

17

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

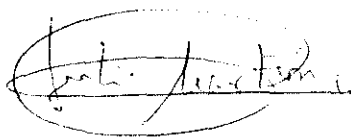
FACULTAD DE VETERINARIA

NUEVAS APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA  
PATOGENIA DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

JULIA MARTIN FERNANDEZ

Madrid 1992

Tesis presentada por Julia Martín  
Fernández para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria por la  
Universidad Complutense de Madrid.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "Julia Martín Fernández".

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el  
Departamento de Sanidad Animal del Instituto  
Nacional de Investigación y Tecnología Agraria  
y Alimentaria, bajo la dirección del Dr. Jose  
Manuel Sánchez- Vizcaíno Rodríguez.

Vº Bº

A handwritten signature in black ink, consisting of a long, sweeping horizontal stroke followed by several shorter, curved strokes underneath.

## **ABREVIATURAS**

**Ac:** Anticuerpo  
**Acm:** Anticuerpos monoclonales  
**ADCC:** Citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos.  
**ADN:** Acido desoxiribonucleico  
**ADP:** Adenosin difosfato  
**Ag:** Antígeno  
**BALT:** Tejido linfoide asociado a bronquios  
**BSA:** Seroalbumina bovina  
**CDAC:** Citotoxicidad por anticuerpos dependiente de complemento  
**CID:** Coagulación intravascular diseminada  
**DAB:** Diaminobencidina  
**DMFA:** Dimetilformamida  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DNFB:** Dinitrofluorobenceno  
**ECF:** Factor quimiotáctico de eosinófilos  
**dpi:** Días post-inoculación  
**EDTA:** Etilendiamino tetracético  
**ELISA:** Enzimoimmunoensayo  
**IC:** Inmunocomplejos  
**IFD:** Inmunofluorescencia directa  
**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta  
**IFN:** Interferón  
**Ig:** Inmunoglobulina  
**KDa:** Kilodaltons  
**LAK:** Actividad citotóxica natural activada por linfoquinas  
**MIP:** Macrófagos intravasculares pulmonares  
**MLPA:** Manguito linfático periarteriolar  
**N+:** Adherente al nylon  
**N-:** No adherente al nylon  
**NK:** Células citotóxicas naturales  
**OPD:** Ortofenilendiamina  
**P+:** Adherente al plástico  
**P-:** No adherente al plástico

**PAF:** Factor activador de plaquetas  
**PAS:** Acido peryódico de Schiff  
**PBL:** Leucocitos de sangre periférica  
**PBS:** Solución salina tamponada con fosfatos  
**PEG:** Polietilenglicol  
**PG:** Prostaglandinas  
**PMN:** Polimorfonucleares  
**PPA:** Peste porcina africana  
**PPC:** Peste porcina clásica  
**PTAH:** Hematoxilina ácida fosfotungstica  
**SFB:** Suero fetal bovino  
**SGSA:** Subdirección General de Sanidad Animal  
**SLA:** Antígenos del complejo principal de histocompatibilidad porcina  
**SMF:** Sistema mononuclear fagocítico  
**SRS-A:** Sustancia reactiva lenta de la anafilaxis  
**TBS:** Solución salina tamponada con TRIS  
**UHA:** Unidades hemadsorbentes  
**VHS:** Virus herpes simple  
**VPPA:** Virus Peste porcina africana  
**VPPC:** Virus de la Peste porcina clásica

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b>	1
Peste Porcina Africana	
1. Antecedentes históricos	2
2. Situación actual en España	3
3. Etiología de la PPA	4
4. Inmunología	5
5. Cuadro clínico y Anatomía Patológica	9
5.1. Sintomatología	9
5.2. Anatomía Patológica	10
6. Patogenia	21
<b>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b>	26
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	28
1. Soluciones y Medios de cultivo	29
2. Obtención de células mononucleares y polimorfonucleares a partir de sangre periférica	32
3. Obtención de suspensiones celulares de timo, bazo y ganglio linfático de cerdo	33
4. Producción de anticuerpos monoclonales	34
5. Otros anticuerpos monoclonales	38
6. Producción de inmunoglobulinas de conejo anti-fibrinógeno de cerdo	38
7. Conjugación de anti-suero de conejo con isotiocianato de fluoresceína	39
8. Conjugación de suero con enzimas	39
9. Inoculación de animales problema con VPPA	40

10. Determinación de la viremia	40
11. Toma de muestras y fijación	41
12. Procesado e inclusión de muestras	41
13. Realización de cortes	42
14. Tinciones histológicas	43
15. Técnicas inmunohistoquímicas	43
16. Estudio microscópico e iconografía	48
17. Análisis de imágenes	49
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
1. Producción de anticuerpos monoclonales	51
2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales	51
2.1. Reactividad con suspensiones celulares	51
2.2. Estudio Histológico	57
3. Curso clínico y pauta de sacrificio	71
4. Expresión de antígeno vírico en hígado, pulmón, y riñón	73
5. Susceptibilidad celular frente al VPPA	77
6. Estudio Histopatológico	81
6.1. Hígado	81
6.2. Pulmón	93
6.3. Riñón	102
<b>V. DISCUSION</b>	<b>116</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>132</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>134</b>

