



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE IgA, IgG E IgM ANTI-  
RUBULAVIRUS PORCINO (RVP) EN SEMEN DE CERDOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**NANCY REBECA MARTÍNEZ BAUTISTA**

**TUTOR: DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA**

**COMITÉ TUTORAL: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES  
DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ**

**MÉXICO D.F., 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

*Especialmente a mi familia, mi mamá que siempre me escucha, me tolera y me orienta, a mi papá que me ha enseñado a ser muy fuerte; gracias por demostrarme que se tiene que trabajar duro para lograr las cosas, los quiero mucho.*

*A mis hermanos, Edgar que es un ejemplo a seguir y Beto que se aferra a conseguir lo que quiere; gracias por la historia que hemos construido juntos desde niños, los quiero un buen.*

*A mi sobrino consentido Edgar Bambam, que alegras mis días con tan solo verte sonreír, eres el niño más hermoso.*

*A Andrés Mendiola García, que a pesar del tiempo y la distancia siempre me apoyaste, gracias por todas las atenciones que has tenido conmigo y por los buenos momentos.*

*Los quiero mucho!*

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Humberto Ramírez Mendoza, por aceptarme como su alumna, por lo mucho que aprendí de usted y por los buenos momentos de convivencia.

A los miembros del Laboratorio de Inmunología Comparada de Piel y Mucosas de la Facultad de Medicina, Dr Armando Pérez Torres, por los consejos que me hicieron mejorar este trabajo y por el apoyo incondicional, a la Biol. Irma López y Biol. Ivonne G. Sánchez por el apoyo técnico brindado.

Dr Marco Antonio Vega López del Laboratorio de Infectómica, CINVESTAV, a su personal por los conocimientos transmitidos y los momentos de convivencia.

A Francisco Rivera por su contribución en la realización de este estudio.

A Verónica Rodríguez Mata del Laboratorio de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina y al personal que labora con ella, por el apoyo en el procesamiento de muestras para histopatología.

Al departamento de cerdos de la Facultad, por el apoyo brindado, en especial a la Dra. Carmen Mercado García.

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: PAPIIT-IN211308 “Evaluación del *Rubulavirus* porcino en semen de verracos”. CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del Ojo Azul en cerdos”. PAPIIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.

# ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Lista de cuadros</b>   | 6             |
| <b>Lista de figuras</b>   | 7             |
| <b>Lista de gráficas</b>  | 8             |
| <b>RESUMEN</b>  | 9             |
| <b>ABSTRACT</b>   | 11            |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | 12            |
| 1.1 Antecedentes  | 13            |
| 1.2 Agente etiológico   | 13            |
| 1.3 Similitud del Rubulavirus porcino con otros paramixovirus                                     | 15            |
| 1.4 Características de la respuesta inmune frente a una infección viral                           | 16            |
| 1.5 Signos clínicos   | 19            |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN</b>  | 21            |
| <b>III. HIPÓTESIS</b>   | 21            |
| <b>IV. OBJETIVO</b>   | 21            |
| <b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | 22            |
| 5.1 Virus para la inoculación   | 22            |
| 5.2 Virus para Inhibición de la hemoaglutinación, seroneutralización<br>e Inmunoensayo enzimático | 22            |
| 5.3 Animales de experimentación   | 23            |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.4 Inoculación del virus                                    | 23        |
| 5.5 Signos clínicos  | 24        |
| 5.6 Medición de las dimensiones testiculares                 | 24        |
| 5.7 Palpación testicular                                     | 24        |
| 5.8 Evaluación seminal                                       | 25        |
| 5.9 Serología  | 26        |
| 5.10 Concentración de anticuerpos anti-RVP en plasma seminal | 28        |
| 5.11 Sacrificio y Necropsia                                  | 29        |
| 5.12 Histopatología  | 30        |
| 5.13 Análisis estadístico                                    | 30        |
| <b>VI. RESULTADOS</b>  | <b>31</b> |
| 6.1 Signos clínicos  | 31        |
| 6.2 Medición de las dimensiones testiculares                 | 31        |
| 6.3 Palpación testicular                                     | 34        |
| 6.4 Evaluación seminal                                       | 35        |
| 6.5 Serología  | 38        |
| 6.6 Inmunoensayo enzimático                                  | 40        |
| 6.7 Concentración de anticuerpos en plasma seminal           | 41        |
| 6.8 Sacrificio y Necropsia                                   | 44        |
| 6.9 Histopatología   | 45        |
| <b>VII. DISCUSIÓN</b>  | <b>51</b> |
| <b>VIII. CONCLUSIONES</b>                                    | <b>59</b> |
| <b>XI. LITERATURA CITADA</b>                                 | <b>61</b> |

## RESUMEN

La enfermedad de Ojo Azul en cerdos de México es causada por el *Rubulavirus* porcino; se caracteriza por generar cuadros nerviosos en cerdos jóvenes, infertilidad en hembras, machos adultos y un bajo porcentaje de opacidad de la cornea en todas las edades.

Se emplearon 12 cerdos machos de 9 meses de edad, híbridos York-Landrace, provenientes de una granja serológicamente libre de la Enfermedad del Ojo Azul, después de un periodo de adaptación de cuatro semanas, se utilizaron como controles negativos durante 16 días, posteriormente fueron inoculados con RVP cepa PAC-3 Jalisco, por vía intranasal. El total de los cerdos no mostró signos clínicos; alteraciones en las dimensiones testiculares se presentaron en todos los cerdos alrededor del día 15 pi. A la palpación se registró inflamación de cabeza y/o cola de epidídimo unilateral o bilateralmente, estas alteraciones se observaron desde los doce días en uno de los cerdos, aunque en promedio se presentaron cerca del día 15 en todos los cerdos. La evaluación seminal tuvo cambios significativos en la concentración espermática y la motilidad. Por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación y Seroneutralización, se detectaron anticuerpos anti-RVP en suero sanguíneo a partir de la segunda semana de infección. Los mismos anticuerpos fueron detectados a partir del día 7 pi. mediante la prueba de ELISA indirecta de tipo cuantitativa. La respuesta humoral permaneció constante hasta el término del experimento. El isotipo predominante en semen es IgA seguido por IgG y en menor cantidad IgM. Anticuerpos IgA e IgG anti-RVP estuvieron presentes solo en dos cerdos respectivamente, en diferentes semanas de infección y en concentraciones bajas. Los cerdos fueron sacrificados en tres grupos, a los 58, 110 y 142 días de infección, a la necropsia en tres cerdos se observaron lesiones como nódulos en epidídimo y líquido seroso en túnica vaginal. Los daños histopatológicos se caracterizaron por degeneración vacuolar, infiltrado mononuclear, áreas de fibrosis, fagocitosis de espermatozoides, pérdida de estructuras tubulares, las cuales persistieron aún en cerdos sacrificados hasta los 142 días. Estos resultados indican que el RVP causa daños importantes en tracto reproductor del macho generando problemas de infertilidad.

Palabras clave: *Rubulavirus p* *orcino*, *semen*, *respuesta humoral*, *epididimitis* ,  
*inmunoglobulinas*.



## ABSTRACT

Blue eye disease caused by the swine Rubulavirus affects Mexican pigs. It is characterized by neurological signs in young animals, infertility in sows and boars and low levels of corneal opacity in all stages.

Were used 12 male pigs of nine months cross-bred Landrace/Yorkshire from a farm free of the disease. After an adaptation period of four weeks, the pigs were used as negative controls for 16 days and were inoculated with PRV strain PAC-3 Jalisco intranasally. All of the pigs did not show clinical signs; changes in the testicular size were seen in all of the animals around the day 15 pi. To the palpation was noted inflammation in the head of the epididymis and tail unilaterally or bilaterally, these alterations were observed in one of the animals since the day 12, otherwise in all of the animals were seen around the day 15. The seminal evaluation had significant changes in the spermatic concentration and motility. By the use of hemagglutination and seroneutralization, antibodies anti-PRV were detected in blood serum in the second week postinfection. The same antibodies were detected in the seventh day pi, by the indirect ELISA test of quantitative kind. The humoral response was constant until the end of the experiment. The main isotype in semen was IgA followed by IgG and in less quantity IgM. IgA and IgG antibodies anti-PRV were present only in two pigs, in different weeks of infection in low concentration. Pigs were sacrificed in three groups, 58, 110 and 142 days postinfection. At necropsy in three pigs were seen lesions like nodules in epididymis and serous liquid in vaginal tunic. The histopathological changes were characterized by vacuolar degeneration, mononuclear infiltration, fibrotic areas, phagocytosis of spermatozooids, loss of tubular structures, which persisted even in sacrificed pigs until 142 days. These results show that PRV causes damage in the reproductive tract of boars causing problems of infertility.

Key words: Porcine Rubulavirus, semen, humoral response, epididymitis, antibodies.

## I. INTRODUCCIÓN

En 1980, se descubre una nueva enfermedad en cerdos de La Piedad Michoacán llamada Enfermedad de Ojo Azul, la cual se caracterizó por producir encefalitis y opacidad de la cornea en lechones de los cuales fue posible aislar un virus con capacidad hemoaglutinante. Se observaron brotes similares en otros estados del centro del país, siendo esta la zona más afectada (Stephano *et al.*,1988). Este virus fue identificado como miembro de la familia *Paramixoviridae* (Stephano *et al.*,1983).

El *Rubulavirus* porcino es un virus emergente detectado en 1980 en granjas de La Piedad Michoacán (LPM), es el agente etiológico de la Enfermedad de Ojo Azul (EOA), infección caracterizada por generar alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas acompañadas de opacidad de la córnea, los signos clínicos dependen de la edad del los cerdos (Moreno-López *et al.*,1986; Stephano *et al.*,1988) . En general, los parámetros productivos se ven afectados y las pérdidas económicas son cuantiosas (Santos-López *et al.*,2004). En machos los órganos reproductivos se ven afectados con epididimitis y orquitis afectando la fertilidad (Ramírez-Mendoza *et al.*,1997), el *Rubulavirus* porcino genera daños en tracto reproductor como órgano diana, además de excretar y diseminar el virus a través del semen. Actualmente se desconoce si el cerdo infectado con *Rubulavirus* es capaz de desarrollar una respuesta inmune humoral en dicho órgano.

La EOA ha sido reconocida únicamente en México, se ha diagnosticado serológicamente en varios estados, pero aún no ha sido reportada en otros países y hasta hoy la única especie donde se ha descrito la enfermedad es el cerdo (Stephano, 1991, 1999).

## 1.1 Antecedentes

En 1980 se describen por primera vez los signos de la enfermedad de Ojo Azul, una patología de los cerdos caracterizada por encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la cornea observado en el municipio de La Piedad, en el estado de Michoacán, México. En 1981 Stephano demuestra que el causante de la enfermedad es un agente viral perteneciente al grupo de los paramixovirus, logrando aislar de órganos de cerdos enfermos un virus capaz de infectar línea celular PK-15 produciendo formación de sincitios como efecto citopático, además de tener capacidad hemoaglutinante en eritrocitos de diferentes especies (Stephano *et al.*, 1981) y se ha observado que virus de la misma familia no reaccionan con sueros hiperinmunes del paramixovirus porcino (Stephano *et al.*, 1986).

La caracterización del virus fue reportada en 1986 por Moreno *et al.*, denominándolo como virus La Piedad Michoacán (LPM), ellos aislan el virus del cerebro de un cerdo que presentaba alteraciones en Sistema Nervioso Central (SNC), neumonía y opacidad de la cornea. Mediante electroforesis se sabe que las proteínas del virus LPM tienen similitud con las proteínas de otros virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae.

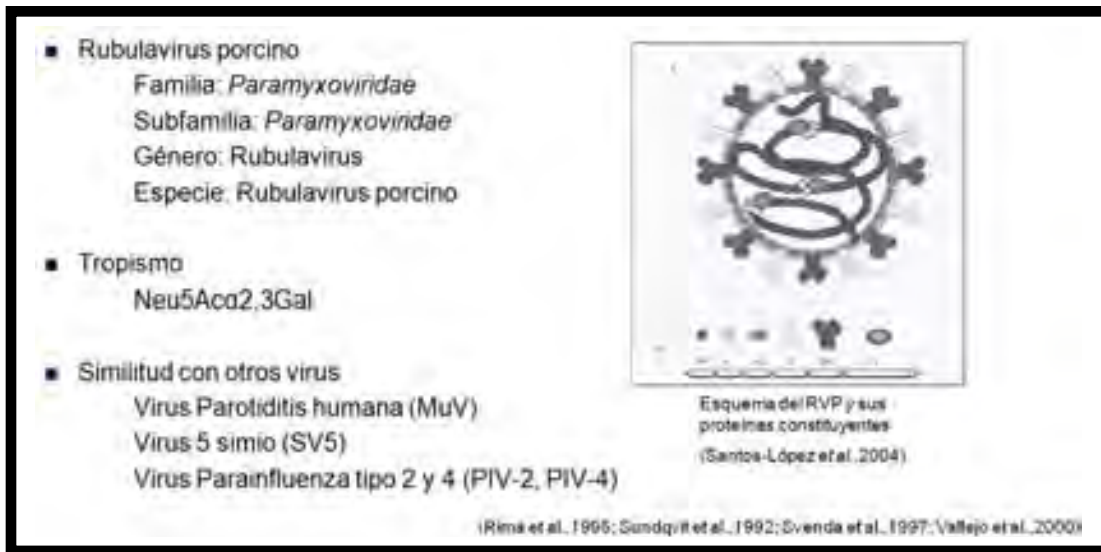
## 1.2 Agente etiológico

La clasificación actual del virus de la enfermedad de Ojo Azul es orden de Monomegalovirus, familia Paramixoviridae, subfamilia Paramixovirinae, género Rubulavirus, especie *Rubulavirus* porcino (PRV) (Murphy *et al.*, 1995).

Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos de 180 a 300 nm de diámetro, formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoproteica con prolongaciones de 8 – 12 nm, correspondientes a las glicoproteínas HN y F responsables de las actividades hemaglutinantes, hemolítica, de neuroaminidasa y formadora de sincitios (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes-Leyva *et al.*, 1999).

La información genética de este virus está contenida en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena negativa. El RVP posee 10 genes que codifican 10 proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas; cada gen codifica una proteína, excepto el gen F y P (Santos *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Esquema del RVP y sus proteínas constituyentes.



En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y F, en la parte interna de la misma se halla la proteína de matriz M. Intimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que forman el complejo con actividad polimerasa del virus (Santos *et al.*, 2004).

El virón de este paramixovirus porcino está constituido por seis proteínas: la hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) que forma parte de la envoltura viral y se ha implicado en el reconocimiento y enlace con gran afinidad a las estructuras celulares que contienen ácido siálico, es constante en los diferentes paramixovirus (Zenteno *et al.*, 1998), proteína de fusión (F) responsable de la fusión de las membranas celular y viral, la lisis de eritrocitos y la formación de sincitios en cultivos celulares, fosfoproteína (P) involucrada en la replicación viral, sufre un proceso postranscripcional similar al ocurrido en el virus de

la parotiditis humana, nucleoproteína (NP) al parecer solo posee función estructural (Ray *et al.*, 1990 citado en Santos *et al.*, 2004), proteína de matriz (M) que organiza a la nucleocapside en las zonas de la membrana celular en donde abundan las glicoproteínas virales y también se le implica en la regulación de la síntesis del ARN y una proteína de alto peso molecular (L) (Ramírez, 1998).

### **1.3 Similitud del RVP con otros paramixovirus**

La secuencia de aminoácidos del gen de la proteína HN tiene un alto porcentaje de identidad con la misma proteína de otros virus de la misma familia, como es el caso del SV5 con el que muestra mayor relación (43%), el virus de las paperas humanas MuV (41%), PVI-2 (38 %) y PVI-4 (35 %) (Sundqvist *et al.*, 1992).

Un análisis comparativo de secuencias del gen M del virus LPM indican que existe un 46% de homología en la secuencia de aminoácidos y 55 % en los niveles de nucleótidos con el virus de las paperas en humanos. Ambos virus, LPMV en los cerdos y MuV en humanos, causan una enfermedad similar en el hospedero correspondiente, los cuales se caracterizan por generar desordenes en sistema nervioso central y órganos reproductivos (Linné *et al.*, 1992).

El virus de la parotiditis es reconocido por producir inflamación de las glándulas salivales parótidas, sin embargo, en casi la mitad de los casos hay complicaciones neurológicas como meningitis. En ocasiones abarca el parénquima nervioso produciendo encefalitis, dejando graves secuelas nerviosas. Este virus se replica en diversos tejidos linfáticos y glandulares, incluyendo las células de los islotes de Langerhans del páncreas y también en células epiteliales y germinativas de órganos reproductivos masculinos causando inflamación testicular y esterilidad en jóvenes pospúberes. El RVP posee gran similitud estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y comparte con él su tropismo tisular y sus características patológicas, ya que también provoca alteraciones en sistema

nervioso central de cerdos neonatos y en tejido reproductivo en cerdos adultos; además, es capaz de replicarse en diversos tejidos glandulares y linfáticos (Reyes Leyva *et al.*, 2002).

#### **1.4 Características de la respuesta inmune frente a una infección viral**

Los mecanismos principales de la inmunidad innata frente a los virus son la inhibición de la infección por los IFN de tipo I y la eliminación de las células infectadas por los linfocitos NK que también reconocen a las células infectadas en las que el virus anula la expresión del MCH-I, por que la ausencia de estas moléculas libera a los linfocitos NK de su estado normal de inhibición (Abbas *et al.*, 2004).

La inmunidad adaptativa frente a las infecciones víricas depende de los anticuerpos, que bloquean la unión del virus a la célula huésped y su entrada a ella, y de los linfocitos T citotóxicos (LCT) que combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas (Abbas *et al.*, 2004).

Para el caso de los paramixovirus se ha demostrado que reconocen moléculas que contienen ácido siálico, el virus de la EOA reconoce perfectamente moléculas que contienen sialil alfa-2,3-lactosa (Reyes-Leyva *et al.*, 1997).

La respuesta inmune frente al virus se inicia con la producción de interferón- $\alpha$  por las células infectadas lo que aumenta el potencial lítico de las células NK y la expresión del MCH-I facilitando la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8 importantes en la erradicación de las infecciones virales (Abbas *et al.*, 2004).

El resultado de la actividad citotóxica de las diversas células efectoras (NK, linfocitos CD8 o CD4) sobre las células infectadas, provoca que se liberen antígenos virales endógenos. Estos pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MCH-II. Este proceso induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4. Estos responden con la producción de citocinas como la IL-2 e interferón- $\gamma$  o IL-4 e IL-10 (Abbas *et al.*, 2004).

En las primeras etapas de maduración de los linfocitos, se observa la coexpresión de las moléculas CD4 y CD8, pero antes de poblar los órganos linfoides secundarios se pierde una de las moléculas. En sangre periférica bajo condiciones normales no se observan altos porcentajes de linfocitos con doble marca en las células humanas y murinas. El cerdo es la única especie que expresa altos porcentajes de linfocitos dobles positivos en sangre periférica (entre 10% y 60%) en condiciones normales (Ramírez, 1998).

Hernández *et al.*, 1998, fueron los primeros en describir algunos de los mecanismos de la respuesta inmune contra el *Rubulavirus* porcino durante la infección experimental en cerdos adultos. En dichos estudios de la respuesta humoral mostraron que los cerdos infectados producen anticuerpos con títulos elevados, que alcanzan su máximo nivel entre la 3ª y 5ª spi (semanas pos- infección) y permanecen elevados durante todo el experimento.

La especificidad de los anticuerpos producidos contra el *Rubulavirus* está dirigida primordialmente contra las proteínas HN, NP y M, la inducción de la respuesta de anticuerpos con títulos elevados es un evento común durante las infecciones por paramixovirus. Wolinsky, 1996, encontró anticuerpos específicos contra el virus de la parotiditis humana en el suero de personas experimentalmente infectadas a los 11 días después de la inoculación, los cuales permanecieron elevados durante años; esto último también ocurre en la infección por *Rubulavirus* porcino (Hernández *et al.*, 1998, Hernández *et al.*, 2004).

Se ha observado que los anticuerpos séricos con actividad neutralizante, solo protegen la infección por virus parainfluenza (paramixovirus) en el tracto respiratorio inferior, mientras que la protección en el tracto respiratorio superior depende de la producción de anticuerpos secretorios en las mucosas (Ray *et al.*, 1988).

La producción de anticuerpos contra las proteínas NP y M coincide con el momento en que los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzan sus títulos más elevados, lo cual ocurre al mismo tiempo en que la respuesta linfoproliferativa se encuentra en su máximo nivel. Esto

sugiere que el incremento de los títulos de anticuerpos ocurrió por el reconocimiento de proteínas internas del virón, evento que es posiblemente mediado por los mecanismos de procesamiento antigénico y de cooperación entre linfocitos T y B (Hernández *et al.*, 1998).

Esto es acorde al desarrollo de la respuesta anticuerpos dependientes de células T contra la NP en diversas infecciones por paramixovirus (Lamb *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 1990).

En el momento en el que las células CD2+, CD8+, CD4+CD8+, IgM+ Y PoM1+ muestran su nivel más bajo en la circulación, el cual coincide con el establecimiento del infiltrado celular en los órganos blanco de la infección, es decir epidídimo y testículos (Ramírez *et al.*, 1997).

### *Inmunoglobulinas*

La inmunidad humoral esta mediada por los anticuerpos y es el brazo efector del sistema inmunológico adaptativo responsable de la defensa frente a los microorganismos extracelulares y las toxinas microbianas. Los anticuerpos entran en las secreciones mucosas, donde participan en la defensa frente a los microorganismos ingeridos o inhalados, como es el caso de RVP, y en la sangre, desde donde son capaces de circular a cualquier lugar donde exista un antígeno (Abbas *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004).

La IgA es la clase principal de anticuerpo que se produce en el sistema inmunitario de las mucosas; ésta inmunoglobulina se sintetiza en los tejidos linfáticos de las mucosas y se secreta a través del epitelio mucoso al interior de las luces de los órganos mediante un receptor Fc específico para ella. Se sintetiza en cantidades mayores que cualquier otro isotipo. La IgG es la encargada de la opsonización de antígenos para ser fagocitados por los macrófagos y neutrófilos, activar la vía clásica del complemento, de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediados por linfocitos NK y macrófagos (Abbas *et al.*, 2004).

Kaiser, J. *et al.*, en 2000 identificaron anticuerpos en el plasma seminal de cerdos infectados con PRRSV (síndrome del virus respiratorio y reproductor porcino) a través del desarrollo de una ELISA para cuantificar el total de inmunoglobulinas para los isotipos



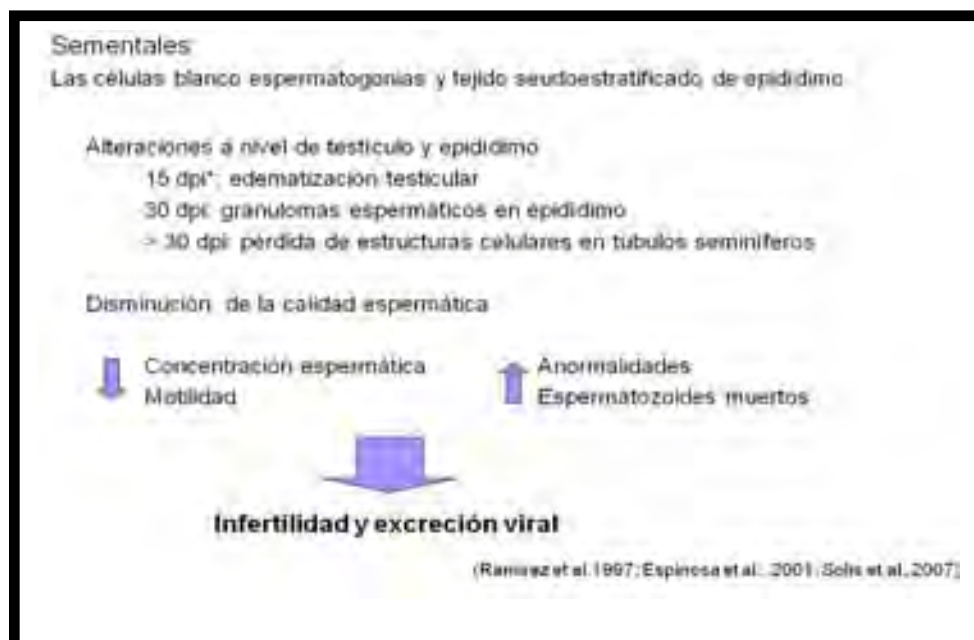
IgA, IgG e IgM. En plasma seminal el isotipo predominante fue IgG ( $23.2 \pm 14 \mu\text{g/ ml}$ ) seguido por IgA ( $4.8 \pm 2.5 \mu\text{g/ ml}$ ) e IgM ( $3.7 \pm 1.7 \mu\text{g/ ml}$ ).

### 1.5 Signos clínicos

Los signos clínicos de los animales infectados con el virus de la EOA dependen de la edad. En cerdos adultos las lesiones se limitan al aparato reproductor: en las hembras se presentan aborto, aumento de mortinatos y reducción de la fertilidad, en machos se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de la fertilidad. La opacidad corneal se presenta solamente en uno a 10% de los animales infectados de cualquier edad (Stephano *et al.*,1988).

Infecciones experimentales en cerdos machos adultos mostraron que el virus produce una inflamación severa en la cabeza del epidídimo, destrucción del epitelio tubular y formación de granulomas a partir del día 15 pos-infección (p.i.). También se observa reducción en la motilidad y concentración de espermatozoides. Entre los 30 – 45 p.i. se identificó la degeneración de túbulos seminíferos con infiltración linfocitaria que condujo a atrofia testicular (Ramírez *et al.*,1997). El *Rubulavirus* altera los índices reproductivos caracterizado por la reducción transitoria de la calidad espermática (Espinoza , 2001; Solís *et al.*,2007).

Cuadro 2. Alteración de índices reproductivos en cerdos infectados con RVP





## **II. JUSTIFICACIÓN**

En sementales, el *Rubulavirus* porcino genera daños en tracto reproductor como órgano diana, además de excretar y diseminar el virus a través del semen. Actualmente se desconoce si el cerdo infectado con *Rubulavirus* es capaz de desarrollar una respuesta inmune humoral en dicho órgano diana, por lo cual es necesario contribuir al entendimiento de la patogenia del *Rubulavirus* porcino en el semental y conocer la respuesta inmune de tipo humoral que se desarrolla en el tracto reproductor ante la infección.

## **III. HIPÓTESIS**

Si la inoculación experimental con el *Rubulavirus* porcino en cerdos machos desencadena una respuesta humoral en tracto reproductor, entonces esta puede ser evaluada en semen.

## **IV. OBJETIVO**

Identificar y cuantificar por ELISA, anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-RVP en semen de cerdos infectados experimentalmente.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Virus para la inoculación**

Para la inoculación experimental de cerdos machos se empleó la cepa Producción Animal Cerdos, cepa 3 (PAC-3) Jalisco/1992 (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), el virus fue multiplicado en cultivos de la línea celular BHK, manteniéndolo en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 U ml<sup>-1</sup> de penicilina y 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomina. El sobrenadante de las células infectadas se clarificó por centrifugación a 3000 g durante 40 minutos. El virus contenido en el sobrenadante fue centrifugado a 100000 g por 4 h a 4° C y filtrado en membranas de 0.45 µm.

La capacidad infectante del virus fue titulada en cultivos celulares en microplacas, usando diluciones décuples seriadas del virus en MEM, finalmente la titulación del virus se determinó por el método de Kärber (Burlison *et al.*, 1992) en dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC<sub>50</sub>). El antígeno viral fue alícuotado y conservado a -70° C hasta su uso (Ramírez, 1997).

### **5.2 Virus para Inhibición de la hemoaglutinación (IHA), Seroneutralización (SN) e Inmunoensayo enzimático (ELISA)**

Para la realización de las pruebas de IHA, SN y ELISA se empleó la cepa PAC-3 Jalisco/1992 (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), el virus fue multiplicado en cultivos de la línea celular PK-15, con el propósito de evitar cualquier respuesta inespecífica en las pruebas realizadas, manteniéndolo en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 U ml<sup>-1</sup> de penicilina y 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomina.

El sobrenadante de las células infectadas se clarificó por centrifugación a 3000 g durante 40 minutos. El virus contenido en el sobrenadante fue centrifugado a 100000 g por 4 h a 4° C y filtrado en membranas de 0.45 µm.

La capacidad infectante del virus fue titulada en cultivos celulares en microplacas, usando diluciones décuples seriadas del virus en MEM, finalmente la titulación del virus se determinó por el método de Kärber (Burlison *et al.*,1992) en dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC<sub>50</sub>). El antígeno viral fue alícuotado y conservado a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso (Ramírez, 1997).

### **5.3 Animales de experimentación**

Se emplearon 12 cerdos machos de 9 meses de edad, híbridos York-Landrace, provenientes de una granja serológicamente libre de la Enfermedad del Ojo azul, distribuidos de forma homogénea en tres aislamientos del departamento de Producción Animal: cerdos, UNAM, los cuales fueron inoculados con RVP por vía intranasal.

Después de un periodo de adaptación con duración de cuatro semanas, el total de los animales se utilizaron como controles negativos durante 16 días previos a la inoculación.

### **5.4 Inoculación del virus**

Los 12 sementales fueron infectados utilizando 5 ml de la cepa PAC-3 del RVP ( $10^5$  DICC<sub>50</sub>/ml) administrado por vía intranasal.

En cada uno de los animales se realizaron las siguientes evaluaciones:

- 1.- Signos clínicos
- 2.- Medición de las dimensiones testiculares
- 3.- Palpación testicular
- 4.- Evaluación seminal
- 5.- Serología
- 6.- Concentración de anticuerpos anti-RVP en plasma seminal

7.- Sacrificio y Necropsia

8.- Histopatología

### **5.5 Signos clínicos**

Los animales se monitorearon diariamente para registrar cambios en su estado físico general y evaluar la manifestación de signos clínicos como pirexia, anorexia, apatía, pérdida de libido y temperatura.

### **5.6 Mediciones de las dimensiones testiculares**

Diariamente se midió longitud y diámetro testicular con un vernier durante la fase previa y de infección.

### **5.7 Palpación testicular**

Se registraron los cambios de tamaño de testículo y epidídimo por medio de palpación testicular diaria de los cerdos durante todo el experimento.

### **5.8 Evaluación seminal**

El total de los verracos fueron previamente entrenados para la colecta de los eyaculados mediante la técnica de mano enguantada, las tres fracciones que conforman el eyaculado se obtuvieron en todos los casos.

Se colectaron dos eyaculados de cada semental por semana con un intervalo de 4 días. Las muestras se obtuvieron antes y después de la inoculación hasta finalizar la quinta semana post infección. A partir de la sexta semana pi. solo se obtiene un eyaculado de cada semental por semana a los cuales se evaluó:

- ✓ *Motilidad.* Una vez obtenido el eyaculado, se depositan 10  $\mu$ l en un portaobjetos previamente calentado a 37°C. Sobre la muestra se colocó un cubreobjetos y se estima la motilidad en masa porcentual observando en el microscopio a un aumento de 10x.
- ✓ *Volumen.* Se midió la cantidad de mililitros del eyaculado usando una probeta graduada.
- ✓ *Concentración.* El conteo de espermatozoides se obtiene mediante un hemocitómetro. Se realiza una dilución 1:200 del semen fresco, se coloca la muestra diluida en la cámara y se cuentan las células contenidas en los 25 cuadros centrales de la misma, observada a 40x en el microscopio.
- ✓ El número de espermatozoides contenido en cada mililitro de eyaculado se obtiene con la siguiente fórmula:

(# espermatozoides) (10) (1000), donde

# espermatozoides = total de espermatozoides contados en los 25 cuadros

10 = factor de profundidad de la cámara

200 = dilución de la muestra

1 000 = conversión de  $\text{mm}^2$  a mililitros

Posterior a la evaluación seminal, todos los eyaculados obtenidos fueron centrifugados a 600 g durante 10 minutos para remover el plasma seminal, al cual se le agregó inhibidor de

proteasas (Phenylmethane sulfonyl fluoride, Sigma Aldrich) en una proporción de 1:200 y se conservó en alícuotas almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Kaiser, J. *et al.*, en 2000).

## **5.9 Serología**

Se empleó sangre sin anticoagulante obtenida de vena cava superior antes y durante la infección. La toma de muestras se realizó semanalmente. Cada muestra fue centrifugada a 500g durante 10 minutos para obtener el suero y determinar el título de anticuerpos mediante IHA, SN y ELISA. Los sueros fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### *5.9.1 Inhibición de la hemoaglutinación (Método Beta)*

En una placa de 96 pozos de fondo en U (Nunc, Roskilde, Denmark) se colocaron 50  $\mu\text{l}$  de PBS (solución de fosfatos con pH 7.2) en todos los pozos, 50  $\mu\text{l}$  del suero problema, se homogenizaron y se realizaron diluciones dobles seriadas de 1:2 hasta 1: 1024. Se colocaron controles positivo y negativo con título previamente conocido. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de antígeno con 8 Unidades hemoaglutinantes (UHA). Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos de bovino al 0.5% en todos los pozos. Se incubaron a temperatura ambiente 30 a 60 minutos, después de los cuales se realizó la lectura ( Burles *et al.*, 1992).

### *5.9.2 Seroneutralización*

De las muestras de suero obtenidas se hicieron diluciones dobles con MEM, desde 1:2 hasta 1:1024. Se colocaron controles positivo y negativo con título previamente conocido. En placas de 96 pozos fondo plano (Nunc, Roskilde, Denmark), se mezclaron 50 $\mu\text{l}$  del suero diluido con 50  $\mu\text{l}$  del RVP-PAC-3 ajustado a 300  $\text{DICC}_{50\%}$ . Se incubaron por 60 minutos a



37° C. Posteriormente, se agregaron 150 µl de células PK-15 en suspensión ( $1 \times 10^6$ /ml). Las células con el virus se incubaron durante 72 h a 37°C y se monitorearon diariamente en un microscopio invertido para evaluar el efecto citopático. Al cumplir el tiempo de incubación, se tomaron 50 µl del sobrenadante de cada pozo y se confrontaron con 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5%. El título de anticuerpos neutralizantes fue determinado a partir de la última dilución que inhibió la capacidad hemaglutinante del RVP (Hernández *et al.*, 1998; Ramírez, 1998).

Inmunoensayo enzimático

### 5.9.3 Concentración de anticuerpos anti-RVP en suero sanguíneo

Mediante la estandarización de un ELISA indirecto de tipo cuantitativo se determinó la cantidad de IgG anti-RVP en suero sanguíneo. Se sensibilizaron placas Maxisorp de fondo plano con 8 UHA de virus diluido en buffer de carbonatos pH 9.6 en un volumen de 100 µl en cada pozo. Se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con solución tween-20, pH 8.0. Se realizó un bloqueo con 1% de albúmina sérica bovina durante 30 minutos y posteriormente se hicieron 4 lavados. Se colocaron las muestras de suero haciendo tres diluciones seriadas de cada muestra y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las diluciones óptimas empleadas se determinaron mediante ensayos preliminares. Se colocaron 100 µl de anti- IgG cerdo conjugado con peroxidasa y diluido 1:50 000, se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Se empleó TMB como sustrato durante 15 minutos. Se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro. Simultáneamente se desarrolló una curva estandar para determinar la cantidad (µg/ml) de cada isotipo contenido en las muestras.

La concentración viral de 8 UHA empleada para sensibilizar las placas con el virus (Pipkin *et al.*, 1999) se calculó su equivalente en dosis infectantes en cultivo celular al 50% por el método de Kärber (Burlison *et al.*, 1992) y la concentración de proteínas.

## **5.10 Concentración de anticuerpos anti-RVP en plasma seminal**

### *5.10.1 Inmunoglobulinas presentes en plasma seminal*

A través de una ELISA de sandwich se identificaron y cuantificaron los isotipos IgA, IgG e IgM presentes en plasma seminal antes y durante la infección con RVP. En placas NUNC Maxisorp de fondo plano se colocaron 100 µl de anti-IgA, IgG o IgM de cerdo, según sea el caso, diluido 1:100 en buffer de carbonatos con pH 9.6. Las inmunoglobulinas se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con solución tween-20 pH 8.0. Se realizó un bloqueo con 1% de albúmina sérica bovina durante 30 minutos y se lavaron las placas 4 veces. Se colocaron las muestras de plasma haciendo 3 diluciones seriadas de cada muestra y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados. Se agregaron 100 µl de anti-cerdo conjugado a peroxidasa HRP diluido 1:50000 y se dejaron incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente. Se empleó TMB como sustrato durante 15 minutos, finalmente se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro. Simultáneamente se desarrolló una curva estandar para determinar la cantidad (µg/ml) de cada isotipo contenido en las muestras (Nordengrahn *et al.*, 1999; Pipkin *et al.*, 1999; Kaiser, J. *et al.*, 2000, Oleksiewicz *et al.*, 2001; Reyes- Leyva *et al.*, 2004).

### *5.10.2 Inmunoglobulinas anti-RVP en plasma seminal*

Mediante la estandarización de un ELISA indirecto de tipo cuantitativo se determinó la cantidad de IgG anti-RVP en plasma seminal. Se sensibilizaron placas Maxisorp de fondo plano con 8 UHA de virus diluido en buffer de carbonatos pH 9.6 en un volumen de 100 µl en cada pozo. Se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con solución tween-20, pH 8.0. Se realizó un bloqueo con 1% de albúmina sérica bovina durante 30 minutos y posteriormente se hicieron 4 lavados. Se colocaron las muestras de plasma haciendo tres diluciones

seriadas de cada muestra y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las diluciones óptimas empleadas se determinaron mediante ensayos preeliminares. Se colocaron 100 µl de anti-cerdo conjugado a peroxidasa diluido 1:75 000 para el caso de IgA y 1:50 000 para IgG e IgM. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Se empleó TMB como sustrato durante 15 minutos. Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro. Simultáneamente se desarrolló una curva estandar para determinar la cantidad (µg/ml) de cada isotipo contenido en las muestras.

La concentración viral de 8 UHA empleada para sensibilizar las placas con el virus (Pipkin *et al.*, 1999) se calculó su equivalente en dosis infectantes en cultivo celular al 50% por el método de Kärber (Burleson *et al.*, 1992) y la concentración de proteínas.

### 5.11 Sacrificio y Necropsia

El sacrificio de los animales en experimentación se realizó agrupando los cerdos en diferentes semanas de infección y se registraron las lesiones presentes en los órganos (Cuadro 2).

De todos los cerdos se obtuvieron cortes de tejido del aparato reproductor: testículos, epidídimo, próstata, glándulas bulbouretral y seminal.

Cuadro 3. Días de infección al sacrificio de los animales

| <i>Grupo</i> | <i>No. animales</i> | <i>*ID</i>   | <i>**Dpi al sacrificio</i> |
|--------------|---------------------|--------------|----------------------------|
| 1            | 4                   | 1, 4, 10, 12 | 58 (8.2 semanas)           |
| 2            | 4                   | 2, 3, 8, 13  | 110 (16 semanas)           |
| 3            | 4                   | 5, 7, 9, 11  | 142 (20 semanas)           |

\* Identificación del animal

**\*\*Días post infección**

### **5.12 Histopatología**

Los tejidos obtenidos de la necropsia fueron fijados en formol amortiguado al 10% durante 24 horas y posteriormente se procesaron para su inclusión en parafina. Se hicieron cortes seriados de 6  $\mu\text{m}$  de grosor de cada bloque de parafina, así como tinciones con hematoxilina/eosina para determinar las lesiones microscópicas de cada tejido.

### **5.13 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el modelo *t* de Student con muestras pareadas, haciendo uso del programa estadístico SPSS Statistics 17.0 y graficando con el programa Prism, y así poder determinar el momento en el que se presentaron diferencias significativas en las variables analizadas durante el experimento. El nivel de significancia utilizado fue de  $P < 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS**

Los 12 cerdos del grupo experimental fueron infectados con RVP, en tres de ellos no fue posible obtener el eyaculado desde días antes de la inoculación, por tal motivo quedaron fuera del experimento.

### **6.1 Signos clínicos**

Durante el monitoreo diario de los animales en la fase de adaptación y preinoculación no se registraron cambios en el estado físico general. Durante el periodo de infección se observaron alteraciones en las dimensiones testiculares a partir de la segunda semana de infección, la temperatura corporal y el estado físico de los animales permaneció normal durante toda la fase experimental.

### **6.2 Medición de las dimensiones testiculares**

El total de los animales presentó alteraciones testiculares a partir del día  $14.5 \pm 2.4$  de infección, dichas alteraciones consistieron en cambio de la longitud y diámetro testicular unilateral o bilateral. En algunos casos estos cambios no fueron claramente evidentes a la observación; el cerdo ID 5 presentó disminución notable en el diámetro y longitud de ambos testículos a partir de la quinta semana de infección y permaneció hasta el término del experimento (figura 1).

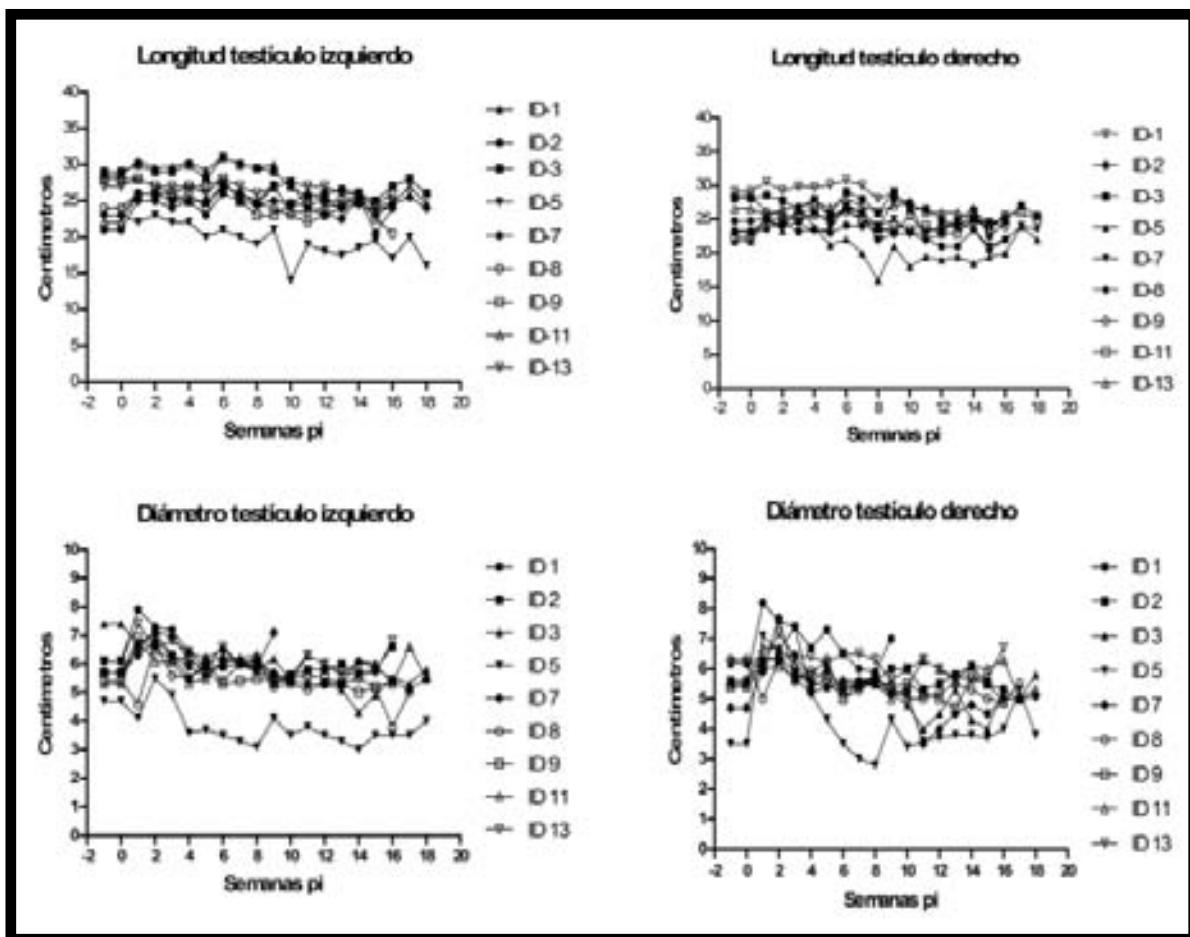


Figura 1. Cerdo ID 5. A. Antes de la inoculación con *Rubulavirus* porcino, B. Alteraciones testiculares en la quinta semana de infección.

En la gráfica 1, se re peresenta lon gitud y dí ametro testicula r se manal expresado en centímetros. Antes de la inoculación con RVP y hasta la primera semana post infección se

mantiene constante la longitud testicular, a partir de la segunda semana de infección se observó variación en las mediciones de testículo derecho e izquierdo. El diámetro testicular presentó cambios desde la primera semana de infección, principalmente en el testículo derecho. En ambos casos, diámetro y longitud, en el cerdo 5 se generó una mayor disminución de tamaño testicular.

### Dimensiones testiculares



Gráfica 1. Longitud y diámetro testicular izquierdo y derecho de cada animal registrado semanalmente y expresado en centímetros.

### 6.3 Palpación testicular

Se registraron alteraciones testiculares a la palpación, las cuales consistían en cabeza y/o cola del epidídimo con aumento de tamaño, ya sea unilateral o bilateralmente (cuadro 4). Los primeros cambios se observaron a partir del día 9 pi, en algunos cerdos se mantuvieron hasta por 110 días. El cerdo 11 registró aumento de tamaño en cola de epidídimo izquierdo y derecho hasta el día que fue sacrificado. De forma grupal, se presentaron las alteraciones en el día 14, en promedio.

El aumento tamaño de epidídimo se observó en 8 de los cerdos infectados. En el caso del animal 5 se dificultó la palpación debido a la reducción exagerada del tamaño testicular bilateral.

Cuadro 4. Alteraciones testiculares a la palpación en cerdos infectados con RVP

| <i>Cerdo</i> | <i>Alteraciones</i> |                 |   |
|--------------|---------------------|-----------------|---|
| <i>ID</i>    | <i>Inicio*</i>      | <i>Termino*</i> | <i>Ubicación</i>  |
| 1            | 9                   | 58              | Cabeza epidídimo izquierdo<br>Cabeza y cola epidídimo derecho |
| 2            | 15                  | 93              | Cabeza y cola epidídimo izquierdo                             |
| 3            | 14                  | 86              | Cola de ambos epidídimos                                      |
| 5            | 13                  | 25              | Cabeza y cola epidídimo derecho                               |
| 7            | 16                  | 65              | Cola ambos epidídimos   |
| 8            | 15                  | 86              | Cola ambos epidídimos   |
| 9            | 15                  | 93              | Cola ambos epidídimos   |
| 11           | 12                  | 114             | Cabeza ambos epidídimos                                       |
| 13           | 16                  | 86              | Cabeza y cola epidídimo izquierdo<br>Cola epidídimo derecho   |

\*dpi : días post infección

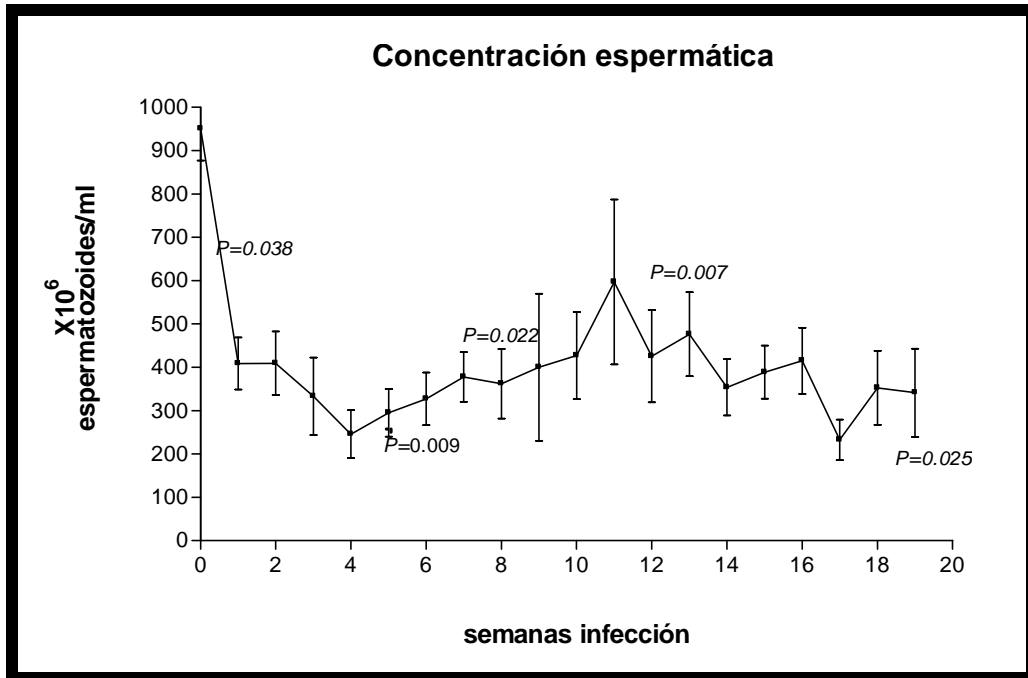
#### 6.4 Evaluación seminal



Se realizó la evaluación seminal de los eyaculados obtenidos de 9 animales, los 3 animales restantes no montaron sobre el potro durante el periodo de preinoculación. El total de muestras evaluadas fue de 219 eyaculados, previos a la inoculación  $n=36$  y  $n=183$  obtenidos durante la infección experimental con *Rubulavirus* porcino.

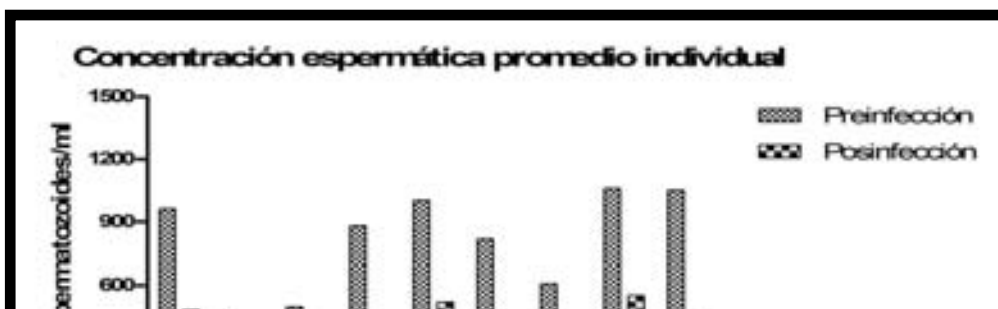
### *Concentración*

La concentración de espermatozoides en el eyaculado registró cambios estadísticamente significativos ( $P<0.05$ ) durante la fase de infección. Al hacer un análisis grupal y semanal se observó que de la semana cero a la semana uno de infección existió diferencia significativa ( $P=0.038$ ), de la semana cinco a la seis ( $P=0.009$ ), semana siete a ocho ( $P=0.022$ ), doce a trece ( $P=0.007$ ) y de la semana diecinueve a la veinte ( $P=0.025$ ). El cerdo que mostró menor concentración en el eyaculado fue el número 9, que en la semana cinco de infección registró  $55.0 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro. Durante la fase de infección se observó disminución en la concentración de los eyaculados, estos cambios surgieron al comparar el valor grupal de los cerdos semana a semana hasta finalizar el experimento (gráfica 2).



Gráfica 2. Concentración de células espermáticas en el eyaculado de cerdos infectados experimentalmente con RVP.

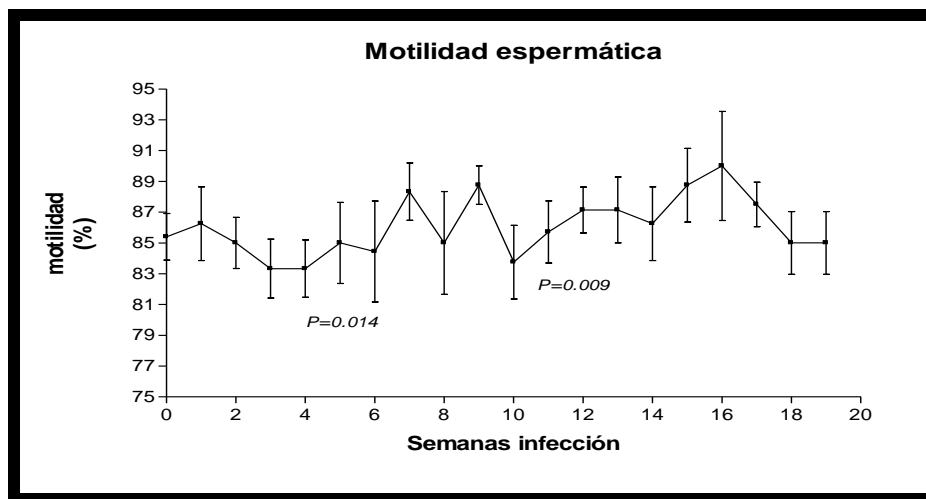
Al analizar la concentración de forma individual, en todos los cerdos existió una disminución en el número de espermatozoides por mililitro comparanda con la concentración promedio que registró cada uno de ellos antes de ser infectados con RVP (gráfica 3). El cerdo 5 y el número 9 son aquellos en los que se vió más afectada la concentración de células espermáticas en el eyaculado.



Gráfica 3. Comparación individual de la concentración espermática antes y durante la infección experimental con RVP.

### *Motilidad*

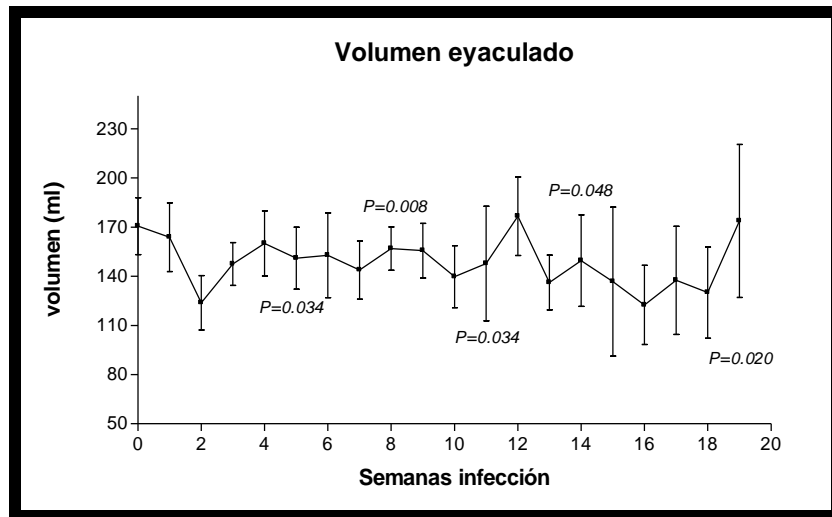
El porcentaje de motilidad en masa de los eyaculados evaluados tuvo cambios significativos ( $P < 0.05$ ) de la quinta a la sexta semana de infección ( $P=0.001$ ) y de la semana 13 a la semana 14 post infección ( $P=0.009$ ) (gráfica 4).



Gráfica 4. Evaluación de la motilidad espermática de los cerdos durante periodo previo y durante la infección con RVP.

### *Volumen*

El volumen de los eyaculados obtenidos constantemente mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de la semana cuatro a cinco ( $P = 0.034$ ), entre la siete y ocho ( $P = 0.008$ ), diez y once ( $P = 0.034$ ), de la trece a catorce ( $P = 0.048$ ) y finalmente de la semana dieciocho a la semana diecinueve de infección ( $P = 0.020$ ) (gráfica 5).



Gráfica 5. Evaluación semanal del volumen del eyaculado durante la fase previa y durante la infección experimental de cerdos con RVP.

## 6.5 Serología

Se obtuvieron un total de 172 muestras ( $n = 172$ ),  $n = 18$  en la fase preinfección y  $n = 154$  después de infectar a los cerdos con *Rubulavirus* porcino.

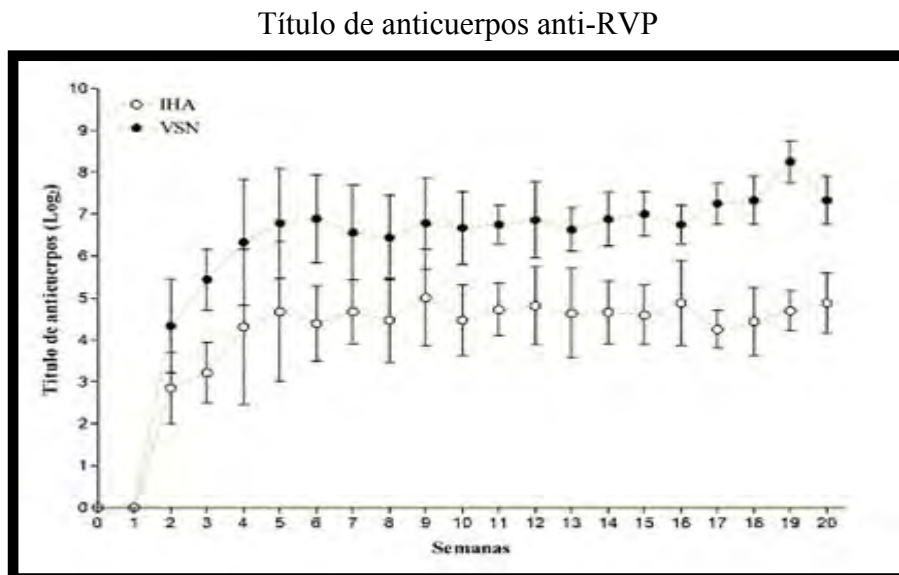
### *Inhibición de la hemoaglutinación*

Las muestras de los 9 cerdos resultaron negativas antes de la inoculación y permanecieron así hasta la segunda semana de infección con un título promedio de 8 hasta 32 unidades de

anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y fueron aumentando hasta la quinta semana, a partir de la cual el título promedio permaneció constante hasta el término del experimento. Los valores se expresan en logaritmo base 2 (figura 7).

### Seroneutralización

Los cerdos presentaron anticuerpos neutralizantes para el *Rubulavirus* porcino a partir de la segunda semana, al igual que en la prueba de IHA, los cuales continuaron aumentando hasta la sexta semana y permanecieron constantes durante el resto del experimento. Los valores se expresan en logaritmo base 2 (gráfica 6).



Gráfica 6. Comparación de los títulos obtenidos semanalmente por inhibición de la hemoaglutinación y virus suero neutralización en cerdos infectados con RVP.

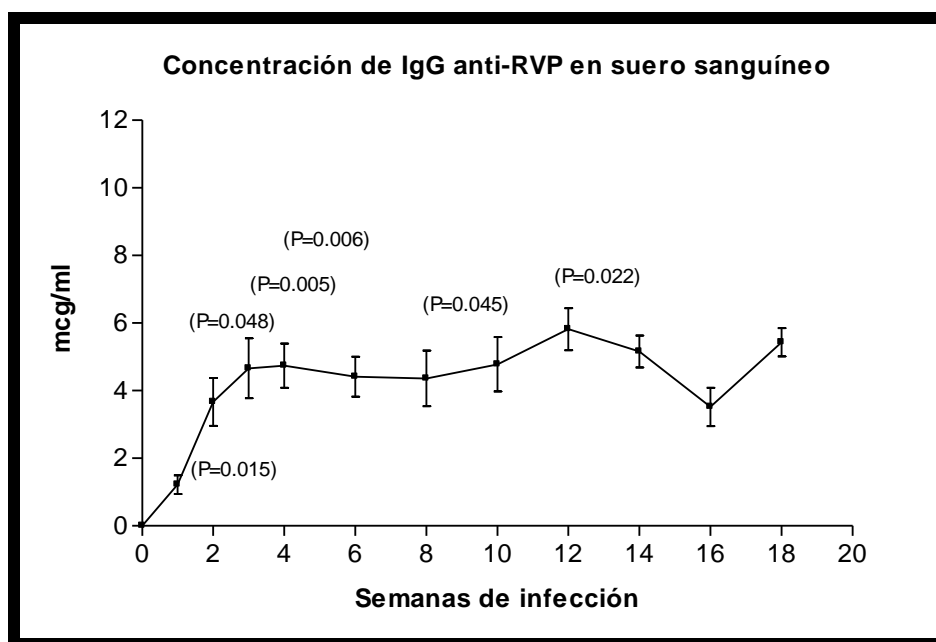
### 6.6 Inmunoensayo enzimático

La concentración viral que fue utilizada en la sensibilización de las microplacas para la prueba de ELISA tiene un título de  $10^{3.09}$  DICC<sub>50%</sub>, una concentración de proteínas de 1.3 µg en 100 µ y 8 UHA.

### Concentración de anticuerpos anti-RVP en suero sanguíneo

Las diluciones empleadas para la cuantificación de IgG anti-RVP en suero fueron 1:25, 1:50 y 1:100, con las cuales fue posible obtener la cantidad de  $\mu\text{g/ml}$  con respecto a la curva para la cuantificación. Las muestras se analizaron semanalmente durante la fase previa y hasta la semana cuatro de infección, posteriormente se analizaron quincenalmente hasta la finalización de la fase experimental (semana 20). No se encontraron anticuerpos anti-RVP durante el periodo previo a la infección.

A partir de la primera semana de infección se presentaron anticuerpos anti-RVP y existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las semanas dos ( $P = 0.01$ ), tres ( $P = 0.048$ ), cuatro ( $P = 0.005$ ), seis ( $P = 0.006$ ), diez ( $P = 0.045$ ) y catorce ( $P = 0.022$ ); durante estas semanas de infección se presentó aumento progresivo en la concentración de IgG anti-RVP con respecto a la semana anterior (gráfica 7).



Gráfica 7. Cuantificación de IgG anti-RVP en cerdos infectados experimentalmente.

## 6.7 Concentración de anticuerpos en plasma seminal

Las muestras de plasma seminal se analizaron quincenalmente durante el experimento.

### *Inmunoglobulinas presentes en plasma seminal*

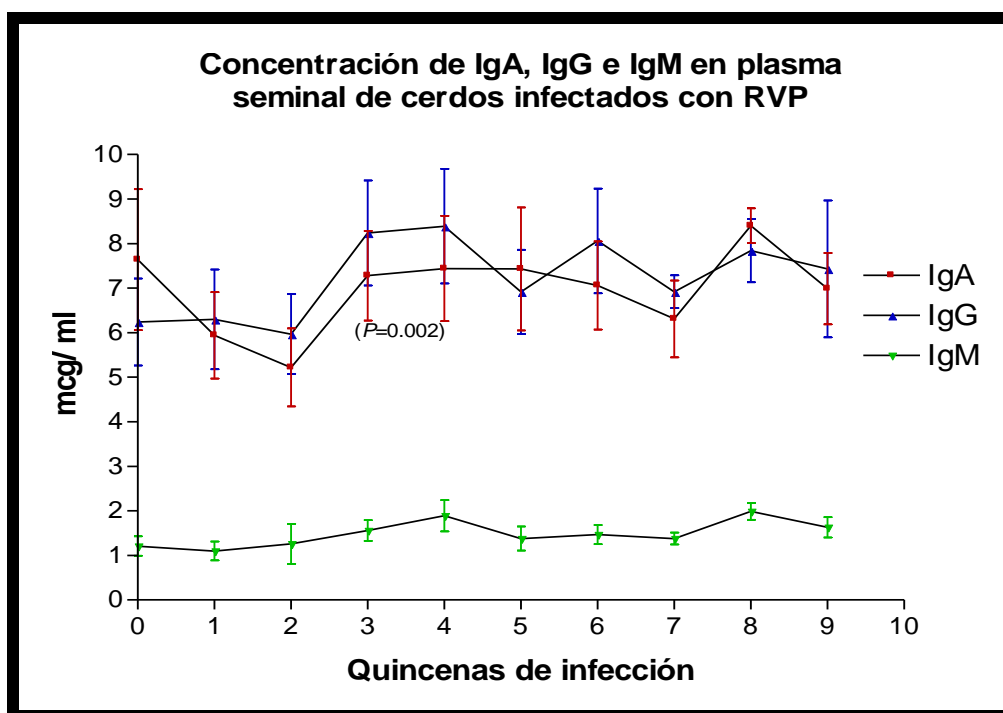
Las diluciones de las muestras, anticuerpos conjugados a peroxidasa y rango de diluciones empleadas en las curvas para cada isotipo analizado se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Diluciones empleadas para la cuantificación de inmunoglobulinas en plasma seminal

| ELISA sandwich             | IgA                   | IgG                   | IgM                   |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Curva Estándar             | 1000 a 15.62<br>ng/ml | 1000 a 15.62<br>ng/ml | 1000 a 15.62<br>ng/ml |
| Dilución plasma<br>seminal | 1:4                   | 1:20                  | 1:2                   |
|                            | 1:8                   | 1:40                  | 1:4                   |
|                            | 1:16                  | 1:80                  | 1:8                   |
| Dilución anticuerpo<br>HRP | 1:75 000              | 1: 50 000             | 1:50 000              |

Los resultados obtenidos muestran que hasta antes de la infección, el isotipo predominante fue IgA  $7.64 \mu\text{g/ml} \pm 4.75$ , en la primera y segunda quincena de infección disminuyó su concentración ( $5.58 \mu\text{g/ml}$ ), y en la tercera quincena se observaron concentraciones similares a la quincena cero, generando cambios significativos ( $P < 0.05$ ) con respecto a la quincena anterior ( $P = 0.002$ ); en el caso de IgG  $6.24 \pm 2.93 \mu\text{g/ml}$  con cambios a lo largo

del experimento pero no estadísticamente significativos. Durante la fase previa y de infección IgM mantuvo una concentración promedio de  $1.5 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ , siendo el isotipo de menor abundancia en plasma seminal (gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación de la cantidad de IgA, IgG e IgM presentes en plasma seminal de cerdos infectados experimentalmente con RVP.

#### *Inmunoglobulinas anti-RVP en plasma seminal*

Las diluciones realizadas de la muestra fueron cero hasta 1:4. El isotipo IgA anti-RVP estuvo presente en la quincena tres ( $0.013 \mu\text{g/ml}$ ) y seis ( $0.003 \mu\text{g/ml}$ ) en sólo un cerdo (ID 8). Únicamente uno de los cerdos (ID 5) mostró concentraciones bajas de IgG anti-RVP en las quincenas dos ( $0.150 \mu\text{g/ml}$ ), tres ( $0.062 \mu\text{g/ml}$ ), cuatro ( $0.017 \mu\text{g/ml}$ ), cinco ( $0.008 \mu\text{g/ml}$ ), seis ( $0.008 \mu\text{g/ml}$ ) y siete ( $0.006 \mu\text{g/ml}$ ). El total de cerdos en experimentación no registró anticuerpos IgM anti-RVP en plasmas, antes y durante la infección.



## 6.8 Sacrificio y Necropsia

Los doce cerdos con los que inició el experimento fueron sacrificados en diferentes tiempos de infección agrupándolos en tres grupos. En el primer grupo que se sacrificó se incluyeron los tres cerdos de los cuales no fue posible obtener eyaculado desde la fase previa a la infección. En los distintos tiempos de infección en los que se realizó el sacrificio se observaron lesiones a la necropsia que consistían en formación de nódulos en cabeza y cola de epidídimo, líquido seroso en túnica albugínea y exagerada disminución del tamaño testicular (cuadro 6).

Cuadro 6. Registro de las lesiones observadas a la necropsia

| Grupo | *Dpi | Cerdos con lesión (**ID) | Lugar de la lesión  | Tipo de lesión                     |
|-------|------|--------------------------|---|------------------------------------|
| 1     | 58   | 1 (1)                    | Cabeza de epidídimo izq.                                  | Nódulo                             |
| 2     | 110  | 1 (2)                    | Túnica<br>Cola de epidídimo izq.<br>Cabeza epidídimo izq. | Líquido seroso<br>Nódulo<br>Nódulo |
| 3     | 142  | 1 (5)                    | Testículo izquierdo                                       | Disminución de tamaño              |

\*Días post infección

\*\* Identificación del animal

## 6.9 Histopatología

El análisis histológico del tracto reproductor de los cerdos infectados confirma que los animales cursaron por un proceso inflamatorio con degeneración epitelial y zonas con reparación del tejido afectado, en testículo, cabeza y cola de epidídimo.

En los cortes histológicos de testículo se observaron lesiones como degeneración y ruptura de túbulos ( ID 2, 7, 9 y 13), infiltrado mononuclear ( ID 3, 5, 9 y 13) cambios estructurales en células intersticiales ( ID 5 y 13), degeneración de túbulos seminíferos con formación de vacuolas ( ID 3, 5 y 9), fibrosis con proliferación de fibroblastos ( ID 5), células multinucleadas intraluminales ( ID 5 y 9) . Las lesiones microscópicas se observaron de forma unilateral y/o bilateralmente (cuadro 7, figura 2).

Las lesiones observadas en cabeza de epidídimo consistieron en desepitelización ( ID 3, 5 y 12), zonas de cicatrización con tejido conjuntivo dispuesto irregularmente ( ID 2 y 12), pérdida de esterocilios ( ID 3), degeneración y ruptura de túbulos ( ID 2 y 12), fagocitosis de espermatozoides y ausencia de células espermáticas ( ID 12). Uno de los cerdos presentó pérdida total de la estructura y organización en cabeza de epidídimo izquierdo ( ID 2) (figura 11). A nivel de cola de epidídimo se observó desepitelización con fibrosis ( ID 3 y 5), extravasación organizada de espermatozoides acompañada de masas intersticiales de leucocitos ( ID 2 y 3), vesículas de citoplasma en luz tubular ( ID 3, 5 y 9), ausencia de espermatozoides ( ID 9), espermatozoides intravasculares ( ID 5), necrosis focal de células intersticiales ( ID 5), infiltrado mononuclear ( ID 3). Las lesiones encontradas en epidídimo únicamente se presentaron de forma unilateral en todos los animales (cuadro 7, figura 3).

En glándulas accesorias, se observó aumento de vascularización en glándula seminal ( ID 9) y degeneración epitelial ligera (ID 5); en próstata infiltrado con eosinófilos desgranulados “oesinofilia” y microhemorragia ( ID 12), focos necróticos ( ID 9) (cuadro 8, figura 4).

Cuadro 7. Lesiones histológicas en testículo y epidídimo de cerdos infectados experimentalmente con RVP.

| <b>Lesión</b>   | <b>1</b>  | <b>2</b>              | <b>3</b>              | <b>5</b>              | <b>7</b>              | <b>8</b>              | <b>9</b>              | <b>11</b>             | <b>12</b>    | <b>13</b>             |
|---|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|
| <b>Días de infección al sacrificio</b>  | <b>58</b> | <b>11</b><br><b>0</b> | <b>11</b><br><b>0</b> | <b>14</b><br><b>2</b> | <b>14</b><br><b>2</b> | <b>11</b><br><b>0</b> | <b>14</b><br><b>2</b> | <b>14</b><br><b>2</b> | <b>58</b>    | <b>11</b><br><b>0</b> |
| <b>Testículo</b>  |           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |              |                       |
| Degeneración y ruptura tubular  |           |                       |                       |                       | +D<br>+I              | +I                    | +I                    |                       |              | +<br>D                |
| Infiltrado mononuclear en mediastino y periarteriolar                         |           | +I                    | +I                    | +I                    |                       |                       | +<br>D<br>+I          |                       |              | +<br>D                |
| Cambios estructurales en células intersticiales semejando células plasmáticas |           |                       |                       | +<br>D                |                       |                       |                       |                       |              | +<br>D                |
| Degeneración vacuolar en tubulos seminíferos                                  |           |                       | +I                    | +<br>D                |                       |                       | +<br>D                |                       |              |                       |
| Fibrosis (presencia de fibroblastos)  | +I        | +I                    |                       | +<br>D                |                       | +I                    |                       |                       |              |                       |
| Células multinucleadas intralunimal   |           |                       |                       | +I                    |                       |                       | +I                    |                       |              |                       |
| <b>Epidídimo</b>  |           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |              |                       |
| <i>Cabeza de epidídimo</i>  |           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |              |                       |
| Desepitelización con fibrosis   | +I        |                       | +<br>D                | +<br>D                |                       |                       |                       | +<br>D                | +<br>D<br>+I |                       |
| Tejido conjuntivo dispuesto irregularmente (cicatrización)                    |           | +I                    |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +<br>D       |                       |
| Pérdida de estereocilios  |           | +I                    | +<br>D                |                       |                       |                       |                       |                       |              |                       |
| Degeneración tubular : ruptura  |           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +<br>D       |                       |
| Proceso inflamatorio  | +I        |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +<br>D       |                       |
| Fagocitosis de espermatozoides  |           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +<br>D       |                       |

|  |  |        |              |        |  |  |    |    |  |  |
|--|--|--------|--------------|--------|--|--|----|----|--|--|
| Ausencia de espermatozoides  |  |        |              | +<br>D |  |  |    |    |  |  |
| <b><i>Cola de epidídimo</i></b>  |  |        |              |        |  |  |    |    |  |  |
| Desepitelización con fibrosis  |  |        | +<br>D<br>+I | +<br>D |  |  |    | +I |  |  |
| Extravasación organizada de espermatozoides acompañada de masas intersticiales de leucocitos |  | +<br>D | +I           |        |  |  |    |    |  |  |
| Proceso inflamatorio   |  |        |              | +<br>D |  |  |    |    |  |  |
| Fagocitosis de espermatozoides   |  |        |              |        |  |  |    |    |  |  |
| Vesículas de citoplasma en luz tubular   |  |        | +I           | +<br>D |  |  | +I |    |  |  |
| Ausencia de espermatozoides  |  |        |              |        |  |  | +I |    |  |  |
| Espermatozoides intravasculares  |  |        |              | +<br>D |  |  |    |    |  |  |
| Necrosis focal de células intersticiales   |  |        |              | +<br>D |  |  |    |    |  |  |
| Infiltrado mononuclear   |  |        | +<br>D       |        |  |  |    |    |  |  |

+ D: lesión presente en lado derecho.

+ I: lesión presente en lado izquierdo.

Cuadro 8. Lesiones histológicas en glándulas accesorias de cerdos infectados experimentalmente con RVP.

| Lesión   | 1         | 2          | 3          | 5          | 7          | 8          | 9          | 11         | 12        | 13         |
|--|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| <b>Días de infección al sacrificio</b>                 | <b>58</b> | <b>110</b> | <b>110</b> | <b>142</b> | <b>142</b> | <b>110</b> | <b>142</b> | <b>142</b> | <b>58</b> | <b>110</b> |
| <b>Glándula seminal</b>                                |           |            |            |            |            |            |            |            |           |            |
| Aumento de vascularización                             |           |            |            |            |            |            | +          |            |           |            |
| Degeneración epitelial                                 |           |            |            | +          |            |            |            |            |           |            |
| <b>Próstata</b>  |           |            |            |            |            |            |            |            |           |            |
| Infiltrado con eosinófilos desgranulados "eosinofilia" |           |            |            |            |            |            |            |            | +         |            |
| Microhemorragia  |           |            |            |            |            |            |            |            | +         |            |
| Focos necróticos                                       |           |            |            |            |            |            | +          |            |           |            |

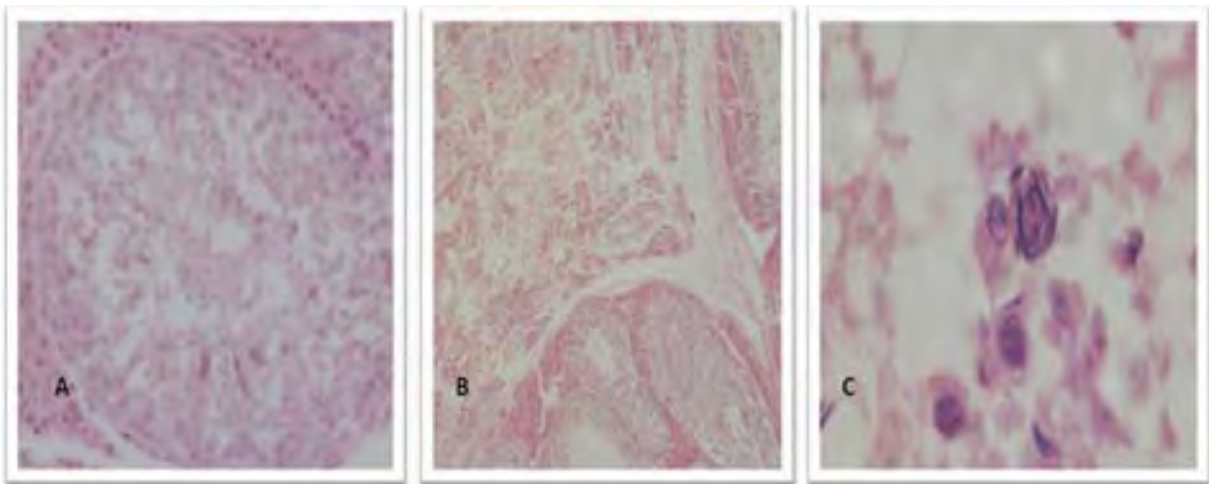


Figura 2. Testículo. A. testículo normal, B. pérdida de la estructura tubular, C. fagocitosis de espermatozoides.

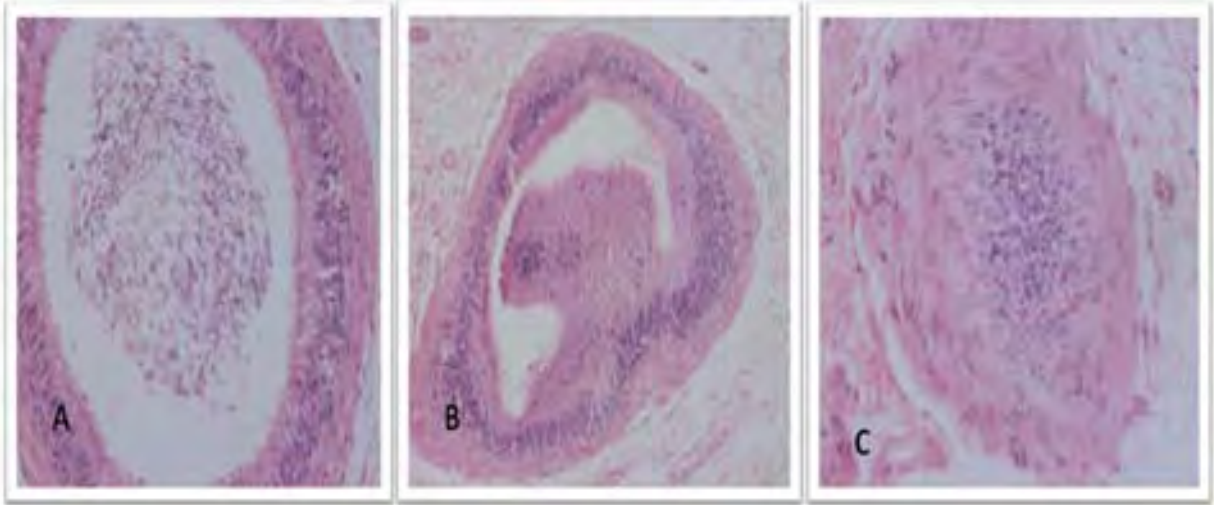


Figura 3. Cabeza de epidídimo de cerdo. A. epidídimo normal, B. vesículas de citoplasma secretadas intratubular y exfoliación exagerada del epitelio, C. degeneración tubular.

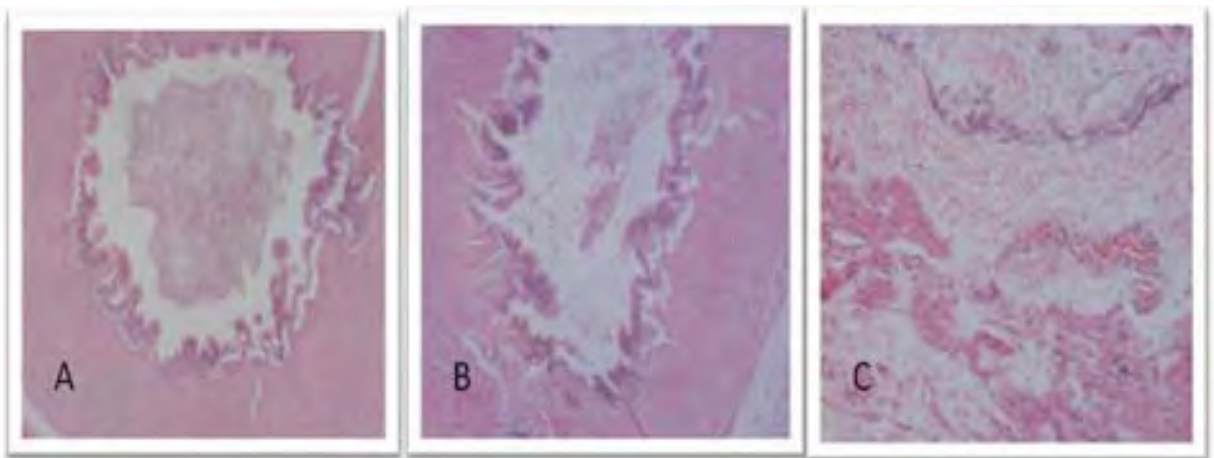


Figura 4. Cola de epidídimo de cerdo. A. epidídimo normal, B. desprendimiento epitelial, C. degeneración tubular e infiltrado mononuclear.

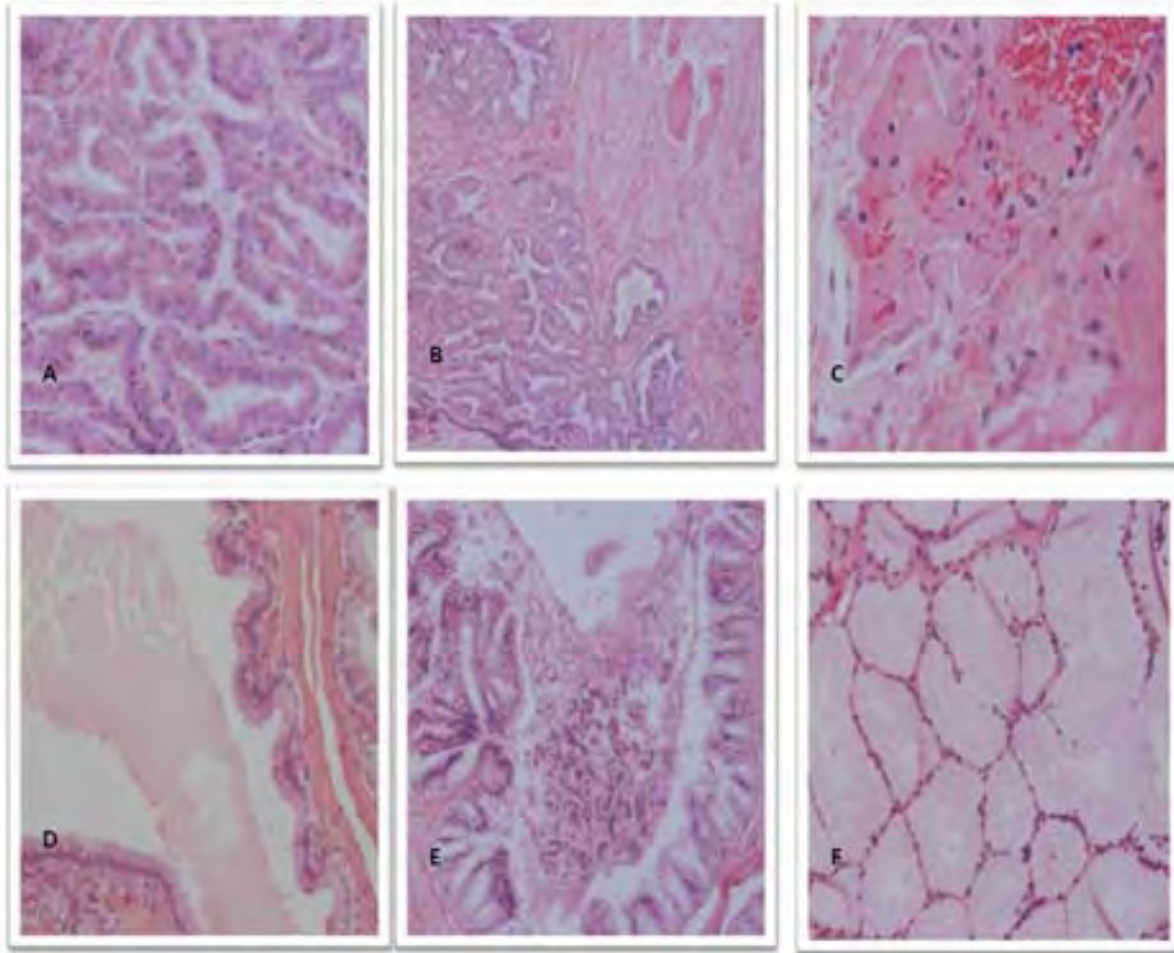


Figura 5. Glándulas accesorias. A. Próstata normal, B. fibrosis, C. hemorragia con infiltrado mononuclear, D. Bulbouretral, E. desorganización estructural del epitelio, F. vesícula seminal normal.

## VII. DISCUSIÓN

La enfermedad de Ojo Azul en cerdos machos adultos se caracteriza por la presencia de signos clínicos inapresiables como son anorexia transitoria y fiebre (Ramírez, 1997; Ramírez *et al.*,1999), aunque en ocasiones y como ocurrió en este estudio, los cerdos infectados pueden no presentar manifestaciones clínicas, propiciando que sea difícil identificar la presencia de la enfermedad en condiciones normales de granja.

Uno de los indicadores para la detección de verracos infectados con RVP son las alteraciones que se presentan a nivel testicular, la cuales consisten en cambios de longitud y diámetro unilateral o bilateralmente. En este caso, el total de los animales en experimentación mostraron notables cambios en testículo alrededor del día 14 de infección.

Se ha reportado que el cambio en las dimensiones testiculares es muy evidente en la mayoría de los animales infectados, sin embargo, estas alteraciones no se han asociado con disminución o pérdida de libido (Ramírez, 1997). En este experimento se observaron cambios macroscopicos en testículo que permanecieron por largos periodos de tiempo, hasta 142 días y en algunos casos las alteraciones llegaron a desaparecer, sin alteraciones en el libido de los animales.

En la evaluación seminal se registraron cambios significativos durante la fase de infección. El análisis grupal de la concentración espermática demuestra diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) que consisten en una baja de la concentración en la semana cero a uno y de la semana cinco a seis, con un amento significativo en la semana 11 a 12 que nuevamente en la última semana de infección disminuye, quedando por debajo de la semana cero. El cerdo ID 9 es aquel que registra la menor cantidad de células espermáticas en el eyaculado durante la fase de inoculación, este mismo cerdo tuvo aumento de tamaño en cola de epidídimo bilateralmente apartir del día 15 hasta el día 93 de infección. Al comparar esta misma variable pero de forma individual para cada uno de los cerdos se observa que en los nueve animales disminuyó el promedio de la concentración espermática.

La motilidad espermática en masa tuvo cambos significativos en la semana cinco a seis y de la trece a catorce, el primer punto en donde disminuye la concentración espermática



grupal coincide con la baja en el porcentaje de motilidad en masa (semana cinco a seis de infección). En cuanto a la evaluación grupal del volumen del eyaculado se registraron cambios en las semanas cinco, ocho, once, catorce y dieciocho; la variabilidad en la medición del volumen del eyaculado esta presente aun en condiciones normales de salud de los animales. Por lo tanto no se puede atribuir a los efectos de la infección con RVP.

En estudios previos se ha reportado que la inoculación con RVP en cerdos machos en edad adulta genera daños principalmente en epidídimo y testículo de cerdos que han sido sacrificados entre los 15 y 80 días de infección, asociándose con reducción de la concentración espermática y motilidad (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 1999; Rivera-Benítez, 2009). Las lesiones inflamatorias del testículo y epidídimo (orquitis y epididimitis) en el cerdo, aparecen como consecuencia de infecciones específicas. Un análisis comparativo de secuencias del gen M del virus LPM indican que existe un 46 % de homología en la secuencia de aminoácidos y 55 % en los niveles de nucleótidos con el virus de las paperas en humanos. Ambos virus causan una enfermedad similar en el hospedero correspondiente, LPMV en los cerdos y MuV en humanos, los cuales se caracterizan por generar desordenes en sistema nervioso central y órganos reproductivos (Linné *et al.*, 1992 ; Sundqvist *et al.*, 1992). En los hombres adultos infectados con el virus de la parotiditis una de las complicaciones comunes es la orquitis presentandose en el 20% de la población de hombres infectados, usualmente solo uno de los testículos es afectado, pero se presentan afecciones bilaterales entre 15 y 30% de los pacientes, generando una baja en la fertilidad (Gupta *et al.*, 2005). En base a los resultados obtenidos en este estudio, podemos decir que los cerdos infectados tuvieron un comportamiento similar al reportado por otros autores, tanto para el *Rubulavirus* porcino, como para el virus de la parotiditis humana.

En los cerdos como en todos los vertebrados la respuesta inmune es el mejor mecanismo de defensa contra la presencia de agentes patógenos. El cerdo posee cuatro clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE. Los anticuerpos antivirales contribuyen con la eliminación del virus, mediante el bloqueo de las proteínas virales que reconocen los receptores en las células susceptibles. Virus cubiertos con anticuerpos pueden bloquear la interacción de estos con sus receptores celulares, al mismo tiempo la deposición de

anticuerpos sobre la superficie de las células infectadas puede evitar la liberación de los viriones. Al inicio de la infección se establece una respuesta primaria con predominación de anticuerpos IgM, posteriormente cuando esta respuesta declina, ocurre el cambio de isotipo IgG alrededor de la segunda semana de infección (Biron *et al.*, 1999; Cuevas *et al.*, 2006).

La respuesta inmune en cerdos adultos infectados experimentalmente con el RVP, indican que este virus durante la fase aguda de la infección es capaz de estimular una respuesta humoral inmunodominante hacia la proteína de superficie hemaglutinina, desde la segunda semana pi (Hernández J. *et al.*, 1998; Cuevas *et al.*, 2006). Por lo tanto, uno de los métodos más comunmente empleados para la medición de la respuesta humoral en cerdos con enfermedad de Ojo Azul, es la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, mediante la cual se pudo determinar que los nueve cerdos en experimentación seroconvirtieron a partir de la segunda semana de infección, estos títulos continúan aumentando hasta la quinta semana, a partir de la cual permanecen constantes hasta la semana veinte que tuvo de duración el periodo de infección, en esta misma semana se presentó el segundo cambio significativo en la concentración y el primer cambio en la motilidad espermática. En relación con otros autores, se ha reportado que los cerdos infectados experimentalmente con RVP presentan anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación después de la segunda semana o alrededor del día 16 pi. (Ramírez, 1997; Hernández J. *et al.*, 1998; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004).

Además de la técnica de Inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Ojo Azul, existen pruebas como inmunofluorescencia, seroneutralización e inmunoensayo enzimático (CONASA, 1995; Martínez-Lara *et al.*, 2008).

Mediante la prueba de seroneutralización se pudieron encontrar anticuerpos neutralizantes a partir de la segunda semana que continúan aumentando hasta la semana sexta, después de la cual los valores permanecen constantes. Se ha demostrado que los títulos más elevados en las técnicas de IH y SN se presentan después de la formación de granulomas en la tercera y cuarta semana; estos anticuerpos son detectables por largos periodos de tiempo después de la infección, como ocurre con el virus de la parotiditis humana. Hallazgos similares se han observado en cerdos infectados naturalmente, los cuales mantienen una respuesta humoral hasta 13 meses después de la primoinfección. Esta respuesta probablemente está asociada

con la persistencia del virus (Cuevas, 2002), debido a que la infección por *Rubulavirus porcino* es capaz de establecer un estado de persistencia al igual que otros miembros del género *Paramixovirus* (Linné *et al.*, 1992).

Actualmente, para el diagnóstico de la enfermedad de Ojo Azul, también se hace uso de la prueba de ELISA, el desarrollo de una ELISA indirecta de tipo cuantitativa es una herramienta útil para el diagnóstico de esta enfermedad, dentro de las ventajas que encontramos en la técnica consideramos alta sensibilidad, no uso de virus activo, bajo costo de producción, generación de resultados en corto tiempo. Por estas características esta técnica pudiera utilizarse en el posible caso de que este padecimiento de los cerdos fuera una enfermedad de campaña, dicha idea ha sido considerada en las reuniones de CONASA y se ha contemplado la importación de kits de ELISA que son elaborados por los suecos. La diferencia consiste en hacer uso de virus completo, detectando así anticuerpos contra más de una proteína viral, además de ser una técnica cuantitativa (Comunicación personal, Ramírez-Mendoza H).

Algunos autores han hecho uso de ELISA de bloqueo o han desarrollado un ELISA indirecto cualitativo detectando anticuerpos anti-RVP séricos (Nordengrahn *et al.*, 1999; Cuevas, 2002; Reyes-Leyva *et al.*, 2004). A través de la elaboración de ELISA indirecta cuantitativa se encontró que en todos los animales a partir de la primera semana de infección se presentan anticuerpos anti-RVP y existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las semanas dos, tercera, cuarta, sexta, décima y décimo cuarta; durante estas semanas de infección se presentó aumento progresivo en la concentración de IgG anti-RVP con respecto a la semana anterior. Reyes-Leyva *et al.*, 2004, reporta la presencia de anticuerpos desde el día 4 pi, en nuestro estudio no podemos comparar este resultado, ya el primer muestreo pi se realizó el día 7 de infección.

La información que existe sobre la respuesta inmune, especialmente de tipo humoral en el tracto reproductor del cerdo es limitada, su importancia reside en la existencia de enfermedades que afectan como órgano blanco el tracto reproductor, además de que estas pueden ser transmitidas a través del semen, como es el caso de PRRSV y RVP (Kaiser *et al.*, 2000; Solís *et al.*, 2007; Rivera-Benítez, 2009). Para conocer cuales son los cambios

generados por el RVP y que se expresan en el semen, se cuantificó la concentración de IgA, IgG e IgM no específicos y posteriormente los isotipos IgA, IgG e IgM anti-RVP.

IgA fue el isotipo de mayor abundancia (7.64  $\mu\text{g/ml}$  en la quincena previa a la infección), disminuyendo significativamente en la primera y segunda quincena de infección, en la tercera quincena los valores se normalizaron siendo equivalentes a los resgistrados en la quincena cero. IgG (6.24  $\mu\text{g/ml}$ ) se mantiene sin cambios significativos a lo largo del experimento, IgM fue el isotipo de menor abundancia en plasma seminal (1.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Con estos resultados diferimos sobre lo reportado por Kaiser *et al.*, 2000, quienes reportan mayor concentración de IgG (23.2  $\mu\text{g/ml}$ ) seguido por IgA (4.8  $\mu\text{g/ml}$ ) e IgM (3.7  $\mu\text{g/ml}$ ).

En el caso del humano, el isotipo predominante en secreciones externas como es el tracto intestinal, saliva, lágrimas y leche es el isotipo IgA, pero en semen y secreciones cervicovaginales predominantemente esta IgG. Varios autores reportan que los hombres infectados con HIV-1 tienen predominio de IgG específicos (Mestecky, 2007), pero la presencia de IgA específica es controversial.

Unicamente el cerdo ID 8 presentó IgA anti-RVP en la quincena tres y seis, con concentraciones mínimas. El cerdo ID 5 mostró concentraciones bajas de IgG anti-RVP en las quincenas dos a la siete, asociado a una disminución exagerada del tamaño testicular y de la concentración espermática. El total de cerdos en experimentación no presentó anticuerpos IgM anti-RVP en plasma seminal, antes y durante la infección. Oleksiewicz *et al.*, 2001, reportan IgA anti-PRRSV en semen de cerdo infectado con este virus, en su estudio proponen que este método puede ser importante para el diagnóstico, los 5 cerdos infectados con PRRSV excretaron anticuerpos específicos en el semen, dos de ellos desde el día 14-17 pi, sin embargo no todos reconocen el mismo péptido viral.

En el hombre, existen diversos factores que pueden ocasionar afecciones en el tracto reproductor masculino, algunos de ellos son de origen viral, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la parotiditis humana.

En hombres infectados con VIH se reportan anomalías en los órganos reproductores accesorios y en el epitelio seminífero, incluyendo inflamación y destrucción de células germinales con fibrosis y hialinización. Estas alteraciones del sistema reproductor se ven

reflejadas en un decremento de los parámetros del semen: porcentaje de motilidad, morfología normal y leucospermia, entre otros. El decremento en la calidad del semen se atribuye directamente a la infección del tracto reproductor con el VIH, efectos hormonales (Chan *et al.*,2002), en el caso de los cerdos machos adultos infectados con el *Rubulavirus* porcino no se ve afectado el perfil hormonal (Ramírez, 1997) y no se ha reportado leucospermia.

El virus de la parotiditis humana causa en el hombre efectos semenjantes a los causados por el *Rubulavirus* porcino en los cerdos machos adultos infectados. Epidídimo-orquitis se presenta en el 15 al 30% de los hombres con paperas, en los cuales ambos testículos son afectados hasta por varias semanas, dando como consecuencia infertilidad en el hombre. En más de la mitad de estos pacientes se genera disminución del tamaño testicular, además de baja en la concentración espermática, mayor presencia de anomalías en células espermáticas y decremento de la motilidad en el 25% de los pacientes. La influencia de la orquitis, producida por el virus de las paperas, sobre el funcionamiento endocrino de los testículos es controversial, ya que puede o no ser afectado el perfil hormonal (Hviid *et al.*, 2008).

Las lesiones a la necropsia estuvieron localizadas únicamente en testículo y epidídimo, permaneciendo el resto de los órganos con apariencia normal. En los tres tiempos de sacrificio se observaron lesiones como nódulos en cabeza de epidídimo izquierdo en el cerdo ID 1 sacrificado a los 58 dpi, líquido seroso en túnica vaginal del testículo, nódulo en cabeza y cola de epidídimo izquierdo a los 110 dpi en el cerdo ID 2 y disminución exagerada del tamaño testicular en el cerdo ID 5 a los 142 dpi. En procesos naturales de infección con RVP, la entrada del agente es por vía oronasal, diseminándose a diferentes órganos dependiendo de la edad del cerdo, esto debido a los cambios conformacionales del ácido siálico en los tejidos (Stephano *et al.*, 1988; Ramírez, 1997; Ramírez-Mendoza *et al.*,1997; Reyes- Leyva *et al.*,1997; Cuevas, 2002), es por ello que en cerdos machos adultos el órgano diana es el tracto reproductor.

Las alteraciones histopatológicas se observaron en los cerdos de los tres grupos de sacrificio, 58, 110 y 142 días postinfección. El primer grupo de animales sacrificados a los 58 días de infección presentaron alteraciones como fibrosis con presencia de

fibroblastos en testículo ; desepitelización con fibrosis, áreas de tejido conjuntivo dispuestas irregularmente, lo que supone un proceso de cicatrización, ruptura de los conductos epididimarios, proceso inflamatorio y fagocitosis de espermatozoides en cabeza de epidídimo; cola de epidídimo no registró ninguna alteración, cabe mencionar que los cerdos sacrificados en el primer grupo son aquellos de los que no se obtuvo muestra de semen y el cerdo uno que mostró, desde el día 9 de infección y hasta la necropsia, aumento de tamaño en cabeza de epidídimo izquierdo y cola bilateralmente; no se identificaron anti-RVP en el semen.

En el segundo grupo de sacrificio, 110 días, las alteraciones consistieron en infiltrado mononuclear, abundante fibrosis, pérdida de la estructura tubular testicular, aunque no existe ninguna tendencia hacia alguno de los lados, izquierdo y derecho; a nivel de epidídimo se observan áreas de cicatrización con tejido conjuntivo dispuesto irregularmente, pérdida de estereocilios en cabeza, en cola de epidídimo se observó extravasación organizada de espermatozoides acompañada de masas intersticiales de leucocitos, vesículas de citoplasma en luz tubular e infiltrado mononuclear. Dentro de este grupo se encontró el cerdo dos, el cual presentó lesiones macroscópicas desde el día 15 dpi y microscópicas más graves, líquido en túnica vaginal y nódulos en cabeza y cola de epidídimo izquierdo, el análisis histopatológico demostró la pérdida total de las estructuras que conforman el epidídimo izquierdo. En el cerdo 8, que también pertenece al segundo grupo de sacrificio, se registró la presencia de pequeñas cantidades de IgA anti-RVP en semen, aun cuando las lesiones no fueron tan graves como las del cerdo 2 que no generó inmunoglobulinas específicas en semen.

Los cerdos sacrificados a 142 dpi presentaron infiltrado mononuclear, cambios estructurales en células intersticiales, degeneración vacuolar, fibrosis y células multinucleadas, siendo el cerdo cinco el que presentó todas estas lesiones y reducción marcada en el tamaño testicular, además de IgG en semen en diferentes quincenas de infección. En epidídimo se observó desepitelización con fibrosis, ausencia de espermatozoides, extravasación organizada de espermatozoides y vesículas de citoplasma en luz tubular.

Estudios previos han demostrado que la inflamación en cabeza de epidídimo se desarrolla en el total de los cerdos infectados alrededor del día 15 pi, lo cual ocurrió de la misma forma en este estudio. Aproximadamente una semana después se observan cambios significativos en la concentración y motilidad del eyaculado; el volumen no presenta cambios atribuidos a la infección con RVP, esto debido a que las glándulas accesorias encargadas de la producción de la fase líquida del eyaculado no han presentado alteraciones en estudios previos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). Sin embargo, en este estudio se observó que el cerdo 5 y 9 sacrificados a los 142 dpi presentaron degeneración epitelial y aumento de vascularización en glándula seminal, respectivamente, además focos necróticos en próstata. En el cerdo 12, sacrificado a los 58 dpi y siendo uno de los que no fue posible obtener el eyaculado, se presentó infiltrado con eosinófilos desgranulados y microhemorragia.

Por lo tanto, se identificaron y cuantificaron anticuerpos IgA, IgG anti-RVP en plasma seminal de cerdos infectados experimentalmente con RVP.

La inoculación experimental con RVP en cerdos machos desencadenó una respuesta humoral que se expresó y cuantificó en dos cerdos.

## VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Los cerdos adultos machos infectados experimentalmente con RVP pueden no presentar signos clínicos.
- ✓ Las dimensiones testiculares sufren alteraciones alrededor del día 15 de infección.
- ✓ Los principales cambios a nivel testicular son inflamación de la cabeza y/o cola de epidídimo, detectables mediante palpación desde el día 12 pi, pudiendo persistir hasta por 142 días que tuvo de duración este estudio.
- ✓ La evaluación seminal se ve afectada en los cerdos adultos infectados con RVP, la concentración y motilidad espermática disminuyen.
- ✓ No es posible asociar las variaciones del volumen del eyaculado con el RVP, ya que estas son observadas en condiciones normales de salud.
- ✓ Los animales infectados experimentalmente generan una respuesta humoral específica a partir de la segunda semana de infección mediante la prueba de IHA y SN.
- ✓ La prueba de ELISA indirecta de tipo cuantitativa detecta IgG anti-RVP a partir de la primera semana de infección con cambios significativos en diferentes tiempos de infección.
- ✓ La respuesta humoral específica para RVP está presente por largos periodos de tiempo, al igual que ocurre con otros paramixovirus.
- ✓ IgA no específicas en suero sanguíneo es el isotipo más abundante antes de la infección y presenta cambios significativos en la segunda quincena de infección.



- ✓ La presencia de inmunoglobulinas anti-RVP en semen no es una herramienta útil para el diagnóstico de esta enfermedad, ya que no fue posible identificar anticuerpos específicos en todos los cerdos infectados.
  
- ✓ Las lesiones a la necropsia en tracto reproductor se pueden observar aún en cerdos sacrificados a los 142 dpi.
  
- ✓ En cerdos machos infectados con RVP el testículo y epidídimo son los principales órganos afectados.

## IX. LITERATURA CITADA

Allan G.M., McNeilly F., Walker I., Linne T., Moreno-López J., Hernández P., Kennedy S., Carroll B.P., Herron B., Foster J.C. and Adair B. A sequential study of experimental porcine paramixovirus (LPMV) infection on pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet Diagn Invest.* 1996; 8:405-413.

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP and Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Ann Rev Immunol.* 1999; 17: 189-220.

Burleson F.G, Chambers TM and Wiedbrauk DL. *Virology. A laboratory manual.* Academic Press, Inc. 1992.

Chan Peter T.K. and Schlegel Peter N. Inflammatory Conditions of the male excurrent ductal system. Part I. *Journal of Andrology.* 2002; 23(4): 453-460.

CONASA. Situación del Síndrome del Ojo Azul en México: Métodos de diagnóstico para el Paramixovirus porcino de la Enfermedad del Ojo Azul (PPEOA). 1995: 152-164.

Cuevas R. J. S. Persistente of *porcine Rubulavirus* (PoRV-LPMV) in naturally infected pigs. Uppsala. 2002

Cuevas Romero J.S. y Rodríguez-Ropón A. Características del sistema inmune del cerdo: respuesta contra las infecciones virales. Tópicos de interés de inmunología veterinaria. Libro científico No. 1. INIFAP. 2006.

Espinosa HS. Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul. Tesis de Maestría. México DF. UNAM. 2001.

Gupta R.K., Best J. And MacMahon E. Mumps and the UK epidemic 2005. *BMJ*. 2005, 330: 1132-1135.

Hernández J., Reyes –Leyva J., Zenteno R., Ramírez H., Hernández-Jauregui P. y Zenteno E. Immunity to porcine *Rubulavirus* infection in adult swine. *Vet. Immunol. And Immunopathology*, 1998; 64: 367-381.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O y Zenteno E. Características de la respuesta inmune de los cerdos infectados con el *Rubulavirus* porcino. *Veterinaria México*.2004; 35(1):1-10

Hernández-Jáuregui P., Ramírez-Mendoza H., Mercado-García C., Moreno-López J. and Kennedy S. Experimental Porcine *Rubulavirus* (La Piedad-Michoacán virus) Infection in Pregnant Gilts. *J. Comp. Path.* 2004.130:1-6

Hernández –Jáuregui P., Yacoub A., Kennedy S., Curran B., Téllez C., Svenda M., Ljung L. and Moreno-López J. Uptake of Porcine *Rubulavirus* (LPMV) by PK Cells. *Archives of Medical Research*. 2001. 32: 400-409.

Hviid Anders, Rubin Steven and Mühlemann Kathrin. Mumps. *Seminar*. 2008; 371:932-44.

Kaiser T.J., Christopher-Hennings J., Nelson E.A. Measurement of immunoglobulin G, A and M concentrations in board seminal plasma. *Theriogenology*. 2000; 54:1171-1184.

Linné T., Berg M., Bergvall A., Hjertner B. and Moreno-López. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*. 1992. 33: 263-273.

Martínez-Lara A, Coba-Ayala MA, Pérez SJ, Córdova-López D, Correa Girón P. Empleo del Rubulavirus porcino inactivado para la prueba de IH en el serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul (EOA). XXI Congreso PANVET. Guadalajara, México. 2008: 1149.

Mestecky J. Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. *J. Reproduc. Immunol.* 2007. 73: 86-97

Moreno-López J., Correa-Girón P., Martínez A. and Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. *Arch Virol.* 1986. 91: 221-231

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DH, Gavhrial SA, Jarvis A, Martell WG, Mayo MA, Summers MD. *Virus Taxonomy. Clasification and nomenclature of viruses. Sixth report of de international committee on taxonomy of virus.* Nueva York: Springer-Verlag. Eds 1995.

Nordengrahn A., Svenda M., Moreno-López, Bergvall A., Hernández P., McNeilly F., Allan G. and Merza M. Develop of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus, La Piedad Michoacan Virus. *J. Vet. Diagn Invest.* 1999. 11: 319-323

Oleksiewicz MB., Botner A. and Normann P. Semen boars infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) contains antibodies against structural as well as nonstructural viral proteins. *Veterinary Microbiology.* 2001.81:109-125

Pipkin PA, Afzal MA, Heath AB, Minor PD. Assay of humoral immunity to mumps virus. *Journal of virological methods.* 1999. 79: 219-225

Politch J.A., Wolff M.D., Hill J.A. and Anderson D.J. Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1993. 60 (2): 372-375

Ramírez M.H., Martínez G.R., Vizuet A.O.T. y Monrroy B.J. Inoculación del virus de la enfermedad de ojo azul en verracos de la raza Pelón mexicano. *Vet. Méx.* 1999. 30 (1): 1-6

Ramírez-Mendoza H., Hernández-Jauregui P., Reyes –Leyva J., Zenteno E. Moreno-López y Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine Rubulavirus. *J. Comp: Path.* 1997; 117:237-252.

Ramírez M. H. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. FMVZ-UNAM. 1998.

Ray R., Glaze B.J. and Compans R.W. Role of individual glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 in the induction of a protective immune response. *J. Virol*. 1998. 62 (3): 783-787.

Reyes-Leyva J., Espinosa B., Hernández J., Zenteno R., Vallejo V., Hernández-Jauregui P. and Zenteno E. NeuA $\alpha$ 2,3Gal-glycoconjugate Expression determines cell susceptibility to the Porcine *Rubulavirus* LPMV. *Comp Biochem Physiol*. 1997. 2: 327-332.

Reyes Leyva J., Santos G., Hernandez J., Espinosa B., Borraz M.T., Ramírez M.H., Vallejo V., y Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus* porcino. *Mensaje bioquímico, UNAM*. 2002. 26: 99-127.

Reyes –Leyva J., García-Morales O., Santos- López G., Ramírez-Mendoza H.y Hernández J. Detección de viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet., 2004;36(1).

Rivera-Benitez J. F. 2009. Persistencia del Rubulavirus porcino en semen de verracos infectados experimentalmente. Tesis Maestría (Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal)-UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.

Santos- López G., Hernández J., Borrás- Argüello M. T., Ramírez-Mendoza H., Vallejo V. y Reyes–Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus* porcino. Arch. Med. Vet., 2004;36(2): 119-136.

Solís M., H. Ramírez-Mendoza, C. Mercado, S. Espinosa, V. Vallejo, J. Reyes Leyva y J. Hernández. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination, Res. Vet. Sci. (2007)

Stephan H.A., Gay G.M. and Ramírez T.C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. Vet. Rec. 1988.122:6-10

Sundqvist A., Berg J., Moreno-López and Linné. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. Arch Virol. 1992. 122:331-340

Vallejo V., Reyes–Leyva J., Hernández J., Ramírez-Mendoza H., Delannoy P. and Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2000. 415-424.

Zenteno-Cuevas R., Hernández J., Espinosa B., Reyes J. and Zenteno E. Secondary structure prediction hemagglutinin-neuraminidase from a porcine *Rubulavirus*. Arch. Virol. 1988. 143: 333-352.