



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE LA
INFECCIÓN DE LEUCOCITOS HUMANOS
POR CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 1:
EFECTO DELETÉREO EN LOS MECANISMOS
DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M en C. GABRIEL ARTEAGA TRONCOSO.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. en C.

FERNANDO MARTÍN GUERRA INFANTE.



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.



Este trabajo se realizó gracias al otorgamiento de las becas económicas proporcionadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el Banco de México y por la Secretaría de Educación, Cultura y Bienestar Social del Gobierno del Estado de México, y que fueron el sustento de mi familia durante mis estudios de doctorado.

GRACIAS



Este trabajo se realizó en el laboratorio de virología del departamento de infectología e inmunología perinatal del Instituto Nacional de Perinatología, bajo la dirección del Sr. Dr. en C. Fernando M. Guerra Infante, y la asesoría del Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo, y del Dr. Luis Felipe Montaña Estrada.

A Dios nuestro señor:

Por todo lo que me has permitido vivir, es quien ha venido a darme fuerza iluminando mi vida.

GRACIAS

A mis padres:

Prof. Gabriel Arteaga Silva[†] y Profra. Alicia Troncoso Aguirre
Con veneración, amor y respeto que desinteresadamente me han ofrecido en todo momento. Por su apoyo y comprensión en la carrera profesional de veterinaria que yo he elegido.

GRACIAS.

A mi esposa e hijos:

Marlen. Con amor y admiración, por formar parte de vida, y por enseñarme la otra cara del amor. **Gabriel Alonso, Ana Victoria, Luis Fernando e Iván Alejandro.** Con amor y respeto, por los valiosos momentos de alegría y de fe en mi y en la familia.

GRACIAS

A mis hermanos:

Juan Carlos y Alejandro. Por compartir la vida juntos, por su confianza y por su apoyo incondicional.

GRACIAS.

A mis maestros:

Fernando Guerra, Dolores Ochoa, Luis Jiménez Zamudio, Sergio Estrada Parra, Vianney Ortiz Navarrete, y José Moreno. Con admiración y respeto a mis profesores del programa de doctorado.

GRACIAS.

A mi director y asesores de tesis:

Con admiración y respeto al Dr. Fernando Guerra Infante, por su invaluable apoyo científico y académico para la realización de este trabajo, por su paciencia, esmero y por su confianza en mi.

A los Doctores Edgar A. Zenteno Galindo y Luis Felipe Montaña. Por la mística y el credo que transmiten en sus enseñanzas no sólo en el acontecer científico, sino también en los diferentes aspectos de la vida.

GRACIAS.

A mis compañeros de trabajo:

de los laboratorios de virología e inmunología, a Alicia Gómez “guera”, Jacqueline Lara “jefa”, María de Carmen Suárez “flaca”, Saúl Flores “químico”, Marcela López “Mar”, Javier Díaz “javi”, Irma Sosa, Graciela Villeda y Sandra Sousa por su apoyo y por compartir los gratos momentos y las experiencias juntos.

GRACIAS.

Al Dr. Linfocito T:

A mi compañero Arturo Cébulo, por recordarme que las actividades de investigación sólo pueden ser placenteras si las vivimos en carne propia, por invitarme a triunfar y mostrarme el camino de la ciencia.

GRACIAS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Que a través de la Facultad de Ciencias, me brindaron sus innumerables atenciones durante el tiempo que duraron mis estudios de doctorado, y por el otorgamiento de la beca económica para realizar la estancia de investigación en Barcelona, España.

GRACIAS

Al Instituto Nacional de Perinatología:

En especial, con admiración y respeto al Sr. Dr. José Roberto Ahued Ahued director de nuestro hospital, por las facilidades y el apoyo brindados para la realización de este trabajo.

GRACIAS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Banco de México:

Por el otorgamiento de las becas económicas, sustento de mi familia durante mis estudios de doctorado.

GRACIAS.

Al Dr. José Luis Arredondo García:

Por su valioso tiempo e incondicional apoyo, le extiendo afectuosamente mi infinito agradecimiento.

GRACIAS.

Al Dr. Adalberto Parra:

Por enseñarme el valor de la palabra humildad científica, le ofrezco de corazón, mi respeto y admiración.

GRACIAS.

CONTENIDO

PÁGINA

Indice general	I
Indice de figuras	II
Indice de cuadros	III
Resumen	IV
Abstract	V
Introducción	1
CAPITULO I. Marco de referencia	
1. EXPERIENCIAS CLÍNICAS Y EXPERIMENTALES USANDO MODELOS XENOGÉNICOS	
1.1 Respuesta inmunológica anti-donador	5
1.2 El xenotransplante compromete los sistemas de defensa antiviral	8
2. RIESGO POTENCIAL DE LA TRANSMISIÓN VIRAL ENTRE HUMANOS Y ANIMALES DURANTE EL XENOTRANSPLANTE	
2.1 La infección en los receptores de órganos	11
2.2 La potencial amenaza a la salud pública	12
2.3 Otros riesgos de infección debidos al retrovirus endógeno porcino	16
3. LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>Circoviridae</i> Y OTROS VIRUS DNA QUE REPLICAN EN EL NÚCLEO DE LA CÉLULA	
3.1 Tamaño de las partículas virales	17
3.2 Dependencia en la función nuclear de los virus ADN	21
3.3 Patogénesis de la enfermedad por PCV y signos clínicos en cerdos	23
3.4 Epidemiología de la infección por PCV	24
CAPITULO II. Planteamiento del problema.	29
CAPITULO III. Hipótesis y objetivos.	32
3.1 Hipótesis	33
3.2 Objetivos	33

CONTENIDO

PÁGINA

CAPITULO IV. Materiales y métodos.	35
4.1 Diseño de investigación	36
4.1.1 Tipo de estudio	36
4.1.2 Población bajo estudio	36
4.1.3 Criterios de inclusión	36
4.1.4 Criterios de exclusión	36
4.1.5 Criterios de eliminación	37
4.2 Líneas celulares	37
4.3 Células mononucleares humanas en suspensión	37
4.4 Condiciones del cocultivo y diseño experimental	38
4.5 Separación de células por sorteo	38
4.6 Alteraciones ultraestructurales en las células humanas infectadas por PCV-1	39
4.7 PCR para PCV-1	39
4.8 Análisis de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	40
4.9 Ensayo mitogénico o de proliferación	41
4.10 Determinación de la actividad citotóxica	41
4.11 Anticuerpos monoclonales	42
4.12 Determinación de los marcadores de activación temprana y tardía en los leucocitos humanos infectados por PCV-1	42
4.13 Determinación de las citocinas proinflamatorias y de la respuesta inmunológica en el sobrenadante de los cultivos	43
4.14 Determinación del patrón T cooperador	43
4.15 Análisis estadístico	45

CONTENIDO

	PÁGINA
CAPITULO V. Resultados	46
5.1 Evidencia ultraestructural de la infección por PCV-1 en las células humanas	47
5.2 Detección molecular del PCV-1 en las estirpes celulares humanas	50
5.3 Hibridación fluorescente para la detección del ácido nucleico del PCV-1 en el núcleo de la célula humana infectada	53
5.4 Ensayos de proliferación celular	53
5.5 Reducción en los niveles de citotoxicidad de las células humanas infectadas por PCV-1	56
5.6 Expresión de las moléculas inductoras de la activación temprana y tardía en las células humanas infectadas por PCV	58
5.7 Marcada reducción de las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ e incremento de TNF- α asociadas con la infección por PCV-1	58
5.8 Producción de INF γ e IL-2 intracelular en los linfocitos T	62
5.9 Características genéticas y clínicas de los participantes	64
5.10 Diferencias en los niveles de citotoxicidad se relacionan con las especificidades serológicas HLA	64
5.11 Las formas alélicas HLA correlacionan con los niveles de intensidad citotóxica contra PK (15)	70
5.12 Reducción de los porcentajes de linfocitos T humanos durante la función citotóxica	73
5.13 Reducción de los porcentajes de linfocitos T humanos con diferentes especificidades serológicas HLA de clase I-A	73
5.14 Modelo probabilístico de la participación de los linfocitos T humanos en la respuesta citotóxica a PK (15) PCV ⁺	76
CAPITULO VI. Discusión	80
CAPITULO VII. Conclusiones	93
CAPITULO VIII. Perspectivas	97
CAPITULO IX. Apéndices	100
CAPITULO X. Referencias.	107

CONTENIDO

	PÁGINA
1. El xenotransplante compromete la defensa inmunológica antiviral	10
2. Criomicrografías y los mapas tridimensionales de tres circovirus	19
3. Presencia ultraestructural del circovirus porcino tipo 2 y lesión microvascular	25
4. La morfología estructural de la línea PK (15) infectada por PCV-1	48
5. Las modificaciones morfológicas de las células T humanas inducidas por PCV-1	49
6. La parte central de un monocito infectado	51
7. La detección molecular del PCV-1 en las células mononucleares humanas	52
8. La hibridación fluorescente in situ para la expresión de PCV-1	54
9. Proliferación inpar de las células T humanas infectadas por PCV-1 observada con diferentes haplotipos HLA	55
10. Reducción de la capacidad citotóxica de las células humanas infectadas por PCV	57
11. Cinética en la expresión de los marcadores de activación temprana y tardía en los linfocitos T infectados por PCV-1	59
12. Expresión de los marcadores CD69 y CD25 en los linfocitos recuperados de los cultivos con PK (15) PCV ⁺	60
13. Análisis cinético de las concentraciones de citocinas inflamatorias y del patrón de activación Th en el sobrenadante de los cultivos	61
14. Los linfocitos T humanos infectados por PCV-1 carecen de la habilidad de sintetizar INF- γ e IL-2	63
15. Las células humanas con especificidad HLA-A y HLA-B destruyen a la línea PK (15) con diferentes niveles de intensidad	67
16. Las células humanas con especificidad HLA-DR y HLA-DQ destruyen a la línea PK (15) con diferentes niveles de intensidad	69

CONTENIDO

	PÁGINA
1. Estimación de las variantes alélicas HLA-A, B,DR, y DQ en los sujetos que participaron en el estudio	65
2. Frecuencia de las especificidades serológicas HLA de clase I y los niveles de citotoxicidad a PK (15) PCV ⁺	71
3. Frecuencia de las especificidades serológicas HLA de clase II y los niveles de citotoxicidad a PK (15) PCV ⁺	72
4. Reducción de los porcentajes de linfocitos T, y B e incremento de las células asesinas naturales humanas recuperadas de los cultivos con PK (15) PCV ⁺	74
5. Relevancia de las formas alélicas HLA-A en los porcentajes de linfocitos T CD4 ⁺ , y CD8 ⁺ humanos recuperados de los cultivos con PK (15) PCV ⁺	75
6. Relevancia de las formas alélicas HLA-A en los porcentajes de células T, B, y NK humanas recuperadas de los cultivos con PK (15) PCV ⁺	77
7. Modelo de predicción para establecer la participación de las subseries celulares humanas en la actividad citotóxica sobre PK (15) PCV ⁺ en cultivo	78

BCMV. Citomegalovirus de primate no humano

CD. Grupos de Diferenciación

CD4⁺. Linfocitos T cooperadores

CD8⁺. Linfocitos T citotóxicos

CD14⁺. Monocitos

CD19⁺. Linfocitos B

CD25⁺. Receptor de interleucina 2

CD45⁺. Marcador Común Leucocitario

CD56⁺. Células Asesinas Naturales

CD69⁺. Marcador de Activación Temprana de Linfocitos

CMV. Citomegalovirus humano

FACS. Fluorescence Activated Cell Sorting

FISH. Hibridación Fluorescente *in situ*

HLA. Antígenos Leucocitarios Humanos

IFN- γ . Interferón gamma

Ig. Inmunoglobulina

IL. Interleucina

MHC. Complejo Principal de Histocompatibilidad

PAEC. Células Endoteliales de Aorta Porcina

PCMV. Citomegalovirus Porcino

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCV-1. Circovirus Porcino Tipo 1

PERV. Retrovirus Endógeno Porcino

PK (15) PCV⁺. Células Epiteliales Obtenidas de Riñón de Cerdo Infechadas por PCV-1

PMWS. Síndrome de Desgaste Multisistémico Postdestete del Cerdo

RPMI-1640. Medio Roswell Park Memorial Institute

SLA. Antígeno Leucocitario Porcino

TNF- α . Factor de Necrosis Tumoral alfa

RESUMEN

Antecedentes. Los patógenos infecciosos de los cerdos, especialmente los virus, representan un riesgo potencial a la salud pública asociado con el uso de tejidos porcinos para el xenotransplante en humanos. Nosotros hipotetizamos que el circovirus porcino tipo 1 (PCV-1) puede infectar a las células mononucleares humanas en cultivo, y como resultado el efecto deletéreo en los mecanismos de la respuesta inmunológica.

Métodos. Exámenes de microscopía electrónica de transmisión se usaron para evaluar las modificaciones ultraestructurales de las células humanas expuestas a la línea celular PK (15) PCV⁺. Una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayos de hibridación *in situ* (FISH) se llevaron a cabo para identificar la presencia de PCV-1 en las células mononucleares humanas. Se determinó la capacidad proliferativa de las células T humanas infectadas por PCV-1 utilizando cultivo mixto de linfocitos. La evaluación de la actividad citotóxica de las células humanas sobre la línea celular PK (15) PCV⁺ o PK (15) PCV⁻ se determinó mediante la reducción de MTT. Los cambios fenotípicos de las subseries linfocitarias, la expresión de los marcadores CD69⁺, y de CD25⁺ (IL-2R) y la actividad intracelular de INF- γ y de IL-2 en los linfocitos humanos se evaluaron mediante citometría de flujo. Las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , y TNF- α en el sobrenadante recuperado de los cultivos con PK (15) se cuantificaron usando un método comercial de ELISA. Se estimaron las frecuencias alélicas para los antígenos leucocitarios HLA de clase I y II mediante el método directo y de Hardy-Weinberg. El nivel de citotoxicidad se estimó a partir de los valores promedio de 24 repeticiones (\pm desviación estándar) calculado para las conjunciones en cultivo de CMPHs \rightarrow PK (15) PCV⁺, CMPHs \rightarrow PK (15) PCV⁻, y CMPHs en reposo y PK (15) PCV⁺ en cada experimento. En apego al teorema del límite central, se considero el nivel de citotoxicidad baja a las observaciones menores de una desviación estándar del promedio ($x < \sigma$), citotoxicidad media ($x \pm \sigma$) y citotoxicidad alta ($x > \sigma$). Se utilizo la prueba de U de Mann-Whitney como procedimiento de análisis para evaluar

las diferencias en los niveles de citotoxicidad. Se estimaron las correlaciones de las especificidades alélicas individuales HLA de clase I y II con los niveles de citotoxicidad mediante el coeficiente de correlación (r) de Spearman.

Resultados. Las inclusiones intracitoplásmicas en forma de “boomerang” inducidas por PCV-1 fueron visibles a niveles ultraestructurales en los linfocitos T. Los leucocitos humanos expuestos a PK (15) PCV⁺ presentaron partículas virales maduras e inmaduras que se formaron en su mayor parte dentro de caveolas. La presencia de partículas virales dentro de los elementos estructurales del sistema Golgi sugieren ensamblaje viral. Las partículas maduras presentes en el núcleo y libres en la membrana plasmática también fueron observadas. Los viriones midieron cerca de 23 nm de diámetro y aparecieron en el núcleo y en la periferia de las inclusiones intracitoplásmicas. Aparentemente, la infección por PCV-1 en los monocitos humanos no afectó la arquitectura de sus organelos. La hibridación fluorescente del ADN humano por el ácido nucleico del PCV-1 y el nivel de expresión de los transcritos mostraron un producto de 375 pares de base en las células humanas CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺ y CD56⁺ demostraron que la transmisión de la infección no fue el resultado de una reacción de espectador. Consistente con la funcionalidad de los linfocitos humanos, las células PK (15) infectadas por PCV-1 exhibieron menor actividad citotóxica que las células PK (15) no infectadas (P<0.001). Las células mononucleares humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ mostraron una reducción significativa de los linfocitos T e incrementos de las células NK (P<0.05). Se observó reducción en la expresión del receptor de IL-2 en las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺. Una marcada reducción de las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e incremento de TNF- α se asociaron con la infección por PCV-1. Además, se determinó el deterioro de la célula T infectada por PCV-1 para producir INF- γ e IL-2. La disminución de los niveles de citotoxicidad se relacionó con las especificidades serológicas HLA de clase I-A1, A2, A3, A9, A11, B5, B7, B27, B35, y B40, así como de clase II-DR1, DR3, DR4, DR6, DR7, DR8, DR12, DR14, DR15, DQ1, DQ2, DQ4, DQ5, DQ8 con respecto a los controles no infectados (P<0.05). Las células humanas con las res-



tricciones HLA-B16, B17, DR2, DR7, DR15, DR17 y DQ2 correlacionaron fuertemente con los niveles de intensidad citotóxica mayores de 24.6% ($P < 0.05$). En contraste, las restricciones HLA-A10, B12, B14, B27, DR3, DR11, DR12 y DQ6 se asociaron con intensidades inferiores a 24.5% ($P < 0.05$). Las células humanas con restricción HLA-A9 mostraron disminución de las subseries $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD19^+$ comparados con los otros grupos alélicos. El modelo de predicción mostró la participación de las subseries $CD3^+$, $CD4^+$, $CD19^+$ y $CD56^+$, pero no de los linfocitos T $CD8^+$ en la actividad citotóxica superior a 19.7%. A pesar de la infección por PCV-1, se determinó la jerarquía de las células NK en la actividad citotóxica sobre PK (15) PCV^+ fue determinada ($r^2 = 0.49$, $p < 0.0001$).

Conclusiones. Estos resultados sugirieron que el circovirus porcino tipo 1 tiene la capacidad de infectar a las células mononucleares humanas. La infección de los leucocitos por PCV-1 contribuyó a la reducción del nivel de citotoxicidad humana dirigida a los blancos celulares PK (15) infectados. Las alteraciones estructurales y la presencia del ADN de PCV-1 en los linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$, linfocitos B y las células asesinas naturales sugieren la incapacidad de las células humanas para montar una efectiva respuesta inmune anti viral.

ABSTRACT

Background. Swine infectious pathogens, especially viruses, represent a potential public health risk associated with the use of pig tissues for xenotransplantation in humans. We hypothesized that porcine circovirus type I (PCV-1) may infect human mononuclear cells, and as a result the deleterious effect on immune response mechanisms.

Methods. Transmission electron microscopy was used for evaluating ultrastructural alterations of human cells exposed to a PCV-infected PK15 cell line. A polymerase chain reaction (PCR) assay and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were developed for detecting PCV-1 in human mononuclear cells. The evaluation of human cells lytic activity on PCV PK (15) cell line or uninfected PK (15) were determined by means of the reduction of MTT assay. The changes on lymphocyte subsets of the human mononuclear cells exposed to PCV PK (15) were evaluated by flow cytometry using a standard protocol. Premature expression of CD69⁺, and IL-2R of human cells exposed to PCV PK (15) were determined by flow cytometry. The concentrations of *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*, *IFN-γ*, and *TNF-α* in supernatants harvested from infected PK (15) cells were quantified by using a indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions. In addition, human cells stained and analyzed by flow cytometric and/or electronically sorted were conducted for detecting INF-γ, and IL-2 intracellular activity.

Results. Morphological alterations of the human T cells exposed to PCV PK15 showed “boomerang-shaped” intracytoplasmic inclusions. Nucleocapsids appeared free, close to the nucleus, or contained into cytoplasmic vacuoles. Virions were observed near the surface of the human cells. A considerable number of mature virions and immature forms could be observed in the human cells that had a completely intact nuclear membrane with no alteration in the disposition of chromatin. PCV-1 particles were identified budding into typical Golgi saccules and vacuoles. Virions sized up to 23nm in diameter, and appeared in the nucleus and in the periphery of the cellular core. PCV-1 infection was detected on CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺, and CD56⁺ human cells by PCR assay and FISH. Consis-



tent with the cytolytic activity of human lymphocytes, the PCV PK (15) cells exhibited smaller activity than uninfected PK (15) cells ($P < 0.001$). The human cells exposed to PCV-1 PK (15) showed a significant downshift of CD3⁺ subset. However, the evaluation of NK lytic activity on PCV PK (15) cell line showed a higher proportions of CD56⁺ cell subset than uninfected PK (15). Reduced expression of IL-2R (CD25) was observed on the human cells exposed to PCV-1 PK (15). Unfavorable outcome of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and IFN- γ levels, and increase of inflammatory mediators (TNF- α) were associated with PCV-1 infection. Moreover, the deterioration of the infected T cell to produce INF- γ , and IL-2 was determined. The cytotoxicity levels were lowest in subjects with HLA class I alleles A1, A2, A3, A9, A11, B5, B7, B27, B35, and B40, as well as of class II-DR1, DR3, DR4, DR6, DR7, DR8, DR12, DR14, DR15, DQ1, DQ2, DQ4, DQ5, DQ8 ($P < 0.05$). The B16, B17, DR2, DR7, DR15, DR17, and DQ2 alleles were significantly associated with cytotoxicity levels over 24.6% ($P < 0.05$). In contrast, the A10, B12, B14, B27, DR3, DR11, DR12, and DQ6 alleles were associated with cytotoxicity index more less than 24.5% ($P < 0.05$). The HLA-A9 allele showed decrease of the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD19⁺ subsets compared with the others allelic specificities. The model of prediction showed lytic activity on PCV PK (15) of the CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺ and CD56⁺ subsets, but not CD8⁺ T cells with cytotoxicity index over 19.7%. In spite of PCV-1 infection, the hierarchy of NK lytic activity on PCV PK (15) was determined ($r^2 = 0.49$, $p < 0.0001$).

Conclusions. These results suggest that PCV-1 has the capability of infecting human leukocytes *in vitro*. Moreover, these data support the notion that PCV-1 positive human cells might have an impaired immune response, and should be considered a potential risk of viral transmission during xenotransplantation.

INTRODUCCIÓN

Muchos pacientes han sido tratados clínicamente con diversos tejidos de cerdo. Estos pacientes se han expuesto a la transmisión de patógenos porcinos en una variedad de indicaciones terapéuticas incluyendo el xenotransplante de piel, islotes pancreáticos, así como de hígado, riñón y de bazos bioartificiales para perfusión de sangre extracorpórea.¹ Para el futuro, se ha propuesto el uso de órganos sólidos obtenidos de cerdos transgénicos como un medio de resolver el problema de la escasez de órganos humanos de donante vivo.²

El uso de tejidos xenogénicos para transplante ha suscitado controversias a cerca de la potencial transmisión de patógenos zoonóticos y de aquellos agentes infecciosos desconocidos. Algunas autoridades sanitarias convincentemente han argumentado que la utilización de primates no humanos como fuentes de tejidos representa riesgos inaceptables. La transmisión de patógenos a través de tejidos está perfectamente documentada. Experiencias en alotransplante humano indican que los virus de las familias *Retroviridae* y *Herpesviridae* se pueden transmitir entre los pacientes inmunosuprimidos.³ Los virus identificados en los cerdos y que son miembros de estas familias, de igual manera pueden causar problemas biotecnológicos en la producción de animales libres de patógenos. Estos incluyen al retrovirus endógeno porcino (PERV), el cual está presente en el genoma porcino y el citomegalovirus porcino (PCMV) que se pueden transmitir *in utero*.^{4, 5} La posibilidad de transmisión de PERV ha sido demostrada al ser capaz de infectar células humanas *in vitro* y atravesar las barreras de especie *in vivo* en ratón.⁶ Existen los riesgos de transmisión en los pacientes transplantados y su posterior dispersión en la población general. Además, de la alta capacidad mutagénica o de los efectos inmunosupresores que tendrían estos retrovirus en sus nuevos circundantes humanos y la transformación dentro de otros patógenos que pueden causar una epidemia.⁷

Asimismo, la experiencia médica ha enseñado que el citomegalovirus humano (CMV) y citomegalovirus de simio (BCMV) miembros de la familia *Herpesviridae* se transmiten

frecuentemente durante el procedimiento de alo y xenotransplante causando enfermedad terminal y rechazo de los injertos durante el periodo post-transplante.^{8,9}

Aunque la mayoría de los patógenos se pueden identificar en las fuentes orgánicas porcinas con apropiados sistemas de diagnóstico, otros patógenos tales como el circovirus porcino (PCV), permanece aún desconocido. Existen dos variantes de PCV, el tipo 1 y 2. La infección por circovirus porcino tipo 1 (PCV-1) fue primeramente demostrada en los cultivos de la línea celular de riñón de cerdo PK (15). Integrado permanentemente al genoma de estas células, el PCV-1 no induce algún cambio morfológico aparente en las células PK (15). Estudios serológicos con PCV-1 en especies no porcinas han conducido a resultados polémicos. Tischer y cols. (1995)¹⁰ demostraron altos niveles de anticuerpos a PCV-1 en la población humana, mientras otros investigadores no han demostrado evidencia de infección excepto por los anticuerpos presentes en el cerdo y la oveja.^{11, 12} Los experimentos de infectividad con PCV-1 han mostrado no ser patogénicos para el cerdo. Sin embargo, la infección por circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), otra variante de la familia *Circoviridae*, está asociado fuertemente con el síndrome de desgaste multisistémico postdestete en cerdos (PMWS).^{13, 14}

En el modelo animal, la infección por PCV-2 se caracteriza por la depleción linfocítica y la infiltración granulomatosa, con o sin la presencia de células gigantes multinucleadas con cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en el tejido linfoide.¹⁵ Estos hallazgos se relacionan con la disminución de los linfocitos T y B, y el incremento de las células del linaje monocito/macrófago.¹⁶ Inclusive, las células que soportan la replicación del PCV son las foliculares dendríticas, interdigitantes, y los macrófagos debido a que en estas se han observado altas concentraciones de antígeno de PCV-2.¹⁷ Los estudios fenotípicos de las células del sistema inmunológico mostraron que los cerdos que sufren de PMWS tuvieron las proporciones celulares más bajas de linfocitos T CD4⁺ y de linfocitos B en contraste con los animales sanos.¹⁸ Estudios recientes han sugerido que PCV-2 infecta a las células en división induciendo apoptosis de los linfocitos B este comportamiento conduce a la depleción en los órganos linfoides.¹⁹ Todos estos factores sugieren que la infección por PCV quizás cause inmunosupresión en humanos. Sin embargo, ninguna asociación se ha es

tablecido entre la infección humana con circovirus porcino. Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar la capacidad patogénica del PCV y la susceptibilidad en otras especies diferentes a la porcina, tal como la humana, para determinar el peligro potencial de ese riesgo de zoonosis que representa uno de los aspectos más debatidos durante el xenotransplante de órganos de cerdo.

Capítulo

I

Marco de referencia

1. EXPERIENCIAS CLÍNICAS Y EXPERIMENTALES USANDO MODELOS XENOGÉNICOS

1.1 Respuesta inmunológica anti-donador

El uso clínico de los xenoinjertos se ha limitado a algunos casos utilizando riñones,²⁰ corazones,^{21,22} e hígados^{23,24} de donadores filogénicamente concordantes a la especie humana observando una sobrevivencia del órgano transplantado, en términos de tiempo, hasta por cerca de 9 meses utilizando un agresivo esquema de inmunosupresión (azatioprina, terapia esteroidal, actinomicina C e irradiación local). De estas experiencias se han identificado dos puntos de especial mención: el primero se refiere a que en la mayoría de los casos el órgano funciona en el receptor, lo que implica que no existen aspectos fisiológicos únicos, y el segundo, que las respuestas inmunológicas involucradas en el rechazo fueron mediados principalmente por la actividad de los anticuerpos y el complemento, siendo este mecanismo de xenoreactividad fundamentalmente diferente a lo observado durante en el transplante de órganos alogénicos.

Algunos años después de los primeros intentos del procedimiento clínico, el xenotransplante de órganos sólidos fue emprendido nuevamente bajo la premisa del uso de nuevos y más potentes agentes inmunosupresores de linfocitos T, tales como: la ciclosporina A y el FK506, los cuales controlan vigorosamente la respuesta del rechazo a partir de que estas drogas evitan la inducción del gene que codifica para la interleucina 2 (IL-2) en las células aloreactivas durante la estimulación linfocítica proliferativa.²⁵ El primer caso clínico a quien le fue transplantado un corazón de mandril sobre vivió por 20 días, la examinación histopatológica del tejido mostró que la respuesta de rechazo fue mediada por los anticuerpos, acompañado por un proceso de necrosis temprana con depósitos de IgM, IgG, IgA y C3.21 Aunque en la práctica clínica son pocos los órganos alogénicos que sufren de rechazo agudo, los episodios pueden ocurrir al término de la primera semana vida a pesar del uso de los inmunosupresores. Estos eventos de rechazo son diferentes a lo observado durante la respuesta humoral dirigida a xenoinjertos debido a la tardía ocurrencia y por la ausencia en muchos de los casos de la presencia de anticuerpos anti-donador y del infiltrado celular frecuentemente observado en las biopsias.²⁵

Los primeros protocolos experimentales para evaluar la respuesta celular de los receptores de xenoinjertos fueron llevados a cabo por Widner y Bach (1972),²⁶ sus resultados demostraron un amplio rango de variabilidad en las reacciones mixtas de linfocitos utilizando células humanas, de ratón y de perro. Posteriormente, Lindahl y Bach (1975)²⁷ determinaron que la máxima respuesta proliferativa dirigida a los xenoantígenos en un modelo humano anti ratón depende de la expresión las moléculas de clase II en las células blanco. Las células T humanas bajo las combinaciones alo y xenogénico respondieron a los mismos determinantes antigénicos que en el MHC del ratón, específicamente a la región IA.²⁸ Por otra parte, al evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos humanos cultivados con distintos estimuladores murinos, Swain y cols. (1983)²⁹ demostraron que las células T citotóxicas lisaron con mas eficiencia a sus blancos cuando estos fueron cultivados con estimuladores secundarios que expresaban el mismo haplotipo de clase I, sin embargo el umbral de IL-2 se observó cuando los estimuladores murinos, primarios y secundarios, compartían sólo la expresión de las moléculas de clase II. Estas primeras observaciones demostraron que, 1) la respuesta celular a los xenoantígenos es dependiente del MHC, 2) que el patrón de xenoreconocimiento es similar a lo observado en aloreactividad, y 3) que las porciones del MHC son altamente conservadas en una variedad de especies permitiendo el reconocimiento de las células T humanas.

Asimismo, la fina especificidad de las células T citotóxicas en el reconocimiento de xenoantígenos porcinos se ha observado en cultivos celulares. Shishido y cols. (1997)³⁰ demostraron que las clonas de linfocitos xenoreactivas fueron capaces de reconocer directamente a los antígenos porcinos a través de las moléculas SLA de clase I en una forma similar a lo observado durante alotransplantes, es decir con disparidad MHC. Ésta interpretación se estableció dado que únicamente las células T CD8+ humanas proliferaron en respuesta a las células endoteliales de aorta porcina (PAEC), y las células T CD4+ no respondieron a las PAEC MHC de clase II negativa. Cuando éstas células son estimuladas en repetidas ocasiones se favorece un marcado incremento en la proliferación de los linfocitos T CD8+ los cuales muestran citotoxicidad específica en contra de los blancos porcinos con disminución de la lisis de las células porcinas no relacionadas, incluyendo aquellas células

sensibles a la destrucción por las células asesinas naturales. Además, utilizando ensayos de bloqueo se demostró que los anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de las moléculas MHC de clase I, pero no de SLA clase II o las humanas, específicamente disminuyeron la actividad citolítica de las clonas anti-PAEC, también los anticuerpos anti-CD8⁺, pero no los anti-CD4⁺, inhibieron marcadamente la destrucción de los blancos porcinos. Estos resultados demostraron que las células T humanas diferencian entre los alelos MHC porcinos, así como muchas de las interacciones coestimuladoras pares-ligandos que pueden ser igualmente funcionales en la combinación humano anti-porcino.³¹

Asimismo, algunas líneas de investigación soportaron el papel “potencializador” del linfocito T CD4⁺ en el sistema inmunológico del receptor de xenoinjertos. En el modelo murino, los animales timentomizados y tratados con anticuerpos anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ o ambos demostraron que los ratones con anti-CD4⁺ y especialmente con la combinación CD4⁺/CD8⁺ mostraron una prolongada sobrevida del injerto de piel de mono en comparación con los ratones no tratados que recibieron únicamente anti-CD8⁺.³² Al comparar las respuestas alo y xenogénicas en ratones que recibieron los injertos de piel lepórida o murina con diferente MHC y con reducción de células T CD4⁺ se evidenció una sobrevida del injerto de conejo y no del aloinjerto de ratón. La dependencia del linfocito T cooperador en la xenoreactividad es similar a lo observado durante los episodios de rechazo de aloinjertos cuando existe una disparidad en los antígenos menores de histocompatibilidad,³³ también la sobrevida de los injertos de piel de ratones transgénicos que expresan el antígeno SLA de clase I se prolonga en los receptores tratados con anticuerpos anti-CD4⁺ comparados con los controles y con los animales quienes sólo recibieron anti-CD8⁺. Los estudios realizados en el ratón NOD (ratón espontáneamente diabético) demostraron que el tratamiento previo con anticuerpos anti-CD4⁺ mejora la sobrevida del xenoinjerto de islotes pancreáticos de perro o de rata, observando una sobrevida del tejido en el grupo control de 10 ± 1.5 días comparados con hasta 83 ± 21 días con las células de perro y de 127 ± 30 días con las células de rata. La reducción de los linfocitos T CD4⁺ periféricos se confirmó por citometría de flujo y la examinación histológi-

ca de los islotes transplantados en los animales tratados no mostró evidencia de infiltrado celular con integridad de las células productoras de insulina.³⁴

Por otra parte, para mejorar el entendimiento del papel inmunológico del linfocito T cooperador durante la xenoreactividad, Wren y cols. (1993)³⁵ evaluaron el perfil de las citocinas con linfocitos murinos que respondieron a la estimulación de células de rata. Los resultados demostraron una predominancia de las citocinas del tipo Th2, es decir un aumento de las interleucinas 4 y 10. Las diferencias en las respuestas alo y xenogénicas pueden ser el mejoramiento de la actividad Th2, el cual conduce al preponderante aspecto humoral de la respuesta inmune. Cabe recordar que, los agentes inmunosupresores utilizados durante el alotransplante, incluyendo la ciclosporina y el FK506, tienen sus blancos primarios en las células cuya activación resulta en la producción de IL-2 e INF γ .³⁶ Si las respuestas del tipo Th2 son predominantes en la xenoreactividad, la ineficiencia de los agentes convencionales para controlar el episodio de rechazo de xenoinjertos se debe aparentemente a que las células responsables de la reacción no son los blancos de la terapia.

1.2 El xenotransplante compromete los sistemas de defensa anti-viral

La producción y el desarrollo zootécnico de los donadores genéticamente modificados para evitar el rechazo de los tejidos durante el xenotransplante en humanos (principalmente cerdos), comprometen concomitantemente a la primera línea de defensa inmunológica de los receptores. Bajo circunstancias de exposición, los virus ADN envueltos, aunque estuvieran presentes en el tejido transplantado, serían eliminados rápidamente por la lisis mediada por el complemento.³⁷ Sin embargo, para prevenir la destrucción rápida de los xenotransplantes se requiere de la inhibición del sistema del complemento a través de la expresión de proteínas regulatorias en el tejido. Estos reguladores harían sumamente inefectivo al sistema de defensa anti-viral (Figura 1). Un problema adicional es el libre paso de las barreras físicas de entrada normalmente restringida a los patógenos. Los virus deberán ganar el ingreso a una nueva célula anfitriona venciendo estas barreras, tal como las dispuestas en las superficies de las mucosas y la piel, sin perder su capacidad infectiva. En el caso del xenotransplante, estas barreras son vencidas fácilmente por la implantación

directa del tejido que potencialmente abrigaría en su interior a los virus. Las condiciones de crianza de los animales libres de patógenos y las rigurosas medidas de bioseguridad establecidas para garantizar la inocuidad de los órganos, que prueban la mayor parte de los virus conocidos, podrán facilitar la eliminación rápida de los patógenos con sistemas de selección genética. Aunque, existe uno más de los problemas inherentes a la carencia de los sistemas naturales de seguridad inmunológica que quizás tenga mayores consecuencias. La presencia de los virus persistentes o lentivirus (los que se integran o mantienen episomalmente como información genética), los virus desconocidos o aquellos que no pueden ser detectados por simples métodos de diagnóstico, que serán las futuras estrategias de identificación, control y erradicación.

La infección persistente del tejido infectado se define como la inmunosobrevivencia de los virus que permanecen integrados en el genoma de las células específicas por un largo periodo de tiempo antes de ser detectados por el sistema inmune. Los ejemplos muy conocidos incluyen al citomegalovirus (CMV),³⁸ el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)³⁹ o al virus de Epstein-Barr (EBV);⁴⁰ en cuyo caso, la infección es enmascarada sin ser vista hasta que la inmunosobrevivencia es alterada como resultado de la inmunosupresión, después de lo cual estos virus llegan a ser clínicamente relevantes.⁴¹ Otras infecciones persistentes se caracterizan por la enfermedad progresiva como se observa en las formas animales de HIV (virus de la inmunodeficiencia del simio, SIV y virus de la inmunodeficiencia felina, FIV) y de otros retrovirus animales, tal como el virus de la anemia contagiosa equina⁴² y el virus Maedi-visna.⁴³ Inclusive, el virus del sarampión que puede causar potencialmente la infección persistente como en la panencefalitis esclerosante subaguda.⁴⁴

Las infecciones crónicas son aquellas en las que un equilibrio agente-hospederø ambiente se ha alcanzado, donde la tasa de replicación viral y la destrucción de las células infectadas iguala la producción de células nuevas no infectadas, o debido a que todas las células están infectadas pero no existe efecto citopático, es así que ambos, replicación viral y división celular ocurren al mismo tiempo. Muchos virus persistentes escapan a la elimina

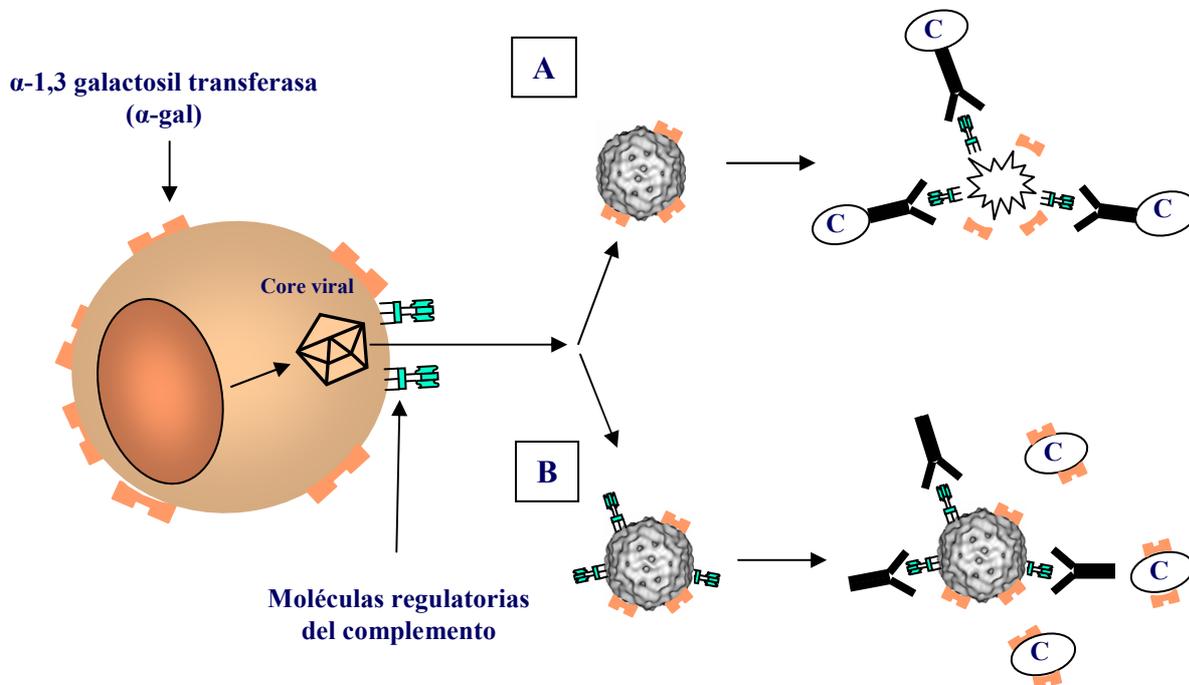


Figura 1. El xenotransplante compromete la defensa inmunológica antiviral.
A. Los virus envueltos, tales como los retrovirus surgen de la célula infectada incorporando parte la membrana plasmática con los residuos de la molécula α -gal. La modificación en la superficie del virión es reconocido por los anticuerpos xenoreactivos sirviendo como blancos antigénicos de la lisis mediada por el complemento. **B.** Los virus surgen de la célula xenogénica modificada trasgénicamente expresando las moléculas regulatorias del complemento (DAF) permitiendo el escape de la virolisis. C: complemento.



ción modulando o evadiendo los mecanismos inmunológicos del anfitrión. El virus del sarampión, por ejemplo, restringe la expresión de los antígenos virales, el HIV muestra extremada variación antigénica, el CMV y los adenovirus regulan negativamente la expresión de las moléculas MHC de clase II, y CMV también altera la producción de las moléculas de adhesión ICAM-1, LFA-1 o la coestimuladora B7.⁴⁵ Otras estrategias patogénicas seguidas por los virus herpes (tal como el EBV) y poxvirus es la modulación de la producción de citocinas por la célula infectada, así como de la regulación negativa de los interferones (virus influenza).⁴⁶

2. EL RIESGO POTENCIAL DE LA TRANSMISIÓN VIRAL ENTRE HUMANOS Y ANIMALES DURANTE EL XENOTRANSPLANTE

2.1 La infección en los receptores de órganos

La transmisión de los patógenos a través del transplante de órganos ha sido bien documentada, y esto ha causado serias complicaciones en el paciente inmunocomprometido.⁴⁷ Los términos “xenosis” o “xenozoonosis” se han propuesto para definir la enfermedad infecciosa introducida a la especie humana favorecida por el transplante de órganos xenogénicos. A diferencia de las tradicionales enfermedades zoonóticas, donde la transmisión de la enfermedad es mediada por las condiciones naturales de contacto. Los modelos xenozoonóticos de infección no han servido para evaluar la transmisión de los patógenos porcinos asociados en el xenotransplante,⁴⁸ debido a los mecanismos evolutivos de adaptación inherentes a los patógenos y a los hospederos naturales. Por ejemplo, se reconoce al hantavirus como causante de enfermedad en humanos, aunque se mantiene en su hospedero natural, el roedor. La interacción filogenética que se observa en ésta relación refleja largos periodos de latencia y adaptación sugiriendo que ambos han evolucionado juntos. En los roedores, el hantavirus no produce ninguna morbilidad ni mortalidad perceptibles, sin embargo cuando los virus cruzan las barreras de especie hacia los humanos, en estos, la tasa de mortalidad es tan alta como del 50%.⁴⁹

Asimismo, las distancias filogenéticas entre las especies donadoras y las receptoras no ga-



rantizan que las infecciones retrovirales puedan ocurrir, la identificación reciente de la transmisión del morbilivirus porcino (Virus de Nipah, siendo su hospedero natural el murciélago fructívoro) en trabajadores de rastro mostró una forma severa de encefalitis con un 40% de mortalidad, estas evidencias epidemiológicas sugieren la existencia del contagio con el uso de tejidos porcinos.⁵⁰ De igual manera, evidencian ésta posibilidad, las pandemias de influenza de origen aviar que se transmitieron a la especie humana y se retransmitieron a sus contactos y que tuvieron como huéspedes intermediarios a los cerdos.⁵¹ Cabe recordar que la combinación de la inmunosupresión, el uso de los órganos en la presencia de las diferencias moleculares de los tejidos y la posible ausencia de una inmunidad preexistente a los patógenos animales hacen a estos receptores xenogénicos más susceptibles a la infección a través de especies.

Lo impredecible del potencial patogénico de un agente infeccioso en humanos, es el hecho de que no disminuye el riesgo de infección por la distancia filogenética entre la especie hospedera primaria y la humana. En el mono rhesus (*Macaca mulatta*), hospedero natural del herpesvirus cercopithecine 1 (virus B) tiene un perfil clínico muy semejante a la infección herpética por herpes simplex en humanos. Sin embargo, las infecciones del virus B en los humanos u otros primates no macacos tiene como resultado cuadros de encefalitis con tasas de mortalidad del 70%. Por el contrario, la infección en el mono rhesus con sarampión tiene como resultado el mismo curso clínico de la enfermedad en humanos, pero en el mono tití (género *Callithrix*), tal infección produce una manifestación severa que frecuentemente es fatal.⁵²

2.2 La potencial amenaza a la salud pública

Durante el xenotransplante, el riesgo de infección no sólo se restringe al receptor del órgano, esto simplemente constituye uno de los muchos factores de riesgo inherentes a la transmisión inter-especies. Una vez que se han introducido en humanos los virus, zoonóticos y los no patogénicos a su especie anfitriona, se han producido cuantiosos daños a la salud comunitaria dignos de mención. La importación a Alemania y a la anterior Yugoslavia, en 1967 de monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) infectados con

un nuevo filovirus (virus de Marburg), tuvo como resultado la transmisión humana-humana de la enfermedad en dos generaciones, implicando a 31 personas, con una tasa de mortalidad del 23% (Martini GA mencionado por Fisher-Hoch y cols., 1992).⁵³

La admisión al hospital de pacientes infectados con el virus Ebola cepa Zaire, otro filovirus zoonótico, tuvo como resultado un brote de la infección nosocomial en Sudán en 1976, y en Zaire en 1976, 1979, y 1995 con tasas de mortalidad del 53% al 65%. Entre octubre del 2001 y mayo del 2003, 5 brotes del virus Ebola en humanos, con un total de 313 casos y 264 muertes han ocurrido en Gabón y la República del Congo.⁵⁴ En Pakistán en 1976, un pastor de ovejas con hemorragia gastrointestinal debido a la infección no reconocida con el virus de la fiebre hemorrágica del Crimean Congo, un bunyavirus zoonótico experimentó un procedimiento de laparatomía exploratoria innecesaria. El contagio implicó a dos generaciones humanas, infectando a 17 personas y produciendo una tasa de letalidad del 24%. En tales brotes, el virus se transmite inicialmente del paciente al personal médico y a los miembros de familia y de ahí a la comunidad. Así, la experiencia mundial con los virus zoonóticos proporciona la evidencia substancial del potencial infeccioso y de la epidemia que puede resultar en la población humana debido a las infecciones xenogénicas asociadas al trasplante.⁵⁵

Con la experiencia de los brotes de Ebola en África, se puede deducir que la capacidad de atención médica en los pacientes puede movilizarse, pero no la adaptación de los virus a sus nuevos hospederos y su eventual importancia a la salud pública. Un estudio virológico de 32 monos (16 cynomolgus, *Macaca fascicularis* y 16 monos verdes africanos, *Cercopithecus aethiops*) demostró que las cepas de filovirus asiáticos son menos patogénicas que las cepas africanas en ambas especies de monos. La morbilidad y la mortalidad fueron altas con los animales que recibieron el virus africano, con un curso acelerado de infección con un periodo de mortalidad de 48h. Estos resultados sugieren diferencias en la patogenicidad de las cepas debido posiblemente a las adaptaciones virus-célula hospedera que permiten la suficiente perpetuación del patógeno en la especie anfi-

triona, y el efecto de la inserción genómica del virus en los mecanismos de transmisión de la progenie viral a las subsecuentes generaciones.⁵⁶ En realidad, las consecuencias a la salud comunitaria de las infecciones xenogénicas pueden establecer reflexiones aún más profundas, esto es, cuando la patogenicidad inmediata de los virus es menos evidente. En la infección humana por filovirus y bunyavirus que tiene como resultado la enfermedad clínica aguda seguida por la recuperación o la muerte, el nuevo hospedero humano carece de la adaptación evolutiva a estos virus, lo que impide sostener la amplificación viral más que por un corto tiempo limitando la fuente de transmisión sólo entre los contactos, es así, que las consecuencias a la salud pública de tales brotes se limita a un reducido número de casos. La dimensión de estos brotes contrasta con la extensión pandémica del virus humano de la inmunodeficiencia tipos HIV-1 y 2 en el que se sugiere que la adaptación de los retrovirus del simio se estableció a través de las barreras de especie entre humanos.⁵⁷

Cuando distintas especies de primates no humanos se albergan juntas en un manejo zootécnico en cautiverio, la transmisión de los retrovirus a través de las líneas de especie ocurre con relativa facilidad. Aunque los miembros de la especie anfitriona primaria permanecen generalmente saludables, la transmisión cruzada entre especies incrementa la diversidad fenotípica del virus y de la virulencia del patógeno en el nuevo anfitrión. Las comparaciones en las secuencias genéticas revelan relaciones muy cercanas entre HIV-1, HIV-2, y los virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV). Aunque el potencial patogénico y la transmisibilidad del SIV entre humanos no está definida, la respuesta humoral a la infección activa se ha confirmado en los trabajadores de circo que manejan primates no humanos.⁵⁸ En África Central, la transmisión y la instauración genómica del SIV en sus nuevos hospederos, es decir, la de una especie diferente a la anterior, probablemente el chimpancé, parece estar relacionada con la pandemia de HIV-1.

Las infecciones en humanos antes de los años 70's tuvieron como resultado una década de insidiosa transmisión entre humanos, anterior al primer caso clínico identificado como SIDA y que este fuera un problema de salud pública al principios de los 80's.⁵⁹ Además del SIV, un número considerable de retrovirus exógenos se han reconocido como infectan-

tes de los primates no humanos.⁶⁰⁻⁶⁴ No existen pruebas diagnósticas específicas o que estén disponibles para identificar la mayor cantidad de estos retrovirus, más aún, para establecer la presencia de los retrovirus endógenos que están diseminados extensivamente en las especies mamíferas. Se especula que estos virus fueron originados como secuencias virales exógenas que llegaron a ser permanentemente integrados en el genoma de la célula anfitriona.⁶⁵

Los mecanismos de transmisión de los retrovirus endógenos muestran aspectos importantes en la adaptación a los noveles anfitriones. La infección vertical de la madre al producto, y la presencia de los fragmentos del material genético viral que son benignos para la especie receptora. Los retrovirus pueden infectar a las especies filogenéticamente relacionadas y cursan frecuentemente con estadios xenotrópicos, aunque el anfitrión original sea refractario a la infección. El ADN proviral del retrovirus endógeno de mandriles se puede detectar en todos los tejidos de esa especie, así como también en otros monos. El virus puede ser aislado eficientemente cultivando tejido infectado de mandriles en células humanas, aunque se desconoce el riesgo directo de la infección en humanos. La mezcla fenotípica de retrovirus endógenos de mandriles con la de otros virus de primates que ocurre bajo apropiadas condiciones de experimentación, sugiere que esos retrovirus podrían recombinarse en la especie humana después del xenotransplante. Ésta mezcla retroviral podría crear un híbrido mejor adaptado a la sobrevivencia, a la replicación, y a patogenicidad en el nuevo hospedero humano.⁶⁶ La idea general de que la mayor distancia filogenética entre humanos y cerdos (comparada con los primates no humanos) que haría al cerdo una de las especies donadoras más seguras no ha sido explorada completamente. La corta vida productiva del cerdo aminora la oportunidad de observar las manifestaciones clínicas de las infecciones con agentes que tienen períodos largos de latencia, como es el caso de los retrovirus y de los priones. Finalmente, otro punto importante que deberá ser considerado durante el procedimiento del xenotransplante son las alteraciones patológicas inducidas por los miembros de las familias *togaviridae*, *rabdoviridae* y *herpesviridae* en la especie porcina.

Estos patógenos no sólo infectan sitios orgánicos particulares, sino también se encuentran diseminados en todos los tejidos. Cabe recordar que durante el periodo prepatogénico, la causa de la enfermedad, es una función de la alteración morfológica de las células blanco y la diseminación subsecuente de las partículas infectantes, independientemente del tejido a transplantar o de los patógenos involucrados.⁶⁷

1.3 Otros riesgos de infección debidos al retrovirus endógeno porcino

Los retrovirus poseen características patogénicas que se deben considerar en el desarrollo de tejidos inócuos para el xenotransplante, debido principalmente a que observan latencia clínica y molecular crónica en el hospedero, infectan células del sistema inmunológico y pueden recombinarse a pesar de las barreras de especie. Todos los mamíferos tienen retrovirus endógenos integrados en sus respectivos genomas, presumiblemente estos se originaron a partir de secuencias virales exógenas integradas en el ADN, muchos de los cuales, pero no todos, se han replicado satisfactoriamente. A su vez, estos virus pueden ser xenotrópicos y pueden infectar a aquellas especies relacionadas filogenéticamente donde su transmisión puede no ser benigna. Un ejemplo de ello es la diseminación del retrovirus de mandriles que se puede detectar en todas las especies de orangutanes, incluso en otros monos menores.⁶⁸ Potencialmente, las distancias filogenéticas entre humanos y los cerdos podrían reducir el riesgo de transmisión de infecciones retrovirales. Sin embargo, estudios recientes han descubierto la habilidad de los retrovirus endógenos porcinos (PERV) para inducir la infección productiva en líneas celulares porcinas y humanas indicando que ésta amenaza deberá ser analizada seriamente.⁶⁹⁻⁷¹ El PERV es un retrovirus tipo C que se identifica mediante la expresión de sus genes de envoltura en tres subtipos, el PERV-A, PERV-B y PERV-C, se observan algunas similitudes estructurales con el virus de la leucemia de los simios los cuales han evolucionado a partir de los retrovirus murinos.⁷² Se ha demostrado que el PERV-A produce infección productiva en las líneas celulares porcinas y humanas.⁷³ Asimismo, se han demostrado múltiples sitios de inserción de PERV en el genoma de todas las razas y líneas genéticas de cerdos donde existen numerosas secuencias virales difíciles de cuantificar. La alta prevalencia en los cerdos y la

presencia de múltiples sitios de inserción genómica sugieren la extremada dificultad para remover al virus de sus huéspedes primarios por simples métodos de selección genética basal. Es factible la posibilidad de recombinación entre las secuencias retrovirales humanas y las de origen animal, tales secuencias están presentes en el genoma porcino en aproximadamente 50 copias por haplotipo y en más de 200 en el humano.⁷⁴ No se ha demostrado la recombinación entre los retrovirus humano y porcino, pero se ha documentado que otros retrovirus tales como el HIV y los de origen aviar y murino inequívocamente se asocian con la oncogénesis de sarcomas, linfomas y leucemias en humanos y animales.⁷⁵

A pesar de que las secuencias genómicas de los retrovirus están presentes en el ADN humano se pueden transmitir en línea germinal durante la división mitótica de la células anfitrionas, la mayoría de los provirus resultantes (copias completas de ADN viral) son defectuosos y son incapaces de completar un ciclo de replicación. Aunque, la expresión de los antígenos virales específicos referidos tradicionalmente como “tumor-specific transplantation antigens” se pueden expresar en la membrana de las células infectadas por inducción de la actividad inmunológica a través de algunas citotoxinas, citocinas y esteroides. Dado que la replicación de los retrovirus humanos es defectiva y los PERV son capaces de producir una infección activa en los cerdos la recombinación entre tales componentes creará un nuevo retrovirus bajo las condiciones de inmunosupresión. Estos posibles virus híbridos podrían estar mejor adaptados para sobrevivir, replicarse y diseminarse entre la especie humana, alternativamente se puede producir un virus capaz de infectar a los cerdos teniendo como consecuencia el mayor problema económico para la industria porcina.

3. LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *Circoviridae* Y OTROS VIRUS ADN QUE REPLICAN EN EL NUCLEO DE LA CÉLULA

3.1 Tamaño de las partículas virales

El tamaño, la composición y la organización genómica de los miembros de la familia *Circoviridae* varían considerablemente. Los tamaños relativos de las cápsides o del core de

circovirus porcino (PCV), virus del pico y cresta de las aves (BFDV) y el virus de la anemia aviar (CAV) son mostrados en detalle en la Figura 2. Los estudios realizados por Crowther y colaboradores (2003)⁷⁶ muestran que las imágenes de PCV-2 (Fig. 2-A) tienen una apariencia bastante diferente a la estructura del CAV (Fig. 2-C). Las partículas virales de PCV-2 aparecen más pequeñas y aún mucho más lisas que las partículas del virus de la anemia aviar, aunque el mapa tridimensional del CAV identifica un componente estructural de 12 capsómeros formando una trompeta pentagonal.

El mapa de PCV-2 y BFDV muestra el diámetro de las cápsides de 20.5 nm, mientras el diámetro de CAV es de cerca de 25 nm (Fig. 2-B). Las cápsides de PCV-2 y BFDV muestran muy poca variación estructural entre ellos, consistente de 12 unidades pentaméricas dispuestas en forma de hoja. Las proteínas de cápside de estos circovirus muestran 60 copias de VP1, sin embargo las cápsides de PCV-2 y de BFDV muestran claramente un fondo granular fino menos modulado que CAV. Los pentámeros salen de la estructura básica lo suficiente para proyectar panorámicamente los epitopes conformacionales. La materia extiende a los pentámeros para formar puentes en un radio exterior a través de hachas de doble filo. Cercanos a las estructuras que aparecen como pequeños hoyos en la superficie de la cápside entre los dobleces de las proteínas, estas formas son distribuidas en los ejes X y Y de PCV-2 y BFDV. También pueden apreciarse estructuras de hacha en las secciones del centros en los pentámeros. La superficie interior del esqueleto de las proteínas observan radios de acerca de 7.5 a 8 nm mayormente delineados en PCV-2 que en CAV y las cápsides tienen una delgadez de acerca de 2.5nm. El tamaño del genoma y la forma física de sus ADN varían según el tamaño de los esqueletos, de cerca de 1.767 Kbp en el PCV-2 a 2.3 Kbp en CAV.⁷⁷

El primer circovirus porcino identificado (PCV tipo 1) se aisló como un contaminante de la línea celular PK (15), aunque más tarde se detectó entre la población de cerdos siendo la infección asociada a diferentes cuadros patoneumónicos. La secuencia nucleótida completa (1759 nucleótidos) del genoma de PCV tipo 1 se determinó a partir

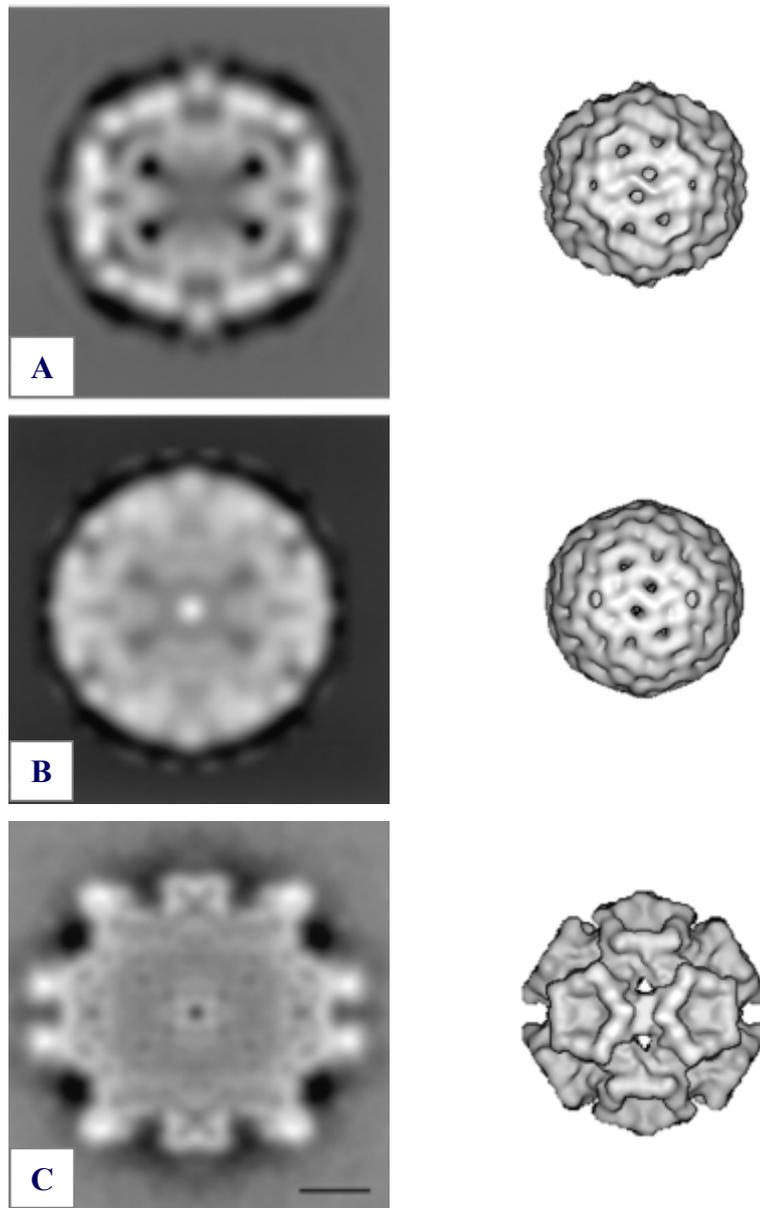


Figura 2. Criomicrografías y los mapas tridimensionales de tres circovirus. (A) Circovirus porcino tipo 2. (B) Virus del pico y cresta de las aves. (C) Virus de la anemia aviar. Los ácidos nucleicos aparecen claros y las proteínas estructurales obscurecidos. Escala de la barra, 5 nm.¹²⁵

de la clonación de la banda de ADN obtenida de las células PK (15). El análisis secuencial ha demostrado diferencias genéticas substanciales con el único miembro del género *Gyrovirus*, el virus de la anemia aviar (CAV), pero sorpresivamente, se han observado altas similitudes con las secuencias nucleótidas en los marcos de lectura del virus del apeloamiento alto del plátano, con el virus de la atrofia del trébol y con el virus del decaimiento foliar del coco.⁷⁸ Estas observaciones sugieren que el PCV-1 puede ser la forma viral más primitiva identificada en animales.

En la estructura genómica del PCV-1, la identidad de los marcos de lectura (ORF) corresponden a las proteínas putativas de replicación (Rep), así como la presencia de una secuencia no nucleótida situada en la región C-terminal, la cual transporta los motifs asociados con la replicación de rodamiento circular (RCR) y que corresponden al vértice de una estructura de rizo idéntica a las identificadas en los virus vegetales (CFDV, SCSV y BBTV) y en los *Geminivirus*. Los virus animales y vegetales que son miembros de la familia *Circoviridae* existen como viriones no envueltos con diámetros medios de 16.8 a 20.7 nm.⁷⁹

La mayoría de los virus vegetales y los *Geminivirus* requieren de insectos como vectores para la transmisión de la infección, así como de los mecanismos de transactivación y silenciamiento de la regulación genética de la célula anfitriona, lo anterior sugiere que el ciclo replicativo y la expresión morfológica de estos virus involucran la participación de genes tardíos.⁸⁰ Todos los circovirus poseen ADN circular de una banda (ADNs) que representan los replicones virales, son sólo los virus BBTV y SCSV los que poseen genomas multipartitas con los componentes requeridos para la recombinación del material genético. La banda viral codifica para una proteína de replicación (Rep) ubicada en el marco de lectura 1 (ORF V1), constituida por tres secuencias o motifs encontradas en la molécula y que están involucradas en la replicación de rodamiento circular y una secuencia en forma de rizo (P-loop). La proteína Rep posee una relación consensual de unión ATP/GTP en el motif I (P-loop) similar a lo observado en algunas proteínas con actividad de helicasa. El marco de lectu

ra (ORF C1) codifica para la proteína de la cápside viral flanqueado por las señales de poliadenilación y por el control de la transcripción de la propia célula eucariota. La secuencia de las proteínas de la cápside poseen un alto porcentaje de residuos de arginina y lisina en la porción amino terminal. El segundo marco de lectura (ORF V2) codifica para un virión de 16 kDa, la secuencia de aminoácidos muestra sitios altamente conservados en las proteínas de PCV y de BFDV (YVtkLTIYVQFRqF) cerca de la posición amino terminal. La estricta conservación de estos motivos han sugerido similitudes en las funciones de replicación entre los miembros de la familia *Circoviridae* género *circovirus*. Las cápsides del virión y las proteínas de cubierta del PCV, como las observadas en otros virus ADN están compuestas de uno a seis proteínas estructurales VP.⁸¹

3.2 Dependencia en la función nuclear de los virus ADN

La infección viral en los hospederos animales se caracteriza por una serie de cuatro etapas obligatorias: 1) La entrada a las células susceptibles del hospedero por el receptor de superficie; 2) desnudamiento, replicación del virus y maduración; 3) diseminación dentro de la célula anfitriona, y muda de los viriones contagiosos fuera del anfitrión, y finalmente 4) la transmisión a la próxima célula adyacente.⁸² Los hospederos animales son organismos multicelulares con una alta complejidad estructural se infectan con los virus a través de un simple tejido portal, y entonces estos se difunden a sitios específicos en los tejidos. No todos los tejidos soportan la replicación de los virus, principalmente porque cada virus necesita factores de transcripción y maquinarias celulares diferentes. Los sitios privilegiados para que los viriones puedan reproducirse son aquellos lugares donde los mecanismos de respuesta inmunológica del hospedero se observan disminuidos permitiendo así la difusión de las partículas virales.^{83, 84} El estudio de la infección viral de células en cultivo puede dirigir la comprensión más exacta de los aspectos básicos en la producción viral. Ya sea en animales o en cultivo celular, todos los virus ADN que infectan animales, excepto los poxvirus, se multiplican completamente o por lo menos en las etapas tempranas dentro

del núcleo de la célula anfitriona. Es así, que el objetivo nuclear del genoma viral entrante es un previo requisito para dar inicio a la infección productiva, la infección latente, y la transformación viral.

Para los circovirus, adenovirus, papovavirus, y parvovirus, el núcleo es el sitio de la replicación del genoma viral, de la formación de nucleocápside, y de la maduración del virión. Para los herpesvirus, la sección de la maduración del virión ocurre en el citoplasma seguida por la reproducción nuclear. Los virus de la familia *Hepadnavirus*, los cuales convierten el ADN del virion a partir del ARN pre-genómico, también utilizan el núcleo de la célula para la multiplicación, son sólo los ortomyxovirus y los deltavirus (entre los virus ARN de animales) los que utilizan al núcleo para la replicación de sus genomas y de la formación de las nucleocápsides

Aunque es relativo el conocimiento a cerca de como la partícula viral alcanza su sitio de reproducción en el genoma de la célula anfitriona, el tamaño específico y la estructura de cada virus parecen determinar su ruta de entrada nuclear a través de los poros nucleares. El ADN puede entrar al núcleo en por lo menos tres maneras: a) el segmento de ADN se puede asociar con una señal nuclear de localización (NLS), ésta secuencia señal facilita la presentación de las proteínas estructurales que inician la entrada; b) el fragmento de ADN empaquetado en el virión unido con una proteína ensambladora que se desmonta del virión mudando las proteínas estructurales y exponiendo las NLS; o (c) embalado con las proteínas celulares que crean NLS funcionales para la entrada nuclear del ADN. El ciclo de los virus ADN que replican en el núcleo, excepto los hepadnavirus, se divide en fases tempranas y tardías siendo éstas separadas por el comienzo de la replicación viral. En una cinética de infección, el virus que infecta a la célula susceptible actúa recíprocamente con el anfitrión, reconociendo a un receptor de superficie y penetrando en el citoplasma para emigrar hacia el núcleo a través de la red de actina. Después que el genoma viral entra en el núcleo, la transcripción y la traducción de un conjunto de genes tempranos ocurre. Estos blancos genéticos son los productos celulares de los genes F, causando los cambi-



os fisiológicos que favorecen la producción de la progenie viral. Ciertos virus pueden llegar a estar ocultos o ser enigmáticos en esta etapa, lo que establece la infección latente en un sólo subconjunto de productos genómicos tempranos, por ejemplo, la expresión de las proteínas E1 y E2 en las células infectadas por papilomavirus o los transcritos asociados a latencia (LAT) en las neuronas infectadas por virus herpes simplex.⁸² Durante la infección productiva normal por PCV, los productos tempranos virales también inician la replicación viral del ADN, lo que provoca la expresión de un conjunto nuevo de genes tardíos que sirven para el ensamble final de la progenie.⁸⁵

3.3 Patogénesis de la enfermedad por PCV y signos clínicos en cerdos

El genoma del circovirus porcino (PCV) posee una organización circundante (Figura 3-A). El PCV es miembro de la familia *Circoviridae* presenta un diámetro de 17 nm con un gradiente de densidad en CsCl de 1.33 a 1.34. Los circovirus porcinos son los virus ADN más pequeños con estructura icosaédrica, no envueltos. El virus es resistente cuando se expone a medios ácidos, al cloroformo y a temperaturas de 56 a 70°C.⁸⁶ El PCV replica en algunas líneas celulares porcinas y depende de la expresión de algunas proteínas durante la fase S del ciclo celular. Tischer y cols. (1987)⁸⁷ demostraron que la replicación viral se mejora cuando los cultivos se tratan con D-glucosamina lo que incrementa por arriba del 30% el número de células que expresan los antígenos de PCV. El virus no causa efectos citopáticos en los cultivos celulares. No obstante la común ocurrencia de la infección y la significancia clínica en los cerdos, se desconoce la morbilidad en otras especies. Existen dos variantes de PCV, el tipo 1 y 2. La transmisión experimental de PCV-1 sugiere que la cepa aislada de PK (15) puede no causar alguna alteración patológica.⁸⁸ Sin embargo, se ha descrito que cuando el genoma del virus está modificado en algunas secuencias (PCV-2) la manifestación clínica se relaciona con el síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS) en los cerdos de crecimiento y posiblemente con la enfermedad del temblor congénito en el cerdo recién nacido (Figura 3-B). El PMWS es una nueva enfermedad emergente de los cerdos, caracterizada clínicamente por disnea y emaciación progresiva, con hiper



trofia de los nódulos linfáticos y una amplia serie de lesiones inflamatorias que con frecuencia incluyen linfadenitis granulomatosa, infiltración perivascular, neumonía intersticial, hepatitis, nefritis intersticial y pancreatitis (Figura 3-C, D).⁸⁹

Las comparaciones genómicas de las cepas virales obtenidas de los animales con infección por PMWS muestran diferencias entre la cepa PCV ISU-31, y la previamente caracterizada a partir de PK (15). La secuencia nucleótida completa del genoma de PCV-1 es de 1 759 pares de bases con una homología del 76% con respecto a la cepa ISU-31. Los dos mayores marcos de lectura ORF1 y ORF2 están localizados en orientaciones opuestas. El ORF1 es el más conservado, con una identidad de ácidos nucleicos y de aminoácidos de 83 y 86%, respectivamente. El ORF2 es más variable con una identidad de ácidos nucleicos de 67% y de aminoácidos de 65%. Se han localizado dos regiones no codificadoras entre los ORF's de 83 y 44 pares de bases. El ORF1 en el genoma de PCV ISU-31 es de 942 pares de bases que codifica para una proteína de 36 kDa constituida por 314 aminoácidos en comparación con el marco de lectura de PCV PK (15) que es de 936 pares de bases con una proteína de 312 aminoácidos. Ambas proteínas tienen tres regiones variables, la región variable 1 recorre a partir de 5' de la proteína donde se observa una supresión de tres aminoácidos (R, S, G) en PCV PK (15), la región variable 2 se encuentra localizada entre los aminoácidos 180 al 198 y la región variable 3 desde 281 a 314.⁹⁰

El ORF1 codifica para la molécula que representa la mayor proteína de replicación (Rep) del PCV observando cierta homología estructural con la respectiva Rep asociada con los circovirus de plantas.⁹¹ Se han determinado tres dominios de las proteínas Rep (Dominios típicos: 1-FTLNN, 2 LOG, 3 YCSK) como también de un sitio de unión nucleótida GPPGCGKS en la posición 170 de PCV PK (15). El ORF2 de PCV PK(15) es de 699 pares de base que codifica para una proteína de 28 kDa el cual es similar al tamaño de ORF2 en PCV ISU-31 con una homología de aminoácidos de 65 y 67% respectivamente.

3.4 Epidemiología de la infección por PCV

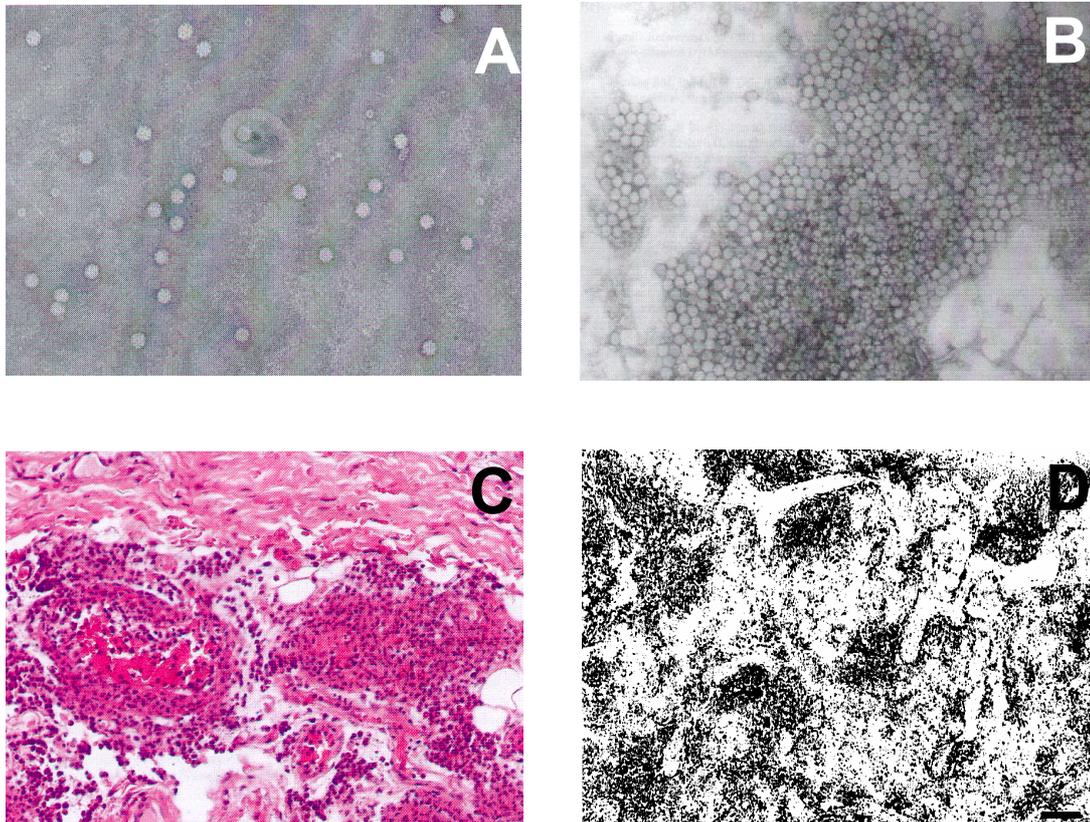


Figura 3. Presencia ultraestructural del circovirus porcino tipo 2 y lesión microvascular. (A) Tinción negativa del PCV-2. **(B)** Dispersión viral activa en tejido porcino. **(C)** Infiltración perivascular, hematoxilina y eosina x400. **(D)** Presencia de antígeno viral en nódulo linfático, hibridación *in situ* x200.

Estudios serológicos en algunos países indican que las infecciones por PCV están distribuidas aparentemente en las poblaciones porcícolas y la frecuencia de seropositividad en muchas de las granjas es del 20 al 80%. Tischer y cols. (1995)⁹² y Allan y cols. (1994)⁹³ fueron incapaces de identificar anticuerpos anti-PCV en el suero de ganado, ovejas, pollos, guajolotes, cabras, ratones, conejos o humanos usando técnicas de inmunofluorescencia, pero los estudios realizados en Alemania usando pruebas enzimáticas y de inmunofluorescencia indirecta mostraron niveles bajos de anticuerpos en el 30% de la población humana hospitalizada por fiebre de etiología desconocida, en pacientes sanos no hospitalizados en un 20% y en un grupo de donadores de sangre en 8.6%. Asimismo, analizando diferentes colonias de roedores estas reaccionaron del 12 al 69% y en el suero de ganado hasta en un 35% sugiriendo que ésta reactividad refleja la infección de las distintas especies, no sólo de las suinas con un circovirus relacionado antigénicamente con el PCV.⁹²

Tischer y cols. (1986)⁸⁹ describieron el primer reporte de la patogénesis experimental usando un antígeno purificado de la línea PK (15). Los resultados demostraron ausencia de los cambios clínicos e histopatológicos con recuperación del virus a partir de los hisopos nasales desde los 3 hasta los 6 días post-reto y en las heces desde los 13 a los 15 días post-infección. Asimismo, uno de los animales control se infectó por contacto y se recuperó el virus de las mismas localizaciones anatómicas observadas en los cerdos desafiados, lo que indicó la transmisión horizontal del PCV. Además, la infección experimental en cerdos recién nacidos también ha fallado en desarrollar los signos clínicos de la enfermedad, sin embargo se detectaron niveles de anticuerpos durante la primera semana después de la exposición con un incremento substancial a la quinta semana con títulos serológicos desde 1:40 a 1:160.⁹⁴

El PCV derivado de la línea PK (15) se considera como una cepa apatógena y los estudios serológicos en el suero de cerdos en Alemania, Canadá, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, Irlanda del Norte y Estados Unidos han demostrado dispersión de los anticuerpos anti-PCV en cerdos de crecimiento y en adultos en un rango de 25 a 98%

de seropositividad. En Canadá desde 1991 y durante los siguientes años en otros países incluyendo a Corea, Francia, España, Dinamarca e Italia se detectó la aparición de una nueva patología porcina vinculada al PCV que se reconoció como síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS)^{95 98} El PMWS afecta a los cerdos durante las etapas de lactancia y en crecimiento, es patológicamente caracterizado por linfocitosis con infiltrados mononucleares en los órganos linfoides secundarios y neumonía broncointersticial.⁹⁹ No se ha demostrado la relación etiológica entre el PCV PK (15) y PMWS, sin embargo en la nueva cepa de PCV se observó una secuencia nucleótida con una similitud del 75% al PCV derivado de PK (15).¹⁰⁰ Se ha sugerido una nomenclatura del PCV tipo 1 y PCV tipo 2 para identificar los aislamientos de PK (15) y de los casos de PMWS, respectivamente. Al parecer existen diferencias antigénicas en la infección por PCV-1 y PCV-2 dado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el PCV-1 no son capaces de reconocer a PCV-2 y viceversa en células infectadas. Sin embargo cuando se utilizó suero hiperinmune de conejo obtenido por inmunización con PCV-2, se demostró un título específico alto contra PCV-2 con niveles bajos contra PCV-1 en cultivo.¹⁰¹

Allan y cols. (1998)¹⁰² analizaron la capacidad infectiva del virus PCV-2 en las lesiones histopatológicas de cerdos con el PMWS observando neumonía intersticial, hiperplasia epitelial alveolar, y basofilia nuclear con inclusiones citoplásmicas de infiltrados mononucleares en las células epiteliales de pulmón. Las preparaciones de tejido pulmonar se inocularon posteriormente en los cultivos celulares de la línea PK (15) siendo positivas para los antígenos de PCV-1 y 2 utilizando una prueba de inmunoperoxidasa con suero hiperinmune anti-PCV2 elaborado en conejo. La marca positiva en ambas preparaciones sugirió que los aislamientos virales obtenidos de las muestras clínicas estaban relacionados antigénicamente con la cepa de PCV-1 presentes en PK (15).¹⁰⁰ En estudios previos, se había demostrado la presencia de anticuerpos anti-PCV-1 en las muestras serológicas de cerdos, ganado, ratón y humanos. A diferencia de otros hallazgos donde no se ha determinado la reactividad en los animales domésticos, ni en el hombre.^{103,104}

Allan y cols. (1995)⁹⁹ estudiaron la susceptibilidad a la infección relacionada con la etapa productiva de los cerdos. Se infectó a un grupo de animales recién nacidos privados de calostro demostrando la presencia del virus en las muestras de timo, bazo, y en los nódulos linfáticos mesentéricos, bronquiales y retrofaríngeos, así como en la mucosa nasal, en pulmón e intestino. La replicación viral en los macrófagos periféricos y tímicos, y en los histocitos permitieron establecer la posible implicación del sistema inmunológico porcino. Además, el virus no fue recuperado de las muestras obtenidas de riñón, hígado y cerebro sugiriendo la no implicación de las células presentes en estos órganos.

Estudios llevados a cabo por Adair y cols. (1993)¹⁰⁵ y por Latimer y cols. (1992)¹⁰⁶ para demostrar los subtipos celulares que soportan la replicación viral de otros miembros de la familia *Circoviridae* identificaron un efecto inmunosupresor debido a la infección en los precursores de los linfocitos T en el timo y de las células hematopoyéticas troncales presentes en la médula ósea, así como en la bursa de Fabricio y en macrófagos alveolares. Previamente, Allan y cols. (1994)⁹⁸ habían demostrado la susceptibilidad a la infección por PCV de la línea monocito/macrófago derivadas de células mononucleares periféricas y de médula ósea de cerdos y de bovinos siendo incapaces de infectar a células humanas y de oveja. Durante el tiempo de cultivo, la infección de estos subtipos celulares no resultó en un efecto citopático visible, resultados similares son observados en las infecciones crónicas o persistentes de la línea PK (15).⁹⁴

Capítulo

II

Planteamiento del Problema

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El procedimiento clínico del xenotransplante es la transferencia de células viables, tejidos y órganos entre diferentes especies, lo anterior ha sido propuesto como una solución al problema de la donación de órganos alogénicos. La investigación científica ha centrado sus esfuerzos en salvar las barreras inmunológicas de especie utilizando tejidos de cerdo, aunque reducida ha sido la evaluación de los riesgos de transmisión de los patógenos porcinos a los receptores humanos de xenoinjertos. Adicionalmente, el riesgo de infección puede incrementarse debido a la aplicación de mayores niveles de fármacos inmunosupresores en los individuos con el objetivo de prevenir el rechazo del órgano, así como el papel que juegan las infecciones asociadas al xenotrasplante en la población humana lo que constituye un verdadero problema de salud pública. Una lista de los patógenos potenciales de los cerdos para los humanos incluyen a: *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la hepatitis E, *Paramyxovirus* (Nipah virus), *Flavivirus* (encefalitis japonesa, fiebre porcina clásica), *Rhabdovirus* (estomatitis vesicular, Lyssa), *Picornavirus* (fiebre aftosa, estomatitis vesicular, encefalomiocarditis, Teschen-Talfan), *Poxvirus* (vaccinia, viruela), *Parvovirus* (SMEDI), *Coronavirus* (GET), *Herpesvirus* (citomegalovirus, seudorabia y virus linfotrópico tipo 1 y 2), *Retrovirus endógeno* (PERV), *Orthomyxovirus* (virus de la influenza porcina), y el Circovirus porcino tipo 1 y 2. Muchos de estos patógenos se pueden excluir de los tejidos para el xenotransplante utilizando sistemas estandarizados de diagnóstico que permitirán al animal donante estar disponible al momento que se requiera.

Otros virus conocidos, específicamente, aquellos que se integran en el genoma y que no dirigen la lisis de la célula hospedera, así como también del número incalculable de los virus desconocidos, tal como el circovirus porcino tipo 1 colocan una amenaza mayor en esos receptores. Los estudios actuales no han definido completamente la actividad antiviral a PCV a pesar de los efectos de la infección en el sistema inmunológico del cerdo. Las subseries celulares que soportan la replicación viral son las del linaje monocito/macrófago y las células presentadoras profesionales tales como las dendríticas

foliculares. Sin embargo, la infección de los macrófagos del cerdo no resulta en un visible efecto citopático, aunque la infección permite demostrar la expresión de los antígenos virales, así como la presencia del antígeno viral en el núcleo de algunas subseries de linfocitos. Además, se ha demostrado que el PCV infecta a las células en división, principalmente macrófagos y linfocitos B, induciendo apoptosis de estas células.

La común ocurrencia de la infección por PCV-1 en las poblaciones porcinas, la demostración de los anticuerpos específicos en humanos, y la habilidad de la variante de PCV-2 en comprometer al sistema de respuesta inmunológica sugieren la necesidad de evaluar el riesgo de PCV-1 como un agente xeno-zoonótico potencial.

Capítulo

III

Hipótesis y Objetivos

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1 HIPÓTESIS

Las células mononucleares periféricas humanas expuestas a la línea celular porcina PK (15) infectada por PCV-1 en condiciones de cultivo permitirá la transmisión de la infección viral con la subsecuente disminución de la capacidad de respuesta antiviral. Se espera que el efecto de la infección por PCV-1 en los linfocitos humanos conllevará a la reducción de la citotoxicidad, disminución del porcentaje de las células que expresan los marcadores CD25, CD69, CD71, y HLA-DR, reducción de las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ e incremento de TNF- α , alteración de las estrategias del patrón de activación Th1/Th2, y de la modificación ultraestructural de las células mononucleares humanas expuestas a PK (15) PCV⁺. Asimismo, la relevancia de cada una de las formas alélicas HLA en la capacidad citotóxica de las células humanas sobre PK (15) PCV⁺ podrán definir la resistencia/susceptibilidad humana a la infección por PCV-1.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar la infección por PCV-1 en los leucocitos humanos expuestos a la línea PK (15) PCV⁺, así como el efecto deletéreo en los mecanismos de la respuesta inmunológica antiviral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la habilidad patogénica del PCV-1 para inducir alteraciones ultraestructurales en los linfocitos T, B, NK, y monocitos humanos.
2. Establecer la presencia molecular del PCV-1 en las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺.

3. Detectar la hibridación fluorescente del ADN genómico humano por el ácido nucleico del PCV-1 en el núcleo de las células mononucleares humanas expuestas a PK (15) PCV⁺.
4. Analizar la capacidad proliferativa de las células T humanas infectadas por PCV-1.
5. Evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos T infectados o no por PCV-1.
6. Determinar las proporciones celulares humanas CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, y CD56⁺ expuestas a PK (15) PCV⁺.
7. Determinar el porcentaje de células T que expresan los marcadores de activación CD25, CD69, CD71, y HLA-DR durante la exposición a PK (15) PCV⁺.
8. Determinar la cinética de las concentraciones de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ en el sobrenadante de los cultivos para establecer el curso del patrón de activación Th1/Th2.
9. Evaluar la capacidad funcional de los linfocitos T infectados por PCV-1 para sintetizar INF- γ e IL-2.
10. Establecer las especificidades alélicas HLA de clase I y II asociadas con la reducción de las respuestas citotóxicas a PK (15) PCV⁺.
 11. Determinar la relevancia de las formas alélicas individuales HLA en el porcentaje de las células T CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y CD56⁺ recuperados de los cultivos con PK (15) PCV⁺.
 12. Definir la participación de los linfocitos T humanos en presencia de las otras células mononucleares infectadas por PCV-1 que están involucradas en las respuestas inmunológicas primarias a PK (15) a través de modelos probabilísticos.

Capítulo

IV

Materiales y Métodos

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio.

Ensayo experimental (Modelo celular de infección viral)

4.1.2 POBLACIÓN BAJO ESTUDIO

Células efectoras humanas. Células mononucleares periféricas humanas en suspensión obtenidas de diferentes sujetos sanos.

Células diana o blancos antigénicos. La cepa de referencia PK (15) infectada permanentemente por circovirus porcino tipo 1 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC CL-33, Rockville, MD. EUA). La Dra. Darwich del Departament de Sanitat y D'Animales de Anatomia de Universitat Autònoma de Barcelona suministró amablemente la línea celular PK (15) libre de PCV-1.

4.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

En humanos: Las células mononucleares periféricas humanas se recolectaron de los sujetos seleccionados sanos. El consentimiento informado fue obtenido de cada uno de los participantes al inicio de la fase experimental. Previamente, se realizaron biometrías hemáticas para garantizar el estado de salud de los mismos. Además, se realizaron los estudios de fenotipificación para los grupos sanguíneos AB0.

Identificación serológica de las especificidades alélicas HLA de clase I (-A y -B) y de clase II (-DR, -DQ) en los sujetos participantes.

En la línea celular infectada por PCV-1: Monocapa epitelial de células renales porcinas cepa de referencia PK (15) (ATCC CL33) infectada por PCV-1, crecida en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) enriquecido con 10 % de suero fetal bovino con 24 horas de incubación.

En la línea celular control: Se aseguró que las células PK (15) estuvieran libres de PCV-1 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por ensayos de inmunoperoxidasa en monocapa celular.

4.1.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En humanos: Que los sujetos reclutados presentaran linfopenia marcada o cualquier estado de alteración hematológica, medicación antidepresiva y/o cualquier otro medicamento que modifique los parámetros hematológicos y fisiológicos de las células e infección por VIH, HBV y HCV; y, en la mujer: embarazo y periodo menstrual.

4.1.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Que los cultivos controles de células PK (15) presentaran reducción de la viabilidad celular (coeficientes de variación >15%), cuando se modificara la morfología epitelial observada bajo microscopía óptica, así como de periodos de expansión mayores de 24 horas.

Además, que los cultivos presentaran contaminación por *Mycoplasma*, virus de la diarrea viral bovina y de la fiebre porcina clásica.

4.2 LÍNEAS CELULARES

La línea celular de riñón de cerdo PK (15) o las células diana permanentemente infectadas con PCV-1 se obtuvo de la Colección Americana para Cultivos Celulares (ATCC CL-33, Rockville, MD. EUA) manteniendo en medio mínimo esencial (Eagle's Minimum Essential Medium, MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 µg/ml de penicilina G, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina. La línea de células PK (15) no infectada fue suministrada amablemente por la Dra. Darwich del Departament de Sanitat y D'Animales de Anatomia. Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Estos cultivos fueron probados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por ensayos de inmunoperoxidasa en monocapa celular para confirmar la no infección con PCV.

4.3 CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS EN SUSPENSIÓN

Las muestras sanguíneas se recolectaron de treinta voluntarios sanos no relacionados. El consentimiento informado por escrito se obtuvo de cada sujeto previo al inicio del estudio experimental. Se identificaron los antígenos leucocitarios HLA humanos por tipificación serológica para los productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II de acuerdo a la metodología de microlinfocitotoxicidad.¹⁰⁷ Se realizó la caracterización del MHC en las células huma-

nas mediante la tinción con doble fluorescencia en panel de antisueros para las moléculas HLA-I (A, B, Bw4/Bw6) y para los HLA-II (DR, DR52/DR53, DQ). Las células mononucleares periféricas humanas de sangre completa se obtuvieron por gradiente de centrifugación con medio de separación de leucocitos a densidad media de $1.077 \pm 0.001 \text{ g/ml}$ (Nalgene. Walkersville, MD. EUA). Las células mononucleares humanas en suspensión (CMPHs) se ajustaron a una concentración de 5×10^4 células/100 μl y se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G, y 100 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina. La viabilidad de las células humanas se determinó por tinción de exclusión con azul de tripano.

4.4 CONDICIONES DEL COCULTIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Monocapas confluentes de células PK (15) (4×10^4 por pozo en placa de 96) se expusieron a luz ultravioleta a dosis mínima de luminosidad de $9000 \mu\text{w/cm}^2$ por 45 seg. Para determinar la actividad citotóxica de las células mononucleares humanas, 5×10^4 células/100 μl de CMPHs fueron incubadas con PK (15) PCV+ o con PK (15) PCV- en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal de bovino al 10% y antibióticos por 72h a 37°C en ambiente de CO_2 al 5%.

4.5 SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS POR SORTEO

Las células humanas en suspensión fueron recuperadas de los cultivos con PK (15) PCV⁺ y PK (15) PCV⁻ por aspiración a las 72h post-reto antigénico. Se colectaron 106 células/mL de los pozos de la microplaca evaluando la viabilidad celular con azul de tripano al 0.4% (>95% de viabilidad). Se realizó análisis de citometría de flujo y el sorteo de células acorde a las especificaciones descritas anteriormente. Se marcaron cinco poblaciones celulares (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺ y CD56⁺) separadas por sorteo. Las células separadas de las CMPHs y las muestras control se incubaron en hielo por 15min a 2h antes de la preparación de los ensayos de PCR, FISH y microscopía electrónica de transmisión.

4.6 ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN LAS CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS POR PCV-1

Mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) se evaluó la presencia de PCV-1 y las alteraciones ultraestructurales de las células humanas expuestas a PK (15). Las células humanas separadas por sorteo se fijaron en solución de cacodilatos al 0.1M y glutaraldehído al 2.5% por 2h a 4°C. Se utilizó Tetraóxido de osmio al 1% para postfijar en solución amortiguadora de fosfatos al 0.1M por 1h. Las muestras se deshidrataron en pasos graduales de etanol (de 50 a 100%) después de lavar y montar en Epon-812 por 18h a 70°C. Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo sólo antes de los exámenes en el microscopio electrónico (ZEISS modelo 900. Oberkochen, Alemania). Además, la línea celular PK (15) PCV⁺ se trataron previamente con D-glucosamina (300 mM de D-glucosamina en solución de Hanks por 60min a 37°C un día después de sembrar) para mejorar la replicación viral en los cultivos persistentemente infectados con PCV-1 y para establecer el efecto citopático y las alteraciones ultraestructurales en citoplasma, núcleo y organelos.

4.7 PCR PARA PCV-1

Los iniciadores fueron diseñados para permitir la amplificación de un fragmento de 347 pares de base de PCV-1 (adelante, 5'-GCGCCATCTGTAACGGTTTC-3'; reversa, 5' TCCAAACCTTCCTCT CCGC-3') de acuerdo a lo descrito por Ouardani y colaboradores (1999).¹⁰⁸ El ADN de las células sorteadas o de los cultivos de PK (15) PCV⁺ se obtuvieron por extracción fenólica. Una alícuota de 5 µl de ADN purificado se añadió a 45 µl de mezcla de reacción conteniendo solución amortiguadora para PCR al 1x (10mM de tris-HCl, 50mM KCl), 1.5mM de cloruro de magnesio, 0.2mM de dNTPS, 1µM de cada iniciador, y 1.5 unidades de ADN Taq polimerasa (PCR-Master Mix Kit, Qiagen. Valencia, CA). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un controlador térmico programable (PTC-100, MJ Research, Watertown, Mass, USA) las condiciones siguientes: 94 °C por 5 min en un ciclo, seguido por 35 ciclos de amplificación (1 ciclo= desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 62 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por

1.5 min), y un ciclo final de extensión establecido a 72 °C por 10 min. Controles positivos y negativos se incluyeron en cada corrida experimental.

4.8 ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

La detección de la secuencia de PCV-1 en las células humanas expuestas a PK (15) se determinó con el uso de una sonda específica para el marco de lectura 1 (ORF1) derivada de la secuencia genómica en el ADN viral caracterizada de los aislamientos de PK (15) (GenBank, número de acceso AY184287).¹⁰⁹ Las células mononucleares humanas en interfase se trataron con una solución hipotónica según el protocolo estándar recomendado por Vysis (Vysis, Downers Grove, IL, EUA) con modificaciones. Las laminillas llevando las células en interfase se pretrataron con solución SSC al 2x (1x es NaCl al 0.15M con citrato de sodio al 0.015M) por 1h a 37°C, deshidratando en una serie de etanol (70%, 85%, y 100%), desnaturalizado (50% formamida/SSC al 2x vol/vol a pH 7±0.2 en concentración final) por 5 min a 73°C ± 1, y deshidratado en series de etanol a 4°C. La sonda de ADN de PCV-1 y las muestras se desnaturalizaron al mismo tiempo. La mezcla de hibridación estuvo compuesta por formamida al 50%, SSC al 2x, y sulfato de dextrán al 10% (solución intermedia de hibridación), y la sonda de PCV-1 marcada con fluoróforo en 192.7µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). La sonda marcada se precipitó en presencia de esperma de salmón (0.5µg por 1 µL de sonda). El cóctel de la sonda se aplicó a las laminillas bajo un cubre objeto (10µl/cm² de vidrio) sellando con cemento de caucho. Después de una noche de incubación a 37°C, las laminillas se lavaron por 2 min con una solución de SSC al 0.4x/ NP-40 al 0.3 % con pH 7 a temperatura de 73°C±1°C por una ocasión seguida por otro lavado con SSC al 2x/ NP-40 0.1 % con pH 7 a temperatura ambiente. Se realizó una contra tinción con DAPI II (125ng/ml), y las laminillas se examinaron bajo microscopía epifluorescente (Olympus BX40F4, Shibuya Ku, Tokio, Japón). La intensidad de fluorescencia observada en los núcleos se realizó por un procesador digital de imagen (Cytovision, San Jose, CA, EUA). Los linfocitos en reposo libres de PCV-1, y las células PK (15) no infectadas sirvieron como los controles negativos.

4.9 ENSAYO MITOGÉNICO O DE PROLIFERACIÓN

La proliferación de las células humanas infectadas por PCV-1 se determinó a través de cultivo mixto de linfocitos (CML unidireccional). Las células mononucleares periféricas humanas (10^4 células/pozo) se probaron por triplicado con PK (15) PCV⁺ a razón de 1:1. La monocapa de células PK (15) PCV⁺ al 100% de confluencia se expuso a Luz UV ($9000 \mu\text{W}/\text{cm}^2/45\text{seg}$) o adicionadas con mitomicina C ($0.1/30\text{min}$). Después de 48h de incubación, cada pozo de la microplaca se radiomarcado con $1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada [3^+H] (actividad específica, $37 \text{ Ci}/\text{mmol}$; ICN Radiochemicals, CA, EUA) por 24h a 37°C . La incorporación de [3^+H] fue probada usando líquido de centelleo en un contador β . El índice proliferativo se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice proliferativo} = [\text{CMPHs} + \text{PK-15 cpm}] - (\text{PK-15 cpm}) / \text{CMPHs cpm}$$

La proliferación significativa se determinó con un índice proliferativo mayor o igual a 2.0.

4.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Se evaluó la actividad citotóxica humana ejercida sobre las células PK (15) PCV⁺ o de PK (15) PCV⁻ después de las 72h de exposición mediante el método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio, Sigma. St. Louis, MO. EUA). Las relaciones de las células efectoras/blanco (E:T) probadas fueron del orden de 0.5:1 a 1.25:1. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de incubación, se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de la solución de MTT diluida al 20% a todos los pozos de la microplaca. Al finalizar la incubación, se adicionaron $150 \mu\text{l}$ de la solución de lisado (SDS al 10%, isopropanol al 50 % y HCl al 0.01 N) agitando la microplaca durante 45 min para disolver los cristales azules de formazan. Se obtuvieron las lecturas colorimétricas después de la solubilización de los cristales en un lector de ELISA tipo CERES 900 HDi (la longitud de onda de la prueba fue de 530 nm con filtro de referencia a 630 nm). Las placas se leyeron normalmente a 1 h de agregada la solución de lisado. Los valores medios de las unidades de densidad óptica (U. OD) en 24 pozos de la placa se estimaron en cada experimento por triplicado. La citotoxicidad de las células blanco se calculó con la ecuación:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = [(\text{CMPHs}_{\text{U. OD}} + \text{PK (15)}_{\text{U. OD}}) - \text{CMPHs}_{\text{U. OD}} / \text{PK (15)}_{\text{U. OD}} - 1] 100$$

4.11 ANTICUERPOS MONOCLONALES

La identificación de los subtipos celulares humanos, y la expresión de los marcadores de activación y de las citocinas intracelulares se evaluaron mediante inmunotinción con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3-PCY-5 (PN IM2635. Immunotech. Marsella, Francia), CD4-FITC (PN IMO0448, Immunotech. Marsella, Francia), CD8-PE (PN IMO 0452. Immunotech. Marsella, Francia), CD14-PE (340040, Becton Dickinson. San Jose, CA. EUA), CD19-PE (PN IM1285. Immunotech. Marsella, Francia), CD25-FITC (347643, Becton Dickinson. San Jose, CA. EUA), CD45-FITC (340040, Becton Dickinson. San Jose, CA. EUA), y CD56-PE (PN IM2073. Immunotech. Marsella, Francia), CD69-PE (PN IM1943 Immunotech. Marsella, Francia) y CD71-FITC (PN IM0483 Immunotech. Marsella, Francia), INF γ -FITC (PN IM2716 Immunotech. Marsella, Francia), IL-2-PE (PN IM2718 Immunotech. Marsella, Francia), IL-4-PE (PN IM Immunotech. Marsella, Francia), y HLA-DR-PE (32415X, Becton Dickinson. San Jose, CA. EUA).

4.12 DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE ACTIVACIÓN TEMPRANA Y TARDÍA EN LOS LEUCOCITOS HUMANOS INFECTADOS POR PCV-1

Los leucocitos humanos en suspensión se recuperaron de los cultivos con PK (15) PCV⁺ por aspiración a las 72h post-reto antigénico. Se colectaron 10⁶ células/mL de los pozos de la microplaca midiendo la viabilidad celular con azul de tripano al 0.4%. Las células humanas fueron depositadas en tubos Eppendorf en 1 mL de medio RPMI-1640. A cada 25 μ l de la muestra experimental se le adicionaron 7.5 μ l de cada uno de los anticuerpos monoclonales arriba mencionados. Cinco subtipos celulares (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, y CD56⁺) se tiñeron simultáneamente con los marcadores de activación CD25, CD69, CD71, y HLA-DR (Apéndice-VI). Las células marcadas fueron incubadas por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se lavaron con solución de PBS 1x con 0.01% de azida de sodio mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó resuspendiendo el botón celular en el volumen residual. Para el procedimiento de fijación de la muestra se adicionaron 500 μ l de solución PBS 1x con 0.5% de paraformaldehído.

Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo utilizando un citómetro Coulter Altra (Beckman Coulter. Brea, CA. EUA) equipado con láseres de argón y helio-neón. Se utilizaron perlas fluorescentes de diez micrómetros para alinear los láseres y para estandarizar el umbral en la emisión de luz delantera dispersa (Forward Light Scatter, FLS) previo a la lectura de las células en cada sesión de análisis. El citómetro de flujo se limpió con 10% de cloro de casa por 5 min entre las muestras para prevenir la contaminación cruzada de las células. La fluorescencia específica de FITC, PE, y PCY-5 a 488 nm, así como también de las señales de FLS y de la luminosidad ortogonal dispersa (Orthogonal Light Scatter, SSC), se usaron para establecer las ventanas de análisis. Se realizaron experimentos por triplicado para cada sujeto y los eventos positivos se definieron como la fluorescencia que excedió al 99% de los eventos comparados con el control de isotipo.

4.13 DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL SOBRENADANTE DE LOS CULTIVOS

El sobrenadante de los cultivos se recolectó en condiciones de esterilidad almacenando 1 mL de la muestra en tubos Eppendorf estériles. Las muestras fueron cuidadosamente recuperadas de los cultivos a las 24h, 48h, y 72h de estímulo antigénico. Las citocinas inflamatorias y las de la respuesta inmunológica se determinaron en los experimentos siguientes: 1) CMPHs en reposo, 2) CMPHs + PK (15) PCV+, y 3) CMPHs + PK (15) PCV-. Las concentraciones de IL-2, (D2050. Quantikine. Minneapolis, MN. EUA), IL-4 (1 921 002. Boehringer-Mannheim. Mannheim, Alemania), IL-6 (1 534 475. BM), IL-10 (1 699 342. BM), IL-12 (1 921 029. BM), TNF- α (40.175.00. Biosource. Camarillo, CA. EUA) y INF- γ (KHC4012. B) mediante pruebas de ELISA específicas de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Las densidades ópticas de las muestras se determinaron en un espectrofotómetro tipo CERES 900 HDi (la longitud de onda de la prueba fue de 490 nm con filtro de referencia a 630 nm).

4.14 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN T COOPERADOR

Se realizó la recolección de las células humanas que se mantuvieron en cultivo con PK (15) PCV⁺ de acuerdo a la metodología descrita previamente. La expresión de las citocinas intracelulares se realizó con tinción de triple marcaje. Las células se colectaron en tubos Eppendorf estériles ajustando una concentración de 106/mL de medio RPMI-1640. Estas muestras se obtuvieron a partir de los experimentos con las células humanas en reposo, y las expuestas a PK (15) PCV⁺. A cada 250µl de muestra se le adicionaron los reactivos siguientes: 1) Brefeldina A (10 µg/ml) y 2) Brefeldina A con PMA (Forbol 12 miristato 13 acetato, 25 ηg/ml. ICN 151864. CA, EUA) y PMA (ionomicina, 1 µg/ml), respectivamente. Las células fueron incubadas a 37°C en ambiente de CO₂ al 5% por 5h. Se adicionó solución de lavado centrifugando a 1500 rpm por 8min. Se recolectaron 25µl de cada tubo adicionando 7.5µl de cada anticuerpo (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺) para la tinción de superficie. Se agregaron 25µl de reactivo FACS Lysing diluído a 1:10 en cada tubo. Las células se lavaron con solución de PBS 1x con 0.01% de azida de sodio mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 50µl de la solución permeabilizadora (IntraPrep. Immunotech, Marsella, Francia), incubando los tubos por 15min. Se adicionó la solución de lavado centrifugando a 1500 rpm por 8min. El sobrenadante se decantó resuspendiendo el botón celular en el volúmen residual. Las muestras se llevaron a un volúmen final de 250µl, disponiendo 25µl de la muestra en diferentes tubos. Se agregaron 10µl de anticuerpo α-IL-2 e INFγ incubandose por 30min. Se fijaron las muestras adicionando 500µl de solución PBS 1x con 0.5% de paraformaldehído. Los pasos previos en el procedimiento de marcaje precedieron a los lavados con PBS 1x con 0.01% de azida de sodio y la incubación de las muestras se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en la obscuridad. El análisis de citometría de flujo fue realizado en un citómetro EPICS-ALTRA COULTER (Coulter. Hialeah, EUA) cuantificando un total de 10,000 eventos. Se utilizó la fluorescencia específica de FITC, PE, y PCY-5 a una longitud de onda de 488 nm, así como también las señales emitidas por FLS y SSC para establecer las ventanas de análisis. Los eventos positivos se definieron como la fluorescencia que excedió al 99% de los eventos observados en el control de isotipo.

4.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando el programa computacional SPSS versión 10.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Se estimaron las frecuencias alélicas para los antígenos leucocitarios HLA de clase I y II mediante el método directo y de Hardy-Weinberg. El nivel de citotoxicidad o de viabilidad de las células PK (15) PCV⁺ o de PK (15) PCV⁻ se estimó a partir de los valores promedio de 24 repeticiones (\pm desviación estándar) calculado para las conjunciones en cultivo de CMPHs \rightarrow PK (15) PCV⁺, CMPHs \rightarrow PK (15) PCV⁻, y CMPHs en reposo y PK (15) PCV⁺ en cada experimento. En apego al teorema del límite central, se considero el nivel de citotoxicidad baja a las observaciones menores de una desviación estándar del promedio ($x < \sigma$), citotoxicidad media ($x \pm \sigma$) y citotoxicidad alta ($x > \sigma$). Se utilizo la prueba de U de Mann-Whitney como procedimiento de análisis para evaluar las diferencias en los niveles de citotoxicidad. Se estimaron las correlaciones de las especificidades alélicas individuales HLA de clase I y II con los niveles de citotoxicidad mediante el coeficiente de correlación (r) de Spearman. Se compararon las expresiones fenotípicas de los linfocitos T de acuerdo a los rangos de citotoxicidad mediante la prueba t de student para muestras independientes. Se estimó la participación de las poblaciones leucocitarias humanas infectadas con PCV-1 involucradas en las respuestas citotóxicas sobre PK (15) a través de modelos predictivos lineales. Las estimaciones probabilísticas menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Capítulo

V

Resultados

V. RESULTADOS

5.1 Evidencia ultraestructural de la infección por PCV-1 en las células humanas

La típica morfología ultraestructural de la línea celular PK (15) PCV⁺, tratada o no con D-glucosamina se muestra en la figura 12. Las células PK (15) PCV⁺ que sirvieron como blancos antigénicos poseen un núcleo con abundante heterocromatina central, rodeado finamente por un material electro-denso dispuesto periféricamente al núcleo. Este tipo de inclusión intranuclear se puede observar aún antes de visualizar cualquier estructura semejante a nucleocápsides. Mínima cantidad de viriones o partículas virales fueron observadas dentro de estas estructuras. También se observaron abundantes ribosomas y un número considerable de mitocondrias en el citoplasma (Figura 4-A).

El principal hallazgo morfológico que expresaron las células porcinas infectadas por PCV-1 durante la etapa de proliferación viral fueron los cambios que ocurrieron en el nucleoplasma. Las células PK (15) PCV⁺ tratadas con D-glucosamina mostraron la desaparición de la membrana nuclear (Figura 4-B). En respuesta a la expresión del virus, estas células desarrollaron cuerpos de inclusión intracitoplásmico (CII) de estructura amorfa o de placa. Los viriones presentaron un diámetro de 23 nm apareciendo en el núcleo y en la periferia de las CII. Cuando el ADN viral está presente dentro del nucleoide, la apariencia estructural varía considerablemente observando que el PCV-1 replica en la heterocromatina. Sin embargo, cuando se observaron las partículas víricas en el citoplasma, la unidad de la membrana aparece oscura o las cápsides pueden mostrarse libres sin ácido nucleico integrado. Además, se observó la presencia de otras partículas semejantes a viriones que tienen una distinta unidad membranal sin halo claro alrededor de su core denso. Una ampliación fotográfica de ésta partícula viral es mostrada en la figura 4-C.

La alteración morfológica de las células leucocitarias humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ en cultivo se muestra en la figura 5. Inclusiones intracitoplásmicas inducidas por la infección de PCV-1 aparecen como una estructura en forma de “boomerang”. Las nucleocápsides aparecen libres cercanos al núcleo o contenidas en caveolas.



Estos organelos vacuolados observan un diámetro de tamaño entre 44 a 100 nm. Algunas formas virales observan carencia de tegumento electro-denso entre su nucleocápside y la capa exterior. Un número considerable de viriones maduros y formas inmaduras se pueden observar en las células humanas que tuvieron una membrana nuclear intacta sin modificación en la disposición de cromatina. Potencialmente, las formas contagiosas víricas podrían actuar recíprocamente con células humanas susceptibles por el reconocimiento de un receptor de superficie (Figura 5, A-C). En ese caso es probable que la infección por PCV-1 sea capaz de inducir una fusión celular rápida de las células T humanas (Figura 5-D).

Por otro lado, las partículas víricas son fagocitadas por los monocitos sin que aparentemente se observe dañado el núcleo y los compartimientos intracitoplásmicos. La formación de los fago-lisosomas mantiene el nivel en la producción de virus por el sistema, inclusive la presencia de abundantes mitocondrias, cuerpos de mielínicos y polisomas sugieren condiciones de síntesis celular (Figura 6-A). Además, los sitios de ensamble de la progenie del circovirus se observaron en los elementos estructurales del sistema Golgi (Figura 6-B). Mientras los monocitos humanos infectados muestran la presencia de los circovirus con relativa alteración estructural, los monocitos no infectados por PCV-1 aparecen con un severo número de vacuolas, lisosomas, cuerpos mielínicos y mitocondrias (Figura 6-C).

5.2 Detección molecular del PCV-1 en las estirpes celulares humanas

El nivel de la expresión de los transcritos de PCV-1 en las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ usando el método de PCR se muestra en la figura 7. Inicialmente, se realizó la evaluación en la eficacia de este método para detectar el ADN del PCV-1 en las células blanco. El límite de detección usando el ADN de PK (15) fue de 5×10^4 células. La amplificación del PCR rindió productos de 375 bp de PCV-1 en el material genómico extraído de las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺. Las células humanas (CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺ y CD56⁺) tuvieron señalamiento de





PCV-1, así como cuando la prueba se condujo con el control positivo, pero no con el control negativo (Figura 7-A). Como esperábamos, en ninguno de los productos de amplificación para PCV-1 se obtuvieron a partir del ADN de las células humanas en reposo, ni de las expuestas a PK (15) no infectadas (Figura 7-B).

Los artefactos simulando bandas en el gel de electroforesis nunca fueron observados en cualquiera de las pruebas de PCR utilizando templetas de ADN de otros patógenos (datos no mostrados).

5.3 Hibridación fluorescente para la detección del ácido nucleico del PCV-1 en la célula humana infectada

Se detectó la hibridación del ADN genómico humano por el ácido nucleico del PCV-1 en el núcleo de células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ y en las células blanco por la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Figura 8). Tres experimentos diferentes se condujeron para determinar si la relación entre la intensidad de la fluorescencia y el ADN del blanco era cuantitativa. Se evaluaron las fluorescencias de la sonda en los núcleos de las células humanas infectadas y en PK (15) infectado difiriendo en sus proporciones celulares. Sólo el 2% (10/500) de las células humanas se pudo observar asociado con las señales del ácido de nucleico de PCV-1, y en el 12.4% (62/500) en la línea celular PK (15) PCV⁺. Además, sólo cuatro núcleos observaron dos o más señales para el ácido nucleico de PCV con sus respectivas intensidades de fluorescencia cuando estas fueron evaluadas en varios núcleos de células con señales sólidas.

5.6 Ensayos de proliferación celular

La estimulación primaria de las células humanas por PK (15) PCV⁺ conducen a diferentes respuestas proliferativas (Figura 9). El umbral de proliferación se determinó en 3 de los 7 haplotipos HLA examinados. La óptima respuesta proliferativa (de 10 a 70 veces mayor que las células en reposo) se observó con los haplotipos *HLA-A3*, *A9*, *B35*, *B40*, *DR3*, *DR11*, *DQ2*, *DQ4* (69,886.5 CPM vs. 3,424.9 CPM), *HLA-A2*, *A9*, *B5*,



B40, DR3, DR11, DQ2, DQ4 (69,357.5 CPM vs. 1,137.4 CPM), y *HLA-A2*, A11, B16, B35, DR7, DR8 (59,008 CPM vs. 5,208 CPM). Asimismo, el menor umbral de proliferación se determinó con los haplotipos *HLA-A3,A28*, B5, B12, DR3, DR5, DQ2, DQ6; *HLA-A2,*, B5, B27, DR11, DR15, DQ1, DQ8; *HLA-A1*, A2, B5, B12, DR4, DR12, DQ1, DQ4; y, *HLA-A1*, A2, B7, B35, DR7, DR12, DQ8. Los valores de fondo observados en las células PK (15) PCV⁺ irradiadas no mostraron incrementos por arriba de 8000 CPM en ambos casos.

5.7 Reducción en los niveles de citotoxicidad de las células humanas infectadas por PCV-1

Los efectos del PCV-1 en la capacidad citotóxica de las células efectoras humanas se ilustran en la figura 10. En estos experimentos se observaron diferencias significativas entre los niveles de citotoxicidad ejercida sobre PK (15) PCV⁺ o PK (15) PCV⁻. Se detectó una actividad citotóxica menor dirigida hacia las células PK (15) infectadas por PCV (22.3±8.4% vs. 31.8±8.5%, respectivamente. P<0.001). Adicional al investigar la actividad efectora de las células humanas dirigida a los blancos infectados por PCV-1, se observaron diferencias en las dispersiones probabilísticas son observadas en ambas muestras. En el contexto de los diagramas de caja y bigote, los valores se resumen como la mediana y los percentiles 25 th y 75 th de los índices de citotoxicidad cuando los datos son arreglados en orden de menor a mayor. Los valores determinados para el grupo CMPHs + PK (15) PCV⁺ muestran una mediana de 20.5% con rango de 32.6%. En el mismo grupo de tratamiento, los percentiles al 75th y 25th fueron de 29.3% y 15.8%, y el intervalo de confianza (IC_{95%}) fue de 8.5% a 39.8%.

En contraste, los valores observados en el cultivo CMPHs + PK (15) PCV⁻ presentaron una mediana de 30.3% con rango de 36.4%. Los percentiles al 75th y 25th fueron de 37.5% y 25.7% respectivamente, y el intervalo de confianza fue de 13.5% a 50%. También, ésta actividad citotóxica se observó en dosis dependiente utilizando cantidades menores de células efectoras (Datos no mostrados).

5.8 Expresión de las moléculas inductoras de la activación temprana y tardía en las células humanas infectadas por PCV-1

Primeramente, se estableció el nivel de expresión de los marcadores de activación temprana y tardía en las células humanas estimuladas por PMA-ionomicina (Figura 11). La cinética en la expresión del marcador de activación temprana (CD69) progresó a un máximo del 30% de las células a las 9h post-estímulo. El porcentaje de células que expresan CD69 mostraron tendencia platicúrtica a partir de las 3h hasta las 48h con cúspide a las 9h. Asimismo, la expresión de los marcadores de activación tardía (CD25, CD71 y HLA-DR) mostraron incrementos substanciales a partir de las 24h post-estímulo. Se observó la expresión de CD25 en el 20% de las células a partir de las 12h alcanzando un máximo del 52% a las 48h. Las células humanas que expresan la molécula CD71 observaron un aumento del 10% al 18% a las 72h post-estímulo. Inclusive, cerca del 10% de los linfocitos expresaron el marcador HLA-DR a las 48h alcanzando un valor del 15% al final del tiempo de experimentación. En contraste, el porcentaje de las células humanas que expresaron los marcadores CD69⁺ y CD25⁺ al estar expuestas a PK (15) PCV⁺ se presenta en la figura 12 (A, B). El análisis citométrico de las células humanas no mostró diferencias substanciales en la expresión de CD69⁺ a las 9h post-estímulo con las subseries CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y CD56⁺ al ser contrastadas con los controles no infectados (Figura 12-A). En relación a la expresión del receptor de la cadena α de IL-2 (CD25) (Figura 12-B), los resultados mostraron reducción significativa en el porcentaje de células CD25⁺ a las 48h post-estímulo (células infectadas 11.7% vs. células no infectadas 37.4%).

5.9 Marcada reducción de las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e incremento de TNF- α asociadas con la infección por PCV-1

Para determinar la presencia de las citocinas inflamatorias y del patrón de activación T cooperador/citotóxico (Th1/Th2) durante la actividad citotóxica de las células humanas sobre PK (15) PCV⁺, se evaluó la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ en el sobrenadante de los cultivos (Figura 13). Mientras se detectaron niveles menores a 12 pg/ml de IL-2 e IL-4 en los sobrenadantes (datos no mostrados), se obser-

va una marcada reducción en las concentraciones de IFN- γ en los cultivos de células humanas con PK (15) PCV⁺ mostrando una disminución del 27.2% con respecto a los controles sin PCV-1 (117.4 \pm 80.7 pg/ml vs. 161.3 \pm 74.1 pg/ml, P<0.02). Las concentraciones de IFN- γ aparecen declinar paulativamente durante el tiempo (24h: 205.3 pg/ml; 48h: 100.1 pg/ml; y, 72h: 46.8 pg/ml, respectivamente).

La reducción de las concentraciones de IL-4, e IL-6 con respecto a los controles sugieren que las células humanas infectadas por PCV-1 tienen un defecto generalizado en la producción de las citocinas del patrón Th2. Los niveles de IL-6 en los cultivos de células humanas con PK (15) PCV⁺ fueron marcadamente menores que en los cultivos con PK (15) PCV⁻ (375.7 \pm pg/ml vs. 611.4 \pm pg/ml, P<0.001). A pesar de las diferencias, las concentraciones de IL-6 detectadas en estos cultivos se incrementaron durante el tiempo de incubación (24h: 302.7 \pm 8.2 pg/ml; 48h: 409.6 \pm 4.2 pg/ml; y, 72h: 414.7 \pm 2.5 pg/ml). De igual manera, disminuyeron los niveles de IL-10 que fueron de 106.7 \pm 35.9 pg/ml vs. 121.9 \pm 49.9 pg/ml (P<0.04). Asimismo, los ensayos para la detección de IL-12 muestran drástica reducción de las concentraciones cuando las células humanas estuvieron expuestas a PK (15) PCV⁺ (42.2 \pm 3.8 pg/ml vs. 73.2 \pm 19.9 pg/ml, P<0.05). Al examinar las concentraciones promedio de TNF- α en los cultivos de células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ se observaron incrementos substanciales con respecto a PK (15) PCV⁻. La respuesta inflamatoria al estímulo de PK (15) PCV⁺ fue dos veces mayor que la observada en los cultivos con PK (15) no infectada (73.3 \pm pg/ml vs. 34.1 \pm pg/ml, P<0.002), respectivamente.

5.10 Producción de INF- γ e IL-2 intracelular en los linfocitos T humanos

El deterioro de la respuesta inmune antiviral de las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ se evaluó por la habilidad de sintetizar INF- γ e IL-2 (Figura 14). Durante la interacción célula efectora:blanco, se observó una reducida capacidad de los linfocitos T CD8⁺ humanos para producir INF- γ intracelular fue observada. Para determinar si la exposición a la infección por PCV-1 condujo a la inhibición de la síntesis de INF- γ , las células humanas expuestas a PK (15) se trataron posteriormente con PMA-Ionomicina

por 5h. El análisis de citometría de flujo demostró efecto refractario en el mantenimiento de la función celular al compararse con la capacidad de las células humanas en reposo para producir INF- γ intracelular. Mientras los linfocitos T CD8⁺ expuestos a PK (15) PCV⁺ no muestran diferencias tangibles en la síntesis de INF γ , los linfocitos T CD4⁺ presentaron un relativo incremento en la síntesis de IL-2 en comparación con los linfocitos en reposo (10.9% vs. 10%). También, cuando las células T CD4⁺ fueron post-tratadas con PMA-Ionomicina, el porcentaje de las células T CD4⁺IL-2⁺ mostró incrementos claramente superiores (16.9% vs.10.9%).

5.11 Características genéticas y demográficas de los participantes

Inicialmente, se estimaron las variantes genéticas individuales para los antígenos HLA (acorde a las especificidades serológicas de clase I y II) en el total de los pacientes prospectos (Cuadro 1). Aquellas reactividades serológicas que identificaron especificidades alélicas homocigóticas en los participantes se ajustaron por el método Hardy-Weinberg. Las variantes alélicas HLA-A2 (46.1%), HLA-A8 (15.7%), HLA-A11 (17.4%), HLA-B5 (11.5%), HLA-B35 (22.9%), HLA-DR1 (11.5%), HLA-DR7 (16.6%), y HLA-DQ1 y HLA-DQ7 (10.7%) se distribuyeron similarmente entre los sujetos seleccionados para el estudio. La información demográfica se analizó en los 30 participantes seleccionados, 14 de los sujetos analizados fueron hombres (46.7%) y 16 mujeres (53.3%), con una media de edad de 36 años (mediana= 35, rango de 20 a 48). El porcentaje de los grupos sanguíneos fue de 64.7% para el grupo 0+, 17% para el A+ y 18.3% para los grupos 0- y B+.

5.12 Diferencias en los niveles de citotoxicidad se relacionan con las especificidades serológicas HLA

Para evaluar el impacto de la infección viral sobre la capacidad de respuesta citotóxica individual, se evaluó la capacidad citotóxica de las células humanas con diferentes especificidades serológicas HLA de clase I (Figura 15). El análisis funcional de la actividad citotóxica de las células humanas y la relevancia de las variantes alélicas HLA-A demostró diferencias más claras en las capacidades de respuesta inmunológica

(Fig. 15-A, panel superior). Aparentemente, las especificidades alélicas HLA de clase I-A1, A2, A3, A9 y A11 se afectaron mayormente por la infección por PCV-1 ($P < 0.05$). El máximo nivel de citotoxicidad dirigida a PK (15) PCV⁺ (37.5%) se determinó con las formas alélicas A2 y A9, y con la menor (3.9%) con A1. Inclusive, al contrastar los valores medios observados contra PK (15) PCV⁻, el nivel de intensidad citotóxica fue aún mayor para estos alelos (A2: $20.8 \pm 9.6\%$ vs. $34.2 \pm 8.8\%$, $p < 0.001$. A9: $22.1 \pm 9.9\%$ vs. $34.8 \pm 12.4\%$, $p < 0.01$; y, HLA-A1: $10.8 \pm 5\%$ vs. $33.9 \pm 7.4\%$, $p < 0.02$; respectivamente). En contraste, las células humanas que expresan la forma alélica HLA-A28 se observa menos afectada por la infección viral. Los valores de citotoxicidad a PK (15) PCV⁺ no mostraron diferencias con respecto a PK (15) no infectadas ($22.9 \pm 8.5\%$ vs. $30.3 \pm 11.3\%$, $p = 0.22$).

De igual manera, los efectos deletéreos en las células humanas infectadas por PCV-1 con las especificidades HLA-B se muestran en la Figura 15-B (parte inferior). Las formas alélicas HLA-B5, B7, B27, B35, y B40 mostraron una sensible reducción en los niveles de citotoxicidad ($P < 0.05$). La máxima intensidad observada fue con el alelo B35 (37.5%) y la mínima con el B7 (3.7%). Al comparar los valores medios de citotoxicidad con estas formas alélicas se observó una reducción significativa al estar expuestos a la infección por PCV-1 (HLA-B35: $18.9 \pm 8.6\%$ vs. $30.7 \pm 8.5\%$, $p < 0.004$; y, HLA-B7: $16.2 \pm 10.6\%$ vs. $29.8 \pm 7\%$, $p < 0.04$; respectivamente). Las células humanas que expresan el alelo HLA-B16 no mostraron diferencias significativas en la capacidad citotóxica contra PK (15) PCV⁺ ($25.6 \pm 8.8\%$ vs. $32.2 \pm 7.5\%$, $p = 0.09$).

Por otra parte, la expresión de las moléculas HLA de clase II demostraron menor restricción con respecto a los índices de citotoxicidad ejercida a PK (15) PCV⁺ (Figura 16). Esta posibilidad podría atribuirse a la mayor frecuencia de formas alélicas HLA-DR que no presentaron diferencias en los niveles de intensidad citotóxica (Fig. 16-A, panel superior). Las células humanas que expresan los alelos HLA-DR5, DR11, DR12, y DR14 no mostraron diferencias tangibles en los niveles de citotoxicidad hacia PK (15)

infectada o no por PCV-1. Este comportamiento también fue observado con las formas alélicas HLA-DQ5, DQ7, y DQ9 (Fig. 16-B, panel inferior).

5.13 Las formas alélicas HLA correlacionan con los niveles de intensidad citotóxica contra PK (15)

Para establecer la tendencia de la actividad citotóxica alelo-específica dirigida a PK (15) PCV⁺, se correlacionaron las frecuencias alélicas HLA de clase I con los niveles de citotoxicidad observada contra las células blanco. La información en el cuadro 2 muestra que las formas alélicas A3, B12, B14, B16, B17, y B27 elucidada por el análisis categórico de las variables fueron significativamente diferentes con relación a los niveles de citotoxicidad ($P < 0.05$). En los 77 experimentos realizados, 7 de las 11 formas alélicas HLA-A estudiadas presentaron índices de citotoxicidad menores al 9.8% (intensidad citotóxica baja), 11 alelos entre 9.9% a 24.6% (intensidad media), y 7 mayores de 24.7% (intensidad alta). Con respecto a la expresión de los alelos HLA-B, 9 de las 15 especificidades serológicas se observaron con niveles bajos de citotoxicidad, 13 con niveles medios, y 8 con mayores intensidades citotóxicas. Estos resultados sugieren cierta relación de dependencia entre las frecuencias de las especificidades HLA de clase I con los niveles de citotoxicidad a PK (15) PCV⁺. Cuando analizamos la tendencia de la actividad citotóxica y la frecuencia de las formas alélicas HLA de clase I, los resultados demostraron con mayor exactitud que la expresión de los alelos HLA-A10, HLA-B12, y HLA-B27 observan correlación con los niveles inferiores al 24.7% de citotoxicidad (A10, r de Spearman = -0.24, $P < 0.03$; B12, $r = -0.31$, $P < 0.01$; y, B27, $r = -0.31$, $P < 0.007$). Inclusive, la forma alélica HLA-B14 que correlaciona con niveles menores a 9.8% ($r = -0.3$, $P < 0.01$). En contraste, la expresión de las formas alélicas HLA-B16 y HLA-B17 que correlacionan con intensidades de citotoxicidad superiores al 24.7% ($r = 0.44$ y 0.41 , respectivamente. $P < 0.001$).

Por otra parte, las especificidades serológicas HLA-DR3, DR6, DR7, DR15, DR17, DQ2, y DQ6 también fueron significativamente diferentes con relación a los niveles de citotoxicidad a PK (15) (Cuadro 3). Dos de los cuales correlacionaron con intensidades

superiores al 24.6% de citotoxicidad (DR2, $r = 0.23$, $P < 0.05$; DR17, $r = 0.45$, $P < 0.001$). Contrariamente, cuatro formas alélicas HLA-clase II correlacionaron con intensidades inferiores a 24.6% de citotoxicidad (DR3, DR11, DR12, y DQ6).

5.14 Reducción de los porcentajes de los linfocitos T humanos durante la función citotóxica

Una vez que las células humanas se recuperaron de los cultivos, los porcentajes de las células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, y CD56⁺ se determinaron por citometría de flujo mediante la expresión fenotípica de los marcadores de superficie celular descritos en la sección de anticuerpos. La participación de los subtipos celulares y la habilidad citotóxica de los linfocitos T humanos dirigida a la línea celular PK-15 infectada por PCV se muestran en el cuadro 4. Invariablemente, los porcentajes de las células que dirigen la respuesta citotóxica (linfocitos T y células asesinas naturales) fueron significativamente diferentes entre las células humanas infectadas o no por PCV ($P < 0.05$). Sin embargo, al contrastar los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ recuperados de los cultivos los resultados no demuestran diferencias estadísticas importantes. El aumento en los valores de dispersión observados con estas subseries sugieren cierta variabilidad biológica entre los participantes del estudio. Con relación a las células asesinas naturales se observaron incrementos significativos en las proporciones celulares (20.1% vs. 6.3%. $P < 0.05$).

5.15 Reducción de los porcentajes de los linfocitos T humanos con diferentes especificidades serológicas HLA de clase I-A

La relevancia de las formas alélicas individuales HLA-A en los porcentajes de linfocitos T CD4⁺, y CD8⁺ recuperados del cultivo son mostrados en el cuadro 5. A pesar de que todas las formas alélicas observaron reducción en los porcentajes de células T recuperadas del cultivo con PK (15) PCV⁺, se observaron diferencias substanciales en la proporción de linfocitos T cooperadores/citotóxicos con los alelos A3 y A11. La proporción de linfocitos T CD4⁺ se incrementó después de la infección con estas especificidades serológicas ($P < 0.05$). El incremento porcentual de ambos fue del orden

de 23.5% y 12%, respectivamente. Otros alelos HLA-A tales como el A1 y A9 mostraron reducción significativa en el porcentaje de células recuperadas ($P < 0.05$). Sin embargo, la proporción de linfocitos T CD8⁺ sólo se incrementó con la forma alélica HLA-A1 ($P < 0.05$). También se observó reducción en el porcentaje de linfocitos citotóxicos con las especificidades A9 y A11 ($P < 0.05$). Las diferencias en la proporción de linfocitos T CD4⁺ recuperados de los cultivos probablemente reflejen el reconocimiento primario y la magnitud de la respuesta citotóxica por la célula T CD8⁺ en contra de la infección por PCV-1 influenciada por las formas alélicas individuales HLA.

Por otra parte, la presencia de células T y la participación de los linfocitos B, y de las células asesinas naturales en las respuestas antivirales se muestran en el cuadro 6. Estos resultados sólo mostraron incremento del 49.1% en la cantidad de los linfocitos B recuperados del cultivo con restricción alélica A3, inclusive la proporción de células NK que observó un incremento 5 veces mayor con éste alelo. A pesar de la reducción en la proporción de linfocitos T CD4⁺ con la forma alélica A-1, se observó aumento en la cantidad de células B y NK recuperadas del cultivo. Con respecto a los porcentajes de linfocitos B con restricción A2, A9 y A11, se demostró una reducción estadísticamente significativa (15.7%, 34.5%, y 12.3%, respectivamente. $P < 0.05$). Independiente de la restricción alélica HLA-A observada en los experimentos, también se observaron incrementos en los porcentajes de células CD56⁺ fueron también observados ($P < 0.05$). El decremento en los porcentajes de linfocitos T y B con las restricciones A2 y A9 podrían estar relacionados a la carencia de la respuesta citotóxica dirigida a PK (15), independientemente de la actividad funcional ejercida por las células NK.

5.14 Modelo probabilístico de la participación de los linfocitos T humanos en la respuesta citotóxica a PK (15) PCV+.

Para establecer la participación de las subseries celulares humanas en la actividad citotóxica hacia los blancos antigénicos infectados por PCV-1 (cuadro 7), los resultados

mostraron que las células humanas con los fenotipos CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺ y CD56⁺, pero no las células T CD8⁺ juegan un papel preponderante en la actividad citotóxica. Los linfocitos T (fenotipo CD3⁺) tuvieron el mayor grado de asociación, siempre y cuando, las estimaciones de citotoxicidad sean mayores a 22.9% ($r^2 = 0.25$, $p < 0.001$). A pesar de la infección por PCV-1, la jerarquía de las células NK en la actividad citotóxica sobre PK (15) PCV⁺ continua siendo importante ($r^2 = 0.49$, $p < 0.0001$). Asimismo, las células con los fenotipos CD4⁺ y CD19⁺ mostraron relativa participación en la actividad citotóxica sobre PK (15) PCV⁺ ($r^2 = 0.11$, $p < 0.05$ y $r^2 = 0.21$, $p < 0.0006$, respectivamente).

Capítulo

VI

Discusión

VI. DISCUSIÓN

En los modelos experimentales *in vivo* existe reducida información a cerca de los eventos inmunológicos involucrados en la infección por PCV-1, debido principalmente a que la persistencia del virus y los prolongados tiempos de incubación observados en la línea celular PK (15) que no causan efecto citopático aparente. Sin embargo, la común ocurrencia de la infección por PCV-1 en las poblaciones porcinas, la demostración de los anticuerpos específicos en humanos, y la habilidad de la otra variante viral (PCV-2) para causar estadios de inmunosupresión sugieren la necesidad de evaluar el riesgo de infección por PCV-1 como un agente xenozoontico.

Mediante el ensayo colorimétrico de MTT se determinó la capacidad citotóxica de las células humanas sobre PK (15) PCV⁺. Aparentemente, los resultados de los experimentos de citotoxicidad y de las modificaciones técnicas de ellos proporcionan un gran potencial para la evaluación del efecto deletéreo de las células humanas en la capacidad de respuesta inmunológica antiviral. Se han usado varios ensayos experimentales para determinar la función citotóxica mediada por células,¹¹⁰ sin embargo estos métodos presentan muchas limitaciones para medir las interacciones célula efectora-célula blanco que deben persistir en los modelos de infección viral. Los ensayos con isótopos radioactivos pueden subestimar la lisis de las células efectoras debido a la retención intracelular del nivel radioactivo que después de la actividad funcional de las células se ejerce sobre los blancos marcados con Cr⁵¹. Además, estos ensayos muestran una liberación espontánea del nivel radioactivo por más del 50% después de 24h de incubación.¹¹¹

La determinación cuantitativa de la actividad citotóxica de las células humanas sobre PK (15) PCV⁺ están de acuerdo con los resultados obtenidos por van de Loosdrecht y colaboradores (1991),¹¹⁰ quienes han concluido que el ensayo de citotoxicidad con MTT puede utilizarse para la determinación cuantitativa de la actividad mitocondrial de las células blanco. Una marcada citotoxicidad sobre la línea PK (15) PCV⁻ y una reducción de la estimación de citotoxicidad a PK (15) PCV⁺ indican la capacidad de las células hu-

manas para lisar de diferente manera a esos blancos infectados y que observamos bajo condiciones adecuadas de laboratorio. Inicialmente, se consideró la posibilidad de que la reducción de los niveles de citotoxicidad sobre PK (15) infectada por PCV-1 fuera debido al potencial contagioso del virus en los linfocitos citotóxicos y en las células asesinas naturales humanas. Estas observaciones están de acuerdo a lo reportado para otros virus ADN en donde se ha demostrado la capacidad para infectar a los linfocitos humanos.¹¹²

Por otra parte, los modelos de patogenicidad *in vivo* han demostrado la generación y el mantenimiento de los linfocitos T citotóxicos virus-específicos cuando las proteínas virales se han sintetizado a péptidos en las células del hospedero siendo eficientemente presentadas por las moléculas MHC. Sin embargo, la cuantificación de la citotoxicidad sobre las células infectadas por virus son una de las respuestas inmunes más difíciles de inducir en los modelos celulares debido a la habilidad de algunos virus ADN para regular negativamente la expresión de las moléculas MHC de clase I y a la inducción de la apoptosis de los linfocitos T CD4⁺ que resulta en la preparación defectuosa de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺.^{113,114}

Durante las 72h de experimentación, las respuestas citotóxicas de las células humanas sobre PK (15) mostraron diferencias substanciales debido a la infección por PCV-1. Estos resultados sugieren que la actividad de los linfocitos citotóxicos puede ser crítica para el establecimiento de la patogénesis de la infección por PCV-1 en humanos. En los modelos de infección viral *in vivo*, se han demostrado la activación y la expansión, la muerte, y la estabilidad o memoria de las células T.¹¹⁵ En la fase inicial, que dura aproximadamente cerca de una semana existe la proliferación de las células T específicas al antígeno viral. Las respuestas inmunológicas mediadas por el linfocito T CD8⁺ se han observado en humanos durante la infección aguda por Epstein-Barr.¹¹⁶ La expansión clonal de los linfocitos (10⁴ a 10⁵) durante la infección indica que el “pico” de proliferación celular antígeno-específico puede dividirse en tiempos de 6 a 8h. En el modelo murino de la infección primaria por LCMV se ha demostrado que la inmunodo-

minancia de la respuesta citotóxica mediada por el linfocito T presenta aumentos diferenciales entre los epitopes virales. Estos incrementos son observados a partir de las 4h con el estímulo NP118-LCMV y a las 20h con GP34-LCMV.¹¹⁷

Subsecuentemente, se presenta un período de muerte linfocitaria, cuando las células T CD8⁺ activadas experimentan la apoptosis y la reducción de la actividad citotóxica, así como cuando la expresión del antígeno declina.¹¹⁸ Esta reducción de la respuesta de la célula T es tan dramática como la expansión, y en la mayoría de los casos, el 95% o más de las células T específicas al antígeno viral desaparecen. Este fenómeno, denominado muerte inducida por la activación de la célula (AICD), sirve como un mecanismo para regular la cantidad de células y la homeostasis que mantienen la memoria inmunológica. Se han implicado las interacciones de los ligandos (FasL, CD95)/Fas en la AICD, así como el papel del TNF α en la apoptosis de células T CD8⁺ activadas.¹¹⁹⁻¹²¹ Cabe señalar que, el incremento en las concentraciones de TNF α determinado en el sobrenadante de los cultivos con PK (15) PCV⁺ sugiere la muerte de los linfocitos T humanos inducida por la activación de PCV-1. La tercera fase en la respuesta de la célula T se caracteriza por una cantidad estándar de células de memoria que puede persistir por muchos años.^{115,122-124}

En el desafío continuo con los antígenos virales, las fases de actividad del linfocito T (expansión, apoptosis, y estabilidad) son observadas, aunque con acelerada cinesis.^{122,125} El grado de la respuesta antígeno-específica de la célula T CD8⁺ si bien favorece la destrucción del virus y la delección de la mayoría de las clonas aloreactivas presenta diferentes niveles de proliferación. Aparentemente, la alta sensibilidad por el antígeno NP118 de LCMV en las primeras 6h postinfección puede relacionarse al aumento progresivo de la carga viral, como también al incremento de la estimulación observada a las 20h en la respuesta al epitope GP34. Estos resultados pueden sugerir un incremento en el riesgo de extenuación de las células T CD8⁺ al inicio de la respuesta por una carga viral relativamente alta.¹¹⁷ Esta fisiopatología se observa en humanos durante la fase aguda de la infección primaria con aquellas entidades que replican sistemáticamente y



que expresan diferentes epitopes durante la replicación, tal como HIV, EBV, sarampión, y CMV.¹²⁶⁻¹³² Desde este punto de vista, la subserie T CD8⁺ es la principal responsable del mantenimiento de la citotoxicidad, y es conveniente focalizar los futuros estudios en las respuestas citotóxicas virus-específico de los humanos afectados por PCV-1. En nuestro estudio, el análisis de citometría de flujo mostró que las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ sufrieron de un cambio significativo en los conteos relativos de las células CD3⁺ y NK. Sin embargo, la participación de las células mononucleares y la habilidad citotóxica de los linfocitos T humanos sobre PK (15) infectada y no por PCV-1 no muestran que la proporción total de células T CD8⁺ sea significativamente diferente. Algunos de esos cambios en los animales afectados por PMWS se han descrito en otros reportes.^{18,19,98} En los cuales la reducción de las células T totales se relacionó con decremento de los linfocitos T CD4⁺.

La evaluación estadística de nuestros resultados no demostraron diferencias en las proporciones celulares CD4⁺, CD8⁺, y CD19⁺ recuperadas de PK (15) PCV⁺, o PK (15) PCV⁻, pero el aumento en los valores de dispersión observados con estas subseries celulares sugieren cierta variabilidad biológica entre los participantes del estudio. Los estudios histopatológicos realizados por Darwich y colaboradores (2002),¹⁶ han demostrado diferencias en la capacidades de respuesta inmune antiviral de los animales afectados por PMWS con signos clínicos de la enfermedad comparados con los cerdos PCV-2-, y con cerdos sanos. La linfopenia observada en los animales PCV-2⁺ fue particularmente el reflejo en la reducción de los linfocitos T CD8⁺. Los porcentajes de la subserie CD8⁺ observados en el grupo de animales PCV- fueron significativamente superiores a los determinados en los animales sanos. Estos resultados sugieren la habilidad de las distintas líneas genéticas porcinas para responder y controlar la infección viral. Además, la señal de marcaje en los timocitos CD3⁺ por el antígeno de PCV-2 y la afectación de los órganos linfoides incluyendo al timo en los animales eutanasiados conducen a interpretar que la infección por PCV afecta a las células T “naive” causando extensiva depleción de estas células circulantes. Las alteraciones pato-



neumónicas inducidas por la infección viral de los otros miembros de la familia *Circoviridae* en especies diferentes a la porcina muestran, de igual manera, la atrofia del timo y la correlación directa de la severa depleción linfocítica.¹³³

En nuestro estudio, el análisis citométrico también demostró que las células humanas sufrieron un ligero cambio en la proporción de linfocitos B recuperados de los cultivos con PK (15) PCV⁺. En consecuencia, estos resultados pueden sugerir que las células B sean menos afectadas por la infección de PCV-1. El análisis comparativo de las formas HLA-A mostró tres diferentes grupos alélicos que redujeron las proporciones de linfocitos B (HLA-A2, A9, y A11). Solamente con la expresión de las moléculas HLA-A9 se demostraron diferencias significativas con respecto a los controles ($P < 0.05$). Los cambios en el porcentaje de células IgM⁺ de las células mononucleares de cerdos infectados por PCV-2 se han descrito por otros investigadores.^{18,19} La alta tasa de replicación viral y la severidad de las lesiones en el tejido linfoide en los animales sugieren que el decremento de los linfocitos B se debe al efecto apoptótico del virus sobre éstas estirpes celulares.

Con respecto a las células NK humanas, nuestros resultados mostraron incrementos significativos en las proporciones celulares recuperadas de los cultivos con PK (15) PCV⁺. La proporción de células asesinas naturales recuperadas de los cultivos infectados fue 3 veces mayor que los porcentajes observados con PK (15) PCV⁻. Estos resultados sugieren el compromiso en la respuesta inmunológica anti-PCV-1 y la actividad citotóxica de las células NK sobre PK (15). El delicado balance entre los receptores inhibitorios expresados por éstas células y los posibles ligandos presentes en la superficie de PK (15) podrían estar relacionados con la espontánea actividad citotóxica y el mantenimiento de las proporciones celulares por 72h. Normalmente, el receptor inhibitorio hace caso omiso de la señal de activación al reconocer a la molécula MHC de clase I expresada en todas las células nucleadas. Sin embargo, si no proporciona la señal inhibitoria a la célula NK por la carencia o el defecto en la expresión de la molécula de clase I, la señal de activación no inhibida puede resultar en la destrucción de la célula



blanco. Consecuentemente, las señales mediadas por los receptores inician en la célula efectora el proceso de lisis, el cual se desarrolla por la actividad de las porfirinas que forman poros en la membrana de las células blanco seguida por un influjo de granzimas citotóxicas.¹³⁴

Aunque se han determinado algunas asociaciones entre los genes HLA y la capacidad de respuesta humoral y celular a diversos antígenos virales, vacunales y de infección natural,¹³⁵⁻¹⁴⁰ es escasa la información disponible a cerca del papel del polimorfismo HLA alelo específico a muchas infecciones virales. Nosotros encontramos diferencias en la capacidad citotóxica de las células humanas que expresaron los MHC de clase I (HLA-A1, A2, A3, A9, A11, B5, B7, B27, B35, y B40), y clase II (HLA-DR1, DR3, DR4, DR6, DR7, DR8, DR12, DQ1, DQ2, DQ4, DQ5, y DQ8). El polimorfismo HLA reveló que 10 de 26 variantes alélicas de clase I, así como 12 de 23 de las variantes alélicas de clase II mostraron reducción significativa de los índices de citotoxicidad a PK (15) PCV-1. Asimismo, la no diferencia en las estimaciones de citotoxicidad determinadas a PK (15) PCV⁺ o PCV⁻ mediado por las células humanas con las restricciones HLA-A28, B16, DR5, DR11, DR14, DR15, DQ7, DQ9 sugieren menores efectos adversos en los mecanismos de la respuesta inmunológica inducidos por la infección con PCV-1. Además, se confirma el hecho de que las moléculas DR y DQ son los principales determinantes de restricción para los linfocitos T CD4⁺ en una favorable respuesta citotóxica a PCV-1. Numerosos son los estudios que han examinado la respuesta linfoproliferativa y el efecto del MHC en la inmunidad antiviral. Las respuestas de los linfocitos T con restricción DR4 y DR9 a los antígenos totales de rubeola han sido reportados,¹³⁷ y también se han demostrado con restricción DR3 y DR4 al péptido E1.¹³⁸

Para establecer la infección, los virus deben vencer la respuesta antiviral provista por el sistema de los interferones (INFs). Los INFs son proteínas secretorias que regulan el crecimiento celular y modulan la activación de las respuestas inmunológicas antivirales.¹⁴¹ La reducida habilidad para producir las citocinas del tipo 1 por los linfocitos



tos T CD4⁺ y CD8⁺ infectados por PCV-1, y la revertida capacidad para producir INF γ o IL-2 como resultado de la re-estimulación con PMA-Ionomicina observados en los experimentos pueden reflejar un cambio al patrón de activación Th2 u otro fenotipo tolerante. Es posible que la no expresión de INF γ intracelular inducido por la infección por PCV-1 sea debido al bloqueo de la proteína cinasa R en la ruta de transducción. De igual manera, Darwich y colaboradores,¹⁴² demostraron que el desequilibrio colectivo de las citocinas INF γ e IL-2, y de IL-4, IL-10 y IL-12 en los nódulos linfáticos de animales afectados por PMWS asociados con los desórdenes hematológicos e histopatológicos observados en estos cerdos indicaron un estado de inmunosupresión de la célula T dañando profundamente al sistema inmunológico antiviral.

Cuando nosotros examinamos la expresión de las citocinas inflamatorias y de la respuesta inmunológica los resultados mostraron marcada reducción de las concentraciones de INF γ , y de IL-2 e IL-12 en el sobrenadante de los cultivos con PK (15) PCV⁺. Los efectos de éstas disminuciones sugieren la inhibición del principal mecanismo inmune antiviral en respuesta al reconocimiento de las células infectadas con PCV-1 por los linfocitos T y las células asesinas naturales. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por Goodbourn y colaboradores (2000)¹⁴³ quienes analizaron la actividad de los linfocitos citotóxicos durante la infección con otros virus ADN. Asimismo, la reducción de las citocinas involucradas en el patrón Th2, tales como: IL-4, e IL-6 sugieren alteración en la proliferación de las células CD19⁺ y defecto en el proceso de diferenciación a células productoras de anticuerpos bajo el control de éstas citocinas por los linfocitos T y de los monocitos activados. Además, estos hallazgos pueden sugerir una inhibición de la activación transcripcional para la producción de inmunoglobulinas tipo secretorias a nivel de ARN mensajero. La presencia de IL-6 en los cultivos se ha asociado con la activación de los linfocitos B, pero no con las células B en reposo, se induce la producción de anticuerpos en líneas de células B transformadas por el virus EBV.¹⁴⁴ Inclusive, se ha demostrado la función de la IL-6 durante la fase tardía de la estimulación de linfocitos B normales,¹⁴⁵ o de las células leucémicas induci-

endo la producción de inmunoglobulinas cuando otras citocinas tales como IL-2 están disponibles.¹⁴⁶

Al examinar la actividad inflamatoria y la regulación de la misma en los sobrenadantes de los cultivos, nosotros determinamos incrementos de TNF- α cuando las células humanas estuvieron expuestas a PK (15) PCV⁺ y reducción significativa en la concentración de IL-10. Estos resultados sugieren alteración de la actividad anti-inflamatoria en la infección humana por PCV-1. Contrariamente, Darwich y colaboradores,¹⁴² demostraron incrementos substanciales en la expresión de IL-10 en el timo de los animales infectados por PCV-2. La depleción linfocítica y el incremento en la expresión de IL-10 correlacionaron con la destrucción del tejido linfoide indicando el compromiso de la actividad anti-inflamatoria, y de la regulación en la cantidad de linfocitos presentes en el tejido.

El objetivo principal de los virus es su perpetuación en el genoma de la célula anfitriona con la subsecuente producción de la progenie infecciosa. Durante ésta interacción, importantes cambios morfológicos son observados en las células de los nuevos hospederos. Los resultados de este estudio demuestran que el PCV-1 tiene la capacidad de modificar ultraestructuralmente a los leucocitos humanos *in vitro* y ésta alteración posiblemente contribuyó a la reducción de la actividad citotóxica de los linfocitos T y de las células NK sobre PK (15) PCV⁺. Después de la exposición a la infección, las células mononucleares humanas presentaron niveles considerables de partículas virales y cambios citopáticos aparentes. La morfogénesis viral del PCV en leucocitos y monocitos humanos fue esencialmente diferente. Los linfocitos T desarrollaron una lesión en forma de “boomerang” intracitoplásmico que es una característica de las células infectadas por ciertos virus. Los cambios morfológicos y la presencia de inclusiones intracitoplásmicas de forma irregular se han observado en las infecciones por poxvirus, paramyxovirus, reovirus y rhabdovirus.^{112,147} Estas inclusiones son el producto de los componentes estructurales de la síntesis viral con acumulaciones de proteína y ácidos nucleicos.¹⁴⁸

Además, las secciones celulares observadas en los linfocitos T infectados mostraron formas virales dentro de invaginaciones citoplásmicas que emergieron de la membrana plasmática hacia la periferia del núcleo. En una amplia variedad de tipos celulares se han observado invaginaciones que están involucradas en el movimiento de moléculas de un lado a otro de la célula. Matveev y cols. (2001)¹⁴⁹ describieron la habilidad de algunas vesículas pequeñas para mediar el transporte molecular de patógenos intracelulares que directamente impactan en una variedad de procesos fisiopatológicos. Una variedad de agentes causales, incluyendo virus y bacterias intracelulares pueden penetrar a las células hospederas por la vía caveola/rafts.^{150,151} Recientemente, Stuart y cols. (2003)¹⁵² reportaron que *Chlamydia trachomatis* penetra a la célula anfitriona por la vía de estos microdominios lipídicos presentes en la membrana celular. Estas balsas o “rafts” son formadas en la membrana por empacamiento de esfingolípidos y colesterol moviéndose a través de la zona fluída de la bicapa membranal.¹⁵³ Los dominios lipídicos de algunas estirpes celulares observan invaginaciones no cubiertas por clatrina definidas morfológicamente como caveolas, y estas están constituidas por colesterol, esfingomielina, glicoesfingolípidos, triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfatidilcolina, fosfoinositida, ceramida, caveolina 1, y caveolina 2.^{154,155} Diferencias en la estructura de las vacuolas citoplásmicas y las caveolas han sido determinadas. Sin embargo, las funciones de la caveola/rafts no son completamente claras, aunque éstas han sido implicadas en el sorteo y tráfico de vacuolas a través de la ruta endocítica, y en la organización de las rutas de señalización.

Independientemente, los hallazgos morfológicos ultraestructurales de este estudio sugieren que el ciclo de invasión del PCV-1 al núcleo de las células T humanas puede ser dividido en dos fases. En una primera fase, los viriones infectantes posiblemente interactúan con las células susceptibles a través del reconocimiento de un receptor de superficie presente en un sitio específico y de su internalización al citoplasma, aunque la potocitosis por vesículas no cubiertas también ha sido descrita como una ruta de asalto para algunos virus DNA. La internalización de los viriones seguida de la unión inicial no ha sido bien caracterizada, excepto para el SV40.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸



SV40 penetra a partir de caveolas, las cuales residen en regiones especializadas de la membrana plasmática pudiendo formar invaginaciones de conformación destellante con diámetros que varían entre 50 a 100 nm observando en su interior una estructura de composición lipídica unida a la proteína caveolina.^{159, 160} En la segunda fase o de asalto al DNA nuclear, la internalización mediada por caveolas requiere de la red de actina que deberá estar intacta en la célula infectada.¹⁶¹

Un importante determinante en la dispersión viral es la habilidad del PCV para replicarse y/o sobrevivir en los monocitos. En este trabajo los monocitos mostraron partículas virales predominantemente dentro de los compartimentos citoplásmicos tales como vacuolas, lisosomas y en los elementos estructurales del sistema Golgi. Estas secciones celulares revelaron partículas virales maduras y ocasionalmente inmaduras dentro del sistema vacuolar. Las vacuolas estuvieron distribuidas en el citoplasma desde la zona central a la perinuclear conteniendo generalmente pocas partículas. Como es el caso de la infección por HIV, los macrófagos infectados por PCV pueden servir como "caballos de Troya" capaces de transportar y producir viriones. En ausencia de una total actividad de replicación viral en los macrófagos, la expresión intracitoplásmica del PCV podría oscurecer la vigilancia inmunológica humana en un potencial xenotransplante.¹⁶²

Para mejorar la multiplicación del PCV en nuestros cultivos celulares, que por lo general es baja debido a la mínima maduración viral o porque la mayoría de los viriones tienen una morfología aberrante, nosotros comparamos la condición ultraestructural y fisiológica de las células PK (15) PCV⁺ antes y después del tratamiento con glucosamina. No encontramos diferencias en la composición de los organelos. Sin embargo, se advirtió una mayor cantidad de mitocondrias en actividad y de polisomas. La principal alteración distintiva en la línea celular PK (15) PCV⁺ fue el decremento en la tasa de incorporación de timidina tritiada en los cultivos después del tratamiento con glucosamina (datos no mostrados), aunque la recuperación total del cultivo se reestableció por la incubación de las células con medios frescos y reconstituidos con nuevas células.





Aparentemente, el cumplimiento del ciclo de replicación del PCV-1 en los linfocitos humanos requirió de la maquinaria de replicación durante la proliferación de la célula intacta. En el ciclo celular, estos factores se observan frecuentemente y son funcionalmente activos en las células en proliferación. El marcaje intranuclear de la secuencia de PCV-1 y el nivel de expresión de los transcritos que mostraron un producto de 375 pares de base en las células CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺ y CD56⁺ sugieren la infección viral de los linfocitos humanos, pero no el resultado de una reacción de espectador al estar expuestos a PK (15) PCV⁺. De igual manera, Tischer y cols. (1987)¹⁶³ mostraron que la replicación del PCV-1 se mejoró después del tratamiento de PK (15) PCV⁺ con *d*-glucosamina, teniendo como resultado un aumento de hasta 30% en el número de células que expresaron los antígenos de PCV, siempre y cuando, el pretratamiento con glucosamina sea aplicado antes de que las células alcancen la fase S del crecimiento celular. Estos hallazgos sugirieron que el genoma del PCV forma parte de este proceso lo que facilitó el comienzo de la replicación de su propio DNA.

En nuestro estudio, los cultivos celulares PK (15) infectados con PCV liberaron distintos tipos de partículas virales. Aunque los viriones son las partículas virales infecciosas, estos no son los únicos productos de la replicación del PCV. Se observaron las partículas virales carentes de genoma viral, pero conteniendo todas las proteínas tegumentarias en las células humanas. La presencia de cápsides envueltas aunque vacías (L particle) se observaron en la infección por herpes simplex tipo 1 (HSV-1),¹⁶⁴ pero estudios subsecuentes también demostraron que partículas análogas a esas producidas por HSV-1 son identificables en cultivos infectados con herpesvirus equino 1, virus de Aujeszkie, herpesvirus bovino tipo 1, virus varicella zoster, HSV-2, y el herpesvirus de las gallinaceas tipo 1.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ La principal significancia biológica entre estos virus, es el hecho de que las partículas L aparentemente actúan de manera similar a los viriones con respecto a los procesos de unión, fusión, y liberación de proteínas tegumentarias funcionales dentro del citoplasma de las células infectadas.¹⁶⁹ La demostración en la producción de partículas virales infecciosas o no infecciosas durante la infección de célula



las humanas *in vitro* por PCV-1 fue evidente en nuestros experimentos.

La vigilancia de los receptores de órganos porcinos deberá continuar por toda la vida del paciente humano o tan larga como la biotecnología lo permita, a menos que la capacidad infecciosa del PCV-1 justifique la duración limitada de este seguimiento. Los sistemas de monitoreo en el xenotransplante deberán contemplar las características propias del paciente humano y del animal conocidos, así como de los patógenos propios de los cerdos, incluyendo la condición evolutiva de la infección por PCV-1. Asimismo, las compañías fabricantes de animales, tejidos y células, y los grupos médicos dedicados al xenotransplante deberán presentar sistemas rigurosos de control sanitario para probar las posibles infecciones en los receptores, así como también la de sus contactos para prevenir en ambos un riesgo potencial a la salud pública.

Capítulo

VII

Conclusiones



VII. CONCLUSIONES.

Las células mononucleares humanas que estuvieron expuestas a la línea celular PK (15) PCV-1 presentaron reducción significativa de la actividad citotóxica en contraste con los leucocitos que estuvieron presentes en los cultivos de PK (15) no infectada.

El análisis citométrico de las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ mostró modestos incrementos en la expresión de CD69 en las subseries CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, y CD56⁺ a las 9h post-estímulo. Sin embargo, los leucocitos infectados por PCV-1 observaron reducción significativa en la proporción de células CD25⁺.

Se presentó una marcada reducción de las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ e incremento de TNF- α en los cultivos con PK (15) PCV⁺.

Los estudios moleculares en las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ permitieron determinar el nivel de la expresión de los transcritos de PCV-1, así como de la hibridación del ADN genómico humano por el ácido nucleico del PCV-1 en la forma siguiente:

- a) La expresión de los transcritos de PCV-1 aparecieron en el ADN extraído de las células humanas CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺, y CD56⁺. La intensidad de los productos demostró la capacidad del circovirus porcino tipo 1 para replicarse en las células del sistema inmunológico humano.
- b) La hibridación fluorescente *in situ* del ADN genómico humano por el ácido nucleico del PCV-1 se detectó en el núcleo de células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ sugiriendo la invasión del ADN humano durante las fases de proliferación y destrucción de PK (15) PCV⁺.



La estimulación primaria de las células humanas por el reto antigénico de PK (15) PCV⁺ mostró óptima respuesta proliferativa (de 10 a 70 veces mayor que las células humanas en reposo) con los haplotipos HLA-A3, A9, B35, B40, DR3, DR11, DQ2, DQ4; HLA-A2, A9, B5, B40, DR3, DR11, DQ2, DQ4; y HLA-A1, A2, B7, B35, DR7, DR12, DQ8.

El deterioro de la respuesta inmunológica antiviral con relación a la habilidad de sintetizar INF- γ e IL-2 se observó en las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺. Sin embargo, las células presentaron el efecto refractario al ser post-tratadas con PMA-Ionomicina.

El estudio ultraestructural permitió establecer la alteración morfológica de los linfocitos T y de los monocitos humanos expuestos a PK (15) PCV⁺ en la forma siguiente:

- a) En los linfocitos T, las inclusiones intracitoplásmicas inducidas por la infección de PCV-1 aparecen como una estructura en forma de “boomerang”.
- b) Las nucleocápsides aparecen libres cercanas al núcleo o contenidas en caveolas. La presencia de estos organelos vacuolados pudieron facilitar el transporte de las partículas virales en el asalto final del núcleo.
- c) Las partículas maduras carecen de tegumento electro-denso entre su nucleocápside y la capa exterior. Un número considerable de partículas maduras se observan asociadas con células sanas con membrana nuclear totalmente intacta sin alteración en la disposición de la cromatina, lo anterior es análogo a lo determinado con algunos lentivirus animales.
- d) Potencialmente, los circovirus infectantes pueden interactuar con las células humanas susceptibles a partir del reconocimiento de receptores de superficie y de su internalización en el citoplasma.



f) Las partículas víricas se fagocitan por los monocitos sin que parentemente se observe dañado el núcleo y los compartimientos intracitoplásmicos.

g) Aparentemente, los sitios de ensamble de la progenie viral en los monocitos infectados se determinaron en los elementos estructurales del sistema Golgi.

h) Los monocitos expuestos a PK (15) PCV⁻ aparecen con un severo número de vacuolas, lisosomas, cuerpos mielínicos y mitocondrias. Estas observaciones demostraron las condiciones celulares de total activación humana.

Se determinó reducción de la actividad citotóxica de las células humanas con las restricciones HLA de clase I-A1, A2, A3, A9, A10, A11, B5, B7, B27, B35, y B40, así como de clase II-DR1, DR3, DR4, DR6, DR7, DR8, DR12, DQ1, DQ2, DQ4, DQ5, y DQ8, pero no con las formas alélicas A28, y B16, DR5, DR11, DR14, DR15, DQ7, y DQ9.

Asimismo, las formas alélicas HLA-A10, B12, B27, y DR3, DR11, D12 y DQ6 correlacionan fuertemente con los niveles de citotoxicidad menores al 24.6%. Sin embargo, los alelos HLA-B16, B17, DR2, DR17 se asociaron significativamente con las intensidades de citotoxicidad por arriba de 24.7%.

El modelo probabilístico mostró la participación de las células humanas CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, CD56⁺ durante la actividad citotóxica a PK (15) PCV⁺ por arriba del 22.9%. Sin embargo, las células con el fenotipo CD8⁺ no mostraron cambios significativos en las proporciones celulares.



Capítulo

VIII

Perspectivas

VIII. PERSPECTIVAS.

Con base en las alteraciones ultraestructurales observadas en los linfocitos T humanos, inicialmente se sugiere demostrar la interacción del PCV-1 con las células humanas susceptibles a partir de la identificación de los receptores específicos (glicosaminoglicanos) expresados en la membrana plasmática de las células infectadas y de su internalización a través de caveolas en el citoplasma (caveolinas 1 y 2). Asimismo, definir el aumento en la actividad de las proteínas de fusión y del suministro de partículas virales unidas a la membrana plasmática a fin de demostrar que la infección por PCV-1 causa una rápida fusión celular de los linfocitos T humanos.

Un aspecto importante en la fisiopatología de la infección por PCV-1 puede ser la dispersión y la habilidad para replicarse y/o sobrevivir en los monocitos. Se sugiere evaluar si la presencia de las partículas virales maduras y ocasionalmente las inmaduras obtenidas de nuestros cultivos tienen la capacidad re infectante al ser expuestos nuevamente a las células susceptibles.

Los monocitos mostraron partículas virales predominantemente dentro de las vacuolas, lisosomas y en los elementos estructurales del sistema Golgi. Ocasionalmente, estas secciones celulares revelaron partículas virales maduras y inmaduras dentro del sistema vacuolar. Como es el caso de la infección por HIV, el linaje monocito-macrófago infectado por PCV-1 pueden servir como "caballos de Troya" capaces de transportar y producir viriones. Se sugiere la evaluación de las propiedades funcionales de los monocitos infectados por PCV-1 tales como: 1) fagocitosis y actividad microbicida, 2) receptores de complemento y de la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas, 3) expresión de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I y II, y 4) de la estimulación de los linfocitos en un sistema carente de monocitos para demostrar si la disfunción de estas células podría oscurecer la vigilancia inmunológica humana.

El efecto de la infección por PCV-1 en los monocitos humanos y la habilidad para modificar la estructura de los linfocitos humanos sugiere la determinación cinética de la tasa de replicación viral en las subseries CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺, y CD56⁺.

Durante la actividad citotóxica a PK (15) PCV⁺ no se observó la participación activa de las células humanas con fenotipo CD8⁺. Se sugiere explorar la actividad funcional de ésta subserie celular con relación a la capacidad de producir perforinas y granzimas que faciliten la destrucción de los blancos infectados por PCV-1.

Para establecer la infección humana, el PCV-1 debió vencer la respuesta inmunológica antiviral que es provista por el sistema de interferones. Se sugiere demostrar si la carente expresión de INF- γ intracelular en los linfocitos humanos fue debida a la inhibición de la proteína cinasa R en la ruta de señalización. Asimismo, demostrar si el desequilibrio colectivo de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, y IL-12 observadas en la infección por PCV-1 se deben a la alteración de alguno de los elementos del control transcripcional tales como: el sitio de unión a la proteína activadora 1 (AP-1), al c-fos elemento responsable sérico (SER), al c-fos elemento homólogo en el control del retinoblastoma, al AMPc o a un sitio de unión de NF κ B que se ha identificado en los promotores de algunas citocinas.

La identificación de los antígenos virales a través de las especificidades alélicas HLA-B16, B17, DR2, DR7, DR15, DR17, y DQ2 eventualmente podrían utilizarse para desarrollar nuevas vacunas basadas en péptidos en contra de infecciones virales, incluyendo la producida por PCV-1. Asimismo, la caracterización de los péptidos virales a partir de las especificidades HLA-A10, B12, B14, B27, DR3, DR11, DR12, DQ6 serían utilizados para desarrollar inmunógenos que induzcan la reducción de la actividad inmunológica en algunas personas principalmente los que sufran procesos de autoinmunidad.

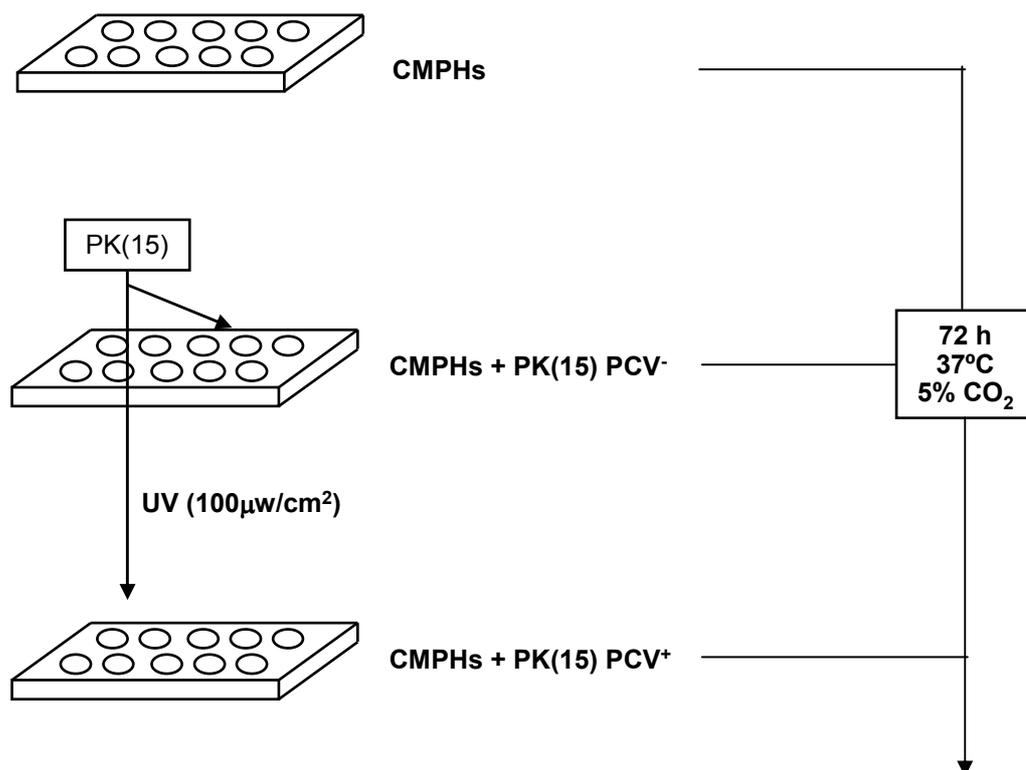
Capítulo

IX

Apéndices

APENDICE-I

Modelo celular para determinar la infección viral por PCV-1 en las células mononucleares humanas expuestas a PK (15) PCV⁺

**Experimentos:**

1. Separación de las células por citometría de flujo para microscopía electrónica de transmisión, PCR y FISH
2. Citotoxicidad, y proliferación.
3. Determinación de los fenotipos celulares, expresión de las moléculas de activadoras, citocinas intracelulares, y de las citocinas en el sobrenadante.

APENDICE-II

Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica

1. Se toma la muestra de sangre por punción de la vena del antebrazo utilizando tubos con heparina de sodio (1000 UI/mL).
2. Se colectan 12mL de sangre diluyendo la muestra volumen/volumen con solución Hanks normal al 1x (ver preparación de reactivos).
3. En 3 tubos de plástico estériles de 12 x 75 mm, se adicionan 3mL de solución de Ficoll-hypaque (Ficoll al 9% en agua destilada para 12 partes, y Hypaque al 34% en agua destilada para 5 partes) distribuyendo 8mL de la sangre diluida a cada tubo de plástico.
4. Se estratifica cuidadosamente la sangre diluida sobre la solución de Ficoll-hypaque.
5. Se centrifuga la muestra a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Se aspiran las células mononucleares que forman un anillo de color blanco sobre la interfase con una pipeta Pasteur colocando en otros tubos estériles.
7. Centrifugar el paquete resuspendido en solución Hanks normal a 900 rpm durante 10 minutos, decantando el sobrenadante.
8. Las células son lavadas con solución RPMI-1640 por una ocasión centrifugando a 1500 rpm durante 15 minutos.
9. Se verifica la viabilidad celular empleando una cámara Neubauer, cuantificando y ajustando la cantidad de células requeridas para los experimentos usando medio RPMI-1640.

APENDICE-III

TEXTO DECLARATORIO, CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO _____

(Nombre del participante o de su representante legal) declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el protocolo. Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación. Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho. En el caso que yo decida retirarlo, deberán seguir las siguientes indicaciones: Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice. Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D. F. a _____ de _____ del 200_.

NOMBRE

FIRMA

INVESTIGADOR

TESTIGO

TESTIGO

APENDICE-IV

TINCION de DOBLE FLUORESCENCIA de LINFOCITOS por CITOMETRÍA de FLUJO.

A partir de los experimentos:

1. Recolectar las células humanas expuestas a PK (15) PCV⁺ en tubos Eppendorf estériles ajustando una concentración de 2×10^6 /mL en medio RPMI-1640.
2. Mezclar un volumen de 30µL del medio RPMI-1640 con células, y 7.5µL de cada uno de los anticuerpos monoclonales (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD45⁺, y CD56⁺).

Para determinar la expresión de los marcadores de activación temprana y tardía de los linfocitos expuestos a PK (15) PCV⁺, las células humanas se tiñeron simultáneamente con los anticuerpos monoclonales para los marcadores CD25⁺, CD69⁺, CD71⁺, y HLA-DR⁺.

NOTA: Se obtuvieron buenos resultados utilizando hasta 3.5 µL del anticuerpo monoclonal.

Resuspender e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

3. Agregar 1mL de solución de lavado (PBS al 1x adicionado con 0.01% de azida de sodio).

Centrifugar a 500 xg por 10 minutos a temperatura ambiente.

Resuspender el botón celular en el volúmen residual.

4. Agregar la solución fijadora (se adicionaron 500µL de una solución de PBS al 1x con 0.5% de paraformaldehído).

5. Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo utilizando un citómetro Coulter Altra (Beckman Coulter. Brea, CA. EUA) equipado con láseres de argón y helio-neón. Perlas fluorescentes de diez micrómetros fueron usadas para alinear los láseres y para estandarizar el umbral en la emisión de luz delantera dispersa (Forward Light Scatter, FLS) previo a la lectura de las células en cada sesión de análisis. El citómetro de flujo se limpió con 10% de hipoclorito comercial (decolorante casero) por 5 minutos entre las muestras, para prevenir la contaminación cruzada de las células. La fluorescencia específica de FITC, PE, y PCY-5 a 488 nm, así como también de las señales de FLS y de la luminosidad ortogonal dispersa (Orthogonal Light Scatter, SSC), fueron usadas para establecer las ventanas de análisis. Se realizaron experimentos por triplicado para cada sujeto y los eventos positivos se definieron como la fluorescencia que excedió al 99% de los eventos comparados con el control de isotipo.

TINCION INTRACELULAR de LINFOCITOS por CITOMETRÍA DE FLUJO.

1. Realizar los pasos 1 y 2 de la tinción doble de linfocitos.
2. Agregar la solución fijadora.

Soluciones fijadoras utilizables:

FACS lysing solution (FLS) al 1x. Se agregan 2 mL por cada mezcla.

Agitar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Agregar 1 mL de solución amortiguadora de lavado (PBA) a cada tubo.

Centrifugar por 5 minutos a 500 xg decantando el sobrenadante, y conservando volumen mínimo residual.

4. Agregar la solución permeabilizadora.

Estas pueden ser:

FACS permeabilizing solution (FPS) al 1x. Se agregan 2 mL por cada mezcla.

DAKO solución B 100µL o inclusive entre 25µL a 50µL dependiendo del volumen residual.

Agitar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Agregar 2 a 3 mL de la solución de lavado resuspendiendo el volumen total.

Centrifugar a 500 xg por 5 minutos, decantando el sobrenadante.

5. Agregar 10µL del anticuerpo que detecta la síntesis intracelular de la proteína (citocinas).

Agitar e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Agregar de 2mL a 3 mL de la solución de lavado.

Centrifugar a 500 xg por 10 minutos, decantando el sobrenadante.

Resuspender el “botón” celular en 500µL de PBA.

6. Realizar la evaluación citométrica o en su defecto almacenar a 4°C en oscuridad hasta por 12 h.

SOLUCIONES Y COLORANTES

- SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS pH 7.2 (PBS)

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio 12 H ₂ O	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar las cantidades indicadas anteriormente y disolver en pequeñas porciones de agua destilada hasta la total disolución. Llevar a un volumen final de 1 lt ajustando el pH a 7.2 con solución de HCl 0.01 M, o en su caso NaOH 0.01 M.

- SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA DE HANKS al 10x

NaHCO ₃	3.5g
--------------------	------

Disolver en 250 mL de agua destilada distribuyendo el medio en frascos de 50 mL. Esterilizar a 15 lb/pulg²

- COLORANTE AZUL DE TRIPANO AL 0.4%.

Formula para 100mL	
Azul tripano	0.4 g
Solución salina fisiológica	100 mL

TÉCNICA:

La medición de la viabilidad celular con azul tripano se basa en la exclusión del colorante dependiendo de la integridad de la membrana celular. Se mezcla un volumen de 90µL de azul de tripano y 10µL del medio con células. Colocar 10µL de la mezcla entre el porta y la cámara de Neubauer. Cuantificar en el microscopio la cantidad de células muertas (teñidas) y las viables (no teñidas).

MEDIOS DE CULTIVO CELULARES

Medio Mínimo Esencial (MEM) con base de sales Earle al 95 %, Piruvato de Sodio y adicionado con 10 % de suero fetal bovino utilizado en los cultivos de mantenimiento de las células PK (15).

Medio RPMI-1640 con base de sales Earle al 90 % y adicionado con 10 % de suero fetal bovino para el mantenimiento de las células mononucleares humanas.

Capítulo

X

Referencias

X. REFERENCIAS

1. Paradis K, Langford G, Long Z, et al. The XEN 111 Study Group, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 1999; 285:1236-41.
2. Buckley AA. Clinical realities of xenotransplantation and cell therapy. *Drug and Market Development* 1999; 10: 136.
3. Avery RK. Recipient screening prior to solid-organ transplantation. *CID* 2002; 35: 1513-9.
4. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3: 282-6.
5. Clark DA, Fryer JFL, Tucker AW, et al. Porcine cytomegalovirus in pigs being bred for xenograft organs: progress towards control. *Xenotransplantation* 2003; 10: 142-8.
6. van Der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, et al. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000; 407: 90-4.
7. Denner J. Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann New York Acad Sc* 1998; 862: 75-86.
8. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-51.
9. Michaels MG, Jenkins FJ, St George K, et al. Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation. *J Virol* 2001; 75: 2825-31.
10. Tischer I, Bode L, Apodaca J, et al. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice and cattle. *Arch Virol* 1995; 140: 1427-39.
11. Allan GM, McNeilly F, McNair I, et al. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol* 2000; 145: 853-7.
12. Rodríguez-Arrijoja GM, Segalés J, Balasch M, et al. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Rec* 2000; 146: 762-4.
13. Segalés J. and Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Quarterly* 2002; 24: 109-24.
14. Rodríguez-Arrijoja GM, Segalés J, Calsamiglia M, et al. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 2002; 63: 354-7.

15. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, *et al.* Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999; 120: 59-78.
16. Darwich L, Segalés J, Domingo M and Mateu E. Changes in CD3(+), CD8 (+), CD4 (+), and Immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clinical Diag Lab Immunol* 2002; 9: 236-42.
17. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, *et al.* Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of convention with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine circovirus. *J Comp Pathol* 2000; 122: 9-24.
18. Segalés J, Alonso F, Rosell C, *et al.* Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 81: 37-44.
19. Shibahara T, Kato K, Ishikawa Y and Kadota K. Porcine Circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 1125-31.
20. Ogden D, Sitprija V and Holmes J. Function on the baboon renal heterograft in man and comparison with renal homograft function. *J Lab Clin Med* 1965, 65 (3): 370-86.
21. Hardy JD, Chavez CM and Kurrus FD. Heart transplantation in man: Developmental studies and report of a case. *Jam Med Assoc* 1964, 188: 1132.
22. Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W and Jolley WB. Baboon to human cardiac xenotransplantation in a neotate. *J Am Med Assoc* 1985, 254: 3321-9.
23. Giles G, Boehmig H, Amemiya H, Halgrimson C and Starzl T. Clinical heterotransplantation of the liver. *Transplant Proc* 1970, 2 (4): 506-12.
24. Starzl ET, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris JA *et al.* Baboon to human liver transplantation. *Lancet* 1993, 341: 65-71.
25. Metcalfe S. Immunomodulation for transplantation tolerance. *Eye* 1995, 9: 192-5.
26. Widner MB and Bach FH. Allogeneic and xenogeneic response in mixed lymphocyte cultures. *J Exp Med* 1972, 135: 1204-8.
27. Lindahl KF and Bach FH. Human lymphocytes recognize mouse alloantigens. *Nature* 1975, 254: 607-9.

28. Lindahl KF and Bach FH. Genetic and cellular aspects of xenogeneic mixed leukocyte culture reaction. *J Exp Med* 1976, 144: 305-18.
29. Swain SL, Dutton RW, Scwab R and Yamamoto J. Xenogeneic human anti-mouse T cell responses are due to the activity of the same functional T cell subsets responsible for allospecific and major histocompatibility complex restricted responses. *J Exp Med* 1983, 157: 720-9.
30. Shishido S, Naziruddin B, Howard T, Mohanakumar T. Recognition of porcine major histocompatibility complex class I antigens by human CD8⁺ cytolytic T cell clones. *Transplant* 1997; 64: 340-6.
31. Shishido S, Naziruddin B, Xiao-Chun X, Howard T, Mohanakumar T. Indirect recognition of porcine xenoantigens by human CD4⁺ T cell clones. *Transplant* 1998; 65: 706-12.
32. Pierson RN III, Winn HJ, Russell PS and Auchincloss H Jr. Xenogeneic skin graft rejection is especially dependent on CD4⁺ T cell. *J Exp Med* 1989, 170: 991-6.
33. Goulmy E, Pool J, Van Lochem E and Völker-Dieben H. The role of human minor histocompatibility antigens in graft failure: a mini-review. *Eye* 1995, 9: 180-4.
34. Auchincloss H Jr, Moses R, Conti D, *et al.* Rejection of transgenic skin expressing a xeno class I antigen is CD4 dependent and CD8 independent. *Transpl Proc* 1990, 22: 1059-60.
35. Wren SM, Wang SC, Thai NL, *et al.* Evidence for early Th2 cell predominance in xenoreactivity. *Transpl* 1993, 56: 905-11.
36. Starzl TE, Todd S and Fung JJ. FK506 for liver, kidney and pancreas transplantation. *Lancet* 1989, 334: 1000-4.
37. Günzburg WH, and Salmons B. Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought?. *Mol Med Today* 2000; 6: 199-208.
38. Mueller NJ, Livingston Ch, Knosalla Ch, *et al.* Activation of porcine cytomegalovirus, but not porcine lymphotropic herpesvirus, in pig-to-baboon xenotransplantation. *JID* 2004; 189: 1628-33.
39. Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos MC, *et al.* Increasing viral burden in CD4⁺ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann Intern Med* 1990; 113: 438-43.
40. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, *et al.* Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transpl* 199; 68: 1517-25.

41. Fishman JA. Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risk posed by an emerging technology. *Kidney Int Suppl* 1997; 58: S41-5.
42. Leroux C, Cadoré J-L, Montelaro R. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet Res* 2004; 35: 485-512.
43. Peterhans E, Greenland T, Badiola J, et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 2004; 35: 257-74.
44. Cutts FT and Markowitz LE. Successes and failures in measles control. *JID* 1994; 170: S32-41.
45. Shen JS, T-To S, Schirieber L and King NJ. Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. *J Virol* 1997; 71: 9323-32.
46. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 778-809.
47. Eastlund T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant* 1995; 4: 455-77.
48. Nalesnik MA, Starzl TE. Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, and posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplant Sci* 1994; 4: 61-79.
49. Chapman LE and Khabbaz RF. Etiology and epidemiology of the four corners hantavirus outbreak. *Infect Agents Dis* 1994; 3: 234-44.
50. Chua KB. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 1999; 354: 1257-9.
51. Wuethrich B. Chasing the fickle swine flu. *Science* 2003; 299: 1502-5.
52. Holmes GP, Chapman LE, Stewart JA, et al. Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. *CID* 1995; 20: 421-39.
53. Fisher Hosh PS, Brammer L, Trappier GS, et al. Pathogenic potential of filoviruses: role of geographic origin of primate host and virus strain. *JID* 1992; 166: 753-63.
54. Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA. Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull World Health Organ* 1983; 61: 247-70.
55. Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, et al. Multiple ebola virus transmission events and rapid decline of Central African wildlife. *Science* 2004; 303: 387-90.



56. Burney MI, Ghafoor A, Saleen M, Webb PA, Casals J. Nosocomial outbreak of viral hemorrhagic fever caused by Crimean Hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 941-7.
57. Hillis D. Origins of HIV. *Science* 2000; 288: 1757-9.
58. Engels AE, Switzer MW, Heneine W, and Viscidi PR. Serologic evidence for exposure to simian virus 40 in north american zoo workers. *JID* 2004; 190: 2065-9.
59. Korber B, Muldoon M, Theiler, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288: 1789-96.
60. Desrosiers RC. The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 557-78.
61. Kanki PJ, and Essex M. Simian T-lymphotropic viruses and related human viruses. *Vet Microbiol* 1988; 17: 309-14.
62. Flugel RM. Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4: 739-50.
63. Shiigi S, and Howard C Jr. Serologic and virologic analysis of type D simian retrovirus infection in a colony of Celebes black macaques. *J Med Primatol* 1989; 18: 421-2.
64. Peeters M, Fransen K, Delaporte E, et al. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* 1992; 6: 447-51.
65. Vanin EF, Kaloss M, Broscius C, Neinhais AW. Characterization of replication-competent retroviruses from nonhuman primates with virus-induced T-cell lymphomas and observations regarding the mechanism of oncogenesis. *J Virol* 1994; 68: 4241-50.
66. Jin MJ, Rogers J, Phillips-Conroy JE, et al. Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. *J Virol* 1994; 68: 8454-60.
67. Michaels MC, McMichael JP, Brasky K, et al. Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplant* 1994; 57: 1462-5.
68. Chiche L, Adam R, Caillat-Zucman S, et al. Xenotransplantation: Baboons as potential liver donors? *Transplant* 1993; 55: 1418-21.
69. Blusch JH, Patience C, and Martin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2002; 9:242-51.
70. Elliot RB, Escobar L, Garkavenko O, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* 2000; 9: 895-901.





71. Ericsson T, Oldmixon B, Blomberg J, et al. Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J Virol* 2001; 75: 2765-70.
72. Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, et al Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol* 2001; 75: 2771-5.
73. Takeuchi Y, Patience C, Magre S, et al. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 1998; 72:9986-91.
74. Simmonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type I from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992; 326: 726-30.
75. Baris D and Zahm S. Epidemiology of lymphomas. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 383-94.
76. Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, and Todd D. Comparison of the structures of three circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J Virol* 2003; 77: 13036-41.
77. Todd D, Niagro FD, Ritchie BW, et al. Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch Virol* 1999; 117: 129-35.
78. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W and Kock MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295: 64-6.
79. Todd D. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 2000; 29: 373-94.
80. Gutierrez C. Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 313-29.
81. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, et al. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus. The first human circovirus. *J Virol* 1999; 73: 3582-6.
82. Kasamatsu H and Nakanishi A. How do animal DNA viruses get to the nucleus?. *Annu Rev Microbiol* 1998; 52: 627-86.
83. Homes KV. Localization of viral infection. En *viral Pathogenesis*, ed. N Nathanson, 3: 35-53. Philadelphia Lippincott-Raven, USA 1997.
84. Nathanson N, Tyler KL. Entry, dissemination, shedding, and transmission of viruses. En *viral Pathogenesis*, ed. N Nathanson, 3: 13-33. Philadelphia Lippincott-Raven, USA 1997.
85. Mankertz A, Persson F, Mankertz J, et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 1997; 71: 2562-6.
86. Allan GM, Phenix KV, Todd D and McNulty MS. Some biological and physico-chemical



- mical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed* 1994; 41: 17-26.
87. Tischer I, Peters D, Rasch R and Pociuli S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 1987; 96: 39-57.
 88. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet Microbiol* 1995; 44: 49-64.
 89. Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M and Greim W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 1986; 91: 271-6.
 90. Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2535-41.
 91. Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, and Buhk HJ. Identification of a protein essential for the replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 1998; 79: 381-4.
 92. Tischer I, Bode J, Apodaca J, et al. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 1995; 140: 1427-39.
 93. Allan GM, McNeilly F, Foster JC, Adair BM. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol* 1994; 41: 267-79.
 94. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet Microbiol* 1995; 44:49-64.
 95. Choi C, Chae C, and Clark EG. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 151-3.
 96. Kennedy S, Allan G, McNeilly F, et al. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec* 1998; 142: 495-6.
 97. Elbers AR, Hunneman WA, Vos JH, et al. Increase in PDNS diagnoses in the Netherlands. *Vet Rec* 2000; 147: 311.
 98. Segalés J, Sitjar M, Domingo M, et al. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 1997; 141: 600-1.
 99. Meehan BM, McNeilly F, Tood D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pig. *J Gen Virol* 1998; 79: 2171-9.
 100. Nayar GPS, Hamel AL, and Lin L. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J* 1999; 40: 277-8.
 101. Rodríguez-Arrijoja GM, Segalés J, Balasch M, et al. Serum antibodies to porcine cir

- circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 2000; 146: 762-4.
102. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diag Invest* 1998; 10: 3-10.
 103. Allan GM, McNeilly F, McNair I, et al. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol* 2000; 145: 853-7.
 104. Ellis JA, Wiseman BM, Allan G, et al. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 1645-6.
 105. Adair BM, McNeilly F, McConnell CDG, et al. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis* 1993; 35: 783-92.
 106. Latimer KS, Steffens WL, Rakich PM, et al. Cryptosporidiosis in four cockatoos with psittacine beak and feather disease. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 5: 707-10.
 107. Gorodezki C. Tipificación de antígenos HLA clase I y clase II mediante doble fluorescencia. En: Manual de procedimientos serológicos y celulares de histocompatibilidad. 1ra impresión. SSA-INDRE, México 1999.
 108. Quardani M, Wilson L, Jetté R, et al. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circovirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3917-24.
 109. Cheung AK. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology* 2003; 310: 41-9.
 110. van de Loosdrecht AA, Nennies E, Ossenkoppele JG, et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991; 141: 15-22.
 111. De Weger RA, Runhaar BA, and Den Otter W. Cytotoxicity by macrophages and monocytes. *Methods Enzymol* 1986; 132: 458-63.
 112. Kozak M. Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. *Adv Virus Res* 1986; 31: 229.
 113. Nataraj C, Eidmann S, Hariharan M, et al. Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules. *Viral Immunol* 1997; 10: 21-34.
 114. Eskra L and Splitter GA. Bovine herpesvirus 1 infects activated CD4⁺ lymphocytes. *J Gen Virol* 1997; 78: 2159-66.
 115. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understand-



- ding their relation. *Science* 1996; 272: 54–60.
116. Callan MF, Tan L, Annels N, *et al.* Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo. *J Exp Med* 1998; 187: 1395-402.
 117. Probst CH, Tschannen K, Gallimore A, *et al.* Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by kinetics of viral protein expression. *J Immunol* 2003; 171: 5415-22.
 118. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-56.
 119. Zheng L, Fisher G, Miller RE, *et al.* Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995; 377: 348-51.
 120. Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994; 1: 365-71.
 121. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 1994; 369: 648-52.
 122. Mullbacher A. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J Exp Med* 1994; 179: 317-21.
 123. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8⁺ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 1994; 369: 652-4.
 124. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998; 8: 177-87.
 125. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68: 4650-5.
 126. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 18: 257-66.
 127. Griffin DE. Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 191: 117-34.
 128. Callan MF, Steven N, Krausa P, *et al.* Large clonal expansions of CD8⁺ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 1996; 2: 906-11.
 129. Oldstone MB. Virus-lymphoid cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12756-8.
 130. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, *et al.* The human cytotoxic T-lymphocyte



- (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996; 70: 7569-79.
131. Borrow P, Lewicki H, Wei X, et al. Antiviral pressure exerted by HIV 1 specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3: 205-11.
 132. Steven NM, Annels NE, Kumar A, et al. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997; 185: 1605-17.
 133. Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 2000; 29: 373-94.
 134. Krog J, Hokland M, Ahlburg P, et al. Lipid solubility- and concentration-dependent attenuation of in vitro natural killer cell cytotoxicity by local anesthetics. *Ac Anaesthes Scan* 2002; 46: 875-81.
 135. Child SJ, Hakki M, De Niro KL, et al. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* 2004; 78: 197-205.
 136. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 37-49.
 137. Ou D, Mitchell LA, Décarie D, et al. Promiscuous T-cell recognition of a rubella capsid protein epitope restricted by DRB1*0403 and DRB1*0901 molecules sharing an HLA DR suertype. *Hum Immunol* 1998; 59: 149-57.
 138. Ou D, Mitchell LA, Ho M, et al. Analysis of overlapping T- and B- cell antigenic sites on rubella virus E1 envelope protein. Influence of HLA-DR4 polymorphism on T-cell clonal recognition. *Hum Immunol* 1994; 39: 177-87.
 139. Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Vierkant RA, et al. Human leukocyte antigen class II alleles and rubella-specific humoral and cell-mediated immunity following measles-mumps-rubella-II vaccination. *JID* 2005; 191: 515-9.
 140. Huang Y, Babiuk LA and van Drunen Littel-van den Hurk S. Immunization with a bovine herpesvirus 1 glycoprotein B DNA vaccine induces cytotoxic T-lymphocyte responses in mice and cattle. *J Gen Virol* 2005; 86: 887-98.
 141. Desloges N, Rahaus M and Wolff MH. Role of the protein kinase PKR in the inhibition of varicella-zoster virus replication by beta interferon and gamma interferon. *J Gen Virol* 2005; 86: 1-6.
 142. Darwich L, Pié S, Rovira A, et al. Cytokine expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by Postweaning multisystemic wasting syndrome. (comunicación personal).

143. Goodbourn S, Didcock L and Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-64.
144. Teranishi T, Hirano T, Arima N, and Onoue K. Human helper T cell factor (s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell replacing factor (TRF)-like factor (s). *J Immunol* 1982; 128: 1903-8.
145. Hirano T, Teranishi T, Lin B, and Onoue K. Human helper T cell factor (s). IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells. *J Immunol* 1984; 133: 798-802.
146. Kikutani H, Taga T, Akira S, et al. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J Immunol* 1985; 134: 990-5.
147. Oldstone MBA. Viral alteration of cell function. *Sci Am* 1989; 261: 34-42.
148. Buller RML and Palumbo GJ. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 1991; 55: 80.
149. Matveev S, Li X, Everson W, Smart E. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 49: 237-50.
150. Norkin L. Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 49: 301-15.
151. Shin J, Abraham S. Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology* 2001; 102: 2-7.
152. Stuart E, Webley W, and Norkin L. Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res* 2003; 287: 67-78.
153. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-72.
154. Norkin L, Wolfrom S, Stuart E. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res* 2001; 266: 229-38.
155. Webley W, Norkin L, and Stuart E. Caveolin-2 associates with intracellular chlamydial inclusions independently of caveolin-1. *BMC Infectious Diseases* 2004; 4: 23-.
156. Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A. Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1989; 109: 2721-.
157. MacKay R, Consigli RA. Early events in polyomavirus infection: Attachment, penetration, and nuclear entry. *J Virol* 1976; 19: 620-.

158. Maul GG, Rovera G, Vorbrodt A, Abramezuk J. Membrane fusion as a mechanism of simian virus 40 entry into different cellular compartments. *J Virol* 1978; 28: 936-.
159. Anderson RGW, Kamen BA, Rothenberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 1992; 255: 410-.
160. Rothenberg KG, Heuser JE, Donzell WC, et al. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coat. *Cell* 1992; 68: 673-.
161. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1994; 127: 1199-.
162. Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immuno-deficiency virus (HIV-1 and HIV-2) in recombinant human colony stimulating factor-1 treated human monocytes; an ultrastructural study. *J Virol* 1988; 62: 2578-86.
163. Tischer I, Peters D, Rasch R and Pociuli S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 1987; 96: 39-57.
164. Szilágyi JF, and Cunningham C. Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J Gen Virol* 1991; 72: 661-.
165. Mc Lauchlan J, and Rixon FJ. Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol* 1992; 73: 269-.
166. Dargan DJ, Patel H, and Dubak-Sharpe JH. PREPs: herpes simplex virus type 1-specific particles produced by infected cells when viral DNA replication is blocked. *J Virol* 1995; 69: 4924-.
167. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, et al. Egress of alphaherpesvirus: comparative ultrastructural study. *J Virol* 2001; 75: 565-.
168. Alemañ N, Quiroga MI, López-Pañ a M, et al. L-particle production during primary replication of pseudorabies virus in the nasal mucosa of swine. *J Virol* 2003; 77: 5657.
169. Dargan DJ, Dubak-Sharpe JH. The effect of Herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. *Virology* 1997; 239: 378.