



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE

LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PATOGENIA DEL *RUBULAVIRUS PORCINO* EN EXPLANTES
TRAQUEALES DE CERDO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MISAEEL VEGA VALENCIA

TUTOR PRINCIPAL: JOSÉ FRANCISCO RIVERA BENÍTEZ
CENID-MA INIFAP

COMITÉ TUTOR: JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FMVZ-UNAM.

HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
FMVZ-UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi familia por ser el sustento de mi vida. A ti papá por siempre apoyarme y por qué ahora entiendo el sentido de tanta disciplina, estas presente en la parte consciente de mis actos, sin ella estaría perdido.

A mi hermano, por ser un buen consejero, amigo y guía. A mi hermana por los momentos compartidos y regalarme el placer de convivir con Alexa.

A ti Alexa, porque gracias a ti conozco la pureza de la palabra amor, porque así será hasta el último día de mi vida, y finalmente, a ti:

La vida nos pone esta prueba, justo ahora. Recuerdo y tengo claro los tropiezos que eh tenido en la vida, múltiples como cualquier ser humano, pero tengo marcados en mi mente un par de tropiezos académicos particulares en donde llegue a tomar decisiones arrebatadas por mi actitud, en donde hasta yo llegue a dudar de mis capacidades y personas importantes dejaron de creer en mí; y tú siempre me apoyaste con la firmeza para instruirme cuando fue necesario, para guiarme con la sensibilidad que tú tienes, para hacerme creer en mí, y en cada uno de esos tropiezos tan marcados seguir adelante, no solo superándolos, si no destacando cada día más, seguro estoy que eh llegado hasta aquí por ti.

Seguro estoy que soy quien soy por ti, por tu apoyo, porque aun en este último tropiezo me motivaste a concluir, me apoyaste y me demostraste que seguirías conmigo, apoyándome a pesar de cualquier decisión profesional y personal que tomara, por más aberrante que sonara, hasta hoy que me decido a escribir esto sé que vale la pena no solamente dedicarte estos escalones académicos, si no mi vida entera.

Nunca había tenido miedo de empezar desde cero o de perder a nada ni a nadie, sin embargo, al conocer este reto que enfrentamos sentí ese miedo, a la vez tan fuerte e inconcebible que me ha hecho mucho más fuerte de lo que creía ser, me motiva a evolucionar, a trabajar y querer devorar cada segundo del tiempo, sentir la necesidad de resurgir para luchar más, y quizás sentir menos: daría todo por verte bien.

Le pido a la vida y al universo entero que te deje con nosotros mucho más tiempo, seguro y con mucha fe tengo en mente que esto es una prueba más de la vida, en la que definitivamente te voy a acompañar hasta superarla, tenemos muchos proyectos más por cumplir, y sé que así será, porque siempre has sido una persona ejemplar y buena, la vida debe de conspirar en tu favor.

Te agradezco infinitamente por existir, por darme la vida y te agradezco los valores y los momentos de cordura que eh tenido gracias a tus consejos, a pesar de mis múltiples arrebatos y momentos de soberbia, eh concluido esta etapa por ti y las que siguen así serán.

Gracias por toda mamá, vamos por más proyectos juntos en conjunto con nuestra familia, Te quiero.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

El estudio fue financiado por los proyectos de investigación: “Identificación y caracterización de variantes genéticas y antigénicas del *Rubulavirus porcino*; y de sus parámetros histopatológicos e inmunológicos”; Recursos Fiscales INIFAP No. SIGI. 19144832016 y FMVZ-UNAM. PAPIIT-IN208814-3. Patogenia del *Rubulavirus porcino* en cerdos en crecimiento, explantes de tejidos y cinética de multiplicación viral en leucocitos.

Se agradece el apoyo técnico del Histotecnólogo Alfredo Amadeo Díaz Estrada del Departamento de Producción y Zootecnia de Aves de la FMVZ, UNAM, y al Histotecnólogo Eduardo Daniel Díaz Nava por el procesamiento de las muestras para la evaluación histológica.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su apoyo en la evaluación e interpretación histológica.

A todo el personal e investigadores del Laboratorio de Virología del CENID-Microbiología Animal del INIFAP, que hicieron posible el desarrollo del presente estudio.

A todo el personal y académicos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM, que hicieron posible el desarrollo del presente estudio.

A los miembros del jurado, Dra. Sandra Cuevas, Dr. Atalo Martínez, Dr. José Iván Sánchez, Dra. Susana Mendoza, gracias por los comentarios y tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A mi tutor, el Dr. José Francisco Rivera Benítez por ser un gran guía y por su apoyo en esta etapa, te admiro como profesional y como persona, agradezco los conocimientos compartidos, la tolerancia y el trato personal dado en este tiempo: Gracias por todo Francisco.

A los miembros de mi comité Tutorial, Dr. Humberto por ser un gran maestro y por el trato personal que existió: gracias, Dr. Iván por su apoyo, aportaciones y motivación para desarrollar y concluir este trabajo de tesis.

A Luis Gómez por su asesoría profesional en el desarrollo de los experimentos, actuando en todo momento como miembro activo de este proyecto. Eres un líder.

Al Dr. Jesús Hernández, por abrirme las puertas de su laboratorio, apoyarme cuando fue necesario y por sus consejos tan certeros. A todo el personal del Laboratorio de Inmunología del CIAD, Hermosillo, Sonora, por la capacitación previa al inicio de esta maestría, Mónica, Alex, y Lupita: Gracias por su apoyo y consejos académicos y personales; estar en CIAD fue sin duda una de las mejores experiencias de esta etapa académica.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por ser mi *alma máter*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante el curso de este posgrado (Número de registro 337946 y 24709).

Al PAEP por el apoyo económico otorgado para la presentación de los trabajos derivados de esta tesis en el L Congreso Nacional AMVEC 2016.

A todo el personal del Laboratorio Crispin-Rosetti del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por permitir integrarme a su equipo de trabajo en el desenlace de este ciclo, en especial al Dr. José Carlos y a la Dra. Florencia por su apoyo profesional y personal en esta etapa tan contrastante, les reitero mi agradecimiento infinito.

RESUMEN

El *Rubulavirus porcino* (*PorPV*) es un *Paramyxovirus* que causa la enfermedad del ojo azul (EOA) en cerdos. La infección con *PorPV* causa problemas neurológicos, respiratorios y reproductivos, siendo la patogenia dependiente de la edad del huésped. El uso de sistemas de evaluación *ex vivo* con explantes de tejidos ha sido de gran utilidad para identificar la patogenia de agentes virales. El objetivo del presente estudio fue estandarizar un sistema de cultivo *ex vivo* con explantes traqueales de cerdo para investigar la patogenia y replicación del *PorPV*. Se utilizaron seis cerdos de seis semanas de edad para la obtención de los explantes. Los explantes, mantenidos en cultivo por seis días, fueron infectados con la cepa PAC-3 del *PorPV* en dos diferentes concentraciones ($1 \times 10^{9.5}$ DICC_{50%} y $1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}). La patogenia del *PorPV* se evaluó mediante análisis histológico, el grosor epitelial con laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y la replicación viral fue valorada por *q-RT-PCR*. Los explantes no infectados mostraron disminución significativa en el grosor epitelial en el día dos y cuatro en cultivo, preservando la estructura y función de un epitelio traqueal normal. El patrón general de infección con *PorPV* a lo largo del tiempo generó pérdida parcial de cilios, formación de vesículas intracitoplasmáticas en epitelio y glándulas seromucosas, degeneración hidrópica y metaplasia del epitelio, detectando daños en epitelio de forma más temprana en la porción posterior de tráquea. El aumento en la carga viral fue mayor con el inóculo viral diluido ($1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}) al día cinco post infección (PI). El presente sistema de explantes constituye una herramienta de evaluación biológica viable para el estudio de la patogenia de *PorPV* y otros agentes infecciosos respiratorios.

Palabras clave: Explantes, *ex vivo*, patogenia, metaplasia, *Rubulavirus porcino*.

ABSTRACT

Porcine Rubulavirus (PorPV) is a *Paramyxovirus* that causes blue eye disease (BED) in pigs. The infection with *PorPV* causes neurological, respiratory and reproductive problems, being the pathogenesis dependent on the age of the host. The use of *ex vivo* evaluation systems with tissue explants has been of great utility to identify the pathogenesis of viral agents. The objective of the present study was to standardize an *ex vivo* culture system with tracheal pig explants to investigate the pathogenesis and replication of *PorPV*. Six six-week-old pigs were used to obtain the explants. The explants, maintained in culture for six days, were infected with the PAC-3 strain of *PorPV* at two different concentrations ($1 \times 10^{9.5}$ DICC_{50%} and $1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}). The pathogenesis of *PorPV* was assessed by histological analysis, epithelial thickness with hematoxylin-eosin-stained slides and viral replication was assessed by *q-RT-PCR*. Uninfected explants showed a significant decrease in epithelial thickness at day two and four in culture, preserving the structure and normal function of a tracheal epithelium. The overall pattern of infection with the PAC-3 strain of *PorPV* over time resulted in partial loss of cilia, formation of intracytoplasmic vesicles in epithelium and seromucous glands, hydropic degeneration and epithelial metaplasia, detecting damage in the epithelium earlier in the posterior portion of the trachea. The increase in viral load was higher with the diluted viral inoculum ($1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}) on day five post infection (PI). The present explant system constitutes a viable biological evaluation tool for the study of the pathogenesis of *PorPV* and other respiratory infectious agents.

Key words: Explants, *ex vivo*, pathogenesis, metaplasia, *Porcine rubulavirus*.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	2
La enfermedad del ojo azul en cerdos	2
Agente etiológico	3
Signos clínicos y lesiones.....	3
Cerdos lactantes.....	4
Cerdos en crecimiento y engorda	4
Cerdos reproductores.....	5
Patogenia y tropismo.....	6
Uso de explantes de órganos.....	7
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
HIPÓTESIS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Virus y células.....	12
Animales donadores.....	12
Colecta y preservación de tráqueas	13
Preparación de placas de cultivo para explantes traqueales	13
Preparación de explantes traqueales	14
Prueba de viabilidad.....	18
Análisis histológico	19
Tinción hematoxilina-eosina	19
Evaluación del grosor de la capa epitelial	19
Infección Experimental.....	19
Cuantificación de ARN viral.....	20
RESULTADOS	21
Viabilidad del sistema de cultivo de explantes	21

Análisis histológico.....	21
Cambios por efecto del sistema de cultivo.....	21
Alteraciones durante la infección con <i>PorPV</i>	22
Porción anterior: dosis concentrada	22
Porción posterior: dosis concentrada.....	22
Porción anterior: dosis diluida	23
Porción posterior: dosis diluida.....	23
Evaluación del grosor de la capa epitelial: porción anterior	28
Evaluación del grosor de la capa epitelial: porción posterior	29
Cinética de replicación viral.....	32
DISCUSIÓN.....	36
Establecimiento del sistema de evaluación <i>ex vivo</i>	36
Efecto del sistema de cultivo <i>ex vivo</i> en los explantes traqueales.....	37
Efecto de la infección con <i>PorPV</i> en los explantes traqueales	38
CONCLUSIONES.....	43
LISTA DE ABREVIATURAS.....	44
REFERENCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de tráqueas.....	14
Figura 2A. Transferencia de bloques de agarosa.....	15
Figura 2B. Papel filtro estéril colocado sobre los bloques de agarosa.....	15
Figura 2C. Placas preparadas para cultivo de explantes traqueales.....	16
Figura 3A. Remoción de tejido conectivo circundante de la tráquea.....	16
Figura 3B. Obtención de explantes traqueales.....	17
Figura 3C. Explantes traqueales en cajas de cultivo posterior a su obtención.....	18
Figura 4. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Anterior concentrado	24
Figura 5. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Posterior concentrado.....	25
Figura 6. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Anterior diluido.....	26
Figura 7. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Posterior diluido.....	27
Figura 8. Grosor de la capa epitelial en explantes infectados con <i>PorPV</i> en porción anterior de tráquea.....	29
Figura 9. Grosor de la capa epitelial en explantes infectados con <i>PorPV</i> en porción posterior de tráquea.....	31
Figura 10. Número de copias de ARN viral/ml (Log10). Inóculo <i>PorPV</i> 10 ^{7.5} DICC _{50%}	33
Figura 11. Número de copias de ARN viral/ml (Log10). Inóculo <i>PorPV</i> 10 ^{9.5} DICC _{50%}	35

INTRODUCCIÓN

El *Rubulavirus porcino* (*PorPV*) es el agente causal de la enfermedad del ojo azul (EOA) en cerdos (Linné *et al.*, 1992; Moreno-López *et al.*, 1986). La EOA es endémica de la región central y centro-occidente de México (Escobar-López *et al.*, 2012; Kirkland and Stephano, 2006). La infección con *PorPV* en lechones causa signos neurológicos y respiratorios, ocasionando opacidad corneal en un reducido porcentaje de casos (1-10%), en cerdos en crecimiento y engorda se evidencian signos clínicos respiratorios y conjuntivitis de 4 a 10 días post infección (dpi) en el 30-40% de los animales infectados (Allan *et al.*, 1996; Kirkland and Stephano, 2006; Rodríguez-Ropón *et al.*, 2003). Estudios experimentales recientes han reportado la presencia de daños histológicos causados por el *PorPV* en el tracto respiratorio inferior, observándose neumonía intersticial e hiperplasia bronco alveolar, evidenciando con estos hallazgos la susceptibilidad a la infección y daños causados en sistema respiratorio (Rivera-Benítez *et al.*, 2013a), sin embargo, son pocos los hallazgos observados en el tracto respiratorio superior.

El tracto respiratorio superior representa una de las primeras líneas de defensa contra los agentes infecciosos, por lo que el estudio de la susceptibilidad a la infección con agentes patógenos es de suma importancia. Considerando los aspectos económicos y éticos relacionados con el uso de animales en estudios experimentales sobre patogénesis, los explantes de órganos, en donde la arquitectura tridimensional del tejido y el contacto entre células es preservada, representan un modelo de estudio viable (Nunes *et al.*, 2010; Vairo *et al.*, 2013; Vandekerckhove *et al.*, 2009). Es por ello, que el estudio *ex vivo* con el cultivo de explantes traqueales es de gran utilidad para el análisis de la patogenia de agentes infecciosos del sistema respiratorio, al ser modelos de estudio que preservan la estructura y los receptores celulares específicos existentes en el animal en una infección *in vivo* (González *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2010).

Con base en lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue identificar la patogenia y cinética de replicación del *Rubulavirus porcino* en explantes traqueales de cerdo.