## I. INTRODUCCION

## **PESTE PORCINA AFRICANA**

### **1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad vírica que afecta a los suidos. Tiene su origen en el continente africano, donde fue descrita por Montgomery en 1921; clasificándola como una variante altamente patógena de la Peste porcina clásica (PPC), por la gran similitud en la sintomatología. Se mantiene enzoótica en Angola, Zimbabwe, Sudán, República Sudafricana, Mozambique, Santo Tomé y Príncipe.

El primer caso de PPA fuera del continente africano, se detectó en Portugal en 1957 (Manso Ribeiro y col., 1958), comenzando así una segunda etapa de difusión de la enfermedad. En 1960, aparecieron los primeros focos en España (Polo Jover y Sánchez Botija, 1961). Posteriormente aparecieron distintos brotes en otros países de Europa. Los últimos, detectados en Bélgica (1985) y Países Bajos (1986), han sido eliminados por el sacrificio de los animales afectados y los próximos a las áreas de los focos. Actualmente la PPA es enzoótica en Portugal, parte de España e Italia (Cerdeña).

Cuba fue el primer país del continente americano donde se diagnosticó la enfermedad (1971) (Oropesa, 1971), erradicándose en este mismo año. Posteriormente reapareció en 1978, extendiéndose a Brasil, República Dominicana (De Paula, 1982, Ribera, 1982) y Cuba nuevamente (Simeón, 1982). Actualmente, todos estos países están exentos de la enfermedad. En Haití, último país del continente americano afectado por la PPA, se inició un programa de erradicación en 1982, por el cual consiguieron eliminar la enfermedad en 1987.

## 2. SITUACIÓN ACTUAL EN ESPAÑA

La PPA ha representado enormes pérdidas, tanto a la Administración, como a los sectores ganadero y cárnico porcino. Hasta fechas recientes, España ha tenido totalmente bloqueado su comercio exterior con los países libres de PPA, en el intercambio de animales, carne y productos derivados del cerdo (excepto los tratados con temperaturas de esterilización).

En los últimos años, se ha producido un gran avance en la lucha contra la PPA, a raíz del Plan de Control y Erradicación, iniciado en 1985 por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Este programa, está basado en las siguientes líneas de actuación: control serológico de los animales, mantenimiento de una red de control y diagnóstico de la enfermedad con equipos móviles de veterinarios, mejora de la infraestructura sanitaria de la explotaciones, eliminación de los portadores y erradicación de los focos clínicos de la enfermedad y finalmente el control oficial del transporte de los animales. Todas estas medidas de acción directa, se complementan con otras indirectas, como son la puesta en marcha de una red de información epidemiológica y el perfeccionamiento del registro y censo de explotaciones porcinas (Informe SGSA, 1988). Las actuaciones llevadas a cabo en el Programa de Lucha contra la Peste Porcina Africana, han permitido avanzar considerablemente en la eliminación de la enfermedad. La actual zona indemne, que abarca más del 90% del territorio del Estado, se mantiene sin incidencia sanitaria desde Septiembre de 1987. La consolidación de la situación sanitaria, ha permitido la apertura y desarrollo de las relaciones comerciales con el resto de los países comunitarios.

Respecto a la actual zona no indemne (Huelva, Córdoba, Sevilla, Badajoz y Salamanca), se está consiguiendo disminuir el números de casos (Informe SGSA 1990). Estas perspectivas, auguran que en un futuro próximo nuestro país estará totalmente libre de la enfermedad.

### 3. ETIOLOGÍA DE LA PPA

El agente etiológico de la PPA es un desoxivirus, de simetría icosaédrica, clasificado hasta el momento dentro de la familia Iridoviridae y pendiente de una nueva clasificación, debido a sus características particulares y a la semejanza que presenta con los Poxvirus. (Ortin y col., 1979, Salas y col., 1981, Almendral y col., 1984).

Este virus, se multiplica exclusivamente en miembros de la familia Suidae y garrapatas del género Ornithodoros, siendo estos últimos los principales vectores de difusión de la enfermedad (Sánchez Botija, 1963, Plowright y col., 1970, Plowright y col. 1974). Estudios morfológicos del virus, realizados en diversos sistemas celulares porcinos (Hess y De Tray, 1960; Moura Nunes y col., 1975; Wardley y col., 1977 y 1979, Forman y col., 1983), así como líneas celulares establecidas de diversas especies animales (Enjuanes y col., 1976, Vigario y col., 1967, Pan y col., 1980), indican que la partícula vírica está constituida por un nucleoide electrondenso, formado por ADN de doble cadena, asociado a una serie de proteínas. Rodeando a este núcleo, se encuentra una membrana lipídica, que a su vez está asociada a otra envoltura más externa, constituida por proteínas. Esta envoltura denominada cápsida, está formada por subunidades repetidas, formando todo el conjunto una configuración icosaédrica (Carrascosa y col., 1984, Moura Nunes y col., 1977). El virus extracelular, se rodea de otra membrana que adquiere al salir de la célula infectada y que no parece ser esencial para la capacidad infectiva (Moura Nunes y col., 1975).

Entre las peculiaridades de este virus, destacan su enorme complejidad molecular y una elevada variabilidad genética y antigénica. Se han descrito más de 100 proteínas entre estructurales y de infección (Tabarés y col., 1980, Santaren y Viñuela, 1986, Esteves y col., 1986, Urzainqui y col., 1987, Alcaraz y col., 1988), sin embargo su papel biológico no está totalmente definido. A pesar, de que se han comparado los

patrones de proteínas reconocidas por sueros de animales supervivientes, con los patrones reconocidos por sueros de animales que no han sobrevivido a la infección, hasta el momento, no se han delimitado qué proteínas pueden ser relevantes en los mecanismos de protección (Alcaraz y col., 1988). Por otra parte, recientemente se han caracterizado una serie de proteínas de infección asociadas a la membrana, que son reconocidas exclusivamente por sueros de animales resistentes (Alcaraz y col., 1989), estudiándose en la actualidad su posible implicación en los mecanismos de protección inmunitaria.

Estudios realizados sobre el genoma del virus, por análisis con endonucleasas de restricción, han permitido determinar la diversidad genética existente entre aislados de diferentes orígenes y brotes (Wesley y Tuthill 1984, Viñuela, 1985, Blasco y col., 1989), así como la detección de subpoblaciones víricas, originadas durante la adaptación del virus a distintos cultivos celulares (Santurde y col., 1985). Mediante análisis de unión con anticuerpos monoclonales frente a partículas víricas del VPPA, se han obtenido hasta seis grupos con homología antigénica, hecho que refleja la existencia de una compleja variedad de serotipos (García-Barreno y col., 1986).

#### **4. INMUNOLOGÍA**

Gran parte de los estudios realizados en los últimos 10 años sobre aspectos inmunológicos de la PPA, han sido encaminados hacia la búsqueda de una vacuna. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, actualmente no se dispone de ningún producto eficaz. La enorme complejidad molecular del virus, la existencia de mecanismos de evasión del virus frente a la respuesta inmune y la no inducción de anticuerpos (Ac) neutralizantes, han sido los principales obstáculos que han dificultado su obtención.

Entre los mecanismos evasores del virus, además de la variabilidad antigénica y genética del virus (mencionados en el

apartado de Etiología), se incluye la infección de las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF). Estas células juegan un papel fundamental en la génesis de la respuesta inmune, actuando como células presentadoras de antígeno y en mecanismos efectores, participando de forma activa en la inflamación.

Se han obtenido animales resistentes a la infección con virus homólogo virulento (Coggins y col., 1968, Hess , 1981, Ruíz Gonzalvo y col., 1986b), observándose actividad inhibidora en el suero de estos animales (Ruíz Gonzalvo y col., 1986a, Knudsen y col., 1987b). Sin embargo por el momento se desconocen los mecanismos inmunológicos responsable de esta resistencia.

El virus es muy inmunogénico, produciendo altos títulos de anticuerpos, pero no se detectan o se detectan en muy bajo título anticuerpos neutralizantes (De Boer, 1967, Ruíz Gonzalvo y col., 1986a). No obstante, los anticuerpos pueden jugar un papel protector frente a la enfermedad. En este sentido, se ha descrito, un retraso en la aparición de síntomas clínicos en lechones alimentados con calostro de cerdas inmunizadas (Schlafer y col., 1984).

La producción de anticuerpos, parece ser dependiente de la virulencia del aislado. Así, cerdos supervivientes de la infección con un aislado de alta virulencia, a los 10 días post-inoculación (dpi), no presentan título de anticuerpos o en baja proporción, mientras que cerdos infectados con virus de virulencia moderada, pueden tener IgM anti-VPPA a partir del 4º dpi e IgG entre el 5º y el 7º dpi (Sánchez-Vizcaíno y col., 1982), presentando los niveles máximos a los 15 dpi para la IgM y entre los 20-35 dpi para IgG total e IgG<sub>2</sub>. Estas últimas fechas, coinciden con la aparición de anticuerpos inhibidores del efecto citopático. Las proteínas víricas implicadas en la inducción de inmunoglobulinas específicas son, fundamentalmente las de aparición temprana (Hortigüela, 1990).

Se han descrito mecanismos citotóxicos mediados por

anticuerpos en cerdos resistentes a la infección de PPA. Norley y Wardley (1982,1983a), han estudiado la actividad citotóxica mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad por anticuerpos dependiente del complemento (CDAC). Si bien, los anticuerpos específicos VPPA se comienzan a detectar durante la 1ª semana post-inoculación, coincidiendo con los máximos niveles de viremia, la actividad ADCC sólo se detecta a partir del 10º-12º dpi y la CDAC aparece en los 12-14 dpi, por lo tanto, estos mecanismos no son efectivos en fases tempranas de infección; sin embargo, podrían participar en la reducción de la viremia y recuperación clínica de los animales (Wardley y col., 1985). Una característica de la actividad CDAC en la PPA, es que dicha lisis es efectiva por la vía clásica y no por la vía alternativa, como ocurre con otros virus, tales como sarampión, paperas, influenza y herpes simple (Sisson y Oldstone, 1980). Por el momento, se desconoce si la aparición de estos mecanismos de forma tardía, se corresponde con la aparición de Ac frente a antígenos minoritarios (relevantes para la protección), cambios de isotipos de las Igs o a un incremento de la afinidad de los anticuerpos con especificidades ya existentes.

Respecto a la inmunidad celular en la PPA, se ha demostrado la existencia de respuesta proliferativa antígeno específica, actividad citotóxica natural (NK) y actividad mediada por linfocitos T citotóxicos, en animales supervivientes.

Durante las primeras semanas post-infección, se observa una marcada linfocitopenia y una disminución de la respuesta proliferativa inducida por antígeno y mitógenos, que se recupera posteriormente a niveles normales en los animales supervivientes (Sánchez-Vizcaino y col., 1981, Wardley, 1982, Kundsén y Genovesi, 1987a). La inhibición que se produce, parece estar mediada por factores solubles, presentes en los sobrenadantes de cultivo de células infectadas con el virus (Wardley, 1982, González y col., 1990).

La actividad citotóxica natural, mecanismo inespecífico de

acción temprana y no restringido por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), también está disminuida en la fase aguda de la enfermedad, retornando a niveles normales en estadios posteriores (Norley y Wardley, 1983b). Dicha actividad, es inhibida por el VPPA, siendo dependiente de la virulencia y de la dosis del aislado vírico (Mendoza y col., 1991).

En la defensa frente a células infectadas por virus, la actividad mediada por linfocitos T citotóxicos, constituye uno de los mecanismos específicos más importantes. Los primeros estudios sobre dicha actividad en PPA, indican que tiene lugar a los 7-8 dpi, sin presentar especificidad para este virus ni restricción a células autólogas (Norley y Wardley, 1984). Posteriormente, otros autores, estudiando esta actividad en cerdos miniatura, singénicos para el complejo principal de histocompatibilidad (SLA), han demostrado actividad específica frente al VPPA reestimulando "in vitro" las células efectoras. La reestimulación con virus infectivo, induce altos niveles de IL-2 en el medio de cultivo (Martins y col., 1988, Mendoza, 1990). Esta interleucina junto con el IFN inducen a su vez, un incremento de la actividad NK y de la actividad citotóxica natural activada por linfoquinas (LAK). Este hecho, podría explicar, la falta de especificidad observada en estadios tardíos de la infección.

Se ha determinado, la presencia de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo, de células esplénicas de cerdo infectadas con aislados de alta y moderada virulencia, siendo mayor la producción tras la infección con el aislado de moderada virulencia (González Juarrero, 1990).

Por otra parte, se ha demostrado por estudios "in vitro" con interferones recombinantes ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) porcino y bovino, el efecto inhibitorio que ejercen sobre la infección vírica con VPPA; observándose mayor actividad con el IFN- $\gamma$  porcino (Esparza y col., 1988, González Juarreo, 1990).

Durante la infección "in vivo" con el aislado DR-II, de moderada virulencia, se produce una modulación en la expresión de los antígenos SLA Clase I y II en los bazos de los cerdos inoculados. Existe una disminución inicial en la expresión de ambos antígenos, seguida de un incremento considerable; debido probablemente a la producción de IFN y otras citoquinas (González Juarrero, 1990). Esta modificación de Ag de SLA clase I y II, es de gran interés, ya que los linfocitos reconocen los antígenos asociados al SLA. En este sentido, un incremento de expresión de clase I, podría favorecer la eliminación de células infectadas, por mecanismos citotóxicos.

## **5. CUADRO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

### **5.1. SINTOMATOLOGÍA**

Los caracteres clínicos de la PPA, son actualmente, muy similares a los de la PPC, siendo imposible, en la práctica, diferenciar ambas enfermedades. El único método eficaz de diagnóstico es la identificación laboratorial, combinando técnicas de detección de anticuerpos y de virus (Sánchez-Vizcaíno, 1987).

Las formas de evolución y el periodo de incubación de la enfermedad dependen, fundamentalmente, de factores como: la vía de penetración o inoculación, la cantidad de virus y virulencia así como la resistencia del cerdo.

El curso clínico de la PPA, puede evolucionar bajo las formas aguda, subaguda, crónica y subclínica o inaparente.

Al iniciarse en España la epizootia de 1960-1962, era frecuente la evolución subaguda (Sánchez Botija, 1963). Las formas crónicas y subclínicas, se han ido incrementando progresivamente en años posteriores, siendo en la actualidad, las que presentan mayor incidencia. Desde un punto de vista epidemiológico, resultan interesantes como posible origen de

animales portadores (Sánchez Botija, 1965).

El período de incubación de la enfermedad natural, en sus diversas formas, varía entre cuatro y ocho días.

En la enfermedad experimental, este período de incubación suele ser más corto, entre 2 y 4 días, en función del origen del aislado, virulencia, vía de inoculación, cantidad de virus y resistencia del animal (Maurer y col., 1958).

La sintomatología de las formas aguda y subaguda, se caracterizan por: fiebre elevada (40°C-42°C), anorexia, tetania, trastornos circulatorios, digestivos y nerviosos seguidos de hipotermia y posterior muerte del animal (Montgomery, 1921, Sánchez Botija y Polo Jover, 1961, Moulton y Coggins, 1968, Castagnoli, 1969, Mebus y Dardiri, 1979, Hess, 1981).

En la evolución crónica, las manifestaciones son muy variables. Suele aparecer adelgazamiento (Hess , 1981), fiebre oscilante (Moulton y col., 1968), neumonía (Sánchez Botija, 1962, Moulton y col., 1975, Pan y col., 1975), artritis (Mebus y Dardiri, 1979) y alteraciones cutáneas ( Sánchez Botija, 1962, Hess, 1981, Galo, 1988). Estas formas, pueden evolucionar hacia la muerte o hacia la recuperación del animal, pudiendo quedar éste o no portador de la enfermedad (forma subclínica). Esta forma subclínica, se origina en el medio natural por la infección de los animales con virus de baja virulencia o por recuperación de las formas aguda o subaguda. Los cerdos están aparentemente sanos, no presentan ningún tipo de manifestación clínica. Al realizar la necropsia, se observan lesiones discretas y se detecta virus en algunos órganos (Sánchez Botija , 1962).

## **5.2. ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Las lesiones macroscópicas de la PPA, corresponden a una inflamación congestivo-hemorrágica, con predominio de fenómenos alterativos y exudativo-infiltrativos en los cursos agudo y

subagudo, y con predominio de fenómenos proliferativos en las formas crónicas y subclínicas.

En las formas **aguda y subaguda**, son frecuentes las hemorragias en distintos órganos así como exudados serosos pericárdicos, pleurales y peritoneales. Los órganos más lesionados son bazo, ganglios linfáticos, corazón y riñones.

En las formas **crónicas** destacan externamente, nódulos, placas necróticas y úlceras en piel siendo también notable la presencia de artritis (Moulton y col., 1968, Galo, 1988) con fibrosis y tenosinovitis. Las alteraciones más significativas se localizan en el bazo, serosas, pulmones, piel, riñones y articulaciones.

## **BAZO**

Presenta una marcada esplenomegalia, coloración negruzca y consistencia friable (Montgomery 1921, Moulton y Coggins, 1968, Castagnoli, 1969, Konno y col., 1972), pudiendo existir infartos múltiples. Histologicamente, se ha descrito congestión y hemorragia en la pulpa roja (Konno y col., 1971, 1972, Mebus y col., 1982), infiltrados de células redondas (Konno y col., 1971, 1972), deplección de los manguitos linfáticos periarteriolas (Mebus y col., 1982), hialinosis de las paredes de las arteriolas centrofoliculares y necrosis en los elipsoides, pulpa roja y blanca (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969, Nunes Petisca y col., 1977, Mebus y col., 1982).

En la enfermedad de curso crónico, el bazo aparece hipertrófico (Konno y col., 1972, Sánchez Botija y Ordás, 1980), apreciándose atrofia folicular con degeneración linfocitaria. Los vasos sanguíneos, presentan tumefacción y proliferación de las células endoteliales y fenómenos regresivos de las paredes vasculares (Konno y col., 1971, Galo, 1988).

El virus se localiza, mayoritariamente en los cordones y

sinusoides de la pulpa roja y en menor cantidad, en la zona marginal de la pulpa blanca (Minguez y col., 1989, Gonzalez Juarrero, 1990).

### **GANGLIOS LINFATICOS**

La intensidad de las lesiones en los ganglios linfáticos es muy variable; en los caso más discretos, existe una adenitis inespecífica, congestión y hemorragia supcapsular en los casos intermedios y hemorragia masiva en los intensamente afectados. Los ganglios gastro-hepáticos, renales e ilíacos son los más afectados por el virus.

Histológicamente, aparecen congestión y hemorragia intensas (Mebus y col., 1982) y edema difuso (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969, Mebus y col., 1982). También se ha descrito, hiperplasia de las células reticulares, necrosis en células de los senos y centros germinales (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969, Nunes Petisca y col., 1976, Mebus y Dardiri, 1979, Sánchez Botija y Ordás, 1980) y presencia de trombos en vasos sanguíneos con paredes necróticas (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969, Nunes Petisca y col., 1976).

Al igual que el bazo, en la evolución crónica, los ganglios están hipertróficos. Al microscopio óptico, se observa hiperplasia de células reticulares en el estroma sinusal y en los centros germinales así como edema y congestión subcapsular. Los vasos sanguíneos muestran tumefacción, proliferación del endotelio y lesiones regresivas de sus paredes (Moulton y Coggins, 1968, Mebus y col., 1982, Galo, 1988).

Por inmunohistoquímica, se ha detectado virus en el seno subcapsular y en menor cantidad, en los senos de las zonas interfoliculares y médula (Minguez y col., 1989).

## **CORAZON**

Destaca la presencia de abundante hidropericardias (Moulton y Coggins, 1968, Sánchez Botija y Ordás, 1980) , en ocasiones, con líquido serohemorrágico (Nunes Petisca y col., 1965). En animales muy afectados, aparecen petequias y equimosis, con una localización subepicárdica y subendocárdica y depósitos de fibrina sobre los velos valvulares (Montgomery, 1921, Moulton y Coggins, 1968, Sánchez Botija y Ordás, 1980, Hess, 1981). Como lesiones más discretas pueden presentar, petequias sobre el cojinete adiposo del surco coronario o sobre las aurículas (Castagnoli, 1969, Sánchez Botija y Ordás, 1980).

Histológicamente, se observa congestión y hemorragia entre las fibras musculares, que en ocasiones presentan degeneración de Zenker (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969).

## **RIÑONES**

Los riñones suelen mostrar petequias corticales, de forma, tamaño y número variable (Maurer y col., 1958, Moulton y col., 1968, Castagnoli, 1969, Konno y col., 1971, Mebus y col., 1979 y 1983, Nunes Petisca y Martins Gonzalves, 1978, Sánchez Botija, 1962, Terpstra, 1987). En ocasiones, estas petequias son pequeñas y numerosas, semejantes a las de la PPC. Los riñones están tumefactos y de color rojo oscuro, generalmente congestivos. En la superficie de corte, pueden aparecer petequias con equimosis en pelvis renal o una congestión cortical y medular (Moulton y col., 1968, Castagnoli, 1969, Mebus y Dardiri, 1979, Sánchez Botija y Ordás, 1980).

El estudio histológico de los riñones revela intensas congestiones y hemorragias intersticiales y glomerulares (Moulton y Coggins, 1968, Colgrove y col., 1969). En el glomérulo, se han descrito diferentes lesiones, tanto en la fase aguda como en la crónica.

En la forma aguda de la enfermedad, los capilares glomerulares presentan en su interior células en necrosis, restos celulares (García e Costa y col., 1980, Quezada, 1988), masas acelulares PAS (+) (Maurer y col., 1958) o trombos hialinos, debilmente teñidos por la eosina (Konno y col., 1971).

Quezada (1988), describe un cuadro de coagulación intravascular diseminada en capilares glomerulares e intertubulares.

La cápsula de Bowman presenta un engrosamiento de las hojas visceral y parietal (Nunes Petisca, 1965a). El espacio urinario contiene, con relativa frecuencia, una sustancia protéica (Maurer y col., 1958, Nunes Petisca, 1965a, Moulton y col., 1968). En ocasiones, también se observan células de descamación, que en ciertos casos, forman semi-lunas (Nunes Petisca, 1965). Ultraestructuralmente, se observa hipertrofia de podocitos, con prolongaciones aumentadas de tamaño (García e Costa y col., 1980).

Las membranas basales glomerulares están engrosadas (Nunes Petisca y col., 1978), por acúmulo de sustancias PAS (+), Mc Manus (+). Los glomérulos sufren fenómenos de retracción, con un aparente aumento del número de núcleos; observándose a los 7 dpi, una hialinización glomerular por acúmulo de sustancia PAS (+) (Nunes Petisca, 1965a, Moulton y col., 1968).

Ocasionalmente, los glomérulos son hiper celulares o presentan un cuadro de glomerulonefritis exudativa serosa (Quezada, 1988).

Slauson y Sánchez-Vizcaíno (1981), han observado depósitos de inmunocomplejos en riñón. La IgG, se encontraba localizada en las membranas basales de los capilares glomerulares y zonas mesangiales y el C3 y el antígeno vírico, en el mesangio fundamentalmente.

Las lesiones tubulares, generalmente son más acentuadas en la zona cortical, sobre todo en las porciones del túbulo contorneado II (distal), siendo menos intensas en los túbulos rectos de Bellini y túbulos colectores (Nunes Pestisca, 1965a). Los túbulos presentan diferentes grados de degeneración. Los primeros días post-inoculación, existe tumefacción celular, seguida de destrucción de la porción apical de las células epiteliales, que se transforman en una masa granulosa en la luz de los túbulos (Nunes Petisca, 1965a, Quezada, 1988). También, se observa frecuentemente, degeneración hialino gutular (Nunes Petisca, 1965a, Konno y col., 1971, Mebus y col., 1979), degeneración grasa (Nunes Pestisca, 1965a) y necrosis total en estadios finales (Nunes Petisca, 1965a, Quezada, 1988). Los túbulos contienen en su interior cilindros hialinos PAS (+), Mc Manus (+) (Moulton y col., 1968, Konno y col., 1971, Mebus y col., 1979, Quezada, 1988). Según Terpstra (1987), la lesión degenerativa de los túbulos colectores y el depósito de sustancia proteinácea en sus luces, representa una lesión diferencial con la PPC.

En el espacio intersticial intertubular, destacan lesiones vasculares (Moulton y col., 1968, Nunes Petisca y col., 1978, García e Costa y col., 1980). La presencia de infiltrados inflamatorios es poco notable (Nunes Pestisca, 1965a); en los casos en que aparecen, están formados por linfocitos (Mebus y col., 1983) y macrófagos (García e Costa y col., 1980).

Para Konno y col. (1971), la PPA en riñón tiene una fase proliferativa que distiende el tejido intersticial, donde proliferan células reticuloendoteliales, células redondas basófilas y células plasmáticas. Este tipo de células, también se observan alrededor de los túbulos (Mebus y col. 1983).

En la forma crónica, la lesión más destacable es la presencia de glomérulos hipertróficos, hipercelulares y exangües que se corresponden con una glomerulonefritis proliferativa (Sánchez Botija y Ordás, 1980). Se observan pequeños focos

proliferativo-infiltrativos de células mononucleares (linfocitos, plasmocitos, linfoblastos y células de tipo epitelioide) y algunos polimorfonucleares dispersos en el parénquima, que destruyen progresivamente los diferentes elementos de la nefrona. El tejido renal no afectado por este tipo de alteración, puede presentar desde una nefropatía esencialmente regenerativa, hasta una glomerulonefritis crónica, con intensa producción de tejido conjuntivo (Nunes Pestisca, 1965b, Galo, 1988). En los túbulos, se observan imágenes de degeneración del epitelio tubular, principalmente en la zona cortical, semejantes a la descritas en la enfermedad aguda. También existe tumefacción y proliferación de las células endoteliales en vasos de pequeño calibre así como alteraciones regresivas de las paredes vasculares (Galo, 1988).

Diversos autores han observado por técnicas inmunohistológicas y microscopía electrónica, antígeno y virus de la PPA en riñón. Colgrove y col. (1969) y Pan (1987), describen inmunofluorescencia positiva en macrófagos intersticiales y en algunas células de los glomerulos. Pan, también observa positividad en microtrombos localizados en capilares glomerulares e intertubulares y en células mesangiales, de cerdos que murieron de PPA aguda.

Ultraestructuralmente, se ha observado replicación vírica en monocitos circulantes, células endoteliales de los capilares glomerulares de la corteza renal y en macrófagos intersticiales de la corteza y médula renal (García e Costa y col., 1980, Quezada, 1988, Sierra y col., 1989). Sierra y col. indican que un 28,8% del total de macrófagos intersticiales existentes en los riñones de cerdos inoculados con el aislado de alta virulencia E-70, contenían zonas de replicación o viriones.

## **PULMONES**

En la PPA, la cavidad torácica puede presentar hidrotórax con petequias subpleurales en ambas pleuras (Konno y col. 1969). Los pulmones presentan congestión y edema de forma constante,

causando una dilatación de tabiques interlobulares (Nunes Petisca, 1965a, Moulton y col., 1968, Konno y col., 1969, Nunes Petisca y col., 1978, Mebus y col. 1979, 1981). También, se han observado focos de hepatización roja y gris en los lóbulos apicales y cardíaco, con fenómenos de necrosis y contenido sero-espumoso o hemorrágico en los bronquios (Nunes Petisca, 1965a).

Histológicamente, los pulmones muestran intensas congestiones y hemorragias en las paredes alveolares, con fenómenos necróticos, donde ocasionalmente se localizan eosinófilos y algunos neutrófilos (Moulton y col., 1968). El tejido conjuntivo interlobulillar y los espacios peribronquiales contienen líquido seroso y células inflamatorias, en su mayoría necróticas con cariorrexis y en las luces de los alveolos, aparecen células de descamación y hematies (Nunes Petisca, 1965, Moulton y col., 1968, Colgrove y col., 1969, Mebus y col., 1979).

Los bronquios y bronquiolos, contienen en las luces un exudado de células mononucleares necróticas, mucina, fibrina y células epiteliales descamadas (Moulton y col., 1968, Mebus y col., 1979).

Es frecuente, la existencia de infiltrados inflamatorios peribronquiales (Nunes Petisca, 1965a) y alrededor de los tabiques interlobulillares (Nunes Petisca y col., 1978).

Existe trombosis de los vasos linfáticos y sanguíneos, con células linfoides en fases de desintegración (Mebus y col., 1979) e hipertrofia del epitelio respiratorio, por hiperplasia de las células caliciformes (Nunes Petisca, 1965a).

En los cursos crónicos y subclínicos de la enfermedad, las alteraciones que tienen lugar en los pulmones son muy significativas. Pueden presentar neumonía caseificante, que se manifiesta como focos necróticos de diverso tamaño (Moulton y col., 1975, Sánchez Botija y Ordás, 1980, Galo, 1988), de

consistencia firme y color blanquecino y localización variable, pudiendo afectar a un lóbulo completo. Posteriormente, estos focos pueden sufrir un reblandecimiento, transformándose en caseum y experimentar una calcificación distrófica y encapsulamiento. El resto del pulmón y sobre todo, las áreas adyacentes a los focos, presentan congestión y enfisema vicariante (Moulton y col., 1975, Sánchez Botija y Ordás, 1980). La proliferación de tejido conjuntivo es más acentuada en los tabiques interlobulillares e interalveolares, delimitándose las zonas necróticas en secuestros (Nunes Petisca, 1965a).

En todos los tipos de neumonía, hay asociadas pericarditis y pleuritis, sobre todo de tipo fibrinoso, con adherencias a la pared torácica y depósito de fibrina (Montgomery, 1921, Nunes Petisca, 1965a, Mebus y Dardiri, 1979, Sánchez Botija y Ordás, 1980, Galo, 1988).

Histológicamente, la neumonía se manifiesta por abundantes infiltrados de células mononucleares y PMN perivasculares, peribronquiales y en los tabiques interlobulillares, que aparecen muy engrosados (Nunes Petisca, 1965a, Moulton y Coggins, 1968 Moulton y col., 1975, Galo, 1988). Las luces de los bronquios, bronquiolos y alveolos aparecen repletas de células de infiltración inflamatoria: linfocitos, linfoblastos, células plasmáticas, PMN, mastocitos y células de descamación (Nunes Petisca, 1965, Moulton y col., 1975, Galo, 1988). Los infiltrados, pueden sufrir necrosis (Nunes Petisca, 1965a) y calcificarse, quedando encapsulados por tejido conjuntivo (Moulton y col., 1975, Galo, 1988). También se ha descrito, la presencia de microtrombos en zonas edematoso-necróticas. Por la disposición de las lesiones, el mecanismo de expansión más frecuente es la vía hematógena o linfohematógena (Nunes Petisca, 1965a, Galo, 1988).

Moulton y col. (1975) y Pan y col. (1975), describen la presencia de infiltrados de células mononucleares en las tunicas media y adventicia de los vasos, así como depósitos de fibrina

en las paredes alveolares, luces alveolares y bronquiales.

Mediante inmunofluorescencia, se ha observado antígeno vírico en macrófagos intersticiales de los septos alveolares (Colgrove y col., 1969, Pan y col., 1975, 1987) y replicación en los macrófagos intravasculares pulmonares (MIP) de los capilares septales (Carrasco y col., 1989, Sierra y col., 1990). En el interior de dichos capilares, aparecen restos celulares, probablemente, de macrófagos destruidos por el virus (Pan y col., 1975, Carrasco y col., 1989, Sierra y col., 1990).

## HÍGADO

Las lesiones que presenta este órgano no se consideran patognomónicas de la PPA, pero existen una serie de alteraciones a considerar.

Destaca, la presencia de congestión más o menos intensa en las formas agudas de enfermedad (Montgomery, 1921, Moulton y col., 1968), no observándose lesiones macroscópicas en las formas crónicas.

Histológicamente, las lesiones más frecuentes se han descrito en la forma aguda. En el tejido conjuntivo interlobulillar y portal, se observa edema (Nunes Petisca, 1965a, Konno y col., 1971, Mebus y col., 1979), hemorragia, congestión e infiltrados, formados por diferentes tipos celulares: macrófagos (Moulton y col., 1968, Nunes Petisca y col., 1978, Sierra y col., 1987), linfocitos (Maurer y col., 1958, Sierra y col., 1987), eosinófilos (Moulton y col., 1968, Colgrove y col., 1969, Sierra y col., 1989) y células linforeticulares en general (Mebus, 1987). En ocasiones, existe separación y destrucción en las fibras de colágeno y reticulina (Konno y col., 1971, Nunes Petisca, 1965a). Los infiltrados invaden los sinusoides, sobre todo en zonas donde existe necrosis de hepatocitos (Moulton y col., 1968, Konno y col., 1971).

También aparecen células de núcleo picnótico y espacios de Disse dilatados en los sinusoides hepáticos (Mebus y col., 1982).

Como consecuencia de la alteración de las paredes de los capilares, se observan "lagos sanguíneos" en las venas centrolobulillares y sinusoides hepáticos (Nunes Petisca, 1965a).

Existe hipertrofia, hiperplasia y necrosis de las células de Kupffer (Mebus y col., 1979, 1982, Konno y col., 1971, Nunes Petisca, