linfocitos también se les considera como células de memoria. Expresan el receptor de las células T o TCR y el MHC clase II, así como el complejo CD3. Por lo tanto, se sabe que estos linfocitos necesitan la participación del MHC clase II y del CD4 para proliferar. El CD8 puede estar participando como molécula de adhesión, incrementando la afinidad del TCR por el MHC. Esta población se origina a partir de linfocitos CD4+CD8- previamente sensibilizada y después estimulada, como es reportada en el caso del virus la Enfermedad de Aujeszky o con el Rp. Los linfocitos dobles positivos están principalmente encargados de modular las reacciones de la memoria inmunológica en el cerdo.

Las células NK son responsables de la destrucción de células, sin la participación de moléculas del MHC. Estas células son importantes en la defensa del organismo contra infecciones virales y frente a tumores. Las células NK se activan por acción de citocinas como la IL-2, INF α e IFN γ . En el cerdo, el fenotipo de las células NK es CD2+CD3-CD8 low³⁷.

Respuesta humoral del cerdo

En el cerdo se han identificado IgG, IgM, IgA e IgE, aunque también se ha supuesto la existencia de la IgD como en humanos. Estudios serológicos describen 4 subclases de IgG, siendo la IgG1 la que predomina en el cerdo. La IgG se encuentra en alrededor del 88% en suero, 80% en calostro y 20-30% en leche. Los niveles séricos de la IgA se encuentra en aproximadamente 3%, 14% en calostro y 82% en leche. En cuanto a la IgM está presente en un 14% en suero, 6% en calostro y 18% en la leche³⁷.

Respuesta inmune del cerdo contra enfermedades virales

Los virus son agentes infecciosos intracelulares que inician su proceso de infección al reconocer un receptor específico en una célula blanco, la cual puede o no ser susceptible de ser infectada⁴². En el caso de los paramixovirus se ha demostrado que el receptor que reconocen en la célula blanco son moléculas que contienen ácido siálico. El Rp reconoce moléculas que contienen sialil alfa-2,3-lactosa^{15,17}. En el caso de los virus con envoltura, una vez que el virus reconoce al receptor en la célula blanco, se interna fusionándose con la membrana plasmática y, dentro de la célula, el virus inicia la transcripción de sus proteínas utilizando sus propias enzimas y las de la célula infectada. Esto le permite la producción de partículas víricas capaces de infectar a nuevas células blanco⁹. Una vez que se lleva a cabo la infección viral son presentados múltiples epítopes a las células T, montándose una respuesta policlonal antiviral de la célula T. No todas las células T responden de igual manera ya que responden contra epítopes dominantes y seudodominantes³⁹.

Una respuesta inmune celular y humoral eficaz es necesaria para el control y erradicación de las infecciones virales. Esta respuesta depende del tipo de virus, la vía de entrada, la dosis infectante, el tipo de célula presentadora y del estado general del huésped⁴³.

La respuesta inmune frente a virus inicia con la producción de interferón α por las células infectadas, lo que aumenta el potencial lítico de las células NK y la expresión del

MHC clase I. El aumento en la expresión del MHC-I facilita la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺⁴⁴.

La molécula del MHC clase I es importante para el control de infecciones intracelulares como virus, algunos parásitos, bacterias intracelulares y tumores, ya que la expresión de estas moléculas en la superficie celular conlleva a la destrucción de la célula³⁷.

Los linfocitos CD8⁺ se encargan de eliminar células infectadas por virus y células cancerosas, cuando en su superficie expresan el antígeno asociado a la molécula del MHC clase I³⁷.

Si se produce una estimulación óptima, los Linfocitos T CD8⁺ pueden tener una expansión masiva y activación. Para una óptima respuesta de las células T CD8⁺ se necesita:

- Que los Linfocitos T CD8⁺ que no han sido estimulados encuentren su antígeno peptídico presentado por el MHC clase I.
- Moléculas coestimuladoras. Además de la presencia del antígeno y del MHC clase II, se requiere la presencia de interleucinas 1 y 12, moléculas de adherencia de la superficie celular, como CD2 que se une a CD58, CD11a/18 que se une a CD54. Cuya unión sirve para inmovilizar al linfocito T y a la célula presentadora de antígeno y facilitar la transmisión de señales entre ellos³⁸.

La coestimulación es la segunda señal de activación y sin ella puede presentarse anergia y evitar la remoción de las células infectadas por virus³⁹.

El resultado de la actividad citotóxica de células efectoras como: NK, linfocitos CD8⁺ 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 clase II, lo que induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4 que responden con la producción de citocinas como la IL-2 e interferón γ , IL-4 e IL-10. Durante la infección aguda no es posible discriminar entre una respuesta Th₁ o Th₂. En los procesos crónicos es posible identificar un patrón de producción Th₂⁴⁵. Los Linfocitos T CD4+ son necesarios para mantener la función efectora de las células T CD8+ durante una infección viral crónica. En ausencia de linfocitos T CD4+, la respuesta de los Linfocitos T CD8+ no pueden efectuar funciones efectoras (citotoxicidad y producción de citocinas) para la resolución de la infección³⁹.

En el caso de ciertas infecciones virales, las células infectadas pueden curarse por la acción de citocinas antivirales³⁹.

Algunos virus codifican proteínas, las cuales modulan la respuesta inmune de sus huéspedes⁴⁶.

Respuesta inmune al rubulavirus porcino

Los animales una vez que se infectan desarrollan anticuerpos y desarrollan una respuesta inmune celular contra el virus. Los anticuerpos principalmente van dirigidos contra la proteína HN. Trabajos realizados por Hernández y col.⁴⁷ indican que existe una fase de inmunodepresión en la primera semana de infección, debido a que se reportan bajos índices de estimulación con lectinas. La disminución en la respuesta celular puede estar explicada por el reconocimiento de residuos de sialil α 2, 3 lactosa en la membrana de los linfocitos por el virus^{15,16}. La máxima respuesta frente al virus por parte de los linfocitos T se presentó a la cuarta semana postinoculación. Los valores de monocitos, linfocitos T y los linfocitos dobles positivos CD4+CD8+ se incrementan al inicio de la infección. Por lo que la fase aguda de la infección por el rubulavirus es controlada por células fagocíticas y citotóxicas. Ensayos de proliferación en presencia del virus del Rp mostraron que tanto los linfocitos CD4+CD8+ como los CD4+CD8- fueron capaces de proliferar, lo que indica que

citotóxicas: Ensayos de proliferación en presencia del virus del Rp mostraron que tanto los linfocitos CD4+CD8+ como los CD4+CD8- fueron capaces de proliferar, lo que indica que en ambas subpoblaciones se encuentran células de memoria/efectoras. Además demostraron que el control de la infección está regulada principalmente por linfocitos CD4+CD8+^{47,48}.

HIPÓTESIS

Durante la fase inicial de la infección con el rubulavirus porcino el virus reconoce algunas subpoblaciones de linfocitos y monocitos de sangre periférica, lo cual le permite al virus transportarse a los órganos blanco y conocer el impacto de la respuesta inmune generada con respecto a la signología que presentan los animales en la fase inicial de la infección.

OBJETIVO

Evaluar las alteraciones en las subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica durante la fase inicial de la infección con el rubulavirus porcino en cerdos adultos.

Determinar la susceptibilidad *in vitro* de subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica de cerdos adultos al rubulavirus porcino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar cuales son las subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica que reconoce el rubulavirus porcino.
2. Determinar la susceptibilidad de las subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica al rubulavirus porcino en cerdos infectados con el mismo.
3. Evaluar si existen cambios en los valores promedio de las subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica durante la fase inicial de la infección con el rubulavirus porcino.

JUSTIFICACIÓN

El comportamiento de las subpoblaciones celulares de sangre periférica después de la infección experimental con el rubulavirus porcino, permite entender el impacto de la infección en el sistema inmune, permitiendo suponer los mecanismos que el virus utiliza para su transporte y las células que son blanco de su infección e inclusive sus propiedades inmunosupresoras. En el caso de una infección temprana con el rubulavirus porcino es importante conocer la respuesta inmune generada, si el virus está reconociendo algunas de las subpoblaciones que intervienen en esa respuesta y que impacto tendría esto en el desarrollo de una respuesta inmune o en la inmunodepresión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 5 cerdos adultos híbridos sin castrar provenientes de una granja libre de la enfermedad de ojo azul. Estos animales no presentaban anticuerpos contra ojo azul, aujeszky, PRRS, parvovirus porcino y fiebre porcina clásica. Los cerdos fueron revisados todos los días antes y después del desafío. Se alimentaron a razón de 2 kilogramos al día. El agua se administró *ad libitum*.

Obtención de las muestras de sangre

El sangrado de los animales se efectuó a partir del golfo de las yugulares, donde se obtuvo sangre de la vena cava anterior. El sangrado se efectuó estando el cerdo en pie, como lo describe Mendoza GR⁴⁹. Se colectó la sangre en tubos de vacutainer: sin anticoagulante y otro con heparina. Los animales fueron sangrados durante un periodo de dos meses previos al desafío una vez por semana. Estas evaluaciones previas fueron útiles para tener los valores de referencia en cuanto a la respuesta humoral y celular antes de la infección de los animales con el Rp. Una vez desafiados los animales fueron sangrados los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 postinoculación.

Instalaciones

Se utilizaron las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia pertenecientes al Departamento de Producción Animal: Cerdos. Se alojaron en una unidad de aislamiento que cuenta con 6 corrales. Cada semental fue alojado en un corral.

Virus

El virus utilizado corresponde a un aislamiento realizado por el Dr. Humberto Ramírez a partir de un brote en una granja en el estado de Jalisco el cual se ha denominado PAC-3.

Caracterización del rubulavirus porcino

El virus se aisló a partir del cerebro de un lechón con meningoencefalitis que presentaba signología nerviosa, durante un brote de ojo azul en una granja reproductora. El virus fue denominado PAC3 (Departamento de Producción Animal: Cerdos). La signología observada en dicha granja consistió en la presentación de problemas nerviosos caracterizados por incoordinación y muerte de los lechones afectados. También el pie de cría se vio afectado ya que se presentaron problemas reproductivos, como: absorciones, aumento en el número de momias, además de orquitis y epididimitis en machos.

Para la caracterización del virus se realizaron diversas pruebas:

- a. Evaluación del efecto citopático.
- b. Comprobación de la actividad aglutinante.
- c. Hemadsorción de monoestratos infectados.
- d. Inmunofluorescencia en cultivo celular.
- e. Purificación viral.
- f. Microscopia electrónica.

Efecto citopático (ECP). El encéfalo fue macerado con medio mínimo esencial (MEM)¹ sin suero. Una vez obtenido el macerado, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se prepararon 2 botellas de vidrio de cultivo celular con monoestratos de la línea celular VERO (riñón de mono verde). El sobrenadante obtenido fue filtrado hasta 0.22 micras en forma estéril y colocado en una de las botellas en monoestratos de 24 horas, la

¹ Sigma Chemicals Co. San Luis Missouri.

otra botella sirvió de control. Ambas botellas se les adicionó MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB). Las células inoculadas fueron observadas cada 24 horas, hasta 120 horas postinoculación^{50,51}.

Actividad aglutinante (AG). Se prepararon 2 botellas con monoestratos de células VERO. Una de ellas fue infectada con el aislamiento previamente filtrado en forma estéril y la otra sirvió como control. Se tomó sobrenadante de las botellas desde las 72 horas hasta 120 horas postinoculación. Se colocaron 50 microlitros de estos sobrenadantes en placas de 96 pozos fondo en "U"² con 50 microlitros de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH 7.0 y se realizaron diluciones dobles seriadas. Los ensayos se realizaron por triplicado para adicionar a cada placa diferentes tipos de eritrocitos: ave, bovino y cuye, para comprobar la diferente afinidad que tiene el rubulavirus porcino hacia los diferentes tipos de eritrocitos^{50,52}.

Hemadsorción. Se prepararon monoestratos celulares de la línea celular VERO (2×10^6 células en un volumen de 200 microlitros por pozo) en 4 placas estériles de 96 pozos fondo plano². A partir de la primer cosecha del virus aislado se realizaron diluciones décuples en tubos estériles que contenían MEM sin suero, a partir de 10^1 hasta 10^9 . Cada dilución se colocó en la placa con 8 repeticiones, incluyendo una hilera con la cosecha tal cual (10^0) 24 horas después de haber preparado el monoestrato. Se dejaron dos hileras sin infectar como controles de células. La hemadsorción se realizó a las 72, 96 y 120 horas con eritrocitos de ave al 1%. Finalmente la cuarta placa se tiñó con metanol y cristal violeta. Se realizó la titulación siguiendo el Método de Karber^{50,52}.

Inmunofluorescencia. Se prepararon monoestratos de la línea celular VERO (2×10^6 células/ml) en placas de 4 pozos². Veinticuatro horas después, 2 de los pozos fueron infectados con el sobrenadante del aislamiento y 2 quedaron como controles (control positivo y control de células sin infectar). El inóculo permaneció durante 2 horas y posteriormente fue retirado. Posteriormente se agregó MEM sin suero. A las 24 horas de

² Nunc

incubación las células fueron fijadas con acetona durante 10 minutos. Se colocó albúmina sérica bovina al 0.5% durante 15 minutos. Se lavaron con solución salina durante 3 veces y se le adicionó un conjugado (anticuerpos de conejo anti ojo azul marcados con isotiosianato de fluoresceína) elaborado a partir del aislamiento realizado en 1981 por Ramírez MH. Se incubaron durante 30 minutos, y se lavaron 2 veces con solución salina y una más con agua destilada^{50,52,53,54}. Finalmente la placa fue observada a través de un microscopio de luz ultravioleta³.

Purificación viral. El sobrenadante de los cultivos infectados fue clarificado por centrifugación a 3000g durante 20 minutos y almacenado a -20°C. El virus contenido en los sobrenadantes fue precipitado con polietilenglicol 6000 (10% p/v), durante 4 horas a 4°C con agitación leve y se centrifugó a 3000g durante 20 minutos. El botón se suspendió nuevamente en una solución TEN (NaCl 150 nM, con pH de 7.5 y EDTA 1mM) con un volumen equivalente al 5% del volumen original. Se congeló en nitrógeno líquido (-190°C). El virus fue purificado por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (25% y 50%) durante 1 hora a 100 000g. Posteriormente se recuperó la interfase viral. Se diluyó 1:10 y se centrifugó 4 horas a 100 000g, en un gradiente lineal de sacarosa (10-60%). En este caso el virus se obtuvo del sedimento en una solución de sacarosa al 30%. El virus se tituló por aglutinación y se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. El grado de homogeneidad del material purificado se analizó por un patrón electroforético de poliacrilamida bajo condiciones reductoras⁵⁵.

Microscopia electrónica. El sobrenadante de los monoestratos con 72 horas de infección fue centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 2000g. Este sobrenadante se volvió a centrifugar durante 3 horas a 30 000g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido nuevamente en acetato de amonio al 1% para ser montado en rejillas de carbono sobre las que se tiñó con ácido fosfotúngstico al 2%. Para la observación de partículas virales a través de la microscopia electrónica se utilizó la técnica de tinción negativa con un microscopio Phillips EM300^{56,57,58}.

³ Olympus

Una vez comprobada la pureza, actividad aglutinante, ECP y afinidad de la prueba de hemadsorción, el virus fue replicado en la línea celular VERO dándole 3 pases. Las células infectadas se sometieron a 3 choques térmicos (congelación y descongelación). El sobrenadante se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos. A este sobrenadante se le determinó el título hemaglutinante y el efecto citopático en cultivo celular y fue almacenado a -70°C hasta su uso.

Titulación del virus

Las células VERO se ajustaron a 250 000 células por pozo en MEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB)⁴. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano estériles adicionándoles 150 microlitros de la suspensión de células. Una vez formado el monoestrato (24 horas) se prepararon diluciones décuples del Rp (10^0 hasta 10^9) y se adicionaron 50 microlitros de cada dilución en cada pozo, cada una con 8 repeticiones. Después de 72 horas de incubación se colectaron 50 microlitros de los sobrenadantes, transfiriéndolos a otra placa de 96 pozos de fondo en U y se les determinó su actividad aglutinante utilizando glóbulos rojos de ave al 0.5%. Los resultados se expresan como dosis infectante en cultivo celular 50% (DICC₅₀) usando el método de Karber^{50,52}.

Determinación de la actividad aglutinante: En una microplaca de 96 pozos de fondo en U se realizaron diluciones dobles seriadas (desde 1:2 hasta 1:4096) del Rp utilizando una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH de 7.2 como diluyente. Posteriormente se agregaron 50 microlitros de eritrocitos de ave al 0.5% a cada pozo, incluyendo una hilera más como control de eritrocitos. Se colocó a temperatura ambiente para la incubación. La lectura se realizó una vez que el control de eritrocitos sedimentó (aproximadamente 30 minutos). Los resultados se expresan en unidades hemaglutinantes (UH), que representan el inverso de la última dilución en la cual el virus aglutinó a los eritrocitos.

⁴ BQ

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para facilitar el desarrollo del proyecto de investigación, este se efectuó en tres etapas:

ETAPA I

Se realizó previo al desafío de los animales. Esta etapa consistió en la separación de células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre de cerdos adultos sanos libres de la enfermedad del ojo azul producida por el rubulavirus porcino. Durante esta etapa se obtuvieron los valores basales de las subpoblaciones analizadas (monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD3 y células B). Estas subpoblaciones se infectaron *in vitro* con el rubulavirus porcino. Posteriormente se evaluó la presencia del virus por Inmunofluorescencia en monocitos, linfocitos T CD4+ y en linfocitos T CD8+ a través de citometría de flujo. Además se realizaron cultivos de 24 horas de CMN para evaluar la presencia del virus en las mismas subpoblaciones anteriores.

Metodología Etapa I

Toma de muestras

Los animales fueron sangrados como se describió anteriormente durante un período de 2 meses, una vez a la semana. Estos resultados permitieron realizar las infecciones *in vitro* y para obtener los valores basales de las subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD3, CD4+CD8+, así como de células B.

Separación de células mononucleares de sangre periférica

La sangre con heparina se mezcló con el mismo volumen de medio de cultivo RPMI-1640⁵ (25mM HEPES, 5×10^5 de 2-mercaptoetanol, 2mM glutamina y 50 mg/ml de gentamicina) y fue centrifugada 30 minutos a 800g a 4°C en un gradiente de Ficoll-Hypaque⁶. Las CMN se colectaron en la interfase. Las CMN se lavaron 2 veces con medio RPMI-1640 sin suero y finalmente se suspendieron en 5 ml de medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SFB. Se determinó la viabilidad de las células con azul tripán y se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células viables ($\geq 95\%$)^{46,59,60}.