ANTECEDENTES

La enfermedad del ojo azul en cerdos

La enfermedad del ojo azul en cerdos fue identificada a principios de los años 80's en sistemas de producción porcina en la región geográfica de La Piedad, Michoacán, México. Dicha enfermedad fue asociada a un agente viral, el cual se denominó virus de La Piedad Michoacán (VLPM), sin embargo, después fue clasificado como un *Paramyxovirus* denominado *Rubulavirus Porcino* (*PorPV*). Se observó que esta enfermedad causaba en lechones desórdenes neurológicos y opacidad corneal. En cerdos adultos se identificaron problemas reproductivos, respiratorios y opacidad corneal en un rango del 1-10% de los casos (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988). Este virus puede establecer una infección persistente, generando en algunos casos una enfermedad con curso subclínico en donde los animales infectados actúan como reservorio del virus, pudiendo llegar a propagar el virus a cerdos susceptibles y bajo situaciones naturales o de inmunosupresión se podría establecer una infección con curso clínico (Cuevas-Romero *et al.*, 2014; Rivera-Benítez *et al.*, 2013d; Wiman *et al.*, 1998). Esta enfermedad es endémica y solo ha sido diagnosticada en las zonas centro y centro-occidente de México (Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Estado de México y Querétaro) con una seroprevalencia entre el 9 al 23.7% (Cuevas-Romero *et al.*, 2015; Escobar-López *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014). Al ser una enfermedad endémica, es una barrera comercial, afectando la venta y comercialización de cerdos provenientes de esta zona geográfica.

Agente etiológico

El *PorPV* es un virus envuelto por una bicapa lipídica, constituido por un genoma ARN monocatenario en sentido negativo de aproximadamente 15 Kb, que está dividido en 6 genes que codifican para las proteínas estructurales: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) (el gen P consiste de 1373 nucleótidos incluyendo la señal poly (A); de este gen, tres proteínas pueden ser codificadas: la V de 249, la P de 404 y la C de 126 aminoácidos) (Berg *et al.*, 1992), Matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y de alto peso molecular (L). Se ha identificado que el orden del genoma es 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', similar a lo descrito para otros *Paramyxovirus* (Adams *et al.*, 2016; Linné *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1990). Las proteínas F y HN se encuentran expuestas en la envoltura viral. La proteína HN posee función de unión al receptor celular y actividad neuraminidasa, mientras que la proteína F está relacionada con la inducción de la fusión de membranas que es requerida para el ingreso del virus a las células huésped. Las proteínas P y L constituyen el complejo enzimático replicación/transcripción, residiendo la actividad de la polimerasa de ARN en la proteína L, mientras que la proteína P actúa como un cofactor; las unidades de la NP se unen mediante interacciones hidrofóbicas al ARN genómico para dar origen a la nucleocápside helicoidal. La proteína M además de ser estructural en el virión, tiene funciones importantes durante la replicación del virus y la maduración del mismo (Berg *et al.*, 1991; Cuevas-Romero *et al.*, 2014; Moreno-López *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1992, 1990)

Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos y lesiones generados a consecuencia de la infección con el *PorPV* son dependientes de la edad del huésped y la cepa viral. Las cepas virales aisladas se han agrupado en tres genogrupos de acuerdo al cuadro clínico observado (Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cerdos lactantes

Los cerdos lactantes son más susceptibles a presentar cuadros clínicos asociados a la infección con *PorPV*, con una tasa aproximada de morbilidad del 20% y mortalidad del 90%. Los reportes de la infección con *PorPV* en lechones se presentan principalmente con cuadros de meningoencefalitis, incoordinación motora y opacidad corneal (Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Stephano *et al.*, 1988). Los signos clínicos observados en cerdos lactantes normalmente inician con fiebre, pelo hirsuto, cifosis, estornudos, tos y ligera conjuntivitis. Estos signos son inmediatamente seguidos por signos nerviosos como ataxia, debilidad, rigidez, temblor muscular, posturas anormales y muerte en un rango de 6-8 dpi (Allan *et al.*, 1996; Cuevas *et al.*, 2009; Moreno-López *et al.*, 1986). Recientemente se han observado signos respiratorios adicionales a los nerviosos en un 10-20% de los casos. En esta etapa se ha detectado principalmente al genogrupo 1, que agrupa los aislamientos LPMV/1984 y PAC4/1993 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cerdos en crecimiento y engorda

En el tercer genogrupo propuesto, se agrupan los aislamientos PAC-6/2001, PAC-7/2002, PAC-8/2002 y PAC-9/2003 que se asocian a cuadros neurológicos en cerdos en crecimiento y adultos (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008). En cerdos en crecimiento y línea de engorda no se habían identificado signos nerviosos en los primeros reportes realizados (Stephano *et al.*, 1988). En la última década, se ha reportado que aislamientos de granjas endémicas en donde se presenta la EOA (cepas PAC-6 a PAC-9) generan en cerdos adultos una neurovirulencia aunada a signos respiratorios en el 20-25% de los casos, acompañados de opacidad corneal en el 30% de los casos identificados (Rivera-Benítez *et al.*, 2013a, 2013b; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008). El cuadro respiratorio posterior a la infección con *PorPV* incluye secreciones nasales, conjuntivitis, y distrés respiratorio durante las dos primeras semanas de la infección. Mediante evaluaciones histológicas se identificó la presencia de neumonía intersticial, hiperplasia del tejido bronquio-vascular asociado a tejido linfoide (Rivera-Benítez *et al.*, 2013a).

En estos animales son reducidos los signos clínicos, ya que la infección es aclarada con más eficiencia por el sistema inmune. La morbilidad en cerdos en crecimiento es de aproximadamente 1-4%, siendo la mortalidad baja en este grupo, sin embargo se evidencia una disminución generalizada de actividad física, anorexia y retraso en crecimiento (Hernández *et al.*, 1998; Rivera-Benítez *et al.*, 2013a; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cerdos reproductores

El tracto reproductivo en cerdos adultos es el principal sitio de replicación del *PorPV*. La infección con *PorPV* causa disminución en la fertilidad en cerdas reproductoras y sementales en aproximadamente un 14-40% de los animales infectados. El cuadro clínico observado, en algunos de los casos dentro de los primeros dpi incluye anorexia, fiebre y conjuntivitis (Stephano *et al.*, 1988). En cerdas reproductoras se ha reportado un incremento en la tasa de retorno al estro, momificaciones y mortinatos. Hallazgos *post mortem* evidencian congestión focal y hemorragia en placenta y endometrio (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). En cerdos machos se ha reportado epididimitis a partir del día 15 post infección (pi), reducción de la motilidad y concentración espermática. A la necropsia se observa formación de nódulos en la cabeza del epidídimo a los 15, 30 y 45 dpi, atrofia de las *testis*, formación de granulomas espermáticos, degeneración de tubos seminíferos, orquitis y epididimitis a los 30-110 dpi (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Rivera-Benítez *et al.*, 2013c). Estudios experimentales demuestran que el semen de cerdos infectados presenta una reducida calidad seminal. Se identificó que el *PorPV* es un virus persistente en sistema reproductivo y una vía potencial de diseminación del *PorPV*; por aislamiento viral se ha detectado del día 5 al 48 en semen y 64 al 142 dpi en testículo y epidídimo, por RT-PCR hasta el día 142 pi (Cuevas-Romero *et al.*, 2014; Rivera-Benítez *et al.*, 2013c; Solís *et al.*, 2007).

Patogenia y tropismo

El *PorPV* ingresa al organismo, principalmente, por vía aerógena, por la aspiración de microgotas que contienen el virus. La microgota puede quedar atrapada en la mucosa oronasal y el virus tiene que infectar una célula susceptible para replicarse. Se ha propuesto que la infección y replicación del *PorPV* posterior al ingreso vía aerógena puede diseminarse por dos rutas principales: 1) El *PorPV* tiene una replicación primaria en mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado, para posteriormente diseminarse vía aérea a bronquios y pulmones, trabajos previos sugieren que este sitio es ampliamente permisivo a la replicación del *PorPV*, en donde posteriormente se disemina por vía sanguínea a todo el organismo asociado a eritrocitos y monocitos; 2) El ingreso a sistema nervioso central se da a través las terminaciones nerviosas del nervio olfatorio en mucosa nasal, diseminándose posteriormente a hipocampo, tallo cerebral y cerebelo (Allan *et al.*, 1996; Mendoza-Magaña *et al.*, 2007; Reyes-Leyva *et al.*, 2002). La patogenia del *PorPV* depende del tropismo celular en los tejidos del cerdo, siendo este receptor una molécula de ácido siálico y proteínas de adhesión viral. El *PorPV* posee tropismo por el receptor de ácido siálico $\alpha 2,3$ -Gal, el cual es fundamental para que se lleve cabo el proceso de infección (Mendoza-Magaña *et al.*, 2007; Reyes-Leyva *et al.*, 2002, 1997). Esta isoforma de ácido siálico se encuentra ampliamente distribuida en las células animales y su distribución se modifica durante la maduración de los órganos de los cerdos siendo dependiente de la edad del huésped, dicha modificación de receptores es altamente variable en las primeras doce semanas de vida del huésped, por ello existe una estrecha relación entre la distribución del receptor y la patogenia de la infección por el *PorPV* (Reyes-Leyva *et al.*, 1997; Vallejo *et al.*, 2000).

En cerdos recién nacidos este receptor se distribuye principalmente en sistema respiratorio y nervioso, mientras que en cerdos adultos se evidencia una disminución o pérdida de este receptor en sistema nervioso central y aumento de expresión en tracto reproductivo. En cerdos machos adultos (8 a 9 meses de

edad), la expresión de estas moléculas de ácido siálico aumenta en el tejido testicular, para facilitar la migración celular durante el proceso de espermatogénesis; esto explica de forma parcial el tropismo del *PorPV* por el tejido testicular (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Rivera-Benítez *et al.*, 2013d; Vallejo *et al.*, 2000).

La proteína HN juega un papel fundamental en la infección con *PorPV*. Estudios experimentales sugieren que la función de la proteína HN es reconocer el receptor celular (ácido siálico), facilitando de esta forma la activación de la proteína viral F con la subsecuente liberación de la nucleocapside viral en el citoplasma de la célula huésped. Adicionalmente, la actividad neuraminidasa se ha relacionado como un factor de virulencia (Mendoza-Magaña *et al.*, 2007; Reyes-Leyva *et al.*, 1997).

Uso de explantes de órganos

La evaluación *in vitro* de la interacción agente infeccioso-huésped en tracto respiratorio se ha desarrollado tradicionalmente con el uso de líneas celulares continuas o cultivos primarios de órganos, en donde se presentan algunas desventajas como la pérdida de estructuras fisiológicas de la mucosa respiratoria, polarización celular y actividad ciliar (Nunes *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2013).

El uso de explantes para el estudio de la interacción patógeno-huésped se ha utilizado de forma frecuente en el estudio de patógenos respiratorios en humanos y animales. Este sistema de evaluación confiere la ventaja de que se preserva la estructura tridimensional del órgano, la diversidad celular que posee un sistema *in vivo* y las funciones fisiológicas como lo es aclaramiento ciliar y secreción de moco. Al usar cada explante como una repetición, se reduce el número de unidades animales requeridas para realizar un estudio (González *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2010).

El uso de modelos de trabajo *ex vivo* confiere una ventaja ante la evaluación en cultivos primarios o líneas celulares, debido a que en la adaptación y pases del agente viral en líneas celulares se pierden las propiedades nativas del virus, como es el tropismo y virulencia que se podría evidenciar en una evaluación *in vivo* (Katz *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2001).

La estandarización de sistema de evaluación *ex vivo* con explantes de tejidos de tracto respiratorio en interfaz de líquido/aire ha sido de gran utilidad para identificar las células blanco en el epitelio susceptibles a la infección y replicación de agentes virales, permitiendo valorar su patogenia y cinética de replicación durante la fase temprana de la infección (1-7 días en promedio) (Feng *et al.*, 2015; Glorieux *et al.*, 2007; González *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2010); se han estandarizado métodos en donde se concluye que el uso de este sistema de evaluación durante la fase temprana de la infección es suficiente para examinar la interacción virus-célula blanco, permisividad de infección, replicación viral y daños histológicos/estructurales. Como efecto colateral al sistema de cultivo de los explantes *ex vivo* se evidencian daños no significativos en el tejido a lo largo del experimento, como lo es indicadores de apoptosis y esporádica degeneración celular, esto debido a que si bien este modelo de estudio se ha estandarizado de una forma donde el ambiente del cultivo *in vitro* proporciona los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad celular, no es un sustituto total en un ambiente celular *in vivo* (Chambers *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015; Glorieux *et al.*, 2007; González *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2010).

Infecciones experimentales realizadas con el uso de explantes traqueales e infecciones en embriones con cepas del virus de Newcastle evidencian cambios patológicos similares en ambos sistemas de evaluación (pérdida de cilios, depleción de células epiteliales, acumulación de moco dentro de las seis primeras horas pos infección (hpi), concluyendo que ambos sistemas de evaluación son viables para identificar los efectos del virus en esta porción de tracto respiratorio (Lam, 2003; Mast *et al.*, 2005; Wambura, 2006). Modelos de estudio similares se

han desarrollado con explantes donde se ha evaluado la susceptibilidad a la infección con aislamientos del virus de influenza. Mediante evaluaciones con microscopía convencional, microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fluorescencia se ha evaluado la viabilidad del cultivo *ex vivo* en un sistema con interfaz de medio/aire en donde el grosor epitelial y morfología, observando un mantenimiento constante del grosor epitelial y cantidad de colágeno en el periodo de cultivo de los explantes, concluyendo que durante el periodo de cultivo de explantes de tejidos respiratorios se preserva la integridad y viabilidad durante la duración del experimento; con las mismas evaluaciones se identificaron los cambios patológicos atribuibles a la infección con influenza como es pérdida de epitelio ciliar, indicadores de apoptosis, acumulación de moco, o solamente la infección y producción de copias virales, sin un daño histológico o estructural evidente en los explantes (Feng *et al.*, 2015; Glorieux *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se conoce de forma parcial la patogenia del *PorPV* en el tracto respiratorio. La mayoría de los estudios se han enfocado a realizar infecciones *in vivo*, estos estudios pueden requerir un número elevado de animales y presentan algunas limitaciones, por ejemplo, en la cuantificación de una cinética de infección, ya que en general las muestras son colectadas con hisopos nasales y los resultados de cinéticas de replicación viral no pueden ser atribuibles a alguna porción del sistema respiratorio en particular. Establecer un sistema de cultivo *ex vivo* es una alternativa de estudio en donde se pueden limitar los resultados obtenidos al órgano/tejido con el que se establece el cultivo.

El uso de explantes traqueales para el estudio de la patogenia y cinética de infección del *PorPV* provee una alternativa de estudio viable tanto en aspectos económicos como éticos, ya que se minimiza el número de experimentos y unidades experimentales requeridos en un ensayo *in vivo*, como lo es propuesto en 1959 por Russell and Burch en el principio de las tres R's (Reducción del número de animales experimentales, refinamiento de los experimentos para minimizar el dolor y la angustia y reemplazo de animales de experimentación por modelos *in vitro*).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la patogenia *del Rubulavirus porcino* en explantes traqueales de cerdo.

Objetivos específicos

- Establecer un modelo de cultivo de órganos *ex vivo* con interfaz de aire con tráqueas de cerdo.
- Identificar los daños histológicos inducidos por el *PorPV* en explantes de la porción anterior y posterior de tráquea.
- Evaluar la cinética de replicación viral del *PorPV* en explantes traqueales.

HIPÓTESIS

- El *PorPV* se replica de forma eficiente en explantes traqueales de cerdo y causa daños histológicos en células caliciformes y epitelio ciliar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus y células

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cepa PAC-3 del *PorPV* (Jalisco/1992; GenBank access number: EF413173) (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997) . El lote viral fue multiplicado en células de plexo coroideo ovino (SCP por sus siglas en inglés) en botellas de 75 cm², usando medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/F12 HAM (DMEM/F12 HAM). Se infectaron las células SCP al 80% de confluencia con 100 dosis infectante 50% en cultivo celular (DICC_{50%}) en 3 ml de DMEM/F12Ham sin suero fetal. Se dejó adsorber el inóculo durante una hora a 37°C, posteriormente se agregaron 12 ml de medio de mantenimiento (DMEM/F12Ham al 1% de SFB, libre de antibióticos) y se incubaron durante 72 horas a 37°C. El lote viral fue titulado en DICC_{50%} usando el método de Reed and Muench.

Animales donadores

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se utilizaron seis cerdos destetados de seis a siete semanas de edad provenientes de una granja libre de *PorPV* los cuales fueron alojados en una unidad de aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA)-INIFAP con *acceso ad libitum* a comida y agua. Previo a la eutanasia se tomaron muestras sanguíneas para verificar por *qRT-PCR* que los cerdos fueran negativos a la infección con *PorPV* (Rivera-Benítez *et al.*, 2013b). Posteriormente fueron eutanasiados, mediante anestesia con sobredosis de pentobarbital sódico. Para esto los cerdos recibieron una restricción de alimento de 2 horas y fueron tranquilizados con 2.2 mg/kg de xilacina vía intramuscular, posteriormente se administró una sobredosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico vía intravenosa. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a los lineamientos del Subcomité Institucional para el Cuidado y uso de Animales Experimentales (SICUAE) del posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal-UNAM (protocolo número MC-2016/2-10) .

Colecta y preservación de tráqueas

Posterior a la eutanasia de los cerdos, se realizó la colecta de las tráqueas dentro de una campana de flujo laminar (CFL) (figura 1A). Para obtener la tráquea se realizó un corte a la altura del cartílago cricoides y la carina traqueal, y se transfirió de forma inmediata en un frasco de vidrio estéril con 250 ml de medio de cultivo precalentado a 37°C (Figura 1B), consistente en una mezcla 1:1 de DMEM/F12 HAM y RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado con penicilina (100 UI/ml; Sigma) y estreptomicina (50 µg/ml; Sigma, Dorset, UK). Posterior a su colecta las tráqueas se mantuvieron en una incubadora a 37°C y se realizaron seis lavados por inmersión del tejido en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de medio de cultivo precalentado a 37°C (Figura 1C y 1D) de 30 minutos cada uno. Todo proceso de manipulación de las tráqueas se realizó dentro de una CFL.

Preparación de placas de cultivo para explantes traqueales

Se elaboraron bloques de agarosa los cuales funcionaron como soporte mecánico en el cultivo de los explantes traqueales. Se preparó agarosa al 1.5% en agua destilada en un horno de microondas hasta la ebullición, inmediatamente dentro de una CFL fueron transferidos a placas de 24 pozos 1.5 ml de agarosa/pozo. Posterior a la polimerización de la agarosa, los bloques se removieron de la placa de 24 pozos y se colocaron en placas de 12 pozos (Figura 2A), se colocó una sección cuadrada de papel filtro estéril sobre los bloques de agarosa (Figura 2B) y se agregaron 2.5 ml de medio de cultivo por pozo. Finalmente, las placas de cultivo preparadas (Figura 2C) se transfirieron a una incubadora a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂, en donde permanecieron almacenadas hasta su uso para el cultivo de los explantes traqueales.

Preparación de explantes traqueales

Posterior a los seis lavados por inmersión, las tráqueas fueron colocadas en una caja de Petri estéril con 5 ml de medio de cultivo para evitar la deshidratación del tejido durante la obtención de los explantes. El tejido conectivo circundante al cartílago fue removido y se realizó la apertura longitudinal de las tráqueas (Figura 3A). Para obtener los explantes la tráquea fue dividida en dos segmentos: anterior y posterior. Cada anillo traqueal fue cortado en aproximadamente seis explantes de 1 cm² (Figura 3B).

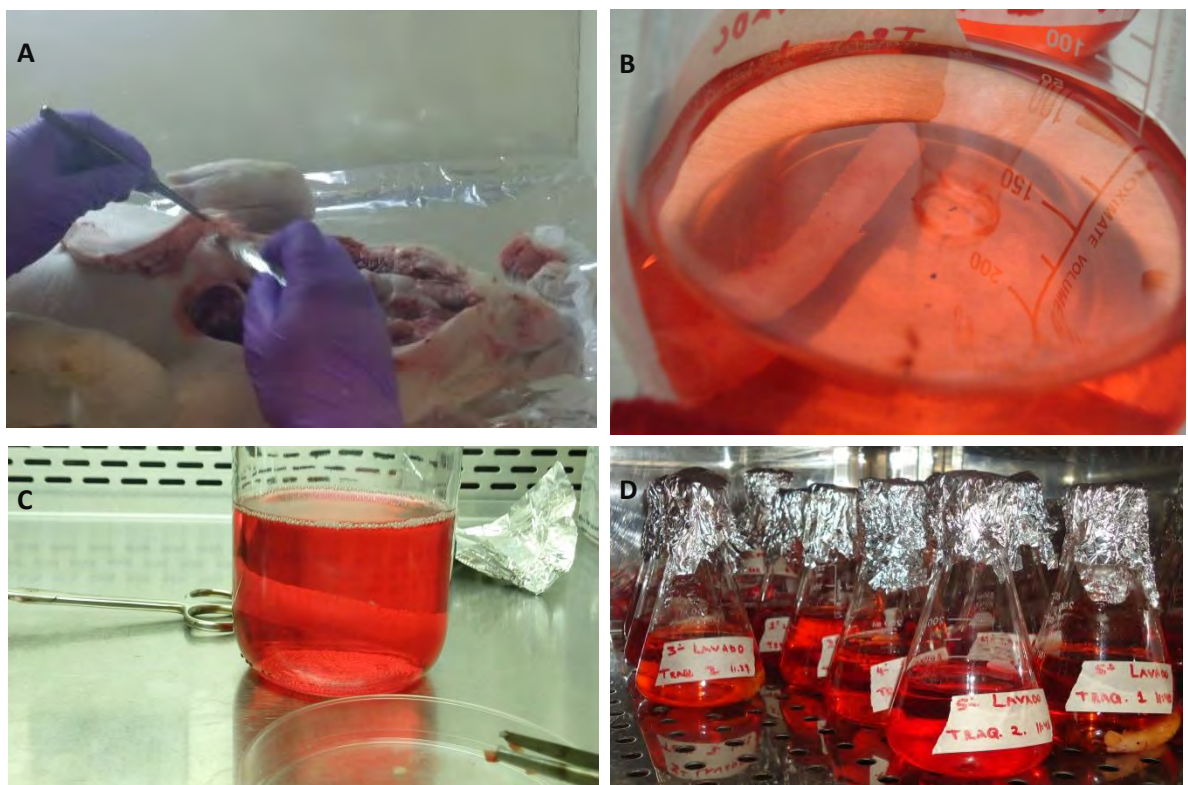


Figura 1. Colecta de tráqueas

A) colecta de tráqueas de cerdo de forma aséptica posterior a la eutanasia; B) tráquea colectada en frasco de vidrio con medio de cultivo precalentado; C) cambio de medio para lavados por inmersión dentro de CFL; D) lavados por inmersión de tráquea dentro de incubadora de CO₂ a 37°C.

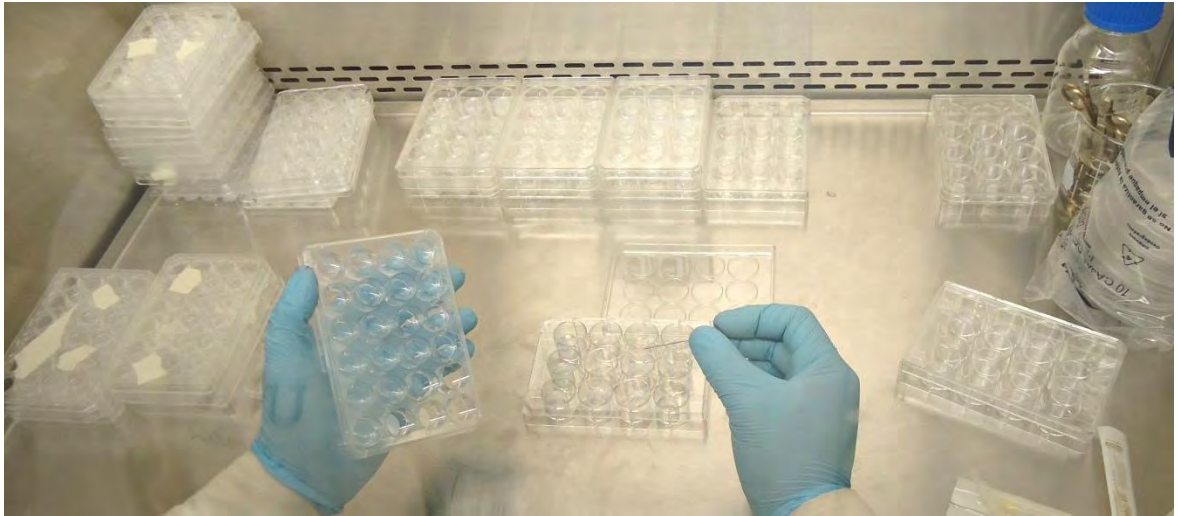


Figura 2A. Transferencia de bloques de agarosa. La transferencia se realizó retirando el bloque de la placa de 24 pozos y transfiriéndolo con una aguja calibre 22 a placa de 12 pozos.

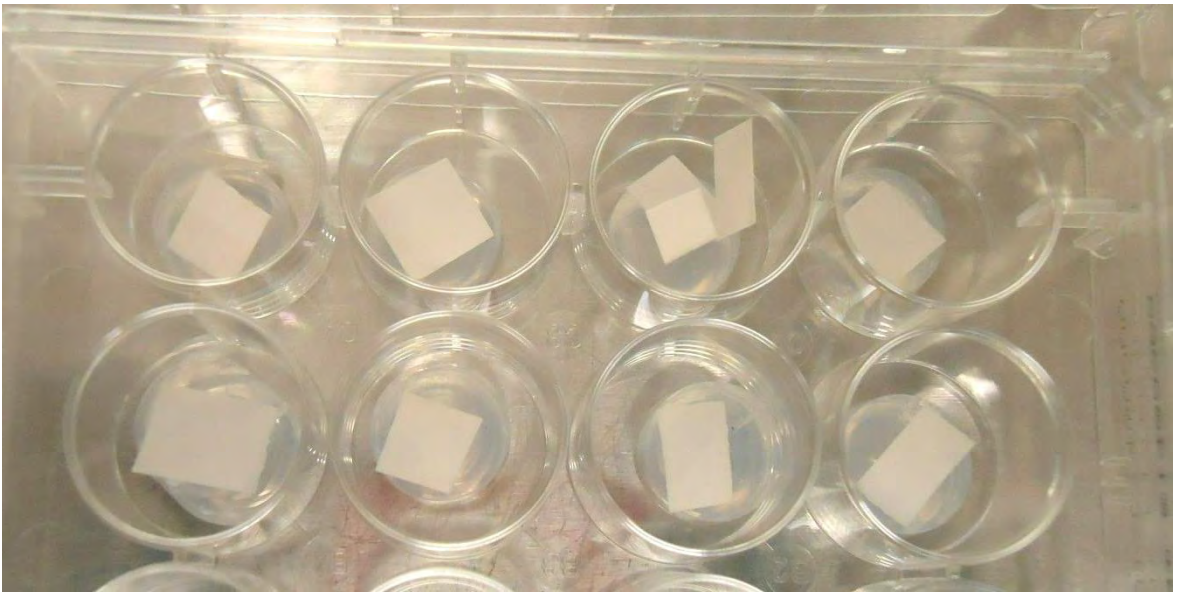


Figura 2B. Papel filtro estéril colocado sobre los bloques de agarosa. El objetivo de colocar el papel fue la distribución homogénea de medio de cultivo para evitar deshidratación del tejido durante el cultivo de los explantes.



Figura 2C. Placas preparadas para cultivo de explantes traqueales. Se utilizaron 2.5 ml de medio de cultivo por pozo. Posterior a su preparación se transfirieron a una incubadora a 37°C con una atmosfera del 5% de CO₂ para precalentar el medio hasta su uso con los explantes.

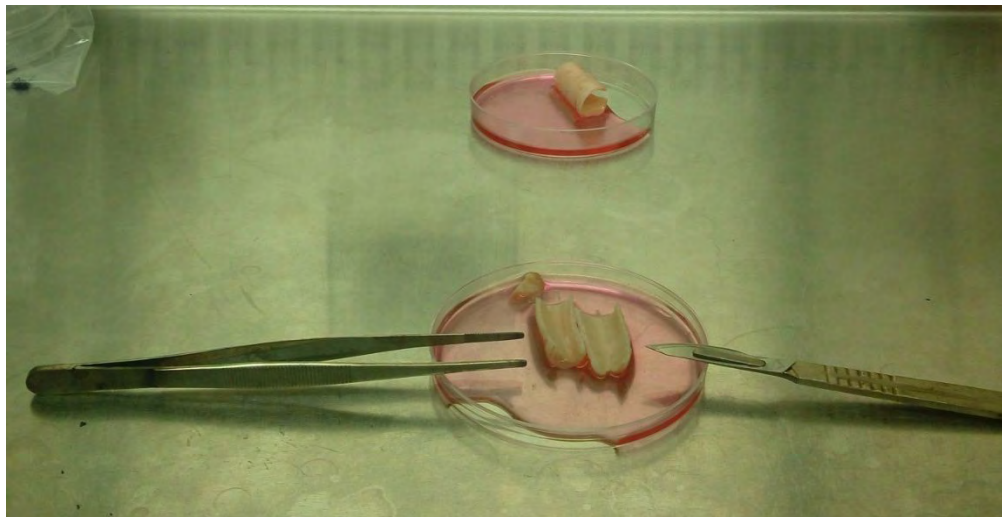


Figura 3A. Remoción de tejido conectivo circundante de la tráquea. Dicho procedimiento se realizó dentro de una CFL en una caja de Petri estéril, posterior a remover el tejido conectivo se realizó apertura longitudinal de la porción anterior y posterior de la tráquea.



Figura 3B. Obtención de explantes traqueales. El corte de la tráquea para la obtención de los explantes se realizó con navaja de bisturí número 22.

Cada explante fue colocado con el epitelio hacia arriba sobre la sección de papel filtro contenida en las placas de cultivo. Solo una película fina del medio cubrió el papel filtro y la porción basal de los explantes, imitando de esta forma la interfaz de aire existente en el tracto respiratorio *in vivo* (Figura 3C). Los explantes se mantuvieron a 37°C en incubadora con una atmosfera del 5% de CO₂ hasta el momento de su uso de acuerdo a la infección experimental con *PorPV*.

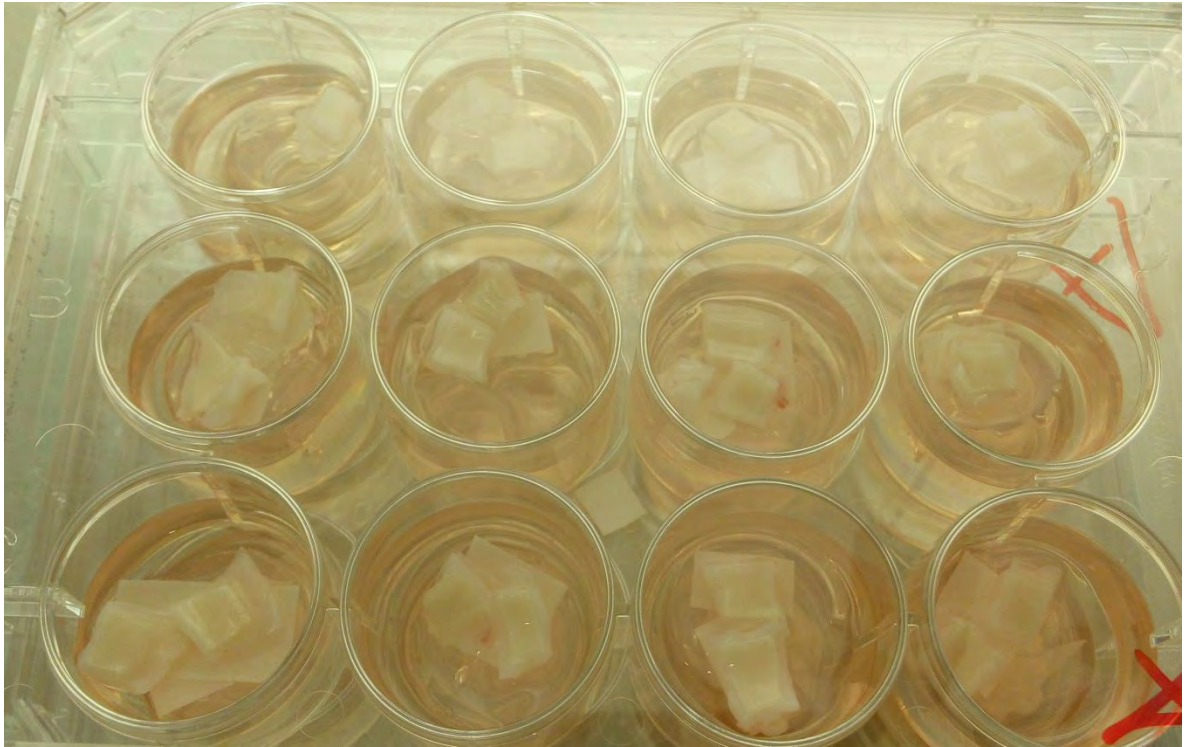


Figura 3C. Explantes traqueales en cajas de cultivo posterior a su obtención. Se puede identificar como solo la porción basal del explante se encuentra en contacto con el medio de cultivo y la porción apical en interfaz de aire, simulando de esta forma un sistema de evaluación *in vivo*.

Prueba de viabilidad

La viabilidad de los explantes traqueales se evaluó cada 24 horas mediante la evaluación del movimiento ciliar. El ensayo consistió en colocar cinco microlitros de microperlas de poliestireno (Polysciences, Northampton, UK) sobre la superficie apical de los explantes. El aclaramiento ciliar fue evaluado visualmente. El ensayo fue considerado positivo (explante viable) cuando se identificó totalmente el aclaramiento ciliar en un lapso de 30 minutos (Nunes *et al.*, 2010).

Análisis histológico

Tinción hematoxilina-eosina

Las muestras de los explantes traqueales colectados en cada medición fueron fijadas en formol amortiguado al 10% durante 48 h. Posteriormente fueron embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 3 μm adheridos en portaobjetos tratados con *Poly-L-lysine solution* (Sigma-Aldrich), para realizar análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina.

Evaluación del grosor de la capa epitelial

Se tomaron microfotografías de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de los explantes traqueales, para realizar la medición del grosor de la capa epitelial usando el programa Infinity Analyze (Lumera Corporation). Se seleccionaron al azar cinco campos a lo largo de cada laminilla de 3 explantes por medición a lo largo del experimento (Nunes *et al.*, 2010), tanto en tratamientos testigo como en experimentales. Se realizó un análisis de varianza con el programa GraphPad Prism 6.

Infección Experimental

Se diseñaron dos grupos experimentales en donde se emplearon tres cerdos como repeticiones independientes cada uno (cuadro 1), obteniendo un total de 96 explantes de cada tráquea. En el Grupo 1 se realizó la inoculación, aplicando una concentración inicial de $1 \times 10^{9.5}$ DICC_{50%}/5 μl y en el Grupo 2 una concentración de $1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}/5 μl . En los tratamientos testigo se aplicaron 5 μl de DMEM/explante. El inóculo fue aplicado en la superficie apical de los explantes. Los explantes inoculados y testigos fueron cosechados a las 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi para realizar el análisis histológico, cuantificación de ARN viral y prueba de viabilidad.

Cuadro 1. Diseño experimental

	Inóculo/5 μ l	Cerdos donadores	Explantos obtenidos
Grupo 1	$10^{9.5}$ DICC _{50%}	3	288
Grupo 2	$10^{7.5}$ DICC _{50%}	3	288

Cuantificación de ARN viral

Los explantes traqueales fueron macerados de forma mecánica en tubos de 2 ml estériles y libres de RNAsas y DNAsas con 700 μ L solución de lisis y una mezcla 1:1 (un gramo) de perlas de sílica de 0.5 μ m y arena de mar estéril en un disgregador de tejidos mecánico (DISRUPTION GENIE, Scientific Industries, Inc.), aplicando 4 ciclos de 5 minutos cada uno a 4°C. Posterior al proceso de macerado, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 minutos para separar la fase acuosa. Se transfirieron 700 μ l de la fase acuosa a un tubo de colecta y se procedió a realizar la extracción de ARN con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat. N°. 74106) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de ARN viral total mediante *q*-RT-PCR, con un protocolo previamente publicado (Rivera-Benítez *et al.*, 2013b). Se utilizó el kit LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Life Science). La mezcla total de reacción fue de 20 μ l, la cual contenía 6.3 μ l de agua libre de nucleasas, 7.4 μ l de LightCycler® RNA Master Hydrolysis Probes, (2.7X), 1.3 μ l de activador (50 mM), 1 μ l de enhancer (20X), 0.75 μ l (10 μ M) de cada primer (sentido: PoRV-Nxp16-Fw, 50-GCG TCG AGA TTA ATG GCT TTG-30; antisentido: PoRV-Nxp16-Rv, 50-AAC ATT GAG TGC ATT GAT GGT G-30), 0.50 μ l de Sonda (20 μ M) (PoRV- Nxp16-P, 50-ATT CCA AAC GAC CGC GCC ATC C-30 marcada en el extremo 5' con HEX (51- hexachloro-fluoresceína fosforamida) y en el extremo 3' con Black Hole Quencher™-1) y 2 μ l de ARN total.

El protocolo de trabajo incluyó un ciclo inicial de 63°C por 15 minutos (transcripción reversa), seguido de un paso de desnaturalización de 95°C durante 3 minutos, y 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C durante 30 segundos (alineamiento), 72°C (extensión) durante 10 segundos y un ciclo final de 40°C durante 1 minuto. La fluorescencia emitida fue capturada en el canal de 535 nm durante el periodo de incubación a 60°C. Dicho protocolo de *q*-RT-PCR fue desarrollado en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

RESULTADOS

Viabilidad del sistema de cultivo de explantes

Los explantes traqueales de cerdo obtenidos para el desarrollo del presente estudio se mantuvieron en cultivo durante seis días, empleando seis experimentos independientes (Cuadro 1); la evaluación de la viabilidad de los explantes se realizó cada 24 horas mediante una prueba de aclaramiento ciliar con microperlas de poliestireno (evaluación de viabilidad ciliar), obteniendo resultados positivos al observarse el aclaramiento ciliar en menos de 30 minutos durante los seis días del experimento.

Análisis histológico

Cambios por efecto del sistema de cultivo

Las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina de los explantes traqueales fueron utilizadas para realizar el análisis histológico y evidenciar los cambios estructurales generados en los explantes por efecto del sistema de cultivo y la infección con las diferentes concentraciones de *PorPV* (Figuras 4, 5, 6, 7).

Los explantes utilizados como testigo en el desarrollo del presente modelo experimental preservaron su estructura histológica normal tanto en el epitelio cilíndrico pseudoestratificado como en la lámina propia, durante el transcurso del experimento. Se evidenció esporádica degeneración celular en el epitelio traqueal a partir del día cinco pi (Figura 4G, 5G) y disminución en el grosor epitelial a partir de las 48 hpi tanto en explantes de porción anterior y posterior de tráquea (Figuras 8, 9).

Alteraciones durante la infección con *PorPV*

Los cambios histológicos observados posterior a la infección con *PorPV* fueron dosis-dependientes, identificando daños histológicos más evidentes por la infección con *PorPV* en la dosis concentrada, comparada con la dosis diluida.

Porción anterior: dosis concentrada

En dosis concentrada ($1 \times 10^{9.5}$ DICC_{50%}) se observaron daños histológicos a partir del día dos pi, identificándose una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grosor del epitelio, pérdida multifocal de cilios y vacuolización de células epiteliales y glándulas seromucosas (Figura 4D). A partir del día cuatro pi se observan zonas de metaplasia en el epitelio, observándose en zonas epitelio cilíndrico simple y cúbico de dos capas con células caliciformes, con pérdida parcial de cilios (Figura 4F, H).

Porción posterior: dosis concentrada

Se identificaron cambios histológicos y estructurales en menos hpi en la porción posterior que en la anterior. A partir del día dos pi se observó pérdida de cilios en el epitelio, formación de vesículas citoplasmáticas, en epitelio y glándulas seromucosas, desorganización intercelular, degeneración hidrópica y adelgazamiento considerable del grosor epitelial, con zonas de metaplasia a un epitelio cúbico simple (Figura 5D). A partir del día cuatro pi la estructura epitelial adquirió una forma de epitelio cilíndrico simple sin cilios, degeneración hidrópica

de células epiteliales y de las glándulas seromucosas más próximas al epitelio (Figura 5F, H).

Porción anterior: dosis diluida

La integridad del epitelio cilíndrico pseudoestratificado se mantuvo sin cambios histológicos aparentes hasta el día cuatro pi (Figura 6 B, D). A partir del día cuatro, se evidenció pérdida multifocal de cilios y disminución significativa del grosor del epitelio (Figura 6 F). En algunos explantes se registró degeneración hidrópica de células epiteliales y haces glandulares (Figura 6F). A partir del día cinco pi el epitelio adquiere la apariencia de epitelio cilíndrico simple sin cilios con presencia esporádica de células caliciformes (Figura 6H).

Porción posterior: dosis diluida

Al igual que en el ensayo de infección con dosis concentrada, en la infección con dosis diluida ($1 \times 10^{7.5}$ DICC_{50%}), la porción posterior de la tráquea presentó cambios histológicos a un menor tiempo pi. El epitelio se mantuvo sin cambios histológicos aparentes hasta el día dos pi (Figura 7B). A partir del día dos pi se observó adelgazamiento significativo del grosor del epitelio, pérdida multifocal de cilios y en algunas zonas de los explantes se observó metaplasia del epitelio, el cual presentaba la apariencia de un epitelio cilíndrico simple de una y dos capas (Figura 7D). No se observó degeneración en haces glandulares. Dichos cambios histológicos se mantuvieron hasta el final del experimento, en donde sólo se evidenció vacuolización de células epiteliales y algunas glándulas seromucosas (Figura 7 F, H).

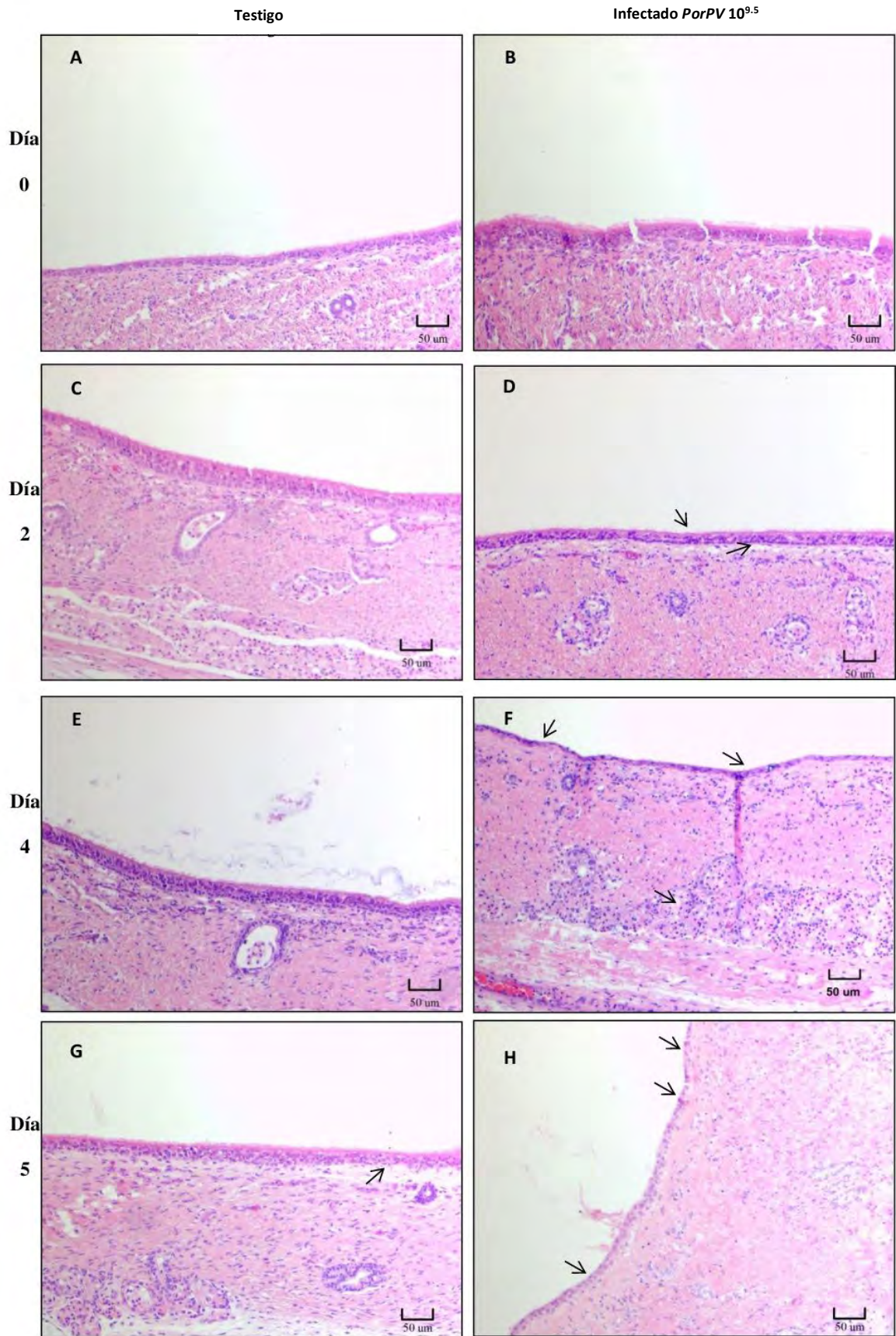


FIGURA 4. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Anterior concentrado
 Microfotografías representativas de explantes de tráquea de cerdo infectados/testigo en sistema de cultivo (Porción anterior, dosis concentrada). Explantes testigo al día 0 (A), 2 (C), 4(E) y 5 (G) comparados con explantes infectados (B, D, F, H).

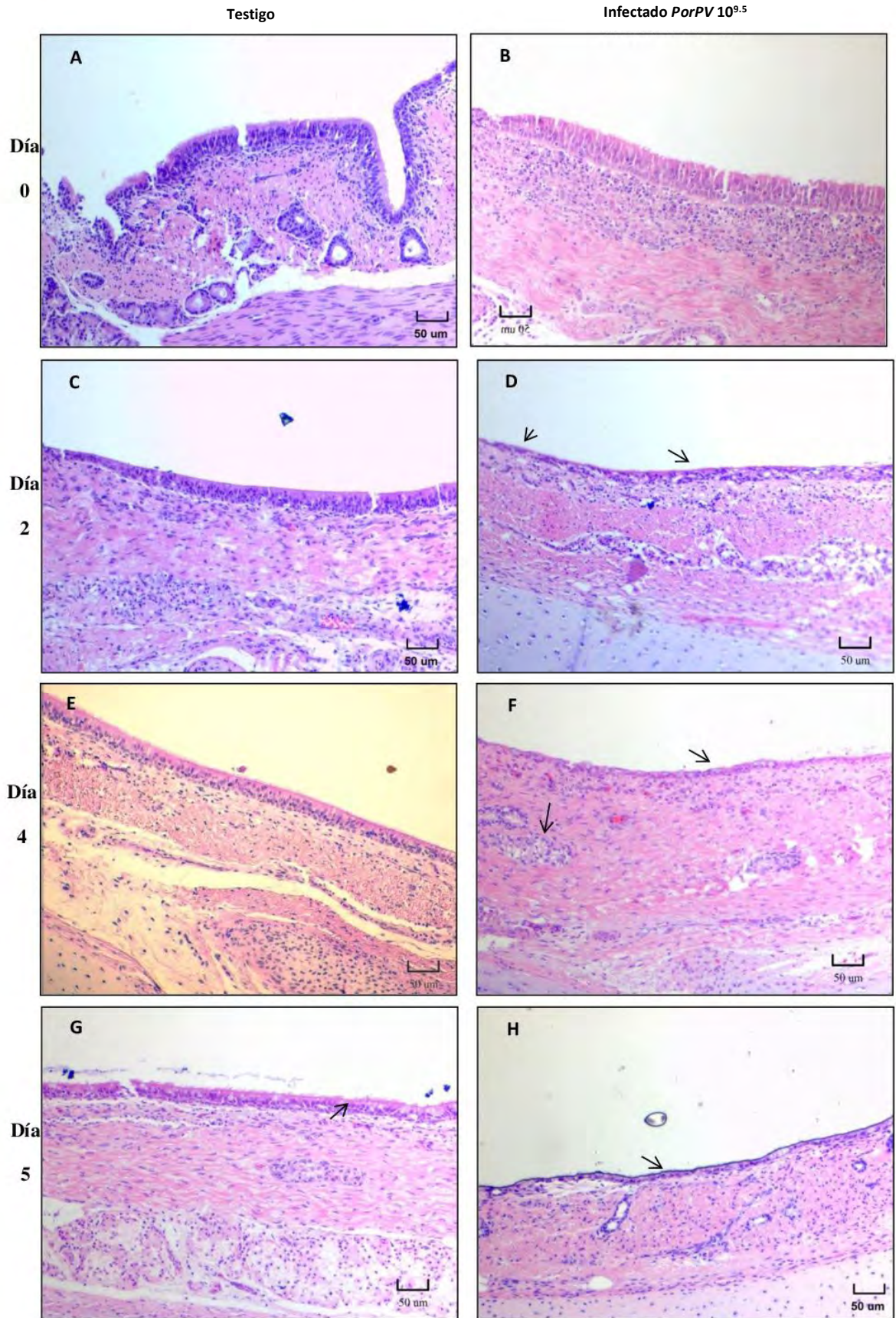


FIGURA 5. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Posterior concentrado

Microfotografías representativas de explantes de tráquea de cerdo infectados/testigo en sistema de cultivo (Porción posterior, dosis concentrada). Explantes testigo al día 0 (A), 2 (C), 4(E) y 5 (G) comparados con explantes infectados (B, D, F, H).

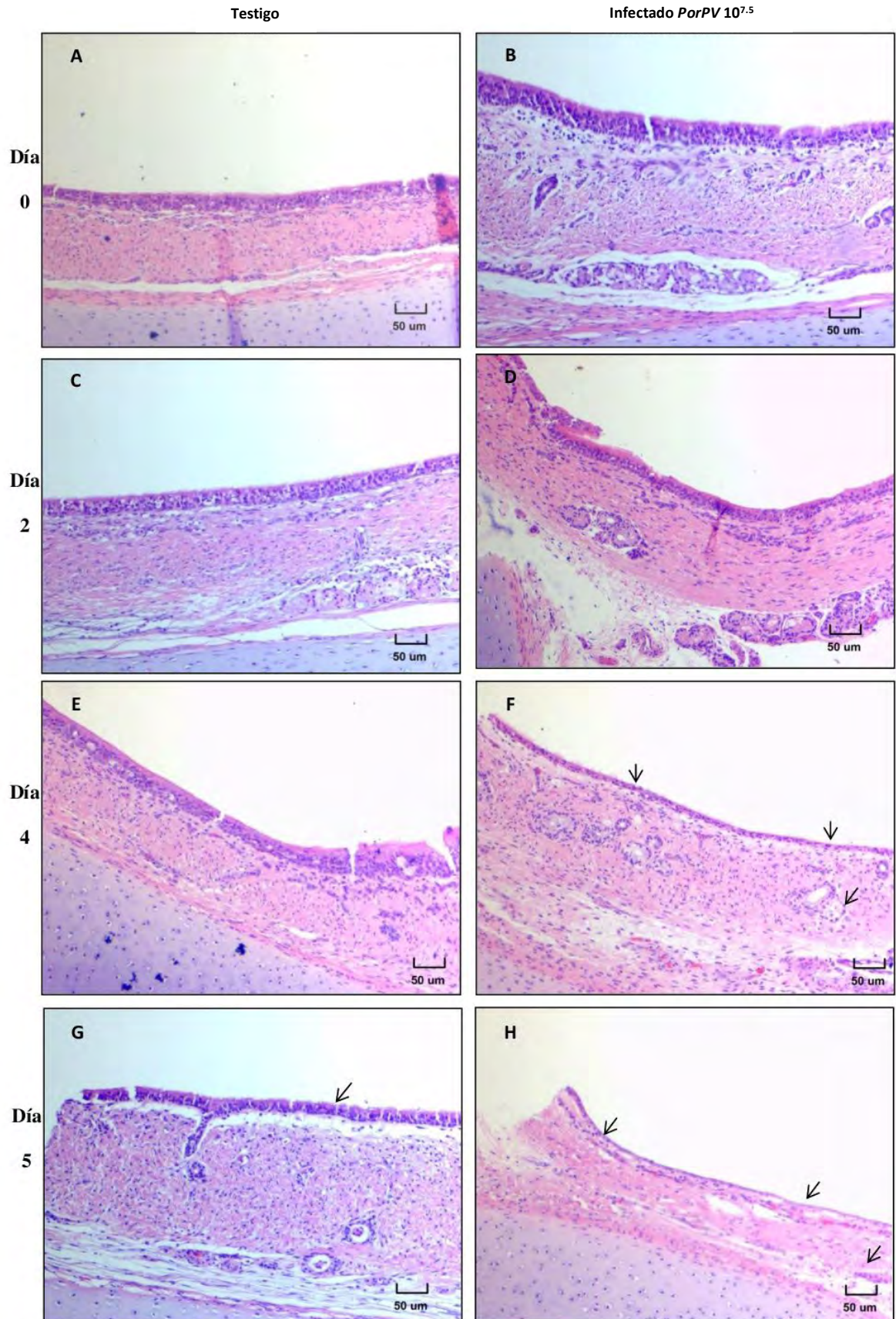


FIGURA 6. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Anterior diluido

Microfotografías representativas de explantes de tráquea de cerdo infectados/testigo en sistema de cultivo (Porción anterior, dosis diluida). Explantes testigo al día 0 (A), 2 (C), 4(E) y 5 (G) comparados con explantes infectados (B, D, F, H).

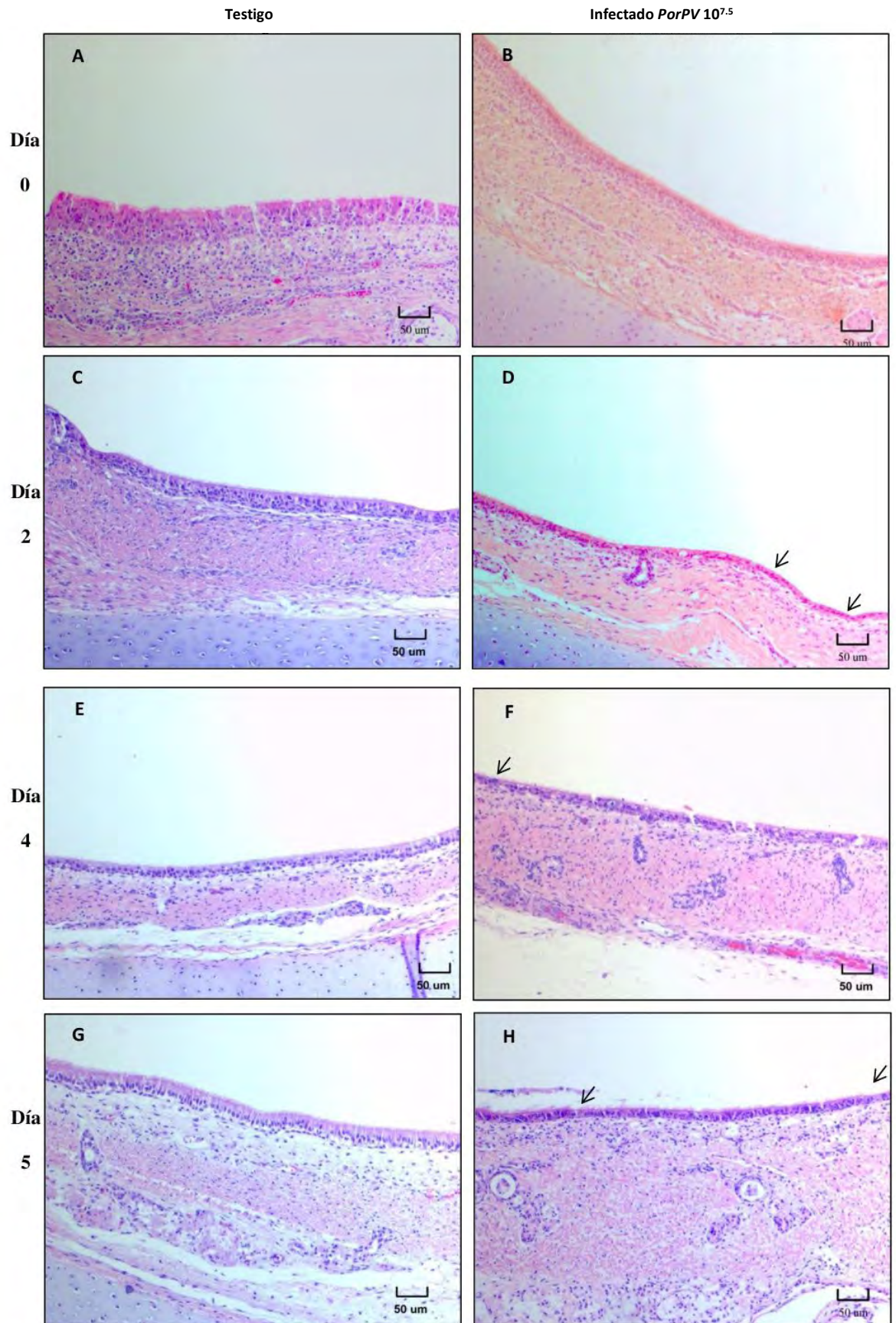


FIGURA 7. Tinción de H/E de explantes traqueales de cerdo: Posterior diluido

Microfotografías representativas de explantes de tráquea de cerdo infectados/testigo en sistema de cultivo (*Porción posterior, dosis diluida*). Explantes testigo al día 0 (A), 2 (C), 4(E) y 5 (G) comparados con explantes infectados (B, D, F, H).

Evaluación del grosor de la capa epitelial: porción anterior

Se realizó la medición del grosor de la capa epitelial de los explantes traqueales en microfotografías de las laminillas teñidas con H/E para evaluar de forma cuantitativa el efecto del sistema de cultivo *ex vivo* y el efecto de la infección con distintas dosis de *PorPV*.

Se identificó un efecto significativo ($P < 0.0001$) en el sistema de cultivo *ex vivo* en la disminución del grosor del epitelio de los explantes entre las 0, 48 y 96 h de cultivo (50.70 ± 0.83 vs. 34.70 ± 0.63 vs. 30.30 ± 0.69 μm respectivamente). Los días restantes de evaluación en cultivo no se observó una variación significativa ($P > 0.05$) en el grosor epitelial.

El efecto de la infección con *PorPV* en el grosor del epitelio en los explantes traqueales se evidenció de forma significativa a las 24 hpi, identificándose disminución significativa en el grosor epitelial, siendo más notable la disminución en el inóculo concentrado (Figura 8). A las 48 hpi se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el grosor epitelial del tratamiento con el inóculo concentrado (18.83 ± 0.73 μm) comparado con el tratamiento testigo (34.70 ± 0.63 μm). No se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) en el grosor epitelial del tratamiento con el inóculo diluido (35.88 ± 0.98 μm) en referencia con tratamiento testigo.

En el día cuatro pi se observó un adelgazamiento significativo ($P < 0.0001$) en el tratamiento con inóculo concentrado (12.27 ± 0.68 μm), seguido del inóculo diluido (17.75 ± 0.50 μm) comparados con el grupo testigo (30.30 ± 0.69 μm). No se identificó variación significativa en el grosor de la capa epitelial los dpi subsecuentes (Figura 8).

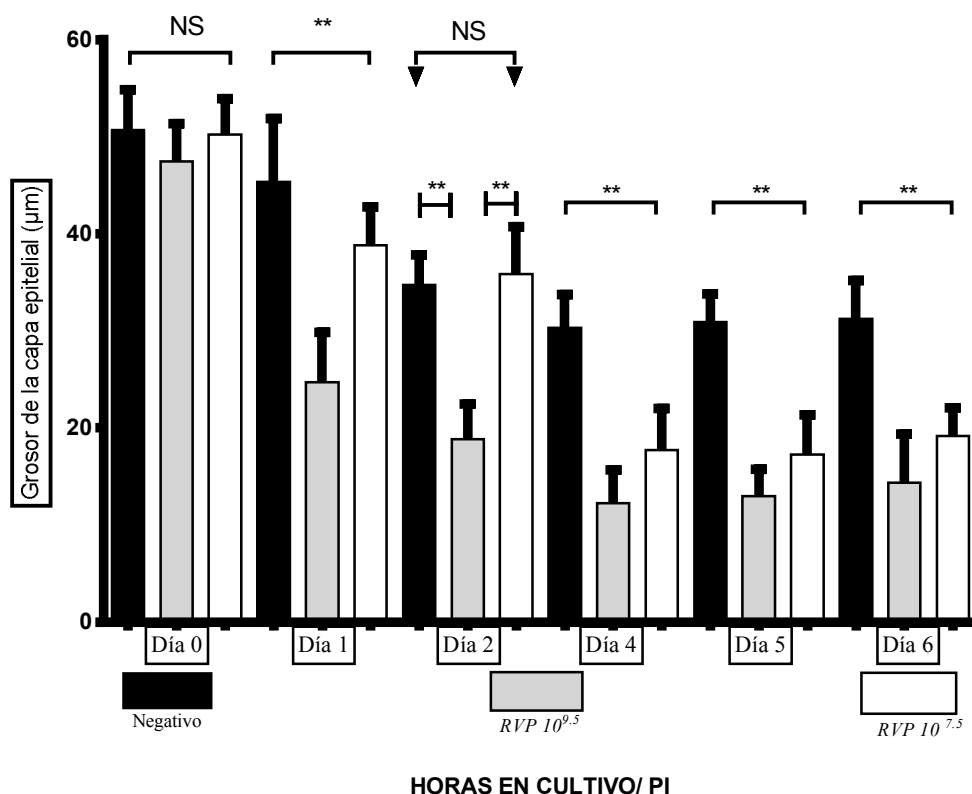


Figura 8. Grosor de la capa epitelial en explantes infectados con *PorPV* en porción anterior de tráquea

La Grafica representa los valores de la media y desviación estándar en µm del grosor de la capa epitelial de tres experimentos independientes. NS= Diferencias no significativas; **= Diferencias significativas $p < 0.05$.

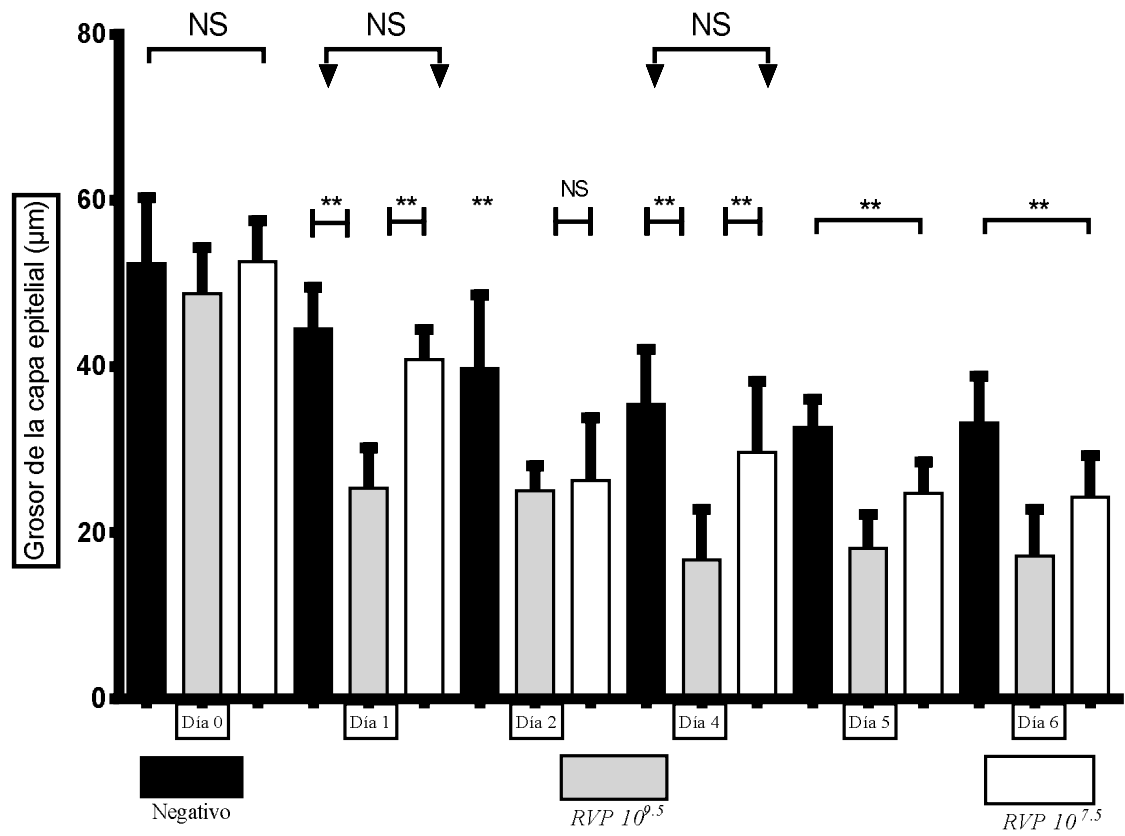
Evaluación del grosor de la capa epitelial: porción posterior

En la porción posterior de la tráquea se observó la disminución significativa ($P < 0.0001$) del grosor de la capa epitelial al día uno pi en el tratamiento con inóculo concentrado comparado con grupo testigo (25.32 ± 4.93 vs. 44.50 ± 5.08 µm). No se observó disminución significativa en el grosor epitelial en el tratamiento con inóculo diluido comparado con grupo testigo (48.84 ± 3.63 µm).

En el día dos pi en cultivo se identificó disminución significativa en el grosor epitelial del tratamiento testigo comparado con el día cero (39.75 ± 8.9 vs 52.37 ± 7.9 µm). De igual manera el grosor epitelial en el tratamiento con inóculo diluido

evidenció una disminución significativa en su grosor comparador con el día uno pi ($26.31 \pm 7.52 \mu\text{m}$), dicho tratamiento no presentó diferencias significativas en el grosor epitelial con el tratamiento concentrado ($25.09 \pm 2.94 \mu\text{m}$) ($P > 0.05$).

En el día cuatro pi se identificó disminución significativa en el grosor epitelial del tratamiento con el inóculo concentrado ($16.7 \pm 6.1 \mu\text{m}$), el cual fue significativamente menor en comparación con tratamiento con inóculo diluido ($29.67 \pm 8.51 \mu\text{m}$). El grosor epitelial en ambos tratamientos fue significativamente menor que el grupo testigo ($35.45 \pm 6.59 \mu\text{m}$). No se evidenció disminución significativa ($P > 0.05$) en el grosor epitelial a partir del día cuatro pi/cultivo para todos los tratamientos (Figura 9).



Horas en cultivo/PI

Figura 9. Grosor de la capa epitelial en explantes infectados con *PorPV* en porción posterior de tráquea

La Grafica representa los valores de la media y desviación estándar en µm del grosor de la capa epitelial de tres experimentos independientes. NS= Diferencias no significativas; **= Diferencias significativas p<0.05.

Cinética de replicación viral

Para identificar la replicación del *PorPV* en los explantes traqueales se realizó la cuantificación ARN total viral mediante *q*-RT-PCR cada 24 h durante seis días. Se realizó una inoculación inicial de $1 \times 10^{9.5}$ DICC_{50%}/5 μ l (dosis concentrada) y $10^{7.5}$ DICC_{50%}/5 μ l (dosis diluida) en los explantes, de acuerdo al diseño experimental (Cuadro 1). Se evaluó la cinética de replicación viral en la porción anterior y posterior de la tráquea, para identificar si la replicación del *PorPV* se ve influenciada por la porción traqueal infectada o es dosis-dependiente.

Se observó un incremento en la cantidad de ARN total viral cuantificado a partir de las 12 hpi en ambos tratamientos (dosis concentrada y diluida). Para el inóculo diluido, el número de copias de ARN total viral inoculado fue de 4.53 Log₁₀. El incremento en el número de copias de ARN total viral detectado fue a partir de las 12 hpi, posteriormente no se evidenció un incremento o disminución significativo en la cantidad de copias de ARN total viral detectadas hasta las 96 hpi, evaluación donde se observó una tendencia al incremento y a las 120 hpi se identificó un pico de replicación viral, el cual disminuyó a las 144 hpi. No se observaron diferencias representativas en la cinética de replicación viral entre la porción anterior y posterior de tráquea (Figura 10). El pico de replicación observado a las 120 hpi superó el número de copias virales detectado en los tratamientos evaluados (porción anterior: 8.77 ± 0.3 ; porción posterior 8.62 ± 0.4 copias de ARN total viral/ml Log₁₀).

Cinética de replicación del *PorPV*

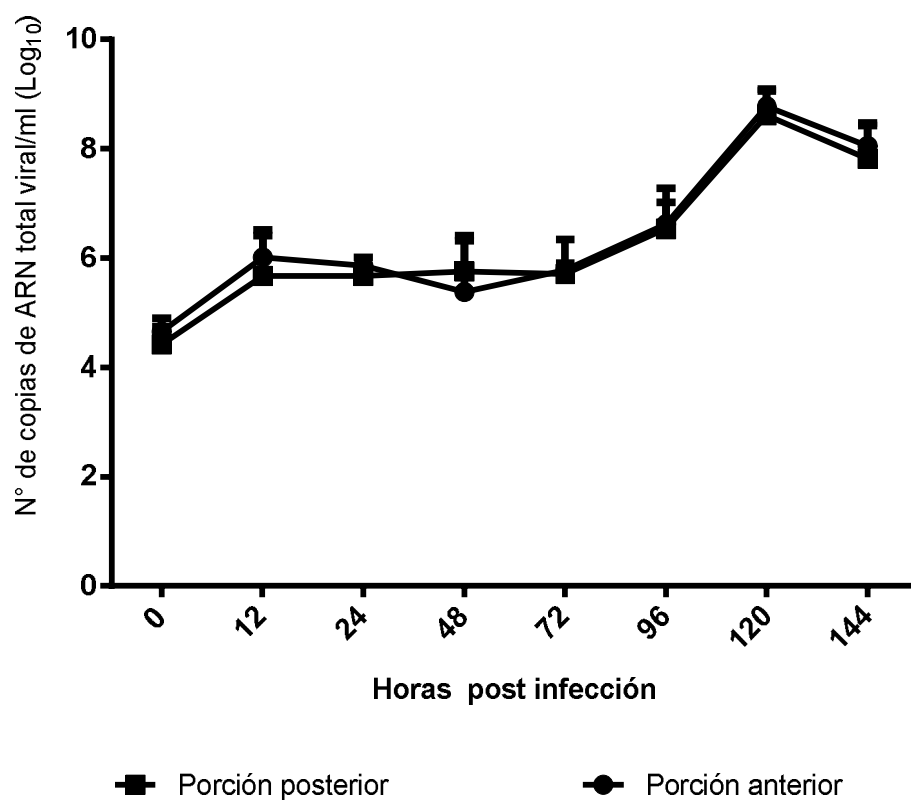


Figura 10. Número de copias de ARN total viral/ml (Log₁₀). Inóculo *PorPV* 10^{7.5} DICC_{50%}

En el caso del inóculo concentrado, el número de copias de ARN total viral detectado fue de 6.15 Log_{10} . En esta cinética de replicación viral no se identificó una tendencia de aumento o disminución en el número de copias virales detectadas hasta las 72 hpi. A las 96 hpi se identificó una disminución en el número de copias de ARN total viral detectado en la porción anterior de la tráquea (4.79 ± 0.8) comparado con la porción posterior de la tráquea, en donde se mantuvo la tendencia en la cantidad de partículas virales detectadas (7.97 ± 0.9). A las 120 hpi el número de copias de ARN total viral fue similar en ambas porciones (anterior: 7.56 ± 0.9 ; posterior 7.47 ± 0.4). No se identificó un pico de replicación viral en la duración del experimento a dosis concentrada (Figura 11).

Cinética de replicación del *PorPV*

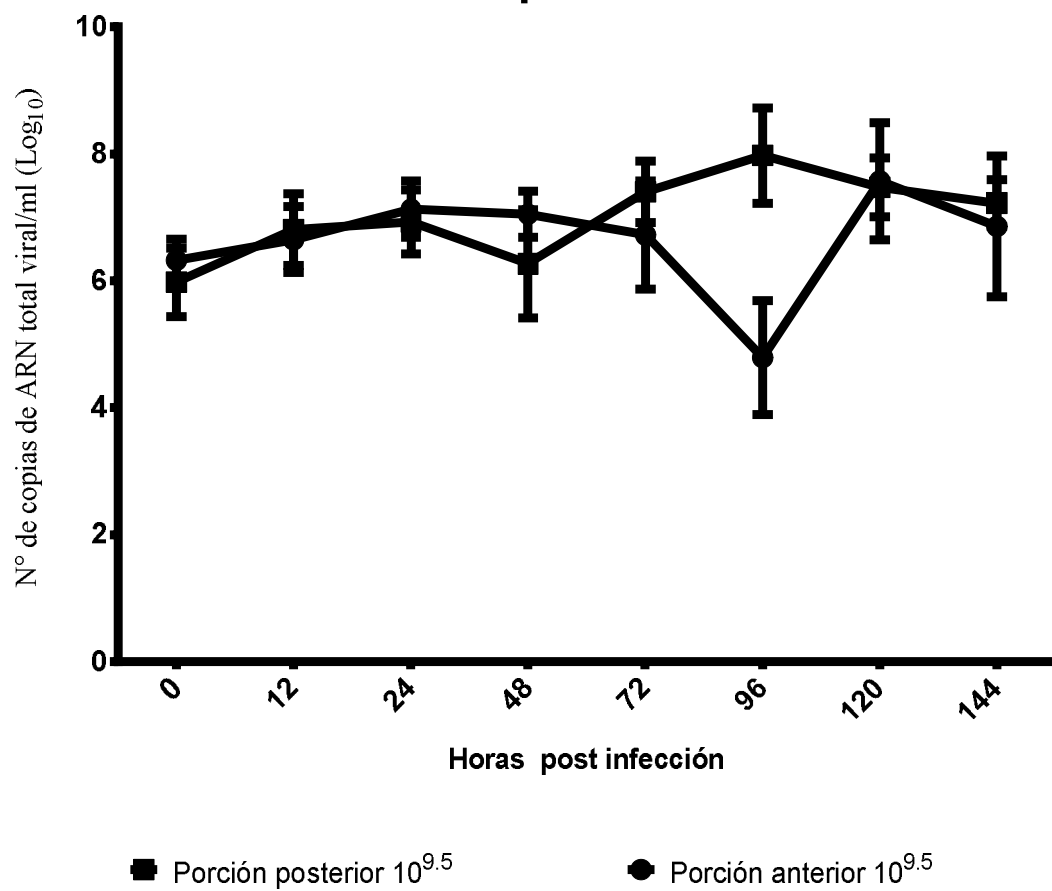


Figura 11. Número de copias de ARN total viral/ml (Log₁₀). Inóculo *PorPV* 10^{9.5} DICC_{50%}.

DISCUSIÓN

Establecimiento del sistema de evaluación *ex vivo*

La mucosa del tracto respiratorio superior es una importante vía de ingreso de agentes patógenos, siendo una de las principales líneas de defensa y un sitio común de replicación de algunos de estos agentes (Vandekerckhove *et al.*, 2009). Los virus que afectan el sistema respiratorio ingresan a la cavidad nasal, entran en contacto con la mucosa e infectan las células epiteliales susceptibles. Algunos virus llegan solo hasta esta fase de infección, algunos cruzan la membrana basal e infectan los tejidos subyacentes (Glorieux *et al.*, 2007).

Estudios previos han evaluado en infecciones *in vivo* el tropismo y permisividad de replicación del *PorPV* en el sistema respiratorio, en donde se ha identificado la susceptibilidad de la tráquea a la infección con *PorPV* a los tres días de edad (Allan *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 2017; McNeilly *et al.*, 1997; Rivera-Benítez *et al.*, 2016, 2013a). En los modelos de infección experimentales para la evaluación de la patogenia del *PorPV*, predomina de forma genérica el estudio de la patogenia de infección con infecciones experimentales *in vivo* (Cuevas *et al.*, 2009; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2004; Rivera-Benítez *et al.*, 2013a, 2013c).

En el presente trabajo de investigación se estandarizó un sistema de cultivo *ex vivo* con explantes traqueales de cerdo para el estudio de la patogenia del *PorPV*, desarrollando el modelo basado en estudios previos (Feng *et al.*, 2015; Glorieux *et al.*, 2007; González *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2010); evidenciando la viabilidad del sistema de explantes y una susceptibilidad a la infección productiva con *PorPV* en el inóculo con la menor concentración viral.

Dicho sistema permite disminuir costos de compra y mantenimiento de unidades experimentales, al poder usar cada explante como una unidad experimental independiente, siendo un sistema de evaluación viable para la simulación de una infección *in vivo* en la fase temprana de infección con *PorPV* o algunos otros agentes patógenos del sistema respiratorio en cerdos.

Este sistema de evaluación presenta ventajas comparado con sistemas de cultivos celulares o cultivos primarios al preservar algunas características como diversidad celular, polarización celular, expresión y distribución de receptores celulares específicos preservando la morfología del tejido en el huésped (Lin *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2010).

Efecto del sistema de cultivo *ex vivo* en los explantes traqueales

Los explantes traqueales mostraron disminución significativa en el grosor epitelial en el día dos y cuatro en cultivo, lo cual difiere con reportes previos (Feng *et al.*, 2015; Glorieux *et al.*, 2007; González *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2010) en donde el grosor epitelial se mantiene sin cambios significativos hasta siete días en cultivo. Es importante señalar que se observó la preservación de la morfología característica de un epitelio traqueal (epitelio cilíndrico pseudoestratificado) y la viabilidad del mismo evaluada por aclaramiento ciliar con las microperlas de poliestireno los días que se mantuvieron dichos explantes en cultivo.

A partir del día cinco en cultivo se identificó esporádicamente degeneración celular en epitelio y haces glandulares, coincidiendo con cambios observados en ensayos previos que van de un rango de evaluación de cinco a siete días (Feng *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2010). La disminución del grosor epitelial y degeneración del epitelio asemejan un fenómeno de atrofia tisular. La atrofia es la disminución en el tamaño de las células en un tejido diferenciado, representando la adaptación a un entorno celular diferente; las células se contraen cuando su nivel de trabajo disminuye o cuando su fuente de nutrición o estimulación se elimina (Cheville,

2009), atribuyendo la atrofia observada a un efecto directo del sistema de cultivo asociados a cambios en el pH del medio de cultivo, adaptación por limitaciones energéticas/nutricionales del tejido, ya que si bien el medio de cultivo contiene nutrientes esenciales requeridos para el mantenimiento/viabilidad de los explantes, este no puede sustituir los requerimientos específicos en el sistema *in vivo*.

Efecto de la infección con *PorPV* en los explantes traqueales

Los cambios patológicos evidenciados a causa de la infección por *PorPV* en los explantes traqueales siguen el mismo patrón de daño y degeneración celular, siendo el tiempo de aparición de los mismos dependientes de la dosis de inóculo y porción de tráquea, esto se debe a que los cambios patológicos que se desarrollan en respuesta a una lesión dependen de la duración del efecto y concentración en el tejido del agente dañino y características metabólicas de la célula. En este caso no existe un suministro vascular al tejido, por lo que no es un factor que influya en los cambios patológicos observados.

Los cambios patológicos identificados en los explantes infectados con *PorPV* presentaron variaciones particulares, evidenciando un efecto de la concentración del inóculo viral y porción de tráquea infectada.

En el día uno pi no se identificaron cambios patológicos microscópicos atribuibles a la infección con *PorPV*, sin embargo se observó una disminución significativa en el grosor del epitelio y un aumento en la cantidad de ARN total viral detectado por *q-RT-PCR* entre las 12 y 24 hpi en los explantes infectados en ambas porciones de la tráquea, identificando una tendencia más clara en el tratamiento con el inóculo diluido ($10^{7.5}$), lo que evidencia la susceptibilidad a la infección productiva con *PorPV* en los explantes traqueales, sin identificarse variabilidad en este momento por la variable porción de tráquea.

Ensayos experimentales con infecciones *in vivo* han evidenciado un incremento en la cantidad de ARN total viral detectado a partir del día 1 pi, coincidiendo con lo observado en el presente trabajo (Herrera *et al.*, 2017; Rivera-Benítez *et al.*, 2016, 2013a). La susceptibilidad a la infección y permisividad de replicación se atribuye a que el *PorPV* presenta afinidad por el receptor de ácido siálico $\alpha 2,3$ -Gal (Reyes-Leyva *et al.*, 1997), y ha sido reportada la distribución de este receptor en tráquea (Nelli *et al.*, 2010; Vallejo *et al.*, 2000).

A partir del día dos pi se identificaron cambios patológicos microscópicos atribuidos a la infección con *PorPV* de forma más pronunciada en los explantes de la porción posterior de la tráquea, observándose cambios más significativos en el tratamiento con el inóculo concentrado.

Se identificó pérdida parcial de cilios, formación de vesículas intracitoplasmáticas en epitelio y glándulas seromucosas, desorganización intercelular, degeneración hidrópica y algunas zonas con metaplasia a epitelio cúbico simple. La degeneración celular observada se debe a que se alteran los electrolitos celulares, se interrumpen o desplazan las vías metabólicas y se desarrollan cambios estructurales en organelos. En la secuencia clásica de degeneración y muerte, las células afectadas se vuelven pálidas e hinchadas, sufren lesiones irreversibles por efectos directos y secundarios y se colapsan en masas amorfas y encogidas (Cheville, 2009).

En el tratamiento con inóculo diluido solo se identificó adelgazamiento significativo del epitelio, pérdida multifocal de cilios, metaplasia multifocal en algunos explantes a un epitelio cilíndrico simple de una y dos capas. Dichos cambios patológicos en el tratamiento posterior con inóculo diluido se mantuvieron sin mayores cambios hasta el final del experimento. Según reportes previos (Nelli *et al.*, 2010; Trebbien *et al.*, 2011), la porción posterior de la tráquea presenta una distribución más

amplia del receptor receptor de ácido siálico $\alpha 2,3$ -Gal en el epitelio, a lo que se puede atribuir los cambios observados de degeneración celular en un tiempo pi más corto que en porción anterior de tráquea.

En cuanto a la porción anterior de tráquea, el tratamiento con inóculo diluido no mostró cambios aparentes, sin embargo el inóculo concentrado evidenció disminución significativa del grosor epitelio y pérdida multifocal de cilios, así como vacuolización de glándulas seromucosas, cambios patológicos microscópicos iniciales en un evento de respuesta al daño celular (Cheville, 2009; Mast *et al.*, 2005).

En el día cuatro pi en ambas porciones de tráquea, se evidenciaron daños tisulares más denotados atribuibles a la infección con *PorPV*. La porción posterior y anterior con inóculo concentrado presentó metaplasia con un epitelio cilíndrico simple sin cilios y algunas zonas con apariencia de epitelio cúbico de dos capas con presencia esporádica de células caliciformes, degeneración hidrópica de glándulas seromucosas, así como pérdida de células epiteliales. La metaplasia es la sustitución de un tipo de célula adulta completamente diferenciada en un tejido por otro tipo de célula adulta que se encuentra normalmente allí. También llamada transdiferenciación, representa la sustitución de células vulnerables por células que son más resistentes a un agente nocivo que lo incita, en este caso en respuesta la infección con *PorPV*, la metaplasia se desarrolla durante un largo periodo de lesiones persistentes de bajo nivel. La metaplasia surge típicamente de un efecto directo en las poblaciones de células madre. Dicho fenómeno se ha observado como respuesta en tejidos de tráquea con otros paramyxovirus (Cheville, 2009; Mast *et al.*, 2005).

En la cuantificación por *q-RT-PCR* no se observa una tendencia significativa en el aumento de partículas virales a lo largo del experimento, con la dosis concentrada, pudiendo atribuirse este fenómeno a el daño generado en el epitelio, al ser un

inóculo muy concentrado no permitiendo la regeneración de células epiteliales que pudiesen servir como sustrato para una segunda ronda de replicación.

En el caso de los tratamientos con inóculo diluido para la porción anterior de tráquea se evidenció el inicio de cambios patológicos evidentes hasta día cuatro pi, observando pérdida multifocal de cilios, disminución significativa en grosor del epitelio, culminando al día cinco pi con metaplasia a epitelio cilíndrico simple sin cilios con presencia esporádica de células caliciformes. La degeneración del cuerpo basal que ancla los cilios en el cuerpo celular generalmente precede a la pérdida de cilios. Los cilios se deforman, acortan y desaparecen; los componentes microtubulares se retraen y se disocian de otros filamentos del cilio. Los cilios afectados se rompen o retraen con la pérdida de componentes internos a la matriz citoplásmica del citoplasma subyacente. La pérdida de los cilios, es una respuesta común de las enfermedades virales respiratorias tales como las infecciones por influenza y paramyxovirus (Cheville, 2009; González *et al.*, 2014; Mast *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2010).

Una menor concentración viral podría desencadenar una ligera respuesta inmune innata, restringida a algunas células, permitiendo al virus infectar a una amplia gama de células susceptibles en diversas fases de infección, a lo que atribuye el pico de replicación viral entre las 96 y 120 hpi en el tratamiento con inóculo diluido. Por ello es fundamental en ensayos futuros evaluar el papel de la inmunidad innata en infecciones experimentales con explantes, para poder validar esta hipótesis. La identificación de los cambios patológicos microscópicos más pronunciados, así como el inicio del pico de replicación viral al día cuatro pi coinciden con los resultados observados en infecciones *in vivo* en donde se evidencian signos clínicos pronunciados en respuesta a la infección con *PorPV* y mayor carga viral. Adicionalmente se identificó una carga viral similar en porción anterior y posterior de tráquea, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Rivera-Benítez *et al.*, 2016, 2013a).

Clasificaciones previas (Reyes-Leyva *et al.*, 2002) basadas en estudios experimentales alistan a la cepa PAC-3 del *PorPV* en el grupo tres, en donde junto con la cepa PAC-2 se observó que generan principalmente problemas reproductivos en cerdos adultos y escasas manifestaciones neurológicas en lechones (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). Adicionalmente, ensayos experimentales evidencian la susceptibilidad a la infección en sistema respiratorio con esta cepa (Rivera-Benítez *et al.*, 2016, 2013a), optando de esta forma a continuar con la cepa PAC-3 como modelo de investigación, y así poder evidenciar el daño generado en tráquea.

Los cambios asociados a daño y degeneración celular se pueden asociar adicionalmente a que dicha cepa posee mayor actividad enzimática (neuraminidasa) y un nivel elevado de destrucción celular (citólisis), atribuyendo de esta forma la rápida destrucción del tejido epitelial observada por histología.

La actividad neuraminidasa, al eliminar los residuos de ácido siálico, exponen residuos de galactosa que son reconocidos por galectinas transmembranales que inducen una cascada de señales que culminan en apoptosis (Reyes-Leyva *et al.*, 2002), pudiendo de esta forma ser la apoptosis una de las vías de afectación epitelial, por lo que en estudios futuros se sugiere la evaluación de marcadores apoptóticos en epitelio.

CONCLUSIONES

El sistema de cultivo de explantes traqueales es un modelo de evaluación que permanece viable hasta por seis días, con los parámetros de cultivo desarrollados en el presente experimento, evidenciando solamente disminución del grosor epitelial de forma significativa en el día dos y cuatro en cultivo, no afectando este fenómeno la funcionalidad e integridad del epitelio traqueal.

Los resultados mostrados evidencian la degeneración tisular causada por la infección del *PorPV*, confirmando la susceptibilidad del epitelio traqueal a la infección productiva con *PorPV*, siendo más eficaz la replicación viral con inóculos con menor concentración de partículas virales.

La infección con *PorPV* destruye la arquitectura y función del epitelio traqueal, por lo que puede predisponer al huésped a infecciones bacterianas o virales secundarias. Es relevante evaluar en estudios futuros la respuesta inmune innata de los explantes y poder asociarlo con los cambios patológicos microscópicos y permisividad de replicación del *PorPV*.

El presente sistema de evaluación *ex vivo* constituye una herramienta de evaluación biológica viable para el estudio de la patogenia del *PorPV* y otros agentes infecciosos respiratorios.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	Ácido Ribonucleico.
CFL	Campana de flujo laminar.
CO ₂	Dióxido de carbono.
DICC _{50%}	Dosis infectantes 50% en cultivo celular.
DMEM/F12 HAM:	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/F12 HAM
dpi:	Días post infección.
EOA:	Enfermedad del ojo azul.
F:	Proteína de fusión.
H/E:	Hematoxilina/Eosina.
h:	Horas.
HEX:	51- hexachloro-fluoresceina fosforamidita
HN:	Hemaglutinina-neuraminidasa.
hpi:	Horas post infección
L:	Proteína de alto peso molecular.
M:	Proteína de Matriz.
NP:	Nucleoproteína.
P:	Fosfoproteína.
PAC:	Producción Animal Cerdos.
pi:	Post infección.
qRT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
RPM:	Revoluciones por minuto.
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute.
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
<i>PorPV:</i>	<i>Rubulavirus porcino</i>
SCP:	Plexo coroideo ovino

SFB:	Suero fetal bovino.
μl:	Microlitros
μm:	Micrómetros
VLPM:	Virus de La Piedad Michoacán.

REFERENCIAS

- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J., 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch. Virol.* 161, 2921–2949. doi:10.1007/s00705-016-2977-6
- Allan, G.M., McNeilly, F., Walker, I., Linne, T., Moreno-López, J., Hernández, P., Kennedy, S., Carroll, B.P., Herron, B., Foster, J.C., Adair, B., 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. diagnostic Investig.* 8, 405–13. doi:10.1177/104063879600800401
- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J., Linne, T., 1992. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: The P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73, 1195–1200. doi:10.1099/0022-1317-73-5-1195
- Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J., Linne, T., 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 72, 1045–1050. doi:10.1099/0022-1317-72-5-1045
- Chambers, T.M., Balasuriya, U.B.R., Reedy, S.E., Tiwari, A., 2013. Replication of avian influenza viruses in equine tracheal epithelium but not in horses. *Influenza Other Respi. Viruses* 7, 90–93. doi:10.1111/irv.12188
- Cheville, N.F., 2009. *Ultrastructural Pathology the Comparative Cellular Basis of Disease: Second Edition, SECOND EDI.* ed, Ultrastructural Pathology the Comparative Cellular Basis of Disease: Second Edition. Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9780813810379
- Cuevas-Romero, J.S., Blomstrom, A.L., Berg, M., 2015. Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection - an overview. *Infect Ecol Epidemiol* 5, 29602. doi:10.3402/iee.v5.29602\r29602 [pii]
- Cuevas-Romero, S., Hernández-Baumgarten, E., Kennedy, S., Hernández-Jáuregui, P., Berg, M., Moreno-López, J., 2014. Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: the detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Res.* 188, 155–61. doi:10.1016/j.virusres.2014.04.012

- Cuevas, J.S., Rodríguez-Ropón, A., Kennedy, S., Moreno-López, J., Berg, M., Hernández-Jáuregui, P., 2009. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 148–52. doi:10.1016/j.vetimm.2008.09.008
- Escobar-López, A.C., Rivera-Benitez, J.F., Castillo-Juárez, H., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo-Ortega, M.E., Sánchez-Betancourt, J.I., 2012. Identification of antigenic variants of the porcine rubulavirus in sera of field swine and their seroprevalence. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 416–20. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01286.x
- Feng, K.H., Gonzalez, G., Deng, L., Yu, H., Tse, V.L., Huang, L., Huang, K., Wasik, B.R., Zhou, B., Wentworth, D.E., Holmes, E.C., Chen, X., Varki, A., Murcia, P.R., Parrish, C.R., 2015. Equine and canine influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence. *J. Virol.* 89, JVI.00521-15. doi:10.1128/JVI.00521-15
- Glorieux, S., Van den Broeck, W., van der Meulen, K.M., Van Reeth, K., Favoreel, H.W., Nauwynck, H.J., 2007. In vitro culture of porcine respiratory nasal mucosa explants for studying the interaction of porcine viruses with the respiratory tract. *J. Virol. Methods* 142, 105–12. doi:10.1016/j.jviromet.2007.01.018
- González, G., Marshall, J.F., Morrell, J., Robb, D., McCauley, J.W., Perez, D.R., Parrish, C.R., Murcia, P.R., 2014. Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas. *J. Virol.* 88, 9208–19. doi:10.1128/JVI.00887-14
- Hernández-Jáuregui, P., Ramírez Mendoza, H., Mercado García, C., Moreno-López, J., Kennedy, S., 2004. Experimental Porcine Rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant Gilts. *J. Comp. Pathol.* 130, 1–6. doi:10.1016/S0021-9975(03)00058-6
- Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández-Jauregui, P., Zenteno, E., 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 367–381. doi:10.1016/S0165-2427(98)00169-X
- Herrera, J., Gómez-Núñez, L., Lara-Romero, R., Diosdado, F., Martínez-Lara, A., Jasso, M., Ramírez-Mendoza, H., Pérez-Torres, A., Rivera-Benítez, J.F., 2017. Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Res.* 230, 50–58. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.010
- Jones, J.C., Baranovich, T., Zaraket, H., Guan, Y., Shu, Y., Webby, R.J., Webster, R.G., 2013. Human H7N9 influenza A viruses replicate in swine respiratory tissue explants.

- J. Virol. 87, 12496–8. doi:10.1128/JVI.02499-13
- Katz, J.M., Naeve, C.W., Webster, R.G., 1987. Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* 156, 386–95.
- Kirkland, P., Stephano, A., 2006. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle, and Nipah Virus Infections., in: *Diseases of Swine*, 9th. John Wiley & Sons, p. 1153.
- Lam, K.M., 2003. Newcastle Disease Virus – Induced Damage to Embryonic Tracheae and Red Blood Cells. *BioOne* 47, 197–202.
- Lin, C., Holland Jr., R., Williams, N.M., Chambers, T.M., 2001. Cultures of equine respiratory epithelial cells and organ explants as tools for the study of equine influenza virus infection. *Arch. Virol.* 146, 2239–2247.
- Linné, T., Berg, M., Bergvall, a C., Hjertner, B., Moreno-López, J., 1992. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 33, 263–73.
- Mast, J., Nanbru, C., Van den Berg, T., Meulemans, G., 2005. Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Vet. Pathol.* 42, 559–65. doi:10.1354/vp.42-5-559
- Martínez, A., Coba. M.A., Gómez, L., Diosdado, F., Córdova, D., Socci, G., Cuevas, C., Santiago, J., Carrera, E., Zapata, L.E. 2014. Isolation of BEDV from pigs with respiratory diseases, decreased growth rates, and without characteristic signs of BED. En *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Vol II, P 335. Cancun, Quintana Roo, Mexico*
- McNeilly, F., Walker, I., Allan, G.M., Foster, J.C., Linne, T., Merza, M., Hernández, P., Kennedy, S., Adair, B., 1997. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 3–9. doi:10.1177/104063879700900102
- Mendoza-Magaña, M.L., Godoy-Martínez, D. V., Guerrero-Cazares, H., Rodríguez-Peredo, A., Dueñas-Jimenez, J.M., Dueñas-Jiménez, S.H., Ramírez-Herrera, M.A., 2007. Blue eye disease porcine rubulavirus (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialo-glycoprotein as receptor. *Vet. J.* 173, 428–436. doi:10.1016/j.tvjl.2005.12.004
- Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A., Ericsson, A., 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 91, 221–231. doi:10.1007/BF01314282

- Nelli, R.K., Kuchipudi, S. V, White, G. a, Perez, B.B., Dunham, S.P., Chang, K.-C., 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet. Res.* 6, 4. doi:10.1186/1746-6148-6-4
- Nunes, S.F., Murcia, P.R., Tiley, L.S., Brown, I.H., Tucker, A.W., Maskell, D.J., Wood, J.L.N., 2010. An ex vivo swine tracheal organ culture for the study of influenza infection. *Influenza Other Respi. Viruses* 4, 7–15. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00119.x
- Ramírez-Mendoza, H., Hernández-Jauregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-López, J., Kennedy, S., 1997. Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Pathol.* 117, 237–252.
- Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernández, J., Zenteno, R., Vallejo, V., Hernández-Jáuregui, P., Zenteno, E., 1997. NeuAc α 2,3Gal-Glycoconjugate Expression Determines Cell Susceptibility to the Porcine Rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 327–332.
- Reyes-Leyva, J., Garcia-Morales, O., Santos-López, G., Vallejo, V., Ramirez-Mendoza, H., Hernández, J., 2004. Detección de viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* 34, 3–5.
- Reyes-Leyva, J., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., Borraz, M. del T., Ramírez, H., Vallejo, V., Zenteno, E., 2002. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus Porcino. *Mensaje Bioquímico XXVI*, 99–127.
- Rivera-Benítez, J.F., Cuevas-Romero, S., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Ramírez-Mendoza, H., 2013a. Respiratory disease in growing pigs after Porcine rubulavirus experimental infection. *Virus Res.* 176, 137–43. doi:10.1016/j.virusres.2013.05.017
- Rivera-Benítez, J.F., De la Luz-Armendáriz, J., Saavedra-Montañez, M., Jasso-Escutia, M.Á., Sánchez-Betancourt, I., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Martínez-Lara, A., Ramírez-Mendoza, H., 2016. Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus. *Vet. Microbiol.* 184, 31–39. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.005
- Rivera-Benítez, J.F., García-Contreras, A.D.C., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Sánchez-Betancourt, J.I., Ramírez-Mendoza, H., 2013b. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Arch. Virol.* 158, 1849–56. doi:10.1007/s00705-013-1672-0

- Rivera-Benítez, J.F., Martínez-Bautista, R., Pérez-Torres, A., García-Contreras, A. del C., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Ramírez-Mendoza, H., 2013c. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Vet. Microbiol.* 162, 491–498. doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.037
- Rodríguez-Ropón, A., Hernández-Jauregui, P., Sánchez-Torres, L., Favila-Castillo, L., Estrada-Parra, S., Moreno-López, J., Kennedy, S., 2003. Apoptosis in Lymph Nodes and Changes in Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Pigs Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Pathol.* 128, 1–8. doi:10.1053/jcpa.2002.0598
- Sánchez-Betancourt, J.I., Santos-López, G., Alonso, R., Doperto, J.M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Trujillo, M.E., 2008. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res. Vet. Sci.* 85, 359–67. doi:10.1016/j.rvsc.2007.10.007
- Shi, H., Lu, D., Li, H., Han, S., Zeng, Y., 2013. In vitro isolation and cultivation of rabbit tracheal epithelial cells using tissue explant technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 49, 245–9. doi:10.1007/s11626-012-9572-2
- Solís, M., Ramírez-Mendoza, H., Mercado, C., Espinosa, S., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., 2007. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Res. Vet. Sci.* 83, 403–9. doi:10.1016/j.rvsc.2007.01.018
- Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramírez, T.C., 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122, 6–10.
- Sundqvist, A., Berg, M., Hernández-Jauregui, P., Linne, T., Moreno-López, J., 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 71, 609–613. doi:10.1099/0022-1317-71-3-609
- Sundqvist, A., Berg, M., Moreno-López, J., Linne, T., 1992. 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.* 5, 331–340.
- Trebbien, R., Larsen, L.E., Viuff, B.M., 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol. J.* 8, 434. doi:10.1186/1743-422X-8-434

- Vairo, S., Van den Broeck, W., Favoreel, H., Scagliarini, A., Nauwynck, H., 2013. Development and use of a polarized equine upper respiratory tract mucosal explant system to study the early phase of pathogenesis of a European strain of equine arteritis virus. *Vet. Res.* 44, 22. doi:10.1186/1297-9716-44-22
- Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Ramírez, H., Delannoy, P., Zenteno, E., 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 126, 415–424. doi:10.1016/S0305-0491(00)00213-3
- Vandekerckhove, A., Glorieux, S., Broeck, W. Van Den, Gryspeerdt, A., van der Meulen, K.M., Nauwynck, H.J., 2009. In vitro culture of equine respiratory mucosa explants. *Vet. J.* 181, 280–7. doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.027
- Wambura, P.N., 2006. Comparative propagation of shape Newcastle disease virus (strains I-2 and V4) on chicken embryo tracheal explants. *Vet. Res. Commun.* 30, 673–7. doi:10.1007/s11259-006-3281-9
- Wiman, A.C., Hjertner, B., Linne, T., Herron, B., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B., Moreno-López, J., Berg, M., 1998. Porcine Rubulavirus LPMV RNA Persists in the Central Nervous System of Pigs After Recovery From Acute Infection. *J. Neurovirol.* 4, 545–552.