



# Características inmunopatogénicas de las cepas HP-PRRSV

● Sánchez Carvajal JM<sup>1</sup>, Rodríguez Gómez IM<sup>1</sup>, Ruedas Torres I<sup>1</sup>, Amarilla SP<sup>2</sup>, Carrasco L<sup>1</sup>, Pallarés FJ<sup>3</sup> y Gómez Laguna J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, España.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Patológicas.

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

<sup>3</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, España.

En este segundo artículo sobre las cepas altamente patógenas del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) describimos su patogenia y las principales lesiones que provocan este tipo de cepas.

El virus del PRRSV tiene un marcado tropismo por distintas subpoblaciones de macrófagos localizadas en el pulmón, especialmente por macrófagos alveolares pulmonares (MAPs), así como por otras poblaciones de macrófagos distribuidos en el organismo, pero especialmente en los órganos linfoides y en la placenta (revisado en Lunney *et al.*, 2016). En este sentido, la destrucción de MAPs, así como la apoptosis y/o necrosis de linfocitos y macrófagos en los órganos linfoides (Halbur *et al.*, 1995; Teifke y cols., 2001; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2014) debilitan las barreras defensivas del sistema respiratorio y predisponen al desarrollo del complejo respiratorio porcino,

en el que junto con este virus están implicados otros patógenos tanto primarios como secundarios (Gómez-Laguna *et al.*, 2013). Tradicionalmente, se ha descrito que las cepas del PRRSV-1 inducen lesiones respiratorias menos intensas que las cepas pertenecientes al PRRSV-2 (Martínez-Lobo *et al.*, 2011). Sin embargo, las cepas altamente patógenas del PRRS (HP-PRRSV), tanto las HP-PRRSV-1 como las HP-PRRSV-2, presentan un tropismo tisular y una tasa de replicación mucho más alta que las observadas en las cepas clásicas de este virus, lo que se traduce tanto en una mayor variedad lesional como en una mayor intensidad de las lesiones (Guo *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2016; Stadjek *et al.*, 2017; Canelli *et al.*, 2017). Asimismo, las cepas HP-PRRSV dan lugar a una respuesta inmune inusual, afectando, en mayor medida, a la producción de diferentes mediadores de la respuesta inmune y/o inflamatoria en el hospedador, como son la IL-1, IL-

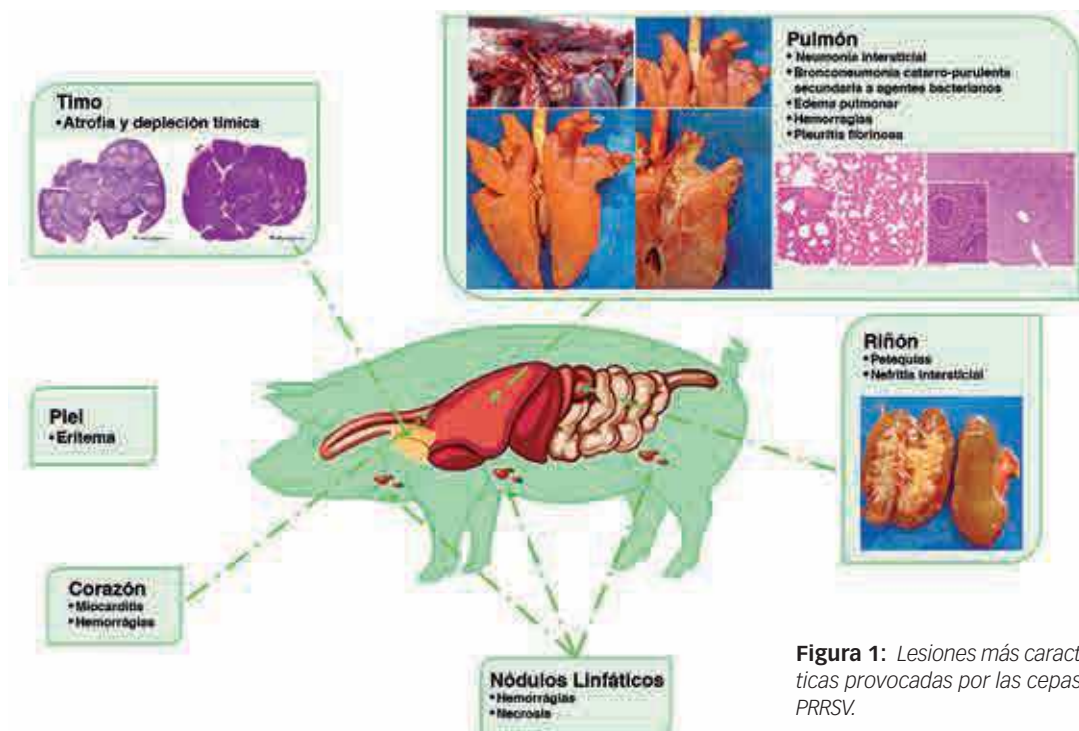


Figura 1: Lesiones más características provocadas por las cepas HP-PRRSV.

6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  entre otras (Guo et al., 2013; Chen et al., 2014; Amarilla et al., 2015; Han et al., 2015; Weesendorp et al., 2016; Renson et al., 2017). Como se ha comentado con anterioridad, a la acción iniciada por el PRRSV se suma, en muchos casos, la acción secundaria de diferentes agentes bacterianos la cual es más frecuente y temprana en el caso de cepas HP-PRRSV, siendo común la participación de patógenos como *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* o *Haemophilus parasuis*, los cuales juegan un papel fundamental en la gravedad del proceso, teniendo en la mayoría de los casos, tanto en lechones como en cerdos adultos, un curso muy grave e incluso mortal (Tian et al., 2007; Zhou et al., 2010; Karniychuck et al., 2010; Sinn et al., 2016).

### LESIONES PRODUCIDAS EN LA INFECCIÓN CON CEPAS HP-PRRSV

Las lesiones macroscópicas más características que podemos encontrar en los animales infectados con cepas HP-PRRSV son la presencia de hemorragias multifocales en piel, pulmón, nódulo linfático, riñón, corazón y/o cerebro y la existencia de una neumonía intersticial grave que, en la mayoría de las ocasiones, se acompaña de edema pulmonar, linfadenopatía, y una marcada atrofia tímica (Figura 1). Estas lesiones están acompañadas en muchas ocasiones por un cuadro septicémico debido a la existencia de infecciones bacterianas secundarias (Karniychuck et al., 2010; Zhou and Yang, 2010; Fan et al., 2016; Sinn et al., 2016; Canelli et al., 2017).

En el pulmón, principal órgano diana del virus, las cepas HP-PRRSV provocan unas lesiones más intensas y agudas que las inducidas por las cepas de baja virulencia. Estas lesiones se caracterizan por un pulmón no colapsado de aspecto moteado que puede presentar edema interlobulillar, asimismo encontraremos áreas de consolidación craneoventral que afectan al lóbulo apical y medial en los casos más graves de HP-PRRSV como consecuencia de procesos bacterianos secundarios (Figura 1). Microscópicamente podemos observar una neumonía intersticial con una distribución de multifocal a difusa que incluye infiltración de linfocitos y monocitos/macrófagos en el septo e hiperplasia de los neumocitos tipo II. Además, también podemos encontrar bronquiolitis, peribronquiolitis y zonas de bronconeumonía de etiología bacteriana, caracterizadas por un intenso infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el interior de los alveolos (Figura 1). En la infección por algunas cepas HP-PRRSV se ha descrito la existencia de una neumonía intersticial necrotizante, hemorragias extensas, pleuritis fibrinosa y/o fibrosa, así como diferentes grados de vasculitis, caracterizada por un marcado infiltrado mononuclear perivascular. Como consecuencia de estas lesiones, los cerdos presentan un cuadro clínico carac-

terizado por disnea, taquicardia y cianosis (Guo et al., 2013; Hu et al., 2013; Han et al., 2014; Amarilla et al., 2015; Fan et al., 2016; Sinn et al., 2016; Canelli et al., 2017). También, es importante resaltar que la apoptosis de macrófagos a nivel pulmonar disminuye la eliminación de bacterias en el pulmón y favorecería el desarrollo de infecciones bacterianas secundarias (Ma et al., 2013; Yuan et al., 2016).

Además de en el parénquima pulmonar, las cepas HP-PRRSV se replican, preferentemente, en el timo, órgano linfoide primario fundamental para la maduración y diferenciación de linfocitos T y para el desarrollo del sistema inmune del animal adulto. Estas cepas provocan una marcada atrofia y depleción del timo (Figura 1), caracterizada por la reducción del número de timocitos y de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> (precursores de los linfocitos CD8 o colaboradores y de los linfocitos CD4 o citotóxicos) junto con un aumento en el número de macrófagos de cuerpo tingible (He et al., 2012; Li et al., 2012; Guo et al., 2013; Amarilla et al., 2016). El grado de depleción y atrofia tímica se ha asociado con una mayor capacidad de estas cepas para inducir la muerte celular y/o los fenómenos de apoptosis (Feng et al., 2002; He et al., 2012; Amarilla et al., 2016; Morgan et al., 2016). Esta reducción en el desarrollo de nuevos linfocitos T en el timo da lugar a un deterioro en la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T (Rodríguez-Gómez et al., 2013; Salguero et al., 2015). El virus del PRRSV puede inducir la apoptosis tanto directamente sobre las cé-



lulas infectadas, como de forma indirecta, induciendo la apoptosis sobre células no infectadas pero localizadas en la proximidad de las células en las que se está replicando el virus. En estos casos la apoptosis podría estar inducida, entre otros mediadores, por la liberación de citoquinas apoptogénicas por parte de los macrófagos (Costers et al., 2008; Barranco et al., 2011; Rodríguez-Gómez et al., 2014). Estos fenómenos de apoptosis tanto directa como indirecta parecen ser mucho más intensos en las cepas HP-PRRSV que en las cepas tradicionales de este virus (He et al., 2012; Li et al., 2014; Huong Giang et al., 2016; Han et al., 2017). ➤



En los órganos linfoides secundarios, como son los nódulos linfáticos, tonsila o bazo, las lesiones provocadas por la infección de cepas HP-PRRSV se caracterizan por la existencia de una marcada depleción linfoide y atrofia de los centros germinales, así como una hiperplasia de la pulpa esplénica roja y depleción de la pulpa esplénica blanca (Hu et al., 2013; Huong Giang et al., 2016).

## INMUNOPATOGENIA

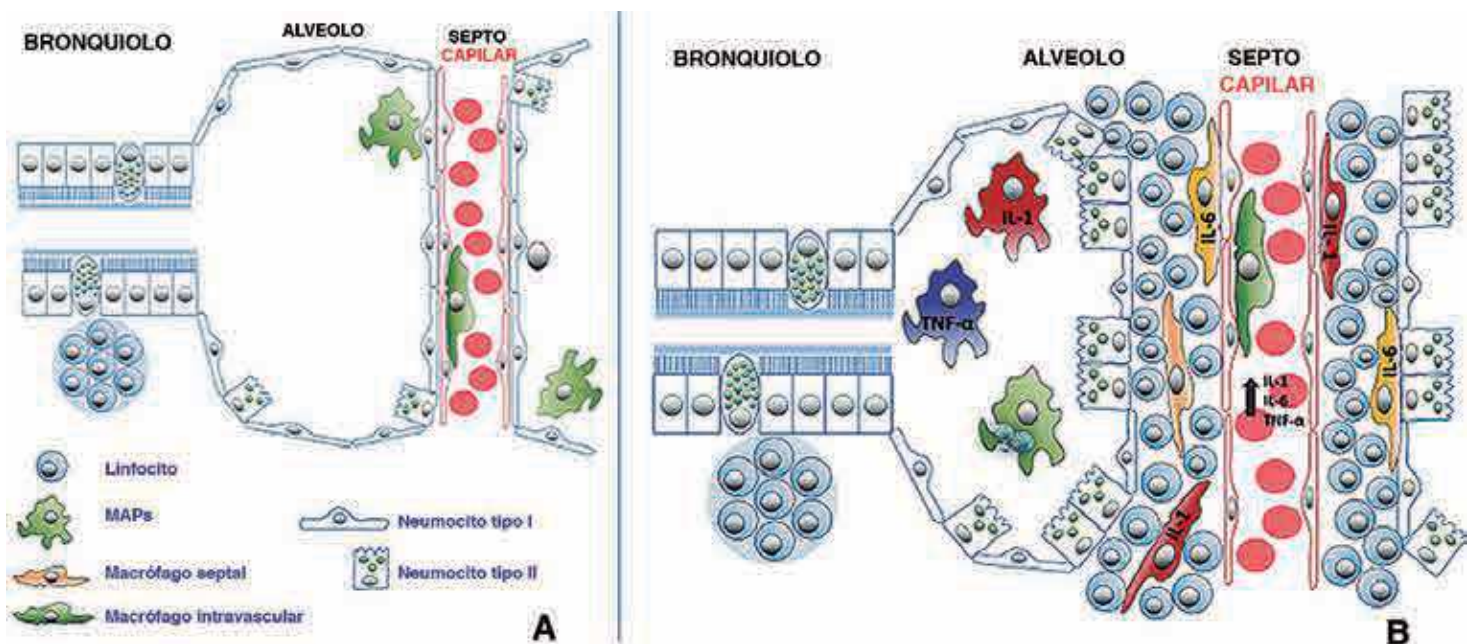
¿A qué se debe la virulencia de las cepas HP-PRRSV?

Una de las grandes incógnitas de las cepas HP-PRRSV es la razón por la que su virulencia es mayor que el resto de las cepas de este virus. Diversos autores han sugerido que ciertas proteínas no estructurales del virus (nsp, del inglés *non structural protein*), como las nsp2, nsp9 y nsp10, podrían estar relacionadas con la elevada virulencia de las cepas HP-PRRSV (Cheng et al., 2009; Gauger et al., 2011; Wang et al., 2013; Li et al., 2014; Wang y Zhang, 2014). En este sentido, las proteínas nsp9 y nsp10 parecen estar relacionadas con la eficacia de replicación de las cepas HP-PRRSV, mientras que la proteína nsp2 podría tener un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del hospedador, favoreciendo así la virulencia y patogenicidad de estas cepas (Liu et al., 2015; Canelli et al., 2017). Además, una de las principales características genéticas que comparten las cepas HP-PRRSV, tanto del PRRSV-1 como del PRRSV-2, es la presencia de deleciones en la región que codifica la proteína nsp2, la cual es considerada actualmente como un marcador



de cepas HP-PRRSV (Cheng et al., 2009; Wang et al., 2013; Wang y Zhang, 2014; Canelli et al., 2017).

Para tratar de entender la patogénesis de las cepas clasificadas como HP-PRRSV debemos de resaltar que han adquirido la habilidad de multiplicarse de forma efectiva en diferentes órganos, presentando de esta forma una distribución tisular mucho más amplia que la de las cepas tradicionales (Guo et al., 2013; Hu et al., 2013; Morgan et al., 2016; Stadjek et al., 2017). Otro aspecto que debemos tener en cuenta sería la capacidad de estas cepas para utilizar receptores alternativos al CD163, receptor esencial en la infección por el PRRSV (Nauwynck et al., 1999; Frydas et al., 2013). En este sentido, las cepas HP-PRRSV no solo se replican en los macrófagos presentes en el pulmón y los órganos linfoides (timo, nódulos linfáticos, tonsila, bazo y medula ósea) sino también en las células endoteliales y epiteliales de órganos como el corazón, el hígado, el estómago, el cerebro o el riñón (Li et al., 2012; Hu et al., 2013; Morgan et al., 2014). Este mayor tropismo del virus se ha señalado como un mecanismo clave



**Figura 2:** En la figura A se representa un pulmón sano. En la figura B se observa la expresión de citoquinas inflamatorias en los MAPs, en los macrófagos intersticiales e intravasculares durante un proceso de neumonía intersticial consecuencia de la infección por una cepa HP-PRRSV.



para explicar la alta virulencia que presentan las cepas HP-PRRSV (Han et al., 2017).

### CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS DE LA INFECCIÓN POR CEPAS HP-PRRSV

El virus del PRRSV se caracteriza por su capacidad para modular, e incluso evadir, la respuesta inmune del hospedador, lo que favorece su replicación, distribución y latencia en el organismo. Así, el virus es capaz de alterar varias de las etapas que intervienen en la homeostasis del sistema inmune, como es la producción y señalización de interferones, la modulación de la expresión de diferentes citoquinas, la alteración de las rutas apoptóticas y la regulación de la inmunidad adaptativa (Butler et al., 2014; Huang et al., 2015).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para evaluar la respuesta inmune frente a cepas HP-PRRSV-1 y HP-PRRSV-2 obteniéndose resultados contradictorios en función de la cepa utilizada. Las cepas clásicas del PRRSV dan lugar a la aparición temprana de anticuerpos mayoritariamente no neutralizantes (7 – 10 días posinfección). Los anticuerpos neutralizantes (AN) aparecen normalmente a partir de las 4 semanas y van aumentando lentamente hasta alcanzar su máximo varias semanas o meses después (Gómez-Laguna et al., 2013; Lunney et al., 2016). El desarrollo de esta respuesta humoral tardía es algo que tienen en común cepas clásicas y HP-PRRSV.

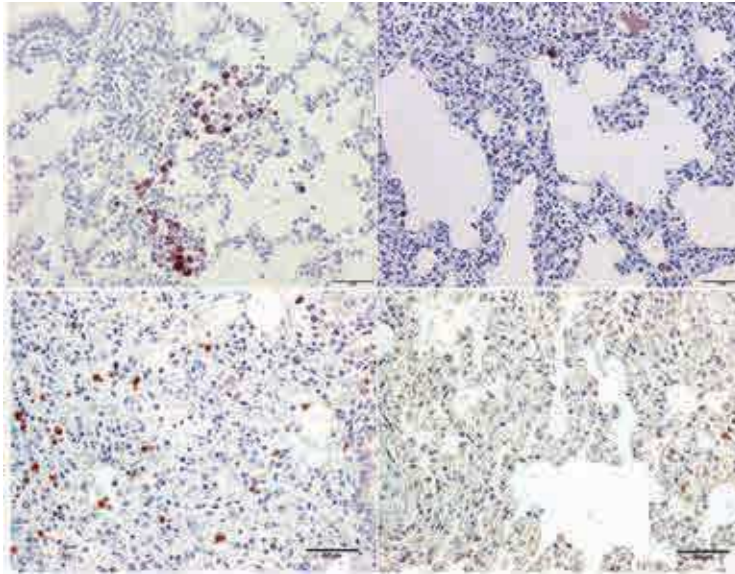
Junto con los AN, los niveles de células secretoras de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ -SC; del inglés *IFN- $\gamma$  secreting cells*) son los principales correlatos de protección frente al PRRSV (Díaz et al., 2005, 2006, 2012). El IFN- $\gamma$  es una citoquina producida principalmente por las células natural killer (NK), los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados y por los linfocitos CD8<sup>+</sup>. El nivel de IFN- $\gamma$ -SC se mide mediante la técnica ELISPOT, y es un indicador de la

eficacia de la respuesta inmune adaptativa, concretamente de la inmunidad celular (Darwich et al., 2010). En el caso del PRRSV, es una respuesta tardía que aparece a las 2-3 semanas posinfección y dependiente de la cepa (Meier et al 2003; Díaz et al., 2005, 2012). En cuanto al HP-PRRSV-1, se han obtenido resultados contradictorios, si la cepa SU1-bel da lugar a un incremento de los niveles de IFN- $\gamma$ -SC comparado con cepas clásicas del PRRSV (Morgan et al., 2013), la cepa Lena no induce este incremento de IFN- $\gamma$ -SC (Weesendorp et al., 2013). De hecho, se describen dos modelos opuestos de respuesta inmune adaptativa frente al PRRSV en función de la cepa, uno basado principalmente en el desarrollo de AN con una respuesta baja de IFN- $\gamma$ -SC, y otro donde predomina IFN- $\gamma$ -SC y los niveles de AN son bajos (Díaz et al., 2012).

Por otro lado, a diferencia de otros virus como el virus de la Influenza porcina o el Coronavirus porcino que desencadenan la liberación de IFN tipo I (IFN  $\alpha/\beta$ ) frenando la replicación vírica y promoviendo la respuesta inmune adaptativa (Van Reeth et al., 1999; Kimman et al., 2009), el virus del PRRSV es capaz de inhibir la síntesis y la respuesta del IFN tipo I (Huang et al., 2015). Sin embargo, las cepas HP-PRRSV inducen un incremento en los niveles plasmáticos de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  favoreciendo la eliminación del virus (Wang et al., 2011; Morgan et al., 2013; Weesendorp et al., 2013; Renson et al., 2017).

### RESPUESTA INFLAMATORIA FRENTE A LAS CEPAS HP-PRRSV

Las citoquinas consideradas como proinflamatorias, entre las que se encuentran la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , son una pieza clave en el establecimiento de la respuesta inflamatoria aguda, que a su vez es un elemento esencial para la instauración de la respuesta inmune innata del hospedador. En este ➔



**Figura 3:** En la imagen A y B se observan macrófagos alveolares y septales expresando el antígeno de una cepa HP-PRRSV (LENA) y de una cepa de baja virulencia (3249) respectivamente. En la imagen C se observa un fuerte infiltrado de macrófagos y neutrófilos expresando IL-1 $\alpha$  en un cerdo infectado con la cepa HP-PRRSV SU1-bel en comparación con la baja expresión IL-1 $\alpha$  de una cepa de baja virulencia (LV) en la imagen D.

sentido, muchas cepas del PRRSV han evolucionado para evadir la respuesta inflamatoria, al limitar la producción de las citoquinas proinflamatorias (Thanawongnuwech et al., 2001; Renukaradhya et al., 2010; Gómez-Laguna et al., 2010; García-Nicolás et al., 2011). Sin embargo, las cepas HP-PRRSV inducen niveles elevados de diferentes citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , que en ocasiones pueden incluso detectarse en el torrente sanguíneo provocando una intensa respuesta inflamatoria a nivel sistémico, que se traduce en la aparición de un cuadro febril marcado (41-42 °C) en los cerdos infectados (Liu et al., 2010; Guo et al., 2013; Morgan et al., 2013; Han et al., 2014, 2015; Sinn et al., 2016; Renson et al., 2017). Si estos niveles de citoquinas proinflamatorias se mantienen elevados durante varios días se provoca la aparición de efectos adversos a nivel sistémico que dan lugar a la existencia de un fallo multiorgánico (o multisistémico) que se ha denominado como “tormenta de citoquinas” (Han et al., 2017), y que se ha asociado a casos de infección por cepas HP-PRRSV al igual que a otros virus como el Ébola o cepas altamente patógenas del virus de la gripe en humanos (La Gruta et al., 2007; Wauquier et al., 2010).

Este aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias por parte de las cepas HP-PRRSV también se refleja a nivel pulmonar, observándose un incremento marcado de algunas de ellas, como la IL-1 (Fig. 2B), en comparación con las cepas clásicas del PRRSV, lo que se ha relacionado con la mayor intensidad de las lesiones

en el pulmón y la reducción en el intercambio gaseoso (Chen et al., 2014; Guo et al., 2013; Amarilla et al., 2015; Han et al., 2015; Renson et al., 2017; Weesendorp et al., 2016). En este sentido, la respuesta inflamatoria puede ser un arma de doble filo, ya que cuando es insuficiente es incapaz de montar una respuesta inmune eficaz frente al virus; pero si fuera demasiado potente provocaría una mayor intensidad de la clínica y de las lesiones, así como una mayor frecuencia de infecciones bacterianas secundarias. Un ejemplo claro de una respuesta inflamatoria temprana sería la provocada por las cepas HP-PRRSV del PRRSV-1 como Lena o SU1-bel (Morgan et al., 2013; Weesendorp et al., 2014).

Las cepas HP-PRRSV también pueden producir un incremento de la producción de las denominadas citoquinas anti-inflamatorias, como es la IL-10.

Esta potente citoquina anti-inflamatoria es capaz de controlar el daño tisular provocado por la respuesta inflamatoria pero a su vez debilita la respuesta inmune Th1 y por tanto, disminuye la inmunidad celular del animal favoreciendo infecciones bacterianas secundarias (Guo et al., 2013; Han et al., 2015; Han et al., 2017). Una disminución en la respuesta inmune debido a un incremento en la producción de esta citoquina se ha descrito en virus como el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), el cual obstaculiza la respuesta inmune del hospedador, induce inmunosupresión y favorece el desarrollo de coinfecciones (Haslung et al., 2005; Darwich et al., 2008; Kekarainen et al., 2008). Sin embargo, no todas las cepas HP-PRRSV son capaces de inducir un incremento en la expresión de IL-10 existiendo una amplia variabilidad en función de la cepa al igual que ocurre con las cepas clásicas o de baja virulencia del PRRS (Gimeno et al., 2011; Zhang et al., 2013; Amarilla et al., 2015; Renson et al., 2017).

A modo de conclusión podríamos decir que la mayor patogenicidad de las cepas HP-PRRSV podría estar relacionada tanto con su mayor tropismo y tasa de replicación, como con su capacidad para inducir los fenómenos de apoptosis y de provocar una mayor respuesta inflamatoria, que se traduciría en un cuadro clínico y lesiones más graves. Además, algunas cepas HP-PRRSV tendrían la capacidad de provocar una potente cascada de citoquinas inflamatorias a nivel pulmonar que favorece la aparición de infecciones bacterianas secundarias.