Identificación de subpoblaciones celulares de sangre periférica

Las CMN se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células viables ($\geq 95\%$) por ml en un buffer de lavado (PBS, pH 7.2; BSA, 0.2%; Na₃N, 0.1%; EDTA, 0.01%) para cada determinación de subpoblación. Para identificar las células se realizaron 2 incubaciones. En la primera incubación se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD4 (IgG_{2b} 74:12.4), anti-CD8 (IgG_{2a} 76-2-11), anti-monocitos (IgG₁ CAM36A), anti-células B (IgM PG145A) y anti-CD3 (IgG_{2a} MSA4) elaborados en ratón⁷. En la segunda incubación se utilizaron anticuerpos policlonales elaborados en cabra: anti-IgG de ratón conjugado con isotiosianato de fluoresceína (FITC)⁸, un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG_{2a} de ratón conjugado a Ficoeretrina (PE)⁹ y un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG₁ de ratón conjugado con PE¹⁰. Las concentraciones óptimas de cada anticuerpo fueron determinadas previamente. Ambas incubaciones fueron de 15 minutos a 4°C y entre cada una las células se lavaron 2 veces con la solución de lavado mencionada anteriormente. Las diluciones de los anticuerpos también se realizaron con la solución de lavado. De las células marcadas

⁵ Sigma Chemicals Co. San Luis Missouri.

⁶ Lymphopaque, Pharmacia, Uppsala Sweden.

⁷ VMRD Inc., Washington USA.

⁸ Becton & Dickinson Mountain Cal. USA.

⁹ Zymed Laboratories Inc. USA.

¹⁰ Serotec, Reino Unido.

se analizaron 10 000 para cada subpoblación por citometría de flujo (FACSCalibur)^{46,61,62,63}.

Infección *In vitro* con el rubulavirus porcino

Las CMN se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células por ml en tubos eppendorf. Cada tubo se lavó 2 veces con el buffer de lavado. Cada tubo se infectó con 500 microlitros de rubulavirus porcino, el cuál tenía un título de $10^{6.5}$ DICC y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo las células se lavaron 2 veces y se realizó el marcaje para cada subpoblación como se describió anteriormente. Además, durante la primera incubación también se agregó un primer anticuerpo para la identificación del virus el cuál consistió en suero policlonal anti-ojo azul elaborado en conejo. Durante la segunda incubación de los anticuerpos secundarios para las subpoblaciones se adicionó además un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con FITC¹¹. La lectura se realizó por citometría de flujo⁶⁴.

Cultivo de células mononucleares de sangre periférica con el rubulavirus porcino

Antes y después del desafío de los animales, las CMN se incubaron durante 24 horas. Previo al desafío: Se incubaron en presencia del rubulavirus porcino a una concentración de 1.5×10^6 células por ml para cada determinación: monocitos, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ sin infectar y otro grupo de células infectadas *in vitro* como se describió anteriormente⁶⁴. Para realizar los cultivos se utilizaron placas de 24 pozos¹². Todas las muestras fueron analizadas a las 24 horas de incubación por citometría de flujo.

¹¹ Sigma Chemicals Co. San Luis Missouri.

¹² Nunc

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples para detectar diferencias entre los tratamientos aplicados (identificación del Rp en células infectadas y sin infectar, así como la variación en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación) mediante un procedimiento GLM (General lineal model). En los casos en que existió diferencia se realizó la prueba de Tukey para determinar entre que tratamientos se presentó. Para tal efecto se utilizó el paquete estadístico SPSS^{65,66,67}.

ETAPA II

Se realizó posterior al desafío. En esta fase se tomaron muestras de sangre periférica de los cerdos adultos desde el día 2 hasta el día 18 posterior al desafío con el Rp. Además, en esta etapa se evaluó la presencia del virus en monocitos, linfocitos T CD4+ y en linfocitos T CD8+ a través de inmunofluorescencia utilizando el citómetro de flujo. Se realizaron cultivos de 24 horas de CMN para evaluar presencia del virus de estas mismas subpoblaciones.

Metodología Etapa II

Desafío con el rubulavirus porcino

Los animales fueron desafiados con virus virulento de bajo pasaje del Rp con un título de $10^{6.5}$ DICC (descrito anteriormente) a razón de 5 ml por animal por vía oronasal.

Toma de muestras

Los animales fueron sangrados cada tercer día desde el día de la inoculación hasta el día 18 postinfección.

Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares

Se realizó, como se describió en la Etapa I, utilizando doble marcaje ya que además de identificar a las subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+, también se realizó la identificación del Rp a través de inmunofluorescencia. Todas las lecturas se realizaron por citometría de flujo.

Cultivo de células mononucleares

Posterior al desafío, una vez contadas las células mononucleares de sangre periférica se ajustaron a una concentración de 1.5×10^6 células/ml y se realizaron cultivos de 24 horas en placas de 24 pozos, realizándose los dobles marcajes para identificar la presencia del virus en cada subpoblación.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples para detectar diferencias entre los tratamientos aplicados (identificación del Rp en células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 pi, así como la variación en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación) mediante un procedimiento GLM (General lineal model). En los casos en que existió diferencia se realizó la prueba de Tukey para determinar entre que tratamientos se presentó. Para tal efecto se utilizó el paquete estadístico SPSS^{65,66,67}.

ETAPA III

Se evaluó la posible alteración en los valores normales totales de linfocitos T CD4+ y CD8+, monocitos, linfocitos T CD4+CD8+, células B y de CD3 por medio del conteo de subpoblaciones por citometría de flujo, así como por medio de intradermoreacciones. Se efectuó también el análisis de la respuesta inmune humoral, así como la presencia del virus

a partir de células mononucleares y suero por medio de aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia. En esta etapa se buscó correlacionar la presencia de orquitis, midiendo el largo y diámetro de ambos testículos, con los posibles cambios de los valores en las subpoblaciones.

Metodología Etapa III

Identificación de Subpoblaciones

Cuando los animales fueron sangrados posterior al desafío, de las CMN obtenidas se realizaron las determinaciones totales de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD8+, CD3 así como de células B utilizando la metodología descrita cuando se obtuvieron los valores basales. Además, se analizaron las subpoblaciones totales de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ para determinar posibles alteraciones durante el tiempo de evaluación.

Intradermoreacciones (Reacción de hipersensibilidad retardada)

Para la realización de las intradermoreacciones (Reacción de hipersensibilidad retardada) se utilizó la fitohemaglutinina (PHA)¹³. Cada semana se realizaron intradermoreacciones en la tabla del cuello de los animales infectados con 3 puntos de aplicación:

- ◆ Lectina
- ◆ Rp
- ◆ Medio de cultivo

Se aplicaron 100 microlitros de cada reactivo por vía subcutánea. La lectina se utilizó a una concentración de 33 microgramos/ml, y del Rp se utilizaron 2 microgramos/ml. Antes de la aplicación la piel fue desinfectada con etanol al 60%. La lectura se realizó a las 24 horas midiendo la induración de la piel, utilizando un vernier⁶⁸.

¹³ Sigma Chemicals Co. San Luis Missouri.

Signología

Todos los animales fueron observados durante todo el periodo de experimentación registrándose las siguientes mediciones:

Temperatura

Dimensiones testiculares: Longitud
Diámetro

Asignación de grupos

Una vez que concluyó el tiempo de evaluación (día 18 postinoculación) se realizó la comparación de las mediciones testiculares (longitud y diámetro del testículo izquierdo y derecho) hechas al inicio del experimento y al final de este para determinar si existió o no diferencia entre ambas mediciones. Para agrupar a los animales se tomó en cuenta las diferencias observadas al inicio y al final del experimento de todas las mediciones realizadas asignando un número dependiendo si presentaron orquitis o no.

1. Sin desarrollo de orquitis
2. Desarrollo de orquitis

Aislamiento en cultivo celular del rubulavirus porcino a partir de células mononucleares de sangre periférica y suero de los animales infectados

De las CMN que fueron colectadas de los animales, se separó en criotubos 1 ml de cada suspensión de células y 1ml de suero congelándose a -70°C en nitrógeno líquido hasta que finalizó el experimento. Una vez obtenidas todas las muestras se prepararon monoestratos de células VERO en placas de 96 pozos para dar un primer pase en cultivo

celular. Cada muestra se colocó por duplicado y se realizaron 4 diluciones, desde 1:2 hasta 1:16; también se dejaron 4 pozos para colocar un control positivo de virus y otros 4 para el control de células. Se incubaron durante 72 horas y se tomó sobrenadante para aglutinar con eritrocitos de ave y bovino al 0.5% y evaluar la actividad aglutinante de este. Para dar un segundo pase en cultivo celular se prepararon monoestratos de células VERO, donde se evaluó la actividad aglutinante del sobrenadante y se realizó la prueba de inmunofluorescencia para identificar la presencia del virus en el monoestrato celular, 72 horas posteriores a la inoculación^{50,64,68}.

Inmunofluorescencia en cultivo celular para identificar al rubulavirus porcino a partir de células mononucleares y suero de animales infectados

Una vez efectuado el primer pase en cultivo celular se prepararon placas de 96 pozos con monoestratos de células VERO para efectuar la prueba de Inmunofluorescencia. Las placas se infectaron a las 24 horas de haberse preparado teniendo un 80% de crecimiento celular. Se incubaron durante 72 horas en una estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente se fijaron durante 5 minutos con alcohol-acetona y se realizaron dos lavados con buffer de lavado. Se secaron y se les adicionó el primer anticuerpo el cual era un suero policlonal contra el Rp elaborado en conejo. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 2 veces y se le agregó el anticuerpo secundario el cual era un anti-IgG de conejo elaborado en cabra marcado con FITC. Se incubaron durante 15 minutos y se lavaron en dos ocasiones. Las placas fueron revisadas en un microscopio de fluorescencia.

Respuesta humoral

Prueba de Inhibición de la hemaglutinación (IH).

Las muestras de sangre obtenidas sin anticoagulante fueron utilizadas para separar el suero. Previo a la realización de la prueba de IH el complemento de los sueros fue

inactivado colocándolos 30 minutos a 56°C en baño María. Posteriormente fueron absorbidos con caolín y eritrocitos de bovino al 5% durante 24 horas en refrigeración (5°C) para eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. La prueba de IH se realizó como la describe Ramírez *et al* (1996) utilizando el método beta que consiste en la dilución del suero con cantidades constantes de virus (8 Unidades hemaglutinantes). Considerándose sueros positivos a partir de títulos de 1:16.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples para detectar diferencias entre los tratamientos aplicados (variación en el tiempo de los porcentajes de las subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD3 y células B en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18) mediante un procedimiento GLM (General lineal model). También utilizando el mismo tipo de análisis se determinó si existían diferencias entre los animales en cuanto al desarrollo o no de orquitis. En los casos en que existió diferencia se realizó la prueba de Tukey para determinar entre que tratamientos se presentó. Para tal efecto se utilizó el paquete estadístico SPSS^{65,66,67}.

RESULTADOS

Caracterización del Rp

EFECTO CITOPÁTICO. Al inocular el macerado de encéfalo del lechón en las células VERO se observó desprendimiento de células a partir del segundo día postinoculación. La formación de sincitios fue evidente desde el 3er día postinfección. Sin embargo, el efecto completo se observó hasta el 5^o día postinoculación. El título obtenido fue de $10^{3.73}$ DICC/ml. La botella control permaneció sin cambios aparentes (Figura 1).

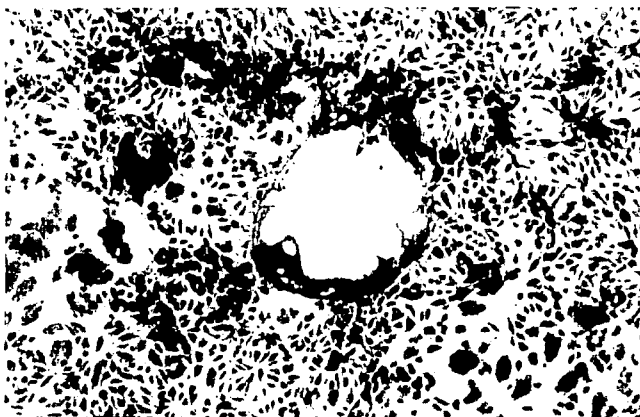


Figura 1. Efecto citopático producido por el Rp después de 96 horas de infección. Este efecto consistió en destrucción celular con la característica formación de sincitios.

ACTIVIDAD AGLUTINANTE. Se tomaron sobrenadantes de los cultivos celulares, infectado y control, a las 72, 96 y 120 horas postinoculación, se congelaron hasta tener las 3 muestras. Una vez colectadas las tres muestras, se midió la actividad aglutinante con eritrocitos de ave, bovino y cuye. El título obtenido a las 72 horas fue de 128 UH (Unidades hemaglutinantes) con eritrocitos de ave, 64 UH con los de cuye y 16 UH con los eritrocitos de bovino. El título obtenido se conservó a las 96 y 120 horas. Para comprobar la

identidad del virus se ajustó la concentración del virus titulado con eritrocitos de bovino a 8 UH y se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) utilizando sueros controles positivo (título de 1:128) y negativo. El suero positivo conservó su título y en el suero negativo no se detectaron anticuerpos.

HEMADSORCIÓN. En las placas preparadas con los monoestratos de células VERO se observó hemadsorción a partir de las 72 horas, donde el virus obtuvo un título de $10^{5.25}$ DICC. El título del virus fue igual en las dos siguientes lecturas (96 y 120 horas). En la placa que se tiñó con cristal violeta el título fue de $10^{5.37}$ DICC.

INMUNOFLUORESCENCIA. Se observó fluorescencia positiva en los pozos infectados a partir del aislamiento del encéfalo del lechón, así como en el control positivo. El control negativo se observó sin fluorescencia. Las marcas fluorescentes corresponden a cúmulos de antígeno viral, lo que refleja identidad viral con su anticuerpo específico marcado con FITC (Figura 2).

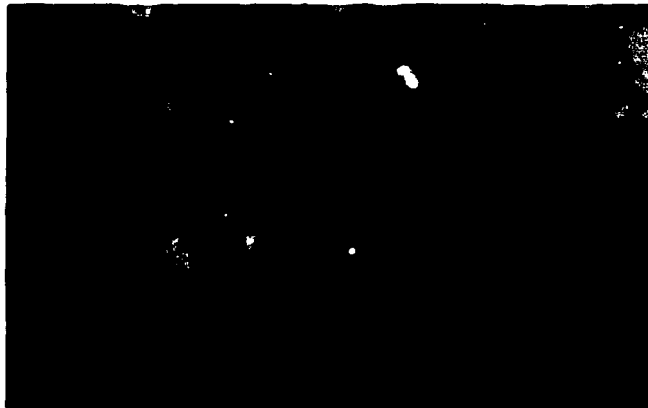


Figura 2. Inmunofluorescencia en cultivo celular a partir de monoestratos de células VERO infectados con el Rp después de 24 horas de incubación.

PURIFICACIÓN VIRAL. Mediante un análisis electroforético se identificaron las 6 proteínas que constituyen al Rp: hemaglutinina-neuraminidasa HN (66 kDa), fosfoproteína P (52 kDa), nucleoproteína NP (68 kDa), proteína L (200 kDa), proteína M (40 kDa) y la proteína de fusión (59 kDa). Los resultados encontrados coinciden con los reportados para el aislamiento del Rp denominado LPM (La Piedad, Michoacán).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. A partir del sobrenadante del cultivo celular con 72 horas de infección se realizó la tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Se observaron estructuras pleomórficas características de la familia *Paramixoviridae*. Se observaron proyecciones sobre la superficie del virus las cuales corresponden a las glicoproteínas externas HN y F. En la parte central se observa la nucleocápside conformada por las proteínas estructurales NP y las proteínas asociadas al genoma P y L. En la parte interna de la envoltura se encontró la proteína M. También se observan partes de la nucleocápside separadas debido a la fragilidad de la envoltura viral (Figura 3).

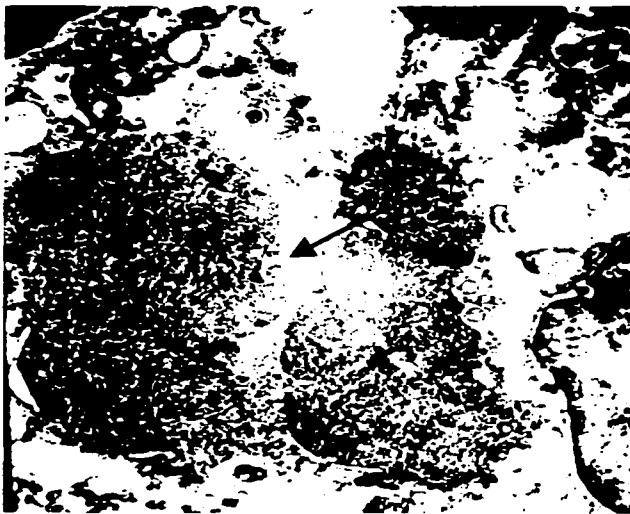


Figura 3. Observación de estructuras virales correspondientes al Rp a través de microscopia electrónica utilizando la técnica de tinción negativa.

Una vez comprobadas las principales características que identifican al Rp se procedió a elaborar los lotes de antígeno necesarios para la realización de las diferentes evaluaciones efectuadas a 5 cerdos clínicamente sanos y libres de anticuerpos contra el Rp, fiebre porcina clásica, PRRS, parvovirus porcino y enfermedad de Aujeszky, provenientes de una granja sin antecedentes previos de haber padecido la enfermedad del ojo azul.

Título del virus

El virus utilizado para realizar los ensayos *in vitro*, así como para la infección de los animales, después de 3 pases en cultivo celular fue titulado por aglutinación y efecto citopático. Este virus presentó actividad aglutinante y tuvo un título de 64 UH. También fue titulado por efecto citopático presentando un título de $10^{6.5}$ DICC. Una vez obtenido el volumen necesario el virus fue fraccionado y congelado en nitrógeno líquido.

ETAPA I

Identificación de subpoblaciones celulares

Se realizaron un total de 8 tomas de muestras de sangre por animal durante un periodo de 2 meses. Las CMN obtenidas fueron contadas y evaluada su viabilidad para ajustarse a una concentración 1×10^6 células viables para cada determinación y obtener los valores basales de las subpoblaciones analizadas (monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD3 y células B). Además, se realizaron dobles marcajes para identificar el Rp en subpoblaciones infectadas *in vitro* en el tiempo 0 e incubadas 24 horas después. Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo analizando 10 000 células para cada determinación.

Las poblaciones basales se obtuvieron sacando el promedio de las 8 mediciones que se tomaron a cada cerdo. Del total de células marcadas (1×10^6) se analizaron por citometría

de flujo 10 000. En la subpoblación de monocitos el valor promedio más bajo correspondió al cerdo 5 (54.03%) y la mas alta al cerdo 3 (84.78%). En el caso de los monocitos existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del promedio obtenido del cerdo 5 con respecto a los valores obtenidos de los demás animales. Los linfocitos T CD4+ se conservaron homogéneos los resultados entre los animales, teniendo un promedio de todos los animales de 24.08%. En los linfocitos T CD8+, el valor promedio de todos los animales fue de 53.21%, correspondiendo el valor más alto al cerdo 5 (56.52%) y el más bajo al cerdo 3 (48.65%). En los linfocitos dobles positivos CD4+CD8+ el cerdo 2 obtuvo el valor promedio más alto (15.93%) y el cerdo 1 el más bajo (8.56%), el promedio de todos los animales fue de 11.68%. En el caso de los linfocitos CD3 los cerdos 2, 3 y 4 obtuvieron valores promedio semejantes, alrededor del 67%, por lo que el promedio general de todos los animales fue del 69.59%. Para las células B el cerdo 4 presentó los valores mas altos (9.15%) y el cerdo 5 el más bajo (4.13%); el promedio para esta subpoblación fue del 5.98% (Figura 4 y 5).

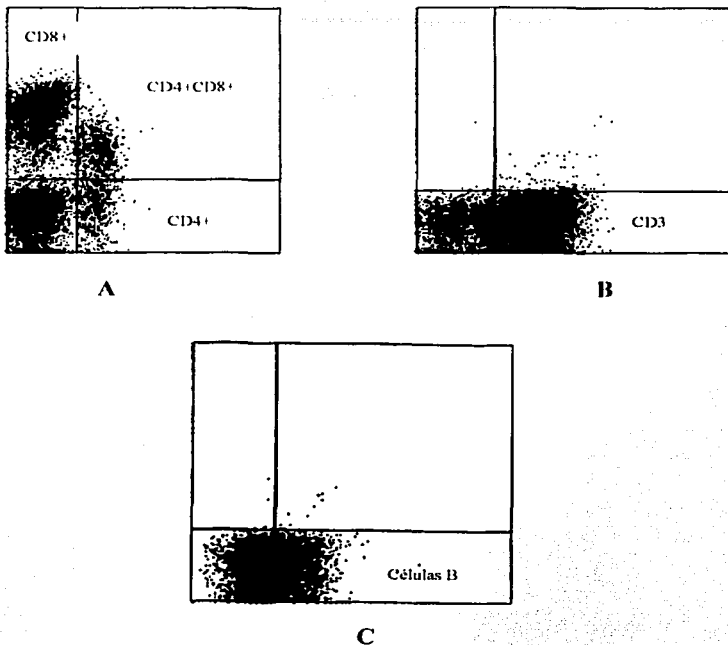


Figura 4. Lecturas realizadas en el citómetro de flujo correspondientes a la identificación de linfocitos T CD4+CD8+ (A), linfocitos T CD3 (B) y células B (C) a partir de células mononucleares de sangre periférica de un cerdo sano. Se analizaron 10 000 células para cada determinación.

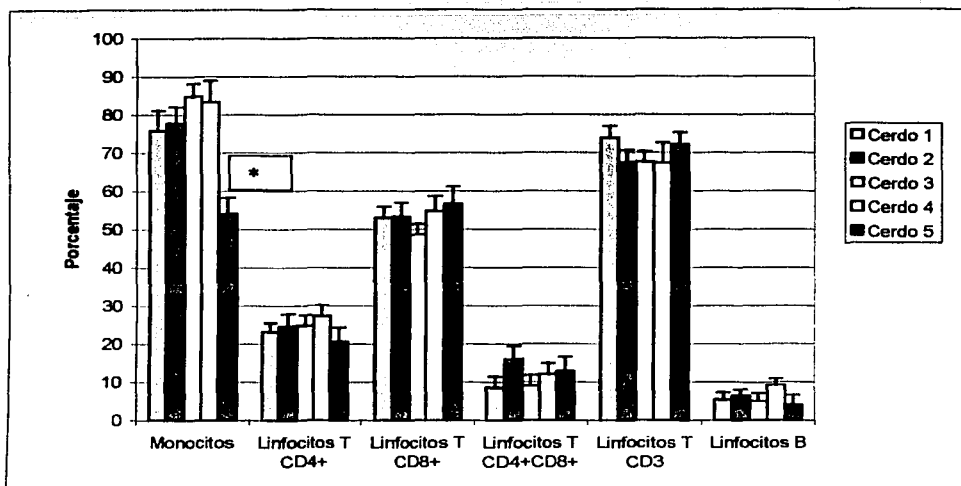


Figura 5. Valores promedio de las subpoblaciones celulares evaluadas de los cinco cerdos previos al desafío con el Rp.

Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas.

Cada barra indica el valor promedio \pm la desviación estándar de las subpoblaciones celulares basales de cerdos sanos previo al desafío con el Rp.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares de sangre periférica infectadas *in vitro*

Se infectaron subpoblaciones de CMN (1×10^6 /ml para cada determinación) con el Rp durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron dobles marcajes para identificar si el Rp era capaz de reconocer y unirse a receptores en monocitos, linfocitos T CD4+ y en CD8+. Además se tomaron grupos controles de células sin infectar y se realizaron las mismas dobles marcas anteriores (anti-Rp y anti-subpoblación) y se compararon ambas mediciones. Se analizaron por medio del citómetro de flujo 10 000 células de cada determinación. Una vez obtenidos los valores, fue comparado el porcentaje de unión del Rp

en las células infectadas y la unión inespecífica de los anticuerpos al grupo de células que no fueron infectadas. Los valores obtenidos de cada cerdo fueron promediados. La comparación se realizó para cada subpoblación (Figura 6 y 7). El promedio de células mononucleares de sangre periférica que fue infectado y reconocido por el Rp fue del 35.6% para los monocitos, 6.2% para los linfocitos T CD4+ y del 30.8% para los linfocitos T CD8+, comparado con los resultados obtenidos en las células que no fueron infectadas: 2.4% en el caso de los monocitos, 0.8% para los linfocitos T CD4+ y 0.3% en los linfocitos T CD8+. En el caso de las tres subpoblaciones de las células analizadas en el tiempo 0 se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de células infectadas y sin infectar ($p < 0.05$).

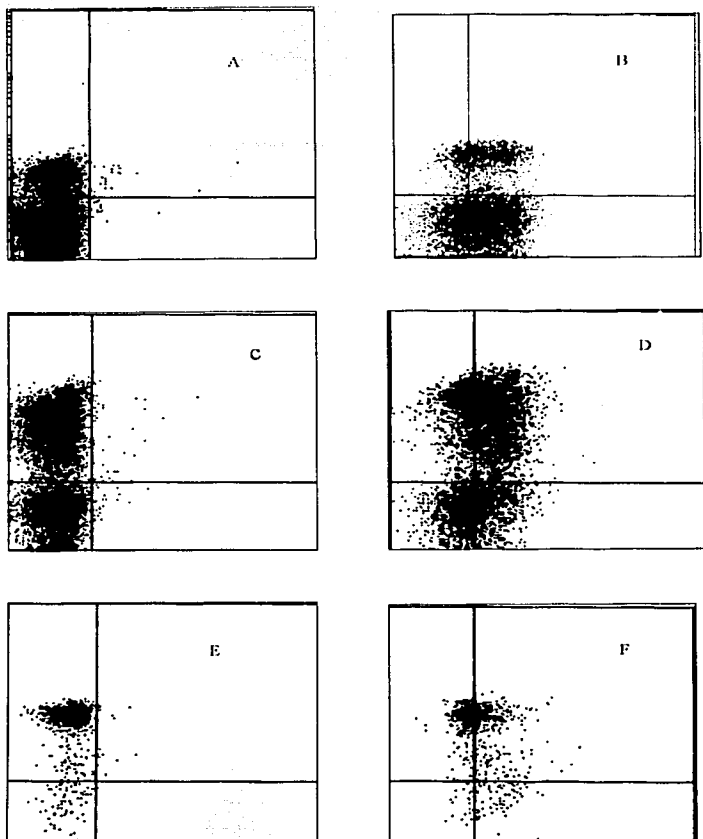


Figura 6. Lecturas de subpoblaciones celulares efectuadas en el citómetro de flujo a partir de linfocitos T CD4+ sin virus (A) y con virus (B), linfocitos T CD8+ sin virus (C) y con virus (D) y de monocitos sin virus (E) y con virus (F).

El Rp se identificó a través de un anticuerpo policlonal elaborado en conejo, seguido de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con FITC. Se analizaron 10 000 células para cada determinación.

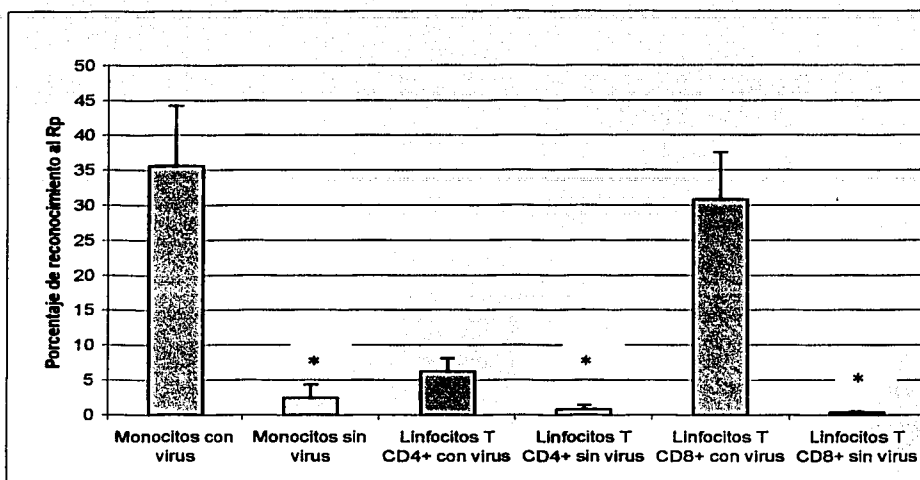


Figura 7. Valores promedio de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ que son reconocidos por el Rp en células infectadas y sin infectar en el Tiempo 0. Estudio *in vitro*. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas de cada uno de los muestreos realizadas en 5 cerdos. Cada barra corresponde al promedio \pm desviación estándar de cada subpoblación.

El Rp se identificó a través de un anticuerpo policlonal elaborado en conejo, seguido de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con FITC.

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares de sangre periférica incubadas durante 24 horas

Otro grupo de CMN (1.5×10^6 células/ml para cada determinación) fue infectado durante 1 hora con el Rp, incubado durante 24 horas y marcadas con los dos anticuerpos para comprobar si el virus era capaz de infectar alguna de las subpoblaciones analizadas. También se colocó un grupo de células control sin infectar para identificar posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados. Se analizaron por citometría de flujo 10 000 células para cada determinación. En el análisis realizado para los monocitos se encontró que el promedio de las células identificadas por el anticuerpo contra el Rp 24 horas después de

la infección fue menor que la lectura realizada en el tiempo 0 para todos los animales. En el caso de los monocitos se encontró que el porcentaje de células marcadas con el Rp fue de 7.74 % para las células infectadas contra un 3.09% encontrado en las células sin infectar. Para los linfocitos T CD4+ el porcentaje de células infectadas con el Rp fue del 4.84% y en las células sin infectar del 1.80%, resultando la inmunofluorescencia real del 3.03%. El porcentaje de los linfocitos T CD8+ infectados e identificados con el anticuerpo contra el Rp fue del 17.78%, en los no infectados se identificó en el 0.74%, resultando la inmunofluorescencia real del 17.04% (Figura 8). En el caso de las células que fueron cultivadas durante 24 horas, la identificación del Rp en las células que fueron infectadas y las que no lo fueron, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el caso de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Mientras que en los monocitos no existió diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en la identificación del Rp entre las células infectadas de las que no lo fueron.

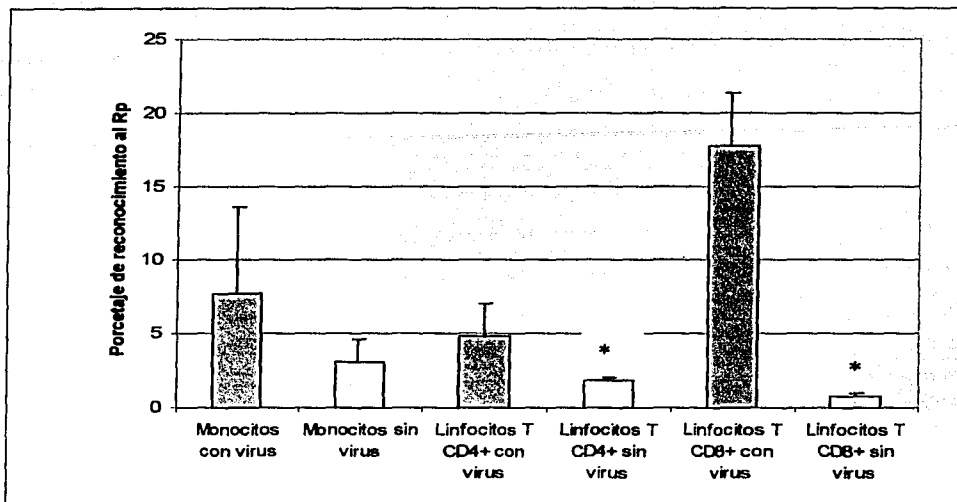


Figura 8. Valores promedio de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ que son reconocidos por el Rp en células infectadas y sin infectar, que fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la inoculación *in vitro*. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas de cada uno de los muestreos realizados en 5 cerdos. Cada barra corresponde al promedio \pm desviación estándar de cada subpoblación analizada.

El Rp se identificó a través de un anticuerpo policlonal elaborado en conejo, seguido de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con FITC.

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Diferencia en las lecturas de las células infectadas *in vitro* con el rubulavirus porcino en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación

Una vez obtenidos los valores correspondientes a las lecturas realizadas al tiempo 0 y 24 horas se realizó una comparación entre las células infectadas donde se había identificado al virus. Las diferencias observadas en las células infectadas y revisadas en el tiempo 0 comparadas con las lecturas obtenidas de las células infectadas y cultivadas durante 24 horas se comportaron muy similares en las tres subpoblaciones analizadas. En general, se observó una disminución en la identificación del Rp en las células infectadas y cultivadas 24 horas comparada con la lectura realizada el mismo día de la infección. En el

caso de los monocitos el promedio encontrado en las lecturas realizadas al tiempo 0 fue del 33.17%, mientras que a las 24 horas fue del 4.65% (diferencia del 28.51%). En los linfocitos T CD4+ el reconocimiento en el tiempo 0 fue del 5.4% mientras que a las 24 horas fue del 3.03% (diferencia del 2.56%). Los linfocitos T CD8+ presentaron un reconocimiento del 30.40% al tiempo 0 y 17.04% a las 24 horas (diferencia del 13.36%) (Figura 9). En el caso de las subpoblaciones de monocitos y de linfocitos T CD8+ que fueron infectados con el Rp se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la lectura realizada en el tiempo 0 y en las células que se infectaron e incubaron además durante 24 horas. En el caso de los linfocitos T CD4+ que fueron infectados no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los diferentes tiempos de evaluación.

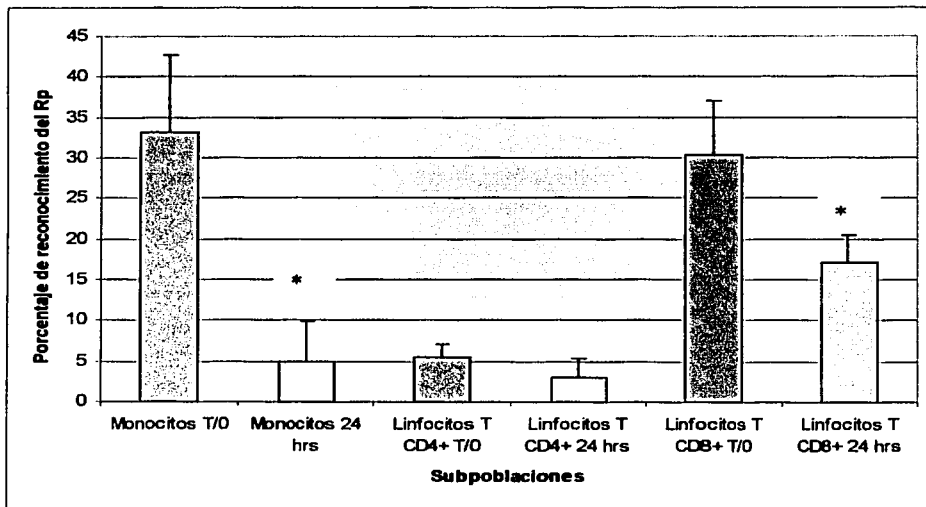


Figura 9. Comparación de las lecturas obtenidas de las células infectadas con el Rp al tiempo 0 y a las 24 horas. Estudio *in vitro*. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas de cada uno de los muestreos realizadas en 5 cerdos. El valor de cada barra corresponde al promedio \pm desviación estándar.

T/0: Valores que corresponden a la lectura realizada el mismo día de la infección.

24 hrs: Valores que corresponden a las lecturas obtenidas de las células infectadas y cultivadas durante 24 hrs.

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

ETAPA II

Una vez desafiados los cerdos con 5 ml por vía oronasal con el Rp previamente caracterizado y replicado (3 pases) en la línea celular VERO se tomaron muestras sanguíneas de los animales en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 posteriores a la infección con el Rp.

Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares provenientes de cerdos infectados

Se realizaron dobles marcajes a partir de la sangre colectada de todos los animales los días antes descritos para identificar al Rp en monocitos, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Se obtuvieron los valores promedio de las células donde se identificó al Rp a partir de las subpoblaciones celulares de los animales cada día en que se tomaron las muestras de sangre. Se separaron y marcaron 1×10^6 células viables por ml para cada subpoblación analizada. La lectura de las muestras se realizó en el citómetro de flujo, analizándose 10 000 células. En el caso de los monocitos el valor promedio más bajo identificado correspondió al día 9 (0.93%) y el más alto al obtenido el día 18 (8.62%) pi. Para los linfocitos T CD4+ los valores promedio obtenidos que son menores a 1 corresponden a los días 0, 2, 7, 9, 11, 16 y 18 pi, mientras que los valores mayores a 1 corresponden a los días 4 y 14 pi (1.04% y 1.32% respectivamente). La identificación del Rp en los linfocitos T CD8+ también resultan bajos, en general menores a 1, a excepción de los valores promedio obtenidos el día 18 pi (3.26%) (Figura 10).

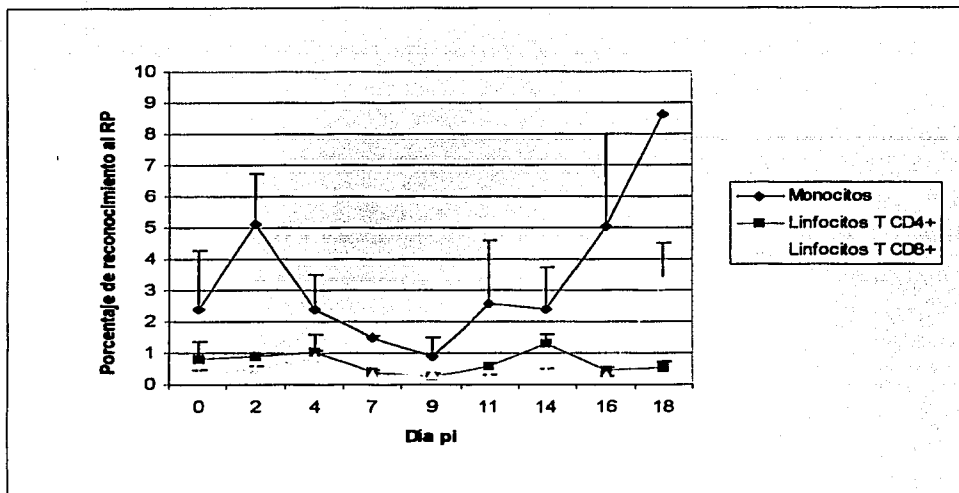


Figura 10. Valores promedio de la identificación del Rp en subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de cerdos infectados con el Rp. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas. El valor en cada punto corresponde al promedio \pm desviación estándar de las muestras colectadas.
Día pi: Día postinfección

Identificación del rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares, que fueron cultivadas durante 24 horas, provenientes de cerdos infectados

Una vez que se colectó la sangre de los animales infectados los días descritos anteriormente, se tomaron 1.5×10^6 células/ml para cultivarse durante 24 horas e identificar al Rp realizando el doble marcaje. Se analizaron 10 000 células por medio del citómetro de flujo. En los monocitos de los animales infectados e incubados durante 24 horas se encontraron los valores promedio más altos de identificación al Rp el día 2 pi (28.13%), sin embargo, también en los días 7 y 9 se volvieron a presentar valores altos (22.74% y 22.92%, respectivamente), mientras que el valor promedio más bajo correspondió al día 0. En los linfocitos T CD4+ el valor promedio más alto correspondió al día 2 pi (5.02%) y el

más bajo al día 11 pi. En cuanto a los valores de los linfocitos T CD8+ los valores promedio en general fueron bajos, en general menores a 1, a excepción de los días 2 y 4 (1.47% y 1.12% respectivamente) (Figura 11).

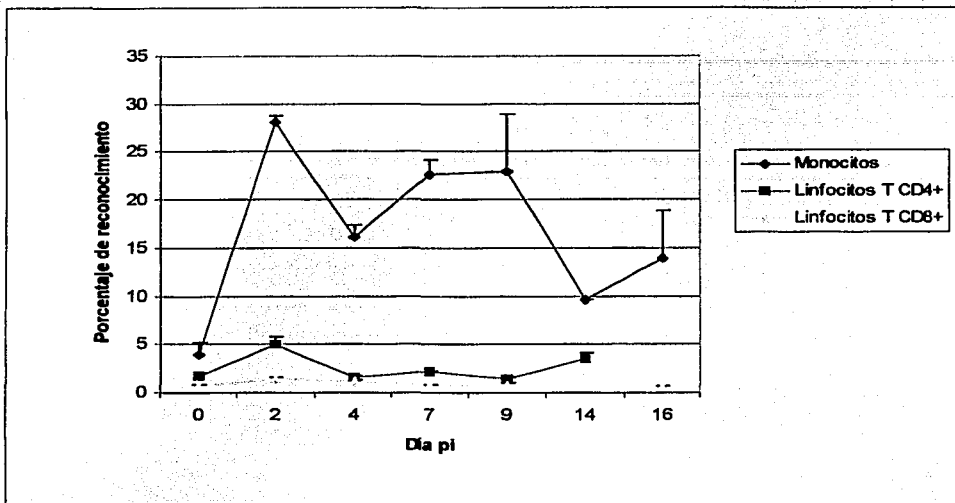


Figura 11. Valores promedio de la detección del Rp en subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ incubadas durante 24 horas, provenientes de cerdos infectados con el Rp. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas. El valor en cada punto corresponde al promedio \pm desviación estándar.

*En los días donde no aparecen puntos no se pudo realizar la lectura de las muestras ya que la viabilidad de las células era baja.

Diferencias en los valores promedio de la identificación del Rubulavirus porcino en subpoblaciones celulares en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación provenientes de cerdos infectados

Una vez realizadas ambas lecturas se realizó la comparación de la identificación del Rp en las subpoblaciones de los cerdos al tiempo 0 y al realizar la incubación de las CMN 24 horas. En general se logró identificar en mayor porcentaje al Rp a las 24 horas que cuando la lectura se realizó en el día en que se tomó la muestra. En el caso de los monocitos fue donde se encontró una mayor diferencia en la identificación del Rp entre el tiempo 0 y 24 horas, principalmente los días 2, 7 y 9 (fue alrededor del 20%). En los linfocitos T CD4+ la mayor diferencia fue en el día 2 (4.13%) y donde no existió cambio entre una lectura y la otra fue en el día 11 (0). Para los linfocitos T CD8+ la diferencia entre la lectura al tiempo 0 y 24 horas después fue mínima ya que en ninguno de los casos esta diferencia fue mayor a 1 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diferencias en los valores promedio de identificación del Rp en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación a partir de CMN de cerdos infectados.

Subpoblación	Día pi Diferencias								
	0	2	4	7	9	11	14	16	18
Monocitos*	-1.58	-22.99	-13.67	-21.25	-21.99	**	-7.27**	-8.89	**
Linfocitos T CD4+*	-1.0	-4.13	-0.61	-1.83	-1.2	0	-2.31	**	**
Linfocitos TCD8+*	-0.44	-0.97	-0.27	-0.57	-0.48	**	**	-0.27	**

Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas. El valor en cada casilla corresponde al promedio \pm desviación estándar.

**No se realizó la comparación ya que en la lectura de las 24 horas había baja viabilidad celular.

ETAPA III

Esta etapa también correspondió a las evaluaciones realizadas posteriores a la infección de los cerdos con el Rp.

Análisis de subpoblaciones totales

Para este análisis se realizaron las determinaciones de las subpoblaciones totales de monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, linfocitos CD3 y de células B. Se utilizaron los valores promedio basales de todos los animales que se obtuvieron previos al desafío con el Rp. Para realizar las determinaciones se utilizó parte de la muestra sanguínea que se obtuvo para realizar la identificación del Rp en las subpoblaciones analizadas. Los valores promedio más altos de monocitos se presentan en los días 2 y 4 pi (85.28% y 85.68% respectivamente), mientras que el día 11 corresponde al nivel más bajo encontrado (53.42%), el cuál es incluso menor al valor basal promedio. En el caso de los linfocitos T CD4+, el día 2 se observó una disminución significativa ($p < 0.05$), mientras que los días 4, 7, 9 y 11 muestran un comportamiento errático. En los últimos días de evaluación: 14, 16 y 18 pi los valores se conservan altos (31 al 33%). Los porcentajes encontrados los días 2, 4, 7 y 9 pi para los linfocitos T CD8+ aumentan significativamente ($p < 0.05$) con respecto a los valores basales, mientras que los días 11, 14 y 16 los niveles se conservan similares al día 0. Finalmente se vuelve a presentar un aumento significativo ($p < 0.05$) el día 18 pi para esta subpoblación (70.01%). Para los linfocitos T CD4+CD8+ se presenta un aumento significativo el día 4 pi, (17.65%), sin embargo, los porcentajes van disminuyendo paulatinamente los días subsecuentes (7, 9, 11, 14 y 16 pi), para nuevamente aumentar significativamente ($p < 0.05$) para el día 18 pi (16.76%). Los linfocitos T CD3 muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) el día 2 pi (83.83%), sin embargo, a partir de ese día los porcentajes comienzan a disminuir paulatinamente hasta el día 16 pi (52.47%). Para finalmente el día 18 los porcentajes vuelven a aumentar significativamente, hasta 10% más que el valor promedio inicial. En el caso de las células B se presenta un aumento significativo ($p < 0.05$) el día 2 pi (11.03%). Posteriormente los porcentajes van disminuyendo paulatinamente, principalmente el día 7 pi (1.23%), y a partir de esta fecha los porcentajes vuelven a aumentar hasta obtener los niveles más altos los días 16 y 18 pi (14.59% y 14.73% respectivamente)(Figura 12).

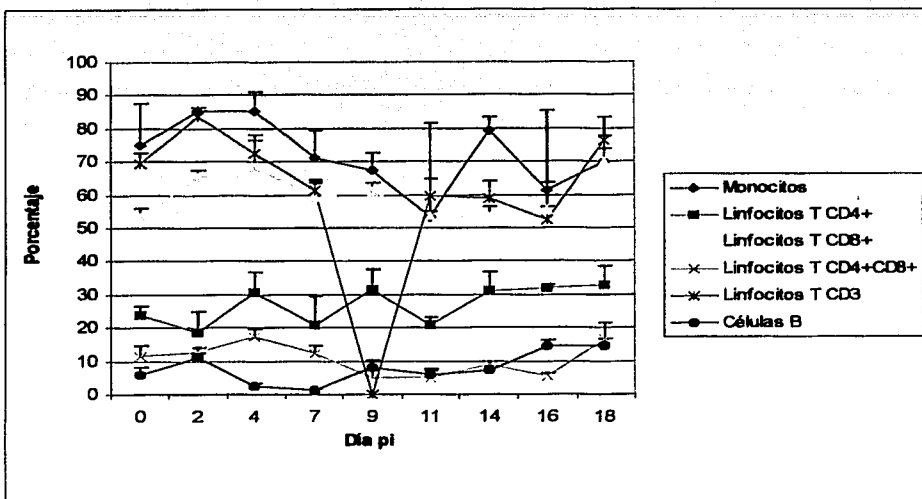


Figura 12. Valores promedio de subpoblaciones de 5 cerdos infectados con el Rp. Se marcaron 1×10^6 células para cada subpoblación. Todas las muestras se analizaron por medio del citómetro de flujo. Los porcentajes obtenidos son a partir de 10 000 células analizadas. El valor en cada punto corresponde al promedio \pm desviación estándar.
 **No se pudo realizar la lectura el día 9 postinfección para la subpoblación de monocitos

Intradermoreacciones (Reacción de hipersensibilidad retardada)

Una vez aplicados la PHA, el Rp y el MEM se midió la reacción de hipersensibilidad retardada evaluándose el grado de induración en cada uno de los sitios de aplicación. Se le asignó los siguientes símbolos para representar el grado de induración: (-) sin reacción, (+) cuando la induración se encontraba dentro del rango de aumento de volumen de 0.5 mm a 1.5mm; y (++) cuando el grado de induración era del 1.6 a 3.0 mm. En el caso de la PHA se observó que todos los animales respondieron con grados desde moderada hasta aparente; en general los cerdos número 3 y 5 fueron los que presentaron una reacción aparente más constante (días 0, 7 y 21). Mientras que en los cerdos marcados como 1 y 4 se identificó reacción aparente en el día 0 y 14 respectivamente. Con respecto a la reacción observada en el sitio donde se aplicó el MEM en ningún día se apreció alguna induración del tejido. En cuanto a la respuesta en el sitio de aplicación del

Rp se encontró que desde el día 7 se observaron reacciones moderadas en los animales identificados como 1, 3 y 5. Para el día 14 casi todos los animales presentaban reacciones moderadas, a excepción del cerdo 4 que presentó una reacción aparente. Este mismo comportamiento se observó en el día 21 (Figura 13, Cuadro 3).



Figura 13. Intradermoreacciones. Muestran el sitio de aplicación de las intradermoreacciones (Reacción de hipersensibilidad retardada):

- A. PHA.
- B. Rp.
- C. Control (MEM).

Cuadro 3. Respuesta inflamatoria cuando se inoculó PHA, Rp y MEM por vía intradérmica de 5 cerdos infectados con el Rp.

Día pi	Cerdo número	Grado de induración		
		PHA	MEM	Rp
0	1	++	-	-
	2	+	-	-
	3	++	-	-
	4	+	-	-
	5	++	-	-
7	1	+	-	+
	2	+	-	-
	3	++	-	+
	4	+	-	-
	5	++	-	+
14	1	+	-	+
	2	++	-	+
	3	+	-	+
	4	++	-	++
	5	+	-	+
21	1	+	-	+
	2	++	-	+
	3	++	-	+
	4	+	-	++
	5	++	-	+

La aplicación se realizó en la tabla del cuello y la induración se midió con un vernier 24 horas después de la aplicación de 0.1 ml de PHA (33 mg/ml), del Rp (0.2 mg/ml) y de MEM. La interpretación de los resultados fue como sigue:

- (-) Negativa
- (+) Moderada (de 0.5mm a 1.5mm)
- (++) Aparente (de 1.6mm a 3.0 mm)

Signos clínicos

Los cerdos identificados como 1, 2 y 3 presentaron fiebre (40-41°C) al segundo día pi. Durante la segunda semana pi los cerdos identificados como 1, 4 y 5 presentaron constipación y los cerdos 2 y 3 tuvieron conjuntivitis. Posterior a este tiempo los animales no mostraron ninguna alteración en su comportamiento.

Dimensiones testiculares

En el Cuadro 4 se muestran los valores obtenidos en las mediciones testiculares correspondientes a la longitud del testículo derecho efectuadas a los cerdos desde el día 0 hasta el día 18 pi. En el se puede observar que el cerdo que obtuvo el mayor aumento fue el cerdo número 3 (18.75 cm en el día 0 y 28 cm el día 18). Mientras que el cerdo número 4 presentó la menor diferencia (17.87 cm al inicio y 20 cm al final).

Cuadro 4. Longitud del testículo derecho posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp.

Cerdo número	Longitud testicular (cm)						
	Día pi						
	0	2	4	9	11	16	18
1	16	16	16	16	18	18	21
2	16.93	17	17	17	20	20	24
3	18.75	19	19	19	28	28	28
4	17.87	18	18	18	20	20	20
5	18	18	18	18	18	22	22

La medición se realizó con cinta métrica y se tomó la medición desde la cabeza del epidídimo hasta la cola del mismo.

En el cuadro 5 aparecen las mediciones correspondientes a la longitud del testículo izquierdo de los cerdos infectados con el Rp. En este caso el cerdo número 3 también obtuvo la mayor diferencia en las mediciones efectuadas en este testículo (19.68 cm al inicio y 29 cm al final) y el cerdo 4 la menor (18.75 cm al inicio y 19 cm al final).

Cuadro 5. Longitud del testículo izquierdo posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp.

Cerdo número	Longitud testicular (cm)						
	Día pi						
	0	2	4	9	11	16	18
1	15	15	15	15	16	16	18
2	16.93	17	17	17	21	21	25
3	19.68	20	20	20	26	26	29
4	18.75	19	19	19	19	19	19
5	18.93	19	19	19	21	21	21

La medición se realizó con cinta métrica y se tomó la medición desde la cabeza del epidídimo hasta la cola del mismo.

Las mediciones del diámetro del testículo derecho aparecen en el cuadro 6. En el se aprecia que la mayor diferencia en las mediciones con respecto al día 0 y 18 correspondió al cerdo número 3 (9.93 cm al inicio y 15 cm al final), mientras que la menor al cerdo número 5 (9 cm al inicio y 11 cm al final).

Cuadro 6. Diámetro del testículo derecho posterior a la infección de los 5 cerdos con el Rp.

Cerdo número	Diámetro testicular (cm)						
	Día pi						
	0	2	4	9	11	16	18
1	7.93	8	8	8	9	9	9
2	8	8	8	8	10	10	12
3	9.93	10	10	10	12	12	15
4	9.8	10	10	10	12	12	12
5	9	9	9	9	11	11	11

La medición se realizó en la parte central del testículo por medio de una cinta métrica.

En el cuadro 7 aparecen las mediciones del diámetro del testículo izquierdo de los cerdos infectados con el Rp. El cerdo número 3 obtuvo el mayor aumento (9.81 cm al inicio y 15 cm al final), mientras que el cerdo 4 casi no presentó cambios en las mediciones anteriores al desafío y posteriores a este (10.75 cm al inicio y 11 cm al final).

Cuadro 7. Diámetro del testículo izquierdo posterior a la infección de los cerdos con el Rp.

Cerdo número	Diámetro testicular (cm)						
	Día pi						
	0	2	4	9	11	16	18
1	8	8	8	8	10	10	10
2	8	8	8	8	10	11	12
3	10.87	11	11	11	13	13	16
4	10.75	11	11	11	11	11	11
5	9.81	10	10	10	12	12	15

La medición se realizó en la parte central del testículo por medio de una cinta métrica.

En el cuadro 8 aparecen las diferencias totales en cuanto a los cambios en longitud y diámetro de ambos testículos de todos los animales. Se aprecia que el cerdo que presentó el mayor aumento en las dimensiones testiculares fue el cerdo número 3 (diferencia del 28.79 cm) y el que presentó la menor diferencia fue el cerdo número 4 (4.83 cm).

Cuadro 8. Diferencia en longitud y diámetro de los testículos antes y después de la infección con el Rp.

Cerdo número	Longitud (cm)		Diámetro (cm)		Diferencia total (cm)
	Izquierdo	Derecho	Izquierdo	Derecho	
1	3	5	2	1.07	11.07 ^b
2	8.07	7.07	4	4	23.14 ^a
3	9.32	9.27	5.13	5.07	28.79 ^a
4	0.25	2.13	0.25	2.2	4.83 ^c
5	2.07	4	5.19	2	13.26 ^b

La diferencia se obtuvo restando a la medición final de los testículos la medición inicial de los mismos. En la última columna se presenta la variación total (longitud y diámetro) que sufrieron los testículos durante el periodo de evaluación. Diferente literal en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Prueba de Tukey).

En las figuras 14 a 18 aparecen las variaciones observadas en las dimensiones testiculares de cada uno de los animales en estudio.

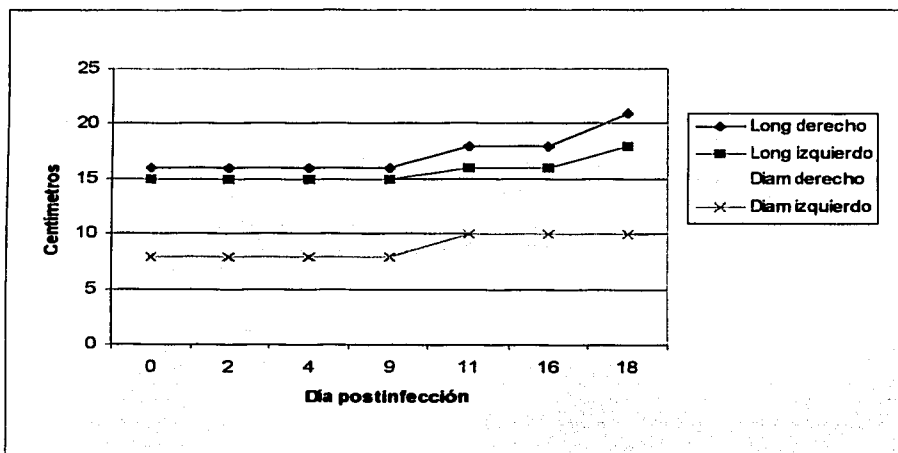


Figura 14. Dimensiones testiculares del cerdo 1 posterior a la infección con el Rp.

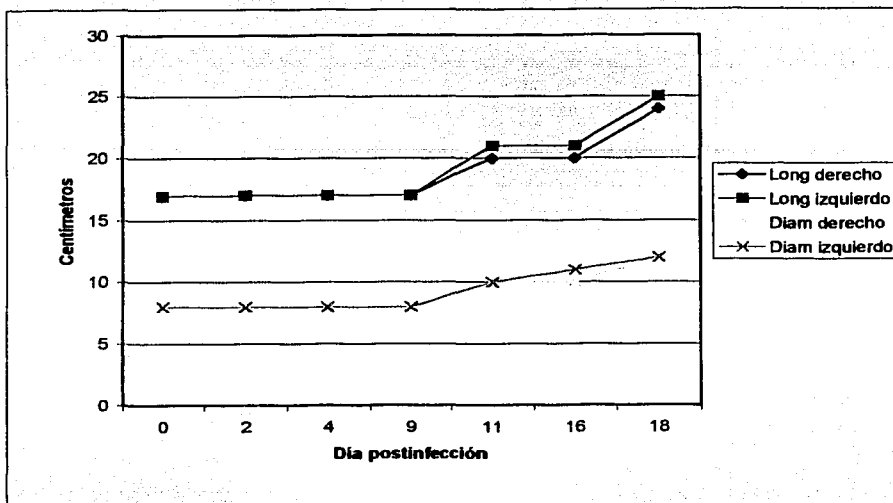


Figura 15. Dimensiones testiculares del cerdo 2 posterior a la infección con el Rp.

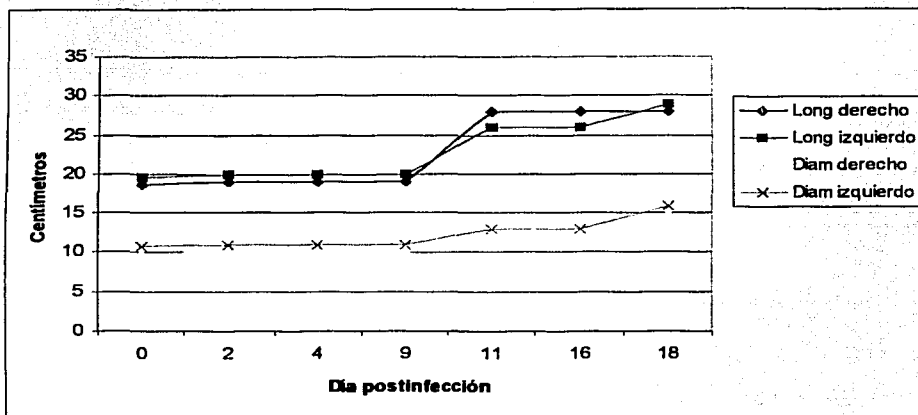


Figura 16. Dimensiones testiculares del cerdo 3 posterior a la infección con el Rp.

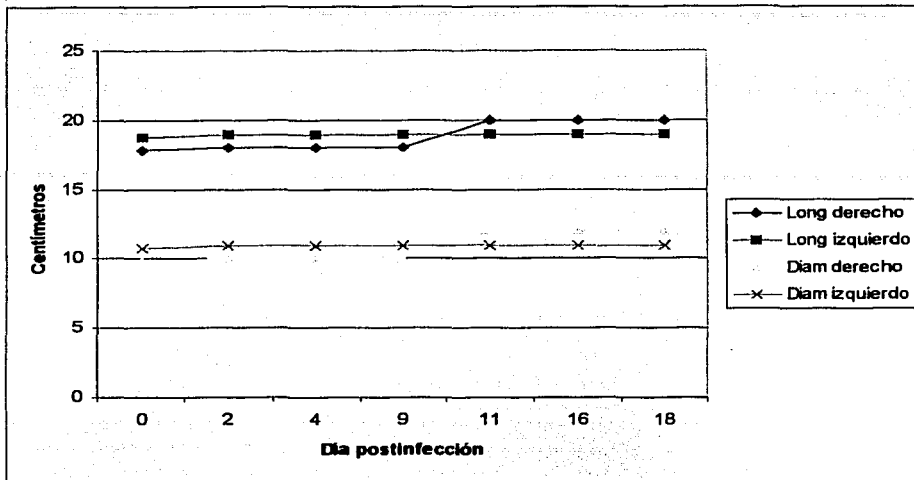


Figura 17. Dimensiones testiculares del cerdo 4 posterior a la infección con el Rp.

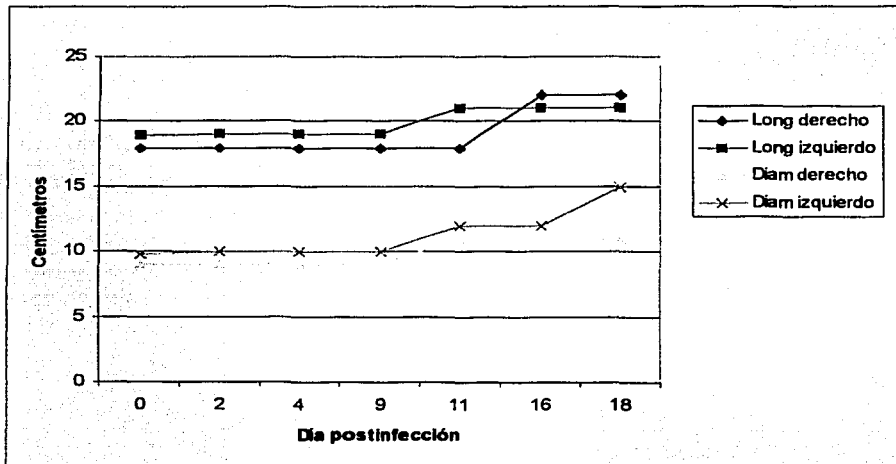


Figura 18. Dimensiones testiculares del cerdo 5 posterior a la infección con el Rp.

Asignación de grupos

Utilizando las diferencias observadas en las mediciones testiculares al inicio comparadas con las mediciones al final del experimento, se realizó una comparación múltiple de los datos y se aplicó la prueba de Tukey para asignar los grupos dependiendo el grado de orquitis que desarrollaron los cerdos inoculados. Mediante este análisis se pudieron identificar 3 grupos de animales:

1. Animales que no desarrollaron cambios significativos en el incremento testicular (cerdo 4).
2. Animales que desarrollaron una orquitis poco aparente (cerdos 1 y 5).
3. Animales que desarrollaron una orquitis significativa o aparente (cerdos 2 y 3).

Aislamiento en cultivo celular del rubulavirus porcino a partir de CMN y suero de animales infectados

Una vez concluido el experimento se realizó el aislamiento en cultivo celular del Rp. Para tal fin se utilizaron placas de 96 pozos con fondo plano esterilizadas por radiación con monoestratos de células VERO. Se trabajó cada muestra por duplicado y se realizaron 4 diluciones (desde 1:2 hasta 1:16). Los resultados se presentan en el Cuadro 9. Los días 0, 7, 14, 16 y 18 pi no se identificó ninguna muestra positiva. El día 2 pi se logró aislar al Rp a partir de suero y CMN del cerdo 2 con títulos de 1:8 y 1:2 respectivamente. El día 4 pi se aisló al Rp a partir de suero de 3 animales (3, 4 y 5) y solo en el cerdo 3 se logró aislar a partir de CMN. En el día 9 pi, en los cerdos 2 y 4 se logró aislar al Rp a partir de suero (Título de 1:4 para ambas muestras) sin embargo, no se logró recuperar a partir de CMN. Finalmente, en el día 11 se aisló el Rp a partir de suero de los cerdos 1 y 2, sin identificarse en las CMN de estos mismos animales.

Identificación del rubulavirus porcino por medio de inmunofluorescencia

Una vez efectuado el segundo pase en cultivo celular de las muestras de suero y CMN de los animales infectados, con los monoestratos de las células VERO se realizó la prueba de IF para la identificación del Rp. Los resultados que se presentan en el Cuadro 9 indican que se logró identificar el mismo número de muestras positivas (10) al Rp por aislamiento e inmunofluorescencia, sin embargo el título del virus fue mayor por inmunofluorescencia. Se logró identificar al Rp por aislamiento en cultivo celular a partir del día 2 pi en el cerdo 2 en suero y CMN, sin embargo el título observado fue más alto por inmunofluorescencia (1:16 y 1:4 respectivamente). En el día 4 pi se identificó al Rp en las muestras de los cerdos 3, 4 y 5 por aislamiento e inmunofluorescencia. En el día 9 pi en los cerdos 2 y 4 se identificaron muestras positivas en suero por aislamiento e inmunofluorescencia. En el caso del cerdo 2 se identificó al Rp también en CMN con un título de 1:4. En el día 11 pi solo se obtuvo una muestra positiva la cual corresponde al suero del cerdo 2.

Cuadro 9. Identificación del Rp en suero y CMN de cerdos infectados por medio de aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia.

Día pi	Cerdo número	Aislamiento en Cultivo Celular (Título Aglutinante)		Inmunofluorescencia (Título por IF)	
		Suero	CMN	Suero	CMN
2	2	1:8	1:2	1:16	1:4
4	3	1:8	1:4	1:8	1:2
	4	1:2	(-)	1:4	(-)
	5	1:4	(-)	1:4	(-)
9	2	1:4	(-)	1:8	1:4
	4	1:4	(-)	1:4	(-)
11	1	1:2	(-)	(-)	(-)
	2	1:2	(-)	1:4	(-)

El aislamiento se realizó en monoestratos de células VERO en placas de 96 pozos. De cada muestra se trabajaron cuatro diluciones (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) y se realizó por duplicado. El título se obtuvo tomando sobrenadantes de los cultivos infectados, transfiriéndolos a placas de 96 pozos con fondo en "U" y agregándoles eritrocitos de bovino al 0.5%. La prueba de inmunofluorescencia se realizó sobre los monoestratos infectados, utilizando como primer anticuerpo un suero policlonal anti ojo azul elaborado en conejo y un segundo anticuerpo que correspondió a un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con FITC. Finalmente la lectura se realizó en un microscopio de luz ultravioleta.

* Los días 0, 7, 14, 16 y 18 no se identificó ningún caso positivo.

Respuesta humoral

Se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación para determinar la presencia de anticuerpos de los cerdos posterior a la infección con el Rp. Los resultados se presentan en el Cuadro 10. Los anticuerpos se empiezan a identificar desde el día 7 pi en un sólo animal. Sin embargo, hasta el día 16 pi ya se logra identificar una respuesta inmune humoral en todos los animales.

Cuadro 10. Título de anticuerpos séricos identificados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación de 5 cerdos infectados con Rp.

Día pi*	Cerdo número	Título de anticuerpos**
7	1	1:32
	2	(-)
	3	(-)
	4	(-)
	5	(-)
9	1	1:64
	2	(-)
	3	(-)
	4	1:32
	5	1:32
11	1	1:128
	2	(-)
	3	(-)
	4	1:32
	5	1:64
14	1	1:64
	2	(-)
	3	(-)
	4	1:64
	5	1:128
16	1	1:64
	2	1:16
	3	1:16
	4	1:64
	5	1:128
18	1	1:32
	2	1:32
	3	1:16
	4	1:64
	5	1:128

Día pi: Día postinoculación.

* Los días 0, 2 y 4 pi todos los animales fueron seronegativos.

** Los títulos están reportados en unidades inhibitorias de la hemaglutinación.

DISCUSIÓN

En este trabajo se comprobaron las principales características que definen al Rp, como la capacidad de provocar efecto citopático en cultivos celulares (células VERO), actividad aglutinante, hemadsorción en cultivo celular (eritrocitos de ave), inmunofluorescencia específica en el citoplasma de monoestratos de células VERO infectadas con el Rp. Así como la identificación de las principales proteínas que conforman al Rp (HN, P, NP, L, M, Y, F) y la identificación de estructuras virales en sobrenadantes de células infectadas con de microscopía electrónica⁶⁹.

Con los resultados obtenidos de la caracterización viral se pudo comprobar que las características encontradas corresponden a las de un virus hemaglutinante de la familia *Paramyxoviridae* y del género rubulavirus, como es reportada Murphy *et al* (1995). Un aspecto importante a considerar fue el obtener el virus necesario para la realización de todos los experimentos y sobre todo que este fuera de bajo pasaje en cultivo celular, debido a que este virus se atenúa fácilmente al colocarlo en cultivo celular y la reproducción de los signos clínicos resulta más difícil conforme el virus se va adaptando al cultivo^{70,71,72}. Por lo que para este trabajo el virus obtenido fue de tercer pase en cultivo celular.

Este virus se ha caracterizado por afectar a cerdos de diferentes edades. Provoca diversas manifestaciones de la enfermedad dependiendo de la edad de los animales. Estas manifestaciones pueden ser problemas nerviosos, respiratorios y reproductivos. Con respecto a los problemas reproductivos en machos se presentan granulomas en epidídimo, orquitis, atrofia testicular y un deterioro en la calidad espermática^{1,7,23,24}. El mayor problema ocasionado por la presencia de estos animales dentro de la granja es la generación de severas lesiones en epidídimo y testículo, alterando la calidad del semen sin que se observen modificaciones en la libido de los animales²⁵.

El cerdo es la única especie donde se ha reportado la enfermedad, ya que otras especies, incluyendo el humano no enferman, sin embargo, se han podido identificar anticuerpos al ser inoculados experimentalmente gatos, ratas, conejos y pecari de collar⁷³.

En este estudio se infectaron 5 cerdos adultos provenientes de una granja ubicada en el Estado de México, sin antecedentes previos de haber padecido la enfermedad del ojo azul. Se efectuaron diferentes pruebas para determinar que los animales se encontraran libres de anticuerpos contra ojo azul (Inhibición de la hemaglutinación³¹), enfermedad de Aujeszky (ELISA GI negativa¹⁴), PRRS (ELISA¹⁵), parvovirus porcino (Inhibición de la hemaglutinación^{50,52}) y fiebre porcina clásica (Inmunoperoxidasa¹⁶).

En la Etapa I se demostró el reconocimiento del Rp hacia ciertas subpoblaciones celulares de sangre periférica de cerdos adultos; así mismo, se realizaron una serie de muestreos para determinar los valores normales de algunas subpoblaciones en cerdos adultos. Se determinaron los valores basales de las subpoblaciones de monocitos, linfocitos T CD4+, CD8+, CD3, CD4+CD8+ y de las células B.

En el caso de los monocitos se observó que el valor promedio para dicha determinación fue de 75.13%. El comportamiento de los valores de los linfocitos T CD4+ de todos los animales fue muy similar obteniéndose un valor promedio de 24.08%. En el estudio realizado por Hernández y col¹³, el valor basal promedio reportado fue del 25%, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio a pesar que los animales con los que se trabajó para este experimento eran de mayor edad con respecto a los utilizados por Hernández, lo cual nos indica que no existe diferencia en la expresión de linfocitos T CD4+ en animales jóvenes (6 meses) con respecto a cerdos de más de un año de edad. El valor promedio basal de los linfocitos T CD8+ obtenido fue de 53.21%. En el estudio realizado por Hernández LJ (1997), si se encontró una diferencia significativa con respecto a este estudio en la población identificada como Linfocito T CD8+, ya que el reporta solo 16%

¹⁴ Bommeli.

¹⁵ IDEXX.

¹⁶ Pronabive.

contra el 53.21% encontrado en este. Esto puede ser debido a la diferencia de edades de ambos grupos de animales. En cuanto a los linfocitos T CD4+CD8+, en general se obtuvo un valor basal promedio similar para todos los animales (11.69%). En el estudio realizado por Hernández LJ (1997) encontró un porcentaje del 7% para esta subpoblación, lo que puede estar influenciado por la edad del animal, ya que al tratarse de células de memoria, estas van aumentando a medida que aumenta la edad de los animales. Para los linfocitos CD3 se obtuvo un valor promedio de 69.59%. Se obtuvo un valor promedio de células B de 5.98%. En cuanto a porcentajes de subpoblaciones de cerdos control Pauly *et al* (1998) encontraron 35% de Linfocitos T CD4+, 22% de linfocitos T CD8+, 7% de Linfocitos T CD4+CD8+, además de un 36% de linfocitos T CD4-CD8-. En comparación con este estudio se encontró que prácticamente no existe diferencia en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, mientras que para los linfocitos T CD8+ existe aproximadamente un 50% más de esta subpoblación en los cerdos de este estudio. En cuanto a la población de los linfocitos dobles positivos se encontraron también valores más altos en los animales de este estudio. Estas diferencias podrían estar asociadas a la diferencia de edades que existe entre ambos grupos de animales en experimentación, ya que Pauly *et al* utilizaron animales de 2-3 meses de edad y en este estudio se trabajó con verracos adultos de más de 1 año de edad, y por lo menos en la subpoblación de linfocitos dobles positivo existen varios reportes donde mencionan el aumento de los valores conforme aumenta la edad del animal, por tratarse de células de memoria⁶¹.

Al evaluar la susceptibilidad de las subpoblaciones al Rp en el tiempo 0, se encontró que en monocitos la identificación del Rp fue significativa en la población de células infectadas, comparado con el grupo control sin infectar, ya que fue reconocido en el 33.17% de la población total de monocitos (75.13%). En los linfocitos T CD4+ se identificó al Rp en el 5.4% del total de las células marcadas como CD4+ (24.08%). En los linfocitos T CD8+ se obtuvo también una alta identificación del Rp (30.49%) del total de células identificadas como CD8+ (53.2%). En un estudio realizado por Hernández LJ (1997) encontró que se presentaban diferencias en el reconocimiento del Rp en las subpoblaciones que analizó. En orden decreciente encontró: monocitos (43%), Células B

(30%), Linfocitos T CD8+ (21%), Linfocitos T CD4+ (17%) y en Linfocitos CD2 (19%). En este estudio en orden decreciente en que se identificó el Rp en las diferentes subpoblaciones fue: monocitos (33.17%), linfocitos T CD8+ (30.49%) y finalmente en los linfocitos T CD4+ (5.4%). En general para las 3 subpoblaciones se identificó en menor porcentaje la presencia del Rp comparado con el estudio de Hernández LJ (1997).

En el estudio realizado en las subpoblaciones que fueron infectadas y cultivadas durante 24 horas se encontró que en los monocitos la identificación del Rp fue menor que en el tiempo 0, sin embargo la inespecificidad presentada en el grupo de células sin infectar fue alta (3.09%) comparado con el reconocimiento del Rp en las células que fueron infectadas (7.74%) con lo que no se obtiene una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el grupo control y el grupo de células infectadas. En los linfocitos T CD4+ a pesar de que el reconocimiento fue bajo (4.84%) y la inespecificidad alta (1.80%), existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo de células infectadas. A las 24 horas se identificó un 89.59% de linfocitos T CD8+, en los cuales se identificó al Rp en el 17.78% de las células. La inespecificidad que se encontró fue baja (0.74%). Por lo que en esta subpoblación también se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de células infectadas y el grupo que no lo fue. Hernández LJ (1997) realizó un estudio similar identificando el virus en células adherentes (monocitos) y no adherentes (linfocitos) incubadas durante 118 horas, tomando sobrenadantes para aglutinar con eritrocitos de bovino al 0.5% cada 24 hrs. En las células adherentes encontró que a partir de 48 horas se presentaba aglutinación, a las 72 horas se observaban sincitios y lisis celular, para finalmente a las 118 horas la viabilidad de las células disminuía al 50%. En el caso de las células no adherentes no se observó actividad aglutinante, sin embargo, la viabilidad de las células a las 24 horas disminuyó al 20%. En el caso de este experimento se observó en la lectura realizada a las células que fueron infectadas e incubadas durante 24 horas que la población de monocitos (adherentes) disminuía de manera significativa la identificación del Rp lo cual puede estar relacionado con las conclusiones obtenidas del estudio realizado por Hernández LJ (1997) donde demuestra que el virus es capaz de multiplicarse y dañar a las células adherentes por lo que

este bajo porcentaje de reconocimiento puede ser debido al proceso de infección que se está dando en el interior de la célula por lo que el virus en ese tiempo no puede ser identificado. También en el caso de otras enfermedades virales se ha observado que los monocitos resultan ser un sitio importante para la multiplicación viral^{74,75,76}. En el caso de las células no adherentes (linfocitos T CD4+ y CD8+) se observa en general un reconocimiento más bajo (2.56% y 13.36% respectivamente) que la lectura realizada en las células que fueron infectadas pero que no se incubaron 24 horas.

En el caso de los linfocitos T CD4+ permanecieron con niveles bajos de reconocimiento y poca variación con respecto a las lecturas realizadas al tiempo 0 y con 24 horas de incubación (5.4% y 3.03% respectivamente). En los linfocitos T CD8+ disminuyó un 13.36% el reconocimiento lo cual puede deberse a que el virus no puede multiplicarse en estas subpoblaciones, como lo demuestra también el estudio realizado por Hernández LJ (1997), por lo que la viabilidad del virus va disminuyendo conforme pasa el tiempo. En el trabajo realizado por Chinsakchai y Molitor (1992) donde evaluaron el efecto inmudepresivo y la replicación del virus de la enfermedad de Aujeszky *in vitro* encontraron también que el virus es capaz de replicarse en monocitos y linfocitos provenientes de sangre periférica de cerdos de 1-4 meses de edad. De hecho, también existe un mayor reconocimiento del virus en monocitos que en linfocitos como ocurre con el Rp. La infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky provoca daño y muerte de monocitos, no afectando la viabilidad de los linfocitos. En este caso el virus de Aujeszky suprime las funciones de los linfocitos, como es la proliferación y la síntesis de IL-2.

En la determinación de infección en las subpoblaciones infectadas con el Rp en el tiempo 0 y con 24 horas de incubación en términos generales se presentó una menor identificación de este a las 24 horas y el grado de inespecificidad de la prueba aumentó. En cuanto al reconocimiento del Rp, éste fue mayor en los monocitos cuando la lectura se realizó en el tiempo 0. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas durante 24 horas el mayor reconocimiento fue en los linfocitos T CD8+. Al efectuar las diferencias en las lecturas entre el tiempo 0 y 24 horas después, la mayor diferencia la tuvieron los monocitos

(28.51%) y la menor se presentó en los linfocitos T CD4+. Cabe señalar que en los linfocitos T CD4+ se presentó la menor identificación del Rp en ambas lecturas, lo que indica una baja afinidad del virus por este tipo de subpoblación.

Es posible que el Rp al reconocer e infectar algunas subpoblaciones celulares (en orden decreciente: monocitos, linfocitos T CD8+ y CD4+) estas puedan tener un papel importante para la distribución del virus hacia los órganos blanco de infección.

Algunas infecciones virales inducen supresión del sistema inmune del huésped, lo cual es demostrado por la inhabilidad de los linfocitos aislados de animales infectados a responder a antígenos específicos y no específicos *in vitro*^{13,25,46}. En el caso de infecciones *in vitro* de linfocitos T con el virus de fiebre porcina clásica no se altera la respuesta proliferativa a mitógenos o a estímulos aloantigénicos⁴⁶. En estudios *in vitro* se demostró que el virus de la enfermedad de Aujeszky es capaz de replicarse y causar desordenes funcionales en macrófagos alveolares porcinos^{77,78,79}. Concluyendo que también los macrófagos son altamente susceptibles a la infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky. También en el caso de la enfermedad de Aujeszky, Chinsakchai y Molitor (1992) obtuvieron un mayor título de virus en monocitos que en los linfocitos. La infección del virus de la enfermedad de Aujeszky en monocitos es seguida por una dramática reducción en la viabilidad celular. Todas las células infectadas con el virus murieron a las 72 horas. Al verse dañados los monocitos, también se altera la síntesis de IL-2 y la interacción célula-célula necesaria para la proliferación de los linfocitos.

En Etapa II se identificó al Rp en algunas subpoblaciones de sangre periférica de cerdos adultos infectados por vía oronasal con 5 ml del virus. Para la identificación se tomaron muestras de sangre periférica de los cerdos infectados desde el día 0 hasta el 18 postinfección.

Al realizar la identificación del Rp en las poblaciones celulares analizadas (monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+) en los animales desafiados con el virus se encontró

que en la única subpoblación donde se encontraron niveles significativos ($p < 0.05$) del Rp fue en los monocitos, principalmente en los días 2, 16 y 18. En el caso de la enfermedad de Aujeszky los monocitos son un sitio importante para la replicación del virus, como lo reporta Chinsakchai y Molitor (1994). En cuanto a la identificación del Rp en los linfocitos T CD8+ el nivel significativo ($p < 0.05$) más alto correspondió al día 18 (3.26%). En el estudio realizado por Hernández LJ (1997) también reporta que los monocitos son reconocidos preferentemente por el Rp.

En forma general la identificación del Rp en las células incubadas durante 24 horas fue mayor a la obtenida en la lectura realizada en el día de la toma de muestra. Esto nos indica que el virus es capaz de replicarse en estas subpoblaciones y es por eso que la identificación es mayor una vez que las células son incubadas durante 24 horas. En los monocitos fue en donde se logró identificar un mayor número de células con presencia del Rp, principalmente los días 2, 7 y 9. En los linfocitos T CD4+ en el segundo día fue cuando se identificó al Rp en un mayor porcentaje de células. Mientras que en los linfocitos T CD8+ los valores fueron muy similares en todos los días de la toma de muestras.

Con estos resultados se comprueba que el Rp es capaz de replicarse principalmente en monocitos ya que la identificación de éste en las células que se incubaron durante 24 horas fue mayor a la lectura realizada el día de la toma de muestra. Para los monocitos y los linfocitos T CD4+ el día donde se identificó en una mayor proporción el Rp corresponde al segundo día pi. En animales infectados con fiebre porcina clásica se detectó antígeno viral en subpoblaciones celulares (CD1, CD2, CD4, CD8 y monocitos) de cerdos de 2 y 3 meses de edad infectados con una dosis letal del virus⁴⁶. Para el marcaje de las subpoblaciones y el virus se utilizaron anticuerpos monoclonales y las lecturas las realizaron por citometría de flujo. En contraste con lo que ocurre con el Rp donde se presenta un mayor reconocimiento del virus en subpoblaciones de monocitos en las células marcadas el día de la toma de muestra y en aquellas que fueron incubadas durante 24 horas. Mientras que para los linfocitos T CD4+ se presenta un reconocimiento muy leve del virus, pero sólo cuando las células son incubadas durante 24 horas. En este mismo estudio Pauly T *et al* (1998)

volvió a detectar la presencia del virus intracelular en linfocitos en los últimos estadios de la enfermedad, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo, ya que nuevamente en el día 18 pi el porcentaje de reconocimiento del Rp vuelve a ser significativo con respecto a los días previos. La identificación del virus de fiebre porcina clásica en las diversas poblaciones analizadas fue hasta el día 50 pi, sin que se presentara ninguna predilección por alguna subpoblación. En este mismo estudio de fiebre porcina clásica se encontró que en los días 10-14 pi se presentó una leucopenia general, síntoma temprano de cerdos infectados, afectando incluso el comportamiento de los linfocitos T, ya que se presenta una respuesta deficiente de estas células⁴⁶.

El virus de la enfermedad de Aujeszky provoca un efecto inmunodepresivo en células mononucleares de sangre periférica⁶⁴. Este efecto explica la predisposición de los cerdos infectados a infecciones secundarias^{80,81} y soporta la hipótesis de que también el virus puede diseminarse en forma sistémica a través de CMN infectadas en sangre y linfa, lo que también pudiera estar ocurriendo con el Rp. En este mismo estudio, Chinsakchai y Molitor (1992) detectaron el virus en CMN de sangre periférica de cerdos infectados y este se pudo replicar en cultivos de CMN de sangre periférica. La detección del virus a partir de CMN de sangre periférica fue inconsistente y varió dependiendo del animal, el día postinfección, el método de detección y el número de células blancas usadas en el ensayo. Donaldson *et al* (1983) fueron capaces también de aislar el virus a partir de CMN en sólo 3 de 10 cerdos que fueron infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky en el día 5 pi.

En la Etapa III se reportó el efecto que tiene la infección del Rp en cerdos adultos en cuanto a modificaciones en los valores de algunas subpoblaciones celulares de sangre periférica, reproduciendo la enfermedad con los signos que son reportados por infecciones naturales así como en las experimentales^{22,25,83,84}.

En los monocitos se observa un aumento significativo los días 2 y 4 pi, de ahí los niveles bajan incluso con niveles menores a los valores basales, para posteriormente volver

a aumentar el día 14 pi y finalmente disminuir en los últimos días de evaluación. En el caso del estudio realizado por Hernández LJ (1997) al infectar al Rp en verracos, encontró que el comportamiento de esta subpoblación en los animales que desarrollaron granulomas y los que no fue similar, presentándose un aumento durante la primer semana, posteriormente estos valores disminuyen (hasta 55%), para finalmente a partir de la cuarta semana los valores regresan a sus rangos normales, lo cual concuerda con el estudio realizado por Ramírez MH (1988). Al comparar los experimentos, se presenta un comportamiento similar. En los linfocitos T CD4+ se observa una disminución aparente el día 2 pi, mientras que los días 4, 7, 9 y 11 muestran un comportamiento errático. Sin embargo, en los últimos días de la evaluación (14, 16 y 18) los valores se conservan altos. Hernández LJ (1997) encontró que se presenta una disminución en los valores de los linfocitos T CD4+ en el grupo de animales que desafió con el Rp hasta la tercer semana pi. Sin embargo, para la cuarta semana de infección los valores de los cerdos que no desarrollaron granulomas regresan a los niveles normales, mientras que los que tuvieron granulomas permanecieron bajos. En el estudio realizado por Ramírez MH (1988), al analizar subpoblaciones de linfocitos T CD4+ también observa una disminución en los valores de los animales infectados a partir de la tercera semana pi. En otro estudio realizado por Hernández LJ (2000) evalúa el comportamiento de los linfocitos T CD4+ en animales jóvenes infectados experimentalmente con el Rp. En este estudio reporta que los linfocitos T CD4+ participan activamente durante las primeras semanas de infección y que, a partir de esta subpoblación se generan los linfocitos T CD4+CD8+. Estos linfocitos dobles positivos participan en la respuesta de memoria del virus y ya no modifican su fenotipo ante estímulos subsecuentes ya sea con el mismo virus o con PHA. En estudios realizados evaluando la respuesta inmune contra fiebre porcina africana se encontró que se presenta una disminución de los linfocitos T CD4+ y aumentan los valores de los linfocitos T CD8+ en el caso de la infección aguda, sin embargo cuando la infección es crónica se observa un aumento en ambas poblaciones⁸⁶. Esta respuesta aguda en el caso de fiebre porcina africana se observa también en los animales que fueron infectados con el Rp. Page *et al* (1992) en un estudio realizado en cerdos infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky sugiere que la disminución en los valores de los linfocitos T CD4+ durante los primeros días de infección

podría deberse a la migración y agrupamiento de estas células en los órganos blanco, lo que también podría estarse presentando en los cerdos que se infectaron en este estudio con el Rp, ya que como se observa en los resultados presentados en los estudios de infección *in vivo* e *in vitro* (Etapa I y Etapa II) la identificación del Rp fue baja en esta subpoblación. Los linfocitos T CD8+ son un potente mediador para la eliminación de virus, sin embargo durante las infecciones crónicas se requiere la ayuda de los linfocitos T CD4+ para aumentar la actividad antiviral de los linfocitos T CD8+³⁹, lo que podría también explicar el aumento de los linfocitos T CD4+ al final de este estudio.

En los linfocitos T CD8+ los niveles encontrados en los días 2, 4, 7 y 9 pi aumentan con respecto a los valores basales, sin embargo los días 11, 14 y 16 los niveles se conservan similares al día 0, para nuevamente aumentar al día 18 pi. En el estudio de Hernández LJ (1997) el comportamiento de esta subpoblación fue similar al encontrado en este estudio, ya que los valores aumentan durante la primera semana, posteriormente disminuyen, para finalmente aumentar hasta en un 23% a partir de la cuarta semana pi. Ramírez MH (1988) también observó este comportamiento al analizar esta subpoblación en animales infectados con el Rp. En el caso del síndrome respiratorio y reproductivo (PRRS) que afecta al cerdo se ha reportado que cuando se produce la infección hay un incremento de los linfocitos T CD8+⁸⁸. Este aumento en los linfocitos T CD8+ sugiere que es importante la actividad citotóxica de esta subpoblación para el control de la enfermedad como sucede en otras enfermedades virales.

En los linfocitos T CD4+CD8+ se presenta un aumento el día 4 pi, sin embargo los niveles van disminuyendo los días subsecuentes (7, 9, 11, 14 y 16) para nuevamente aumentar significativamente el día 18 pi. Para esta subpoblación, en el estudio realizado por Hernández LJ (1997) se presenta un aumento gradual durante la primera y segunda semana pi, presentándose una disminución durante la tercera semana y finalmente los valores vuelven a aumentar. También Ramírez MH (1988) reporta el mismo comportamiento. Este comportamiento fue similar en los tres experimentos. La disminución encontrada en esa fase intermedia puede deberse a un secuestro de esta subpoblación en los órganos linfoides,

y finalmente el aumento identificado al término de los experimentos sea el reflejo de una mayor respuesta frente al Rp y en consecuencia un mayor control de la enfermedad. La identificación de estos linfocitos T dobles positivos en sangre periférica y tejidos sólo ha sido reportada en cerdos y es importante debido a que están relacionadas con la memoria inmunológica, ya que estas células expresan altos porcentajes de la integrina $\alpha 4\beta 1$ que en humanos está relacionada con la memoria inmunológica^{89,90,91}. Además, esta subpoblación de linfocitos es capaz de responder a estímulos antigénicos *in vitro*, después del contacto con virus, bacterias o parásitos sobre otras poblaciones celulares^{41,61,92}. Hernández LJ (1997) al realizar ensayos *in vitro* de estimulación de CMN de cerdos infectados con el Rp supone que estos linfocitos pueden estar jugando un papel importante en la respuesta secundaria frente al virus. Salmüller y Bryant (1994) también reportan que los valores de los linfocitos dobles positivos van aumentando en condiciones normales conforme aumenta la edad del animal.

Para los linfocitos CD3, en el estudio realizado por Hernández LJ (1997) analizó el efecto de la infección del Rp sobre los linfocitos CD2 de los animales que desarrollaron granulomas. A pesar que el CD2 es una molécula presente principalmente en los linfocitos T y en algunos linfocitos B, encontró que durante la primera y segunda semana pi los niveles aumentan un 40% y 16% respectivamente, con relación al grupo control. Para la tercer semana pi los niveles disminuyen (20%), para finalmente aumentar a partir de la cuarta semana (16%). En cuanto a los resultados de los animales que no desarrollaron granulomas, observó que durante la primera y segunda semana no se presentaron cambios aparentes en esta subpoblación, sin embargo para la tercera y cuarta semana el comportamiento es similar para ambos grupos. En este estudio se utilizó un marcador para CD3, el cuál solo está presente en los linfocitos T, sin embargo la tendencia es muy similar a la observada por Hernández en los animales que desarrollaron granulomas, ya que se presenta un aumento (14.24%) al día 2 pi y de ahí, a pesar de tener valores más altos que los basales, comienzan a disminuir hasta que a partir del día 7 los valores son más bajos que los basales, para finalmente en el día 18 pi se identificaron valores de CD3 de casi un 10% más que los valores reportados al inicio del experimento.

En las células B, nuevamente en el día 2 pi se presenta un aumento en los niveles encontrados en sangre periférica. Posteriormente estos niveles disminuyen, principalmente el día 7 pi para ir aumentando hasta llegar a los niveles más altos los días 16 y 18 pi. Mientras que Hernández LJ (1997) al analizar la subpoblación de células B encontró una tendencia irregular, pero en general decreciente en los cerdos que no desarrollaron granulomas; mientras que con los animales con granulomas durante la primera y segunda semana observó un aumento del 6 y 12% y para la tercera y cuarta semana pi se presentó una disminución del 30 y 45% respectivamente. En el estudio de Ramírez MH (1988) el comportamiento fue similar a lo reportado por Hernández (1997). En este caso los resultados encontrados para esta subpoblación en este experimento no concuerdan con los encontrados con Hernández y Ramírez, esto puede deberse a que el análisis de los resultados en este experimento fue realizado a todo el grupo de animales sin distinción del desarrollo o no de orquitis.

Stephano *et al* (1988) propone que la enfermedad se controla una vez que se ha eliminado el virus mediante la respuesta inmune celular, la cual sugiere que ocurre alrededor de la cuarta semana de infección. Sin embargo, también se debe tomar en cuenta la respuesta inmune humoral que está participando para la eliminación del proceso infeccioso, ya que a pesar que cada animal responde de manera diferente ante un mismo agente infeccioso, alrededor de la tercera semana pi generalmente en todos los animales se detectan títulos de anticuerpos. También Hernández LJ (1997) reporta que las tres primeras semanas de infección son críticas, ya que los animales con una pobre respuesta inmune celular durante este tiempo desarrollan granulomas en epididimo y atrofia testicular.

El estudio de la respuesta inmune de los animales hacia agentes infecciosos es importante, debido a que cuando el huésped no monta una respuesta inmune adecuada el virus implementa mecanismos de escape de la respuesta inmune protectora, lo que puede resultar en una infección persistente³⁹.

No necesariamente se presenta la misma respuesta de la célula T en los estados tempranos de la enfermedad que en los últimos, de ahí la importancia de analizar el tipo de

respuesta que se puede encontrar durante el estado agudo de la enfermedad y la encontrada en forma tardía³⁹. En el caso de fiebre porcina clásica se reporta una depleción selectiva de células T γ/δ CD4-CD8-, además de que durante los primeros días de infección no se encuentran cambios aparentes en los valores de linfocitos T. Los linfocitos T de sangre periférica solo son afectados en los estados terminales de la enfermedad (14-19 días pi en animales de 2-3 meses de edad). Un aspecto importante que encontraron en este estudio fue la anulación de la respuesta inmune celular tempranamente (3-5 días pi), así como la presencia de antígeno viral en estas células. Esta inmunodepresión temprana representa un evento crucial para la manifestación de fiebre porcina clásica⁹³. El virus de fiebre porcina clásica también se ha caracterizado por producir leucopenia, así como depleción de células B, esto debido a la infección del virus a leucocitos y a tejido linfoide. De hecho, existe un marcado tropismo del virus hacia los folículos de las células B durante el curso de la enfermedad. Los disturbios en la timopoyesis de los animales infectados evitan la regeneración de los compartimientos donde se localizan las células T inmunocompetentes, lo que explica la falla en la respuesta de los linfocitos T periféricos y la muerte de los animales. La leucopenia con la que cursan los animales afectados puede causar el vaciamiento de los linfocitos T inmunocompetentes. El virus de fiebre porcina clásica arma la respuesta inmune humoral de tal manera que impide a los animales afectados montar una efectiva respuesta inmune celular para combatir la infección, por lo que empeora la respuesta inmune y se aumenta la susceptibilidad de los animales a infecciones secundarias⁴⁶. Aunque en el análisis realizado en los animales infectados con el Rp no se alcanza a apreciar este efecto inmunodepresor, existen reportes que indican que cuando se presentan brotes de la enfermedad del ojo azul, también se ve favorecida la presentación de infecciones secundarias.

En la infección con virus de PRRS los niveles de CD2, CD8 e IgM se aumentan hasta 3 semanas después de la infección⁶⁸. La respuesta por la infección con el Rp no se ve tan afectada y la respuesta humoral y celular generada es suficiente para controlar completamente la enfermedad alrededor del día 21 pi.

Los resultados muestran, en forma general, una adecuada respuesta a la lectina por parte de todos los animales, principalmente en los cerdos 3 y 5 ya que presentaron una reacción aparente en 3 de sus 4 muestreos. En el caso de la respuesta al Rp el cerdo 4 es el que presenta una reacción aparente en los días 14 y 16, mientras que en los cerdos 1, 3 y 5 se observa una reacción moderada en forma más temprana (desde el día 7 pi), la cual se conserva durante las siguientes dos mediciones. Al correlacionar los resultados obtenidos de las intradermoreacciones con respecto al desarrollo o no de orquitis, se pudo observar que en el caso del cerdo que no desarrolló un aumento significativo en el tamaño testicular (cerdo 4), la reacción a la intradermoreaccion se presentó en forma más retardada, pero más aparente. Comparándola con la observada en el resto de los animales que desarrollaron un grado variable de orquitis, donde la respuesta a la intradermoreaccion fue en forma más temprana, pero menos intensa. En el caso de la infección con PRRS la reacción de hipersensibilidad retardada la respuesta a la fitohemaglutinina (PHA) fue significativamente disminuida una semana después de la infección, sin embargo la respuesta es restaurada poco tiempo después⁶⁸. En el caso de la infección de fiebre porcina clásica, también se observa una marcada disminución en el número de subpoblaciones de linfocitos T y una pobre respuesta a la PHA durante los primeros 5 días pi⁹³. Comparativamente con los resultados obtenidos cuando los animales son infectados con el Rp la respuesta no disminuye tanto, debido a que el virus no provoca una inmunodepresión tan marcada como en el caso de los virus de PRRS y FPC.

En cuanto a la signología que presentaron los animales posterior a la inoculación con el Rp, como es reportada por otros autores, pasa en forma desapercibida e incluso, cuando no se presenta una orquitis aparente los animales no sufren cambios en su comportamiento, conservando su libido, aunque sus características seminales se encuentren muy alteradas. En el trabajo realizado por Hernández LJ (1997) en el cual evaluó la respuesta inmune al Rp en cerdos de 6 meses de edad, encontró que la presentación de la signología clínica aparecía alrededor del día 3 pi, caracterizándose también por aumento de la temperatura, conjuntivitis, disminución en el consumo de alimento así como estornudos. Ramírez MH (1988) en el estudio realizado en verracos inoculados con el Rp, encontró

también que 5 de 10 animales infectados presentaron signos leves de la enfermedad durante el segundo y tercer día pi; después de la primera semana pi se presentó lagrimeo en todos los animales. Al igual que en este estudio los signos observados pasaron desapercibidos ya que no fueron muy aparentes y desaparecieron rápidamente.

Se observó aumento aparente en las dimensiones testiculares en 4 de los 5 cerdos. En general la medición que más sufrió cambios fue en la longitud testicular, siendo menos aparentes los cambios en el diámetro testicular. En los cerdos más afectados (2 y 3) el aumento testicular fue bilateral. Mientras que en los cerdos 1 y 5 los cambios más aparentes sólo fueron unilaterales (testículo derecho para ambos animales). En el estudio de Hernández LJ (1997) se observó el desarrollo de orquitis en sus animales de experimentación alrededor de la segunda y tercera semana pi en 3 de los 7 cerdos que utilizó en su estudio, presentándose posteriormente la atrofia testicular a partir de la cuarta semana. Estos datos coinciden con los encontrados en este estudio, donde no todos los animales que son desafiados experimentalmente o infectados en forma natural desarrollan alteraciones evidentes en testículo, sin embargo, histológicamente Hernández encontró alteraciones en testículo y epidídimo en todos los animales. Las alteraciones consistieron en vacuolización y destrucción de las células germinales, aumento de las células de Leydig, infiltrado de células mononucleares y lesiones granulomatosas en el tejido intersticial en testículo; además, en epidídimo se observaron granulomas localizados principalmente en la cabeza, caracterizados por un infiltrado de células mononucleares, con bordes delimitados por macrófagos y en el centro la presencia de células gigantes multinucleadas, células necróticas y espermatozoides, además se localizaron algunos espermatozoides en el tejido intersticial que separa los conductos epididimarios. En el estudio realizado por Ramírez MH (1988) donde se trabajó con 10 animales de 9 meses de edad inoculados experimentalmente con el Rp, se encontró también que no todos los animales que fueron infectados experimentalmente desarrollaron orquitis durante los primeros 15 días de infección, identificando la presencia de anomalías espermáticas a partir del día 21 pi. La atrofia testicular la observó en solo 2 animales hasta el día 30 y 80 pi. El aumento del tamaño testicular a los 15 días pi correspondió a una edematización del tejido escrotal,

mientras que el que observó después de los 30 días de infección correspondió a los granulomas que se generaron en el epidídimo. Finalmente, los animales que terminaron el estudio con un tamaño testicular inferior a la medición original se presentó atrofia testicular. La diferencia en el tamaño testicular permite en la práctica que el animal se pueda identificar y desechar si es necesario. Sin embargo, existe la posibilidad de que los animales infectados puedan tener una apariencia sana, con una libido normal, pero con eyaculados con pocos espermatozoides, con ausencia de estos o bien con espermatozoides con daño acrosomal e incluso que estén transmitiendo el virus a través del semen^{25,84,94}.

Por medio de estas observaciones se pone de manifiesto que cada verraco desarrolla diferentes grados de afección en testículo, ya que en algunos de estos animales la orquitis generada es más aparente (cerdos 2 y 3) con respecto al resto de los animales que fueron desafiados con el mismo virus y vía de infección, además de que estuvieron bajo las mismas condiciones de manejo. Lo que también se ha puesto de manifiesto en estudios experimentales como en infecciones de campo, donde no todos los animales infectados desarrolla una orquitis aparente^{13,22,23,224,25,84,94}.

Al realizar el aislamiento e inmunofluorescencia de las muestras de suero y CMN de sangre periférica de los animales inoculados experimentalmente con el Rp se logró identificar al virus desde el día 2 pi a partir del suero y CMN del cerdo 2. La identificación del Rp se logró hasta el día 11 pi a partir de 2 animales (1 y 2), pero solo a partir de suero por medio del aislamiento en células, sin embargo por la prueba de IF solo se identificó al Rp a partir del suero del cerdo 2. En general la identificación del Rp fue mayor a partir de suero que de las CMN. Además se demostró nuevamente que es más sensible la prueba de IF que el aislamiento viral ya que los títulos encontrados fueron más altos en las muestras por medio de la prueba de IF que por aislamiento en cultivo celular⁹⁴.

En cerdos adultos infectados experimentalmente se ha podido aislar el Rp a partir de semen, epidídimo, testículos y glándulas bulbouretrales^{13,25}. Sin embargo, no se había intentado realizar el aislamiento del Rp a partir de CMN o suero de animales infectados

experimentalmente. Estudios realizados por Reyes *et al* (1993) demuestran la afinidad del Rp hacia moléculas ricas en ácido siálico, siendo el oligosacárido sialila 2-3 lactosa determinante para que se lleve a cabo la infección. Estos mismos autores han identificado la presencia del sialila 2-3 lactosa en diferentes tejidos de cerdos sanos, sobre todo en el sistema nervioso central en animales neonatos, de ahí el tropismo del virus hacia este órgano provocando la signología nerviosa en animales de esa edad. En cerdos adultos, la expresión de este oligosacárido disminuye en sistema nervioso central y aumenta considerablemente su expresión en testículo y epidídimo. Ramírez MH (1988) pudo realizar el aislamiento del Rp de varios de los órganos de los cerdos que infectó durante los primeros 5 días pi, sin embargo en los animales que tuvieron más días de infección, el aislamiento fue más difícil. En un estudio realizado por Allan *et al* (1996) donde inocularon el Rp por vía intranasal a lechones de 3 y 17 días de edad, el virus solo se pudo recuperar de mucosa nasal, tráquea, mucosa bronquial y pulmón, ya que el experimento duró solo 8 días.

Los resultados aquí presentados, junto con los obtenidos por Reyes LJ (1993) apoyan la teoría de que el virus migra en el organismo del animal por vía sanguínea y posteriormente la hemaglutinina del virus reconoce específicamente residuos sacarídicos (sialil-lactosa) en el tejido a infectar.

En el caso de la encefalomiocarditis en cerdos al ser inoculados experimentalmente Foni *et al* (1993) lograron aislar el virus a partir de leucocitos e hisopos nasales hasta el cuarto día pi. El aislamiento lo lograron en 5 de 10 animales inoculados, cuatro en el día 2 pi y uno en el día 4 pi. También el virus fue aislado a partir de cerebro y bazo hasta el día 7 pi. Con este estudio ellos concluyen que el virus se disemina a los órganos blancos por vía linfo-hemática. Lo que coincide con este estudio ya que sólo durante los primeros días de infección se logró identificar al Rp a partir de CMN y suero de los animales infectados. En el caso del virus de encefalitis hemaglutinante no se ha logrado aislar el virus a partir de sangre, en este caso se ha propuesto la migración del virus a través del sistema nervioso central para llegar a los órganos blanco⁹⁶.

Las pruebas desarrolladas para la identificación de anticuerpos contra el Rp han sido una herramienta para evaluar el estado sanitario de las granjas y para realizar estudios epizootológicos de la enfermedad en el país. Una de las pruebas más utilizada para la identificación de anticuerpos contra esta enfermedad es la inhibición de la hemaglutinación, la cual resulta rápida, económica, sensible y específica^{31,97}. Con esta prueba se lograron identificar niveles de anticuerpos a partir del día 7 pi con un título de 1:32. Para el día 9 pi 3 de los animales presentaban títulos de anticuerpos (1:32 promedio). Sin embargo, los cerdos identificados como 2 y 3, correspondientes a los cerdos que desarrollaron una orquitis más evidente, los títulos de anticuerpos se identificaron en forma más tardía (a partir del día 16 pi) con niveles bajos (1:16), mientras que en el resto de los animales los títulos fueron aumentando hasta llegar a niveles promedio de 1:64. En el caso del estudio realizado por Hernández LJ (1997) se encontró que los animales que desarrollaron granulomas también desarrollaron los títulos de anticuerpos más altos, mientras que los que no presentaron una lesión aparente desarrollaron bajos niveles de anticuerpos. Este efecto diferente entre ambos estudios puede ser debido a la edad de los animales, a la diferencia en los tiempos de toma de las muestras y a la duración de ambos experimentos, ya que mientras que en este estudio se evaluó la respuesta temprana a la infección con el Rp en el estudio de Hernández las evaluaciones fueron semanales y el estudio duró 7 semanas. En el caso del estudio realizado por Ramírez MH (1988) se detectó la presencia de anticuerpos hasta el día 10 y 13 pi, en el Grupo 1 y 2 respectivamente, con títulos bajos a través de la prueba de inhibición de la hemaglutinación y virus sueronutralización. Mientras que los títulos más elevados los identificó en la tercera y cuarta semana de infección, lo que coincidió con la formación del granuloma.

La respuesta contra el Rp va dirigida principalmente contra la proteína HN, la cuál se considera como inmunodominante^{13, 25}. La respuesta al virus de parainfluenza 3 también va dirigida contra la proteína HN desde el primer contacto y en las reinfecciones. En este caso, el nivel de anticuerpos séricos se correlaciona con el nivel de protección contra la infección⁹⁸.

Observaciones clínicas realizadas en granjas indican que la enfermedad es autolimitante²¹, ya que después de algún tiempo desaparecen los signos clínicos y es posible detectar anticuerpos contra el virus en los animales que se conservaron en la granja. De ahí la importancia de conocer los mecanismos que tienen los animales para el control de la enfermedad, ya sea a través de la inmunidad humoral o celular. En los cerdos afectados se observó inmunodepresión durante la primera semana, incluyendo la identificación del Rp en subpoblaciones, principalmente en monocitos durante la fase inicial de la infección. En casos de campo²² se ha descrito la susceptibilidad de los cerdos infectados con el Rp a infecciones secundarias. Un comportamiento similar se ha observado con el virus de las paperas, el cual pertenece a la misma familia del Rp⁹⁹.

CONCLUSIONES

1. Se lograron reproducir los signos clínicos característicos de la enfermedad del ojo azul producida por el rubulavirus porcino en 5 verracos adultos inoculados en forma intranasal. Los signos consistieron en fiebre, conjuntivitis así como el desarrollo de orquitis en 4 de los 5 cerdos inoculados experimentalmente.
2. La especificidad del rubulavirus porcino *in vitro* es en forma decreciente hacia monocitos, linfocitos T CD8+ y en menor proporción hacia los linfocitos T CD4+. Al cultivar las células durante 24 horas el rubulavirus porcino fue capaz de infectar, en forma decreciente, a los linfocitos T CD8+, monocitos y linfocitos T CD4+. Lo que indica la predilección del rubulavirus porcino hacia los linfocitos T CD8+, tanto para diseminarse por el organismo, como para replicarse.
3. La mayor susceptibilidad de las células mononucleares de sangre periférica infectadas *in vitro* con el rubulavirus porcino fue en el tiempo 0.
4. El rubulavirus porcino pudo ser detectado en monocitos de sangre periférica de los cerdos infectados al momento de ser colectadas las muestras los días 2, 16 y 18 pi. Este reconocimiento se incrementó cuando las células fueron cultivadas durante 24 horas los días 2, 7 y 9 postinfección. La mayor detección del rubulavirus porcino en los linfocitos T CD4+ fue el día 14 pi y el día 18 pi para los linfocitos T CD8+.

5. La mayor identificación del Rp en la segunda etapa del experimento, en las células mononucleares de sangre periférica proveniente de animales infectados que fueron incubadas durante 24 horas, fue el día 2 pi en todas las subpoblaciones analizadas.
6. En la tercera etapa del experimento se puede concluir que con respecto a las subpoblaciones analizadas las mayores variaciones ocurren en los primeros días de la infección (días 2 y 4 pi) y al final de este (día 18 pi).
7. Durante los primeros días de infección hubo un aumento en el porcentaje de monocitos y linfocitos T CD3, así como una disminución de los linfocitos T CD4+.
8. Durante la fase inicial de la infección los animales respondieron a la prueba intradérmica con la lectina (PHA). En el cerdo 1, que fue el animal que desarrolló el menor cambio testicular y el cerdo 4 que presentó un aumento moderado del tamaño testicular, fueron los animales donde se detectó una pobre respuesta a la lectina. En cuanto a la reacción de la intradermoreaccion en el sitio de aplicación del Rp se observó que el cerdo 3, que fue uno de los animales donde se desarrolló el mayor grado de orquitis, presentó después de la primer semana pi una reacción moderada a la intradermoreaccion. Mientras que los animales que desarrollan una orquitis leve presentan una reacción mas aparente a partir de la segunda semana pi. Lo que indica que a menor grado de respuesta a través de la prueba de intradermoreaccion, se espera que se desarrolle un menor grado de orquitis.
9. Se pudo aislar el rubulavirus porcino a partir de suero y células mononucleares de sangre periférica de los animales durante los primeros días de infección.

10. El mayor número de aislamientos del rubulavirus porcino a partir de células mononucleares de sangre periférica y suero fue el día 4 pi, alcanzándose también los títulos más altos.
11. Los cerdos inoculados con el rubulavirus porcino desarrollaron una respuesta de hipersensibilidad retardada cuando se inocula intradermicamente el Rp, además de una respuesta de anticuerpos, determinado por la prueba de inhibición de la hemaglutinación, a partir del día 7 postinfección.
12. En el caso de los cerdos que desarrollaron una orquitis más evidente los títulos de anticuerpos se presentan en una forma más tardía (día 16 pi).
13. Con relación a la orquitis desarrollada y la respuesta inmune generada en los animales posterior a la inoculación con el rubulavirus porcino se concluye que en general el comportamiento de la respuesta tuvo la misma tendencia en los tres grupos de animales formados: un cerdo sin orquitis (cerdo 4), dos con orquitis poco aparente (cerdos 1 y 5) y 2 con orquitis aparente (cerdos 2 y 3). Se identificó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células B, así como una disminución en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD8+ y de monocitos. Por lo que para poder establecer diferencias más precisas en cuanto a posibles variaciones en las subpoblaciones celulares entre los cerdos que desarrollan orquitis y los que no, es necesario contar con un mayor número de animales.

REFERENCIAS

1. Stephano HA. Aspectos generales de las enfermedades del sistema nervioso central de los cerdos. *Porcirama*. 1984;9(100):61-75.
2. Correa GP, Martínez LA, Ericson A, Moreno LJ. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress; 1986; Barcelona, España. España (Madrid): International Pig Veterinary Society Congress, 1986: 205.*
3. Stephano HA. El síndrome de ojo azul y la investigación. *Síntesis Porcina*. 1986;5(12):14-24.
4. Rosales EF, Correa GP. El síndrome del ojo azul. *Téc Pec Méx*. 1989;27(3):101-116.
5. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. CENID-Microbiología. Martínez LA, Correa GP, Colinas TA. Síndrome del ojo azul producido por el paramixovirus porcino. México (DF): SARH.
6. Stephano HA, Gay GM. Síndrome del ojo azul en cerdos. *Memorias de la reunión sobre Avances en Enfermedades del cerdo; 1985; D. F. México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1985: 299-311.*
7. Stephano A. Blue eye disease. In: Mengeling editors. *Swine Diseases*. Ames, Iowa U. S. A. Iowa State University Press, 1994: 237-241.
8. Socci L, Diosdado DF, Morilla GA. Frecuencia de granjas infectadas con el paramixovirus de la enfermedad de ojo azul (EOA) . *Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 52.*
9. Kingsbury DW. Paramyxoviridae and their replication. In: Fields NB, Knipe DM, Howley MP, Chanock MR, Melnick LJ, Monath PT, Roizman B, Straus ES, editors. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven, 1990:945-962.

10. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DH, Gavhrial SA, Jarvis A, Martell WG, Mayo MA, Summers MD. Virus Taxomony. Clasifcation and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committlee on taxonomy of virus. Viena-Nueva York: Springer-Verlag. Eds, 1995.
11. Sunqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linne T, Moreno-López J. The structural proteins of porcine paramixovirus (LPMV). J. Gen. Virol. 1990, 71:609-613.
12. Stephano HA y Gay GM. Síndrome de ojo azul en cerdos I. Síntesis Porcina 1985; 4(5):9-14.
13. Hernández LJ. Estudio de la respuesta inmune celular y humoral en cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus porcino (tesis de maestría). Distrito Federal (México) México. Univ. Nal. Autónoma de México, 1997.
14. Moreno LJ, Girón-Correa P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramixovirus isolated from brain of a piglet in México. Arch. Virol. 1986, 91:221-231.
15. Reyes-Leyva J, Hernández-Jauregui P, Montañó L, Zenteno E. The porcine paramixovirus LPM specifically recognize sialyl (α 2,3) lactosa containing structures. Arch Virol. 1993, 133:195-200.
16. Reyes LJ, Hernández JP, Montañó L, Zenteno E. The porcine paramixovirus LPM specificalli recognize sialyl (α 2,3) lactosa-containing structures. Arch. Virol. 1988;133:195-200.
17. Reyes LJ. Caracterización de receptores celulares del paramixovirus porcino LPM (tesis de maestría) Distrito Federal (México) México. Univ. Nal. Autónoma de México, 1993.
18. Stephano A, Gay M, Ramírez C y Maqueda J. Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias de la XVII Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialista en Cerdos; 1981 agosto 17-19; Ixtapa Zihuatanejo (Jalisco) México. México (DF): AMVEC, 1981: 97.
19. Stephano A. Gay M. El síndrome del ojo azul, estudio experimental. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 1983, México, D. F. México (DF), Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 1983: 523-526.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

20. Allan GM, McNeilly, Walker I, Linne T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy, Carrol BP, Herrón B, Foster JC, Adair B. A sequential study of experimental porcine paramixovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Invest.* 1996, 8:405-413.
21. Stephano HA, Doporto JM y Gay GM. Estudio epidemiológico en 2 granjas engordadoras. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress; 1986; Barcelona, España. España (Madrid): International Pig Veterinary Society Congress, 1986: 456.*
22. Stephano A, Gay M, Ramírez C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (Blue eye) in pigs, associate with a paramixovirus infection. *Vet. Rec.* 1988, 122:6-10.
23. Stephano A, Hernández D, Pérez C, González T, Ramírez H, Cervantes A. Boar infertility and testicular atrophy associated with Blue eye paramixovirus infection. *Proceedings 11th Congress International Pig Veterinary Society, 1990, Lausane, Suiza . Suiza. Internatinal Pig Veterinary Society, 1990: 99.*
24. Campos H, Carbajal F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *XXVI Reunión de al Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Manzanillo, Colima. México (DF). Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos . 1991:62-64.*
25. Ramírez MH. Fisiopatología del paramixovirus de ojo azul a nivel testicular. Tesis de Doctorado. México DF. UNAM. 1988.
26. Pallares CR, Martínez LA, Correa PA y Coba AM. Perfil de anticuerpos IH y SN en lechones inoculados con diferentes dosis del paramixovirus porcino (PMVP). *Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 57.*

27. Pallares CR, Fajardo MR, Martínez LA, Correa GP y Coba AM. Histopatología de diferentes tejidos de lechones inoculados con tres diferentes dosis del paramixovirus porcino (PMVP). Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 58.
28. Valdivia AG y Alvarado MM. Obtención de anticuerpos contra el paramixovirus porcino en huevo de gallinas. Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 51.
29. Stephano HA y Gay GM. Síndrome de ojo azul en cerdos II. Síntesis Porcina 1985; 4(5):42-49.
30. Stephano HA y Gay GM. Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la cornea en cerdos (síndrome del ojo azul) asociados a un paramixovirus. Med Vet 1986; 3(7-8):359-362.
31. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ y Doportó DJ. Hemagglutination and hemagglutination inhibition for blue eye disease through modification of some variables of the test. Proceedings of 14th International Pig Veterinary Society Congress; 1996; Bologna (Italy). Italy (Rome): International Pig Veterinary Society Congress, 1996:128.
32. Cuevas RS, De Paz VO, Colmenares GR. Resultados preliminares del kit de diagnóstico de ELISA para la detección de anticuerpos contra paramixovirus porcino. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Jalisco 1993; 1993 septiembre 27-30; Guadalajara (Jalisco)México. México (DF): Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 1993:275.

33. Martínez LA, Pallares CR, Correa GP y Coba AM. Determinación de la dosis del Paramixovirus porcino que muestre una letalidad del 80% al 100% en lechones. Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 54.
34. Martínez LA, Pallares CR, Coba AM y Correa GP. Protección calostrual conferida a lechones de cerdas vacunadas con una vacuna inactivada contra la enfermedad del ojo azul (EOA). Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 55.
35. Martínez LA, Correa GP, Coba AM y Fajardo RM. Antigenicidad e inocuidad de una vacuna contra la enfermedad de ojo azul (EOA) de los cerdos al ser aplicada en lechones. Memorias de XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1996 agosto 21-24; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1996: 56.
36. Zenteno R, González C, Hernández J, Agundis C, Huerta S, Hernández-Jauregui P, Ramírez H, Zenteno E. Nuevas estrategias en el diseño de vacunas contra el Rubulavirus porcino (LPMV). Memorias de la 3ª Jornada Internacional en Producción Porcina; 1998 abril 2-4; México (DF). México (DF): Departamento de Producción Animal: Cerdos 1998:15-24.
37. Hernández LJ, Ramírez MH. Características de la respuesta inmune del cerdo. Memorias del Diplomado de Actualización en Asesoría a Empresas porcinas; 2000 marzo 20-24; Distrito Federal (México). México (DF): Departamento de Producción Animal: Cerdos, 2000: 5-17.
38. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 5ta ed. México. Mc-Graw-Hill Interamericana, 1996.

39. Zajac AJ, Murali-Krihna K, Blattman JN, Ahmed R. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin in Immunol.* 1998;10:444-449.
40. Saalmüller A, Bryant J. Characteristics of porcine T lymphocytes and T cell lines. *Vet. Immunol and Immunopathol.* 1994, 43:45-22
41. Pescovitz MD, Sakopoulos A., Gaddy J, Husmann R, Zuckermann F. Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cell. *Vet. Immunol and Immunopathol.* 1994, 43:53-62.
42. Roizman B. Multiplication of viruses, an overview. In:Fields BN, Knipe DM, et. al. editors. *Virology.* Raven Press, New York, 1990: 87-94.
43. Doherty P. Anatomical environment as a determinant in viral immunity. *J Immunol.* 1995, 155:1023-1027.
44. Murray N, McMichael A. Antigen presentation in virus infection. *Curr Opin Immunol.* 1992, 4:401-407.
45. Biron AC. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of virus infection. *Curr Opin Immunol.* 1994, 6:530-538.
46. Pauly T, König M, Thiel J, Saalmuller A. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 1998;79:31-40.
47. Hernández LJ, Reyes LJ, Zenteno R, Ramírez MH, Hernández JP, Zenteno E. Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Imm. and Immunopathol* 1998;6051:1-15.
48. Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado G, Montaña L, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁻ lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet Immuno and Immunopathol.* 2001:6422:1-11.
49. Mendoza GR. Colección y envío de muestras al laboratorio. Boletín informativo editado por el Departamento de Producción Animal: Cerdos. FMVZ. UNAM. Agosto de 1997.
50. Burlenson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual.* Academic Prss, Inc. 1992.

51. Freshney RI. Culture of animals cells. 3rd ed. Wiley-Liss. Inc., New York, USA. 1994.
52. Ling NR, Catty D. Haemagglutination and hemolysis assays. Catty D., editors. Antibodies. Vol 1. A Practical approach. IRL Prsss. 1989: 169-188.
53. Gardner PS. Mc Quillen J. Rapid virus diagnosis application of immunofluorescence. Butter worth Inc. Great Britain. 1980.
54. Harlow E, Lanne D. Antibodies: Laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. USA. 1988.
55. Hames BD, Wood DR. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. 2nd ed. IRL Press. Oxford England. 1990.
56. Dalton AJ, Haguenu F. Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas. Academic Press Inc. USA. 1993
57. Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Hermann B, Mayer F, Schürmann FW. Methods of preparation for electron microscopy: an introduction for the biomedical sciences. Springer-Verlag. NY, Berlin, Heidelberg. 1987.
58. Sandborn EB. Cells and tissues by light and electron microscopy. Academic Press Inc. NY. USA. 1969.
59. Rose RN, et. al. (1992): Manual of clinical laboratory immunology. American Society of Microbiology.
60. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21 (Suppl).1968;97:77-89.
61. Zuckerman FA and Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive cells. Immunology 1996; 87:500-512.
62. Klaus GGB. Lymphocytes: a practical approach. IRL Press. Oxford. England. 1987.
63. Owens MA, Loken MR. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Wiley-Liss. NY. USA. 1995.
64. Chinsakchai S, Molitor TW. Replication and immunosuppressive effects of Pseudorabies virus on swine peripheral blood mononuclear cells. Vet Immunol and Immunophatol. 1992;30:247-260.
65. Neter J, Wasserman W, Kutner MH. Apllied linear statistical models. 3^a ed. USA.: IRWIN. 1990.

66. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. 2^a ed. Tokyo, Japan: McGraw-Hill, 1980.
67. Camacho RJ. Estadística con SPSS (versión 9) para Windows. México: Alfaomega-Rama, 2001.
68. Albina E, Piriou L, Hutet E, Cariolet R, Hospitalier RL. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV). Vet. Immunol. And Immunopathology, 1998, 61:49-66.
69. Mahy BWJ. Virology: a practical approach. IRL Press Oxford, England, 1991.
70. Cropper M, Dunne HE, Leman AD. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs from small vs large litters. JAVMA. 1976;68:233-235.
71. Wang JT, Dunne HW, Griel LC, Hokanson JF, Murphy DM. Mortality, antibody development, and viral persistence in porcine fetuses incubated *in utero* with SMEDI (Enterovirus). Virus Am J Vet Res. 1973;34:785-795.
72. Mengeling WL, Cutlip RC. Pathogenesis of *in utero* infection: Experimental infection of five-week-old porcine fetuses with Porcine parvovirus. Am J Vet Res. 1975;36:1173-1177.
73. Stephano HA. Situación actual de la enfermedad de ojo azul en cerdos. Memorias del primer simposium sobre las principales enfermedades nerviosas del cerdo. Guadalajara, Jal. AMVEC. 1991.
74. Chinsakchai S, Molitor T. Immunobiology of pseudorabies virus infection in swine. Vet Immunol and Immunopathol. 1994;43:107-116.
75. Solonen R, Llonen P, Salmi A. Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells *in vitro*: antigen expression and virus production preferentially in monocytes. Clin Exp Immunol. 1988;71:224-228.
76. Esolen L, Ward B, Moench T, Griffin D. Infection of monocytes during Measles. J of Infec Dis. 1993;168:47-52.
77. El-Awar FY, Hahn EC. Swine antibody-dependent cellular cytotoxicity against pseudorabies virus infected cells. Am J Vet Res. 1987;48:481-485.

78. Iglesias G, Pijoan C, Molitor C. Interaction of pseudorabies virus with swine alveolar macrophages I: Virus replication. Arch Virol. 1989;104:107-115.
79. Iglesias G, Pijoan C, Molitor C. Interaction of pseudorabies virus with swine alveolar macrophages I: Effects of virus infections on cell functions. J Leukocyte Biol. 1989;45:410-415.
80. Lee WC, Liu CI, Wang JT. Lymphoid tissues pathology and effects of immunosuppression on piglets infected with Aujeszky virus. J Chin Soc Vet Sci. 1986;12:15-23.
81. Lai SS, Ho WC, Lin LP. Persistence infection of Pseudorabies virus influenced the efficacy of hog cholera immunization. J Chin Soc Vet Sci. 1987;13:173-179.
82. Donaldson AI, Wardley LC, Martin S, Ferris NP. Experimental Aujeszky's disease in pigs: Excretion, survival and transmission of the virus. Vet Rec. 1983;113:490-494.
83. Pérez PF, Stephano A, Gay M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. Memorias de XXIII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1988 agosto; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, 1988: 81-83.
84. Espinosa HS. Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul. Tesis de Maestría. México DF. UNAM. 2001.
85. Hernández LJ. Participación de los linfocitos CD4+CD8- y CD4+CD8+ durante la respuesta inmune al rubulavirus porcino. Tesis de Doctorado. México, DF. UNAM. 2000.
86. Ramiro-Ibañez F, Ortega A, Ruiz-Gonzalvo F, Escribano J, Alonso C. Modulation of immune cell population and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. Virus Res. 1997;47:31-40.
87. Page G, Wang F, Hahn E. Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes. J Leukocyte Biol. 1992;52:441-448.
88. Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T. Changes of lymphocyte subpopulation in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Vet Immunol Immunopathol. 1996;50:19-27.

89. Saalmüller A, Hirt W, Reddehase M, Buhring H, Jonjic S, Koszinowsky U. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1987;17:1297-1301.
90. Zuckerman F, Gaskins H. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology.* 1996;87:493-499.
91. Yang H, Parkhouse ME. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology.* 1996;89:315-326.
92. Kimman T, Bruin T, Voermans J, Peeters B, Bianchi A. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B-and-T cell response. *Immunol.* 1995;86:372-378.
93. Martínez-Sosa A, Cisneros-Morales I, González-Vega D, Arriaga-Díaz C, Morilla-González A. Perfil inmunológico de cerdos inoculados con el virus de la Fiebre porcina clásica. *Téc Pec Méx.* 1993;31:128-135.
94. Solís HM. Viabilidad del semen diluido proveniente de cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus porcino. Tesis de licenciatura. México, DF. UNAM. 2002.
95. Foni E, Barigazzi G, Sidoli L, Marcato PS, Sarli G, Della SL, Spinaci M. Experimental Encephalomyocarditis virus infection in pigs. *J Vet Med B.* 1993;40:347-352.
96. Andries K, Pensaert MB. Virus Isolation and Immunofluorescence in different organs of pigs infected with Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus. Artículo en proceso de publicación.
97. Hernández-Jauregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz A, Reyes J, Hernández E, Moreno LJ. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros de cerdos vacunados y de brote para anticuerpos contra el Paramyxovirus del síndrome de ojo azul de los cerdos. *Vet Méx.* 1992;23:217-221.
98. Ray R, Compans R. Paramyxovirus. In: Van Regenmortel MHV. *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines.* Elsevier Science Publishers B. V. 1990. 217-236.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

99. Griffin D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of Measles virus infection: An hypothesis for altered immune responses. J Infect Dis. 1994;170 (Suppl 1):24-31.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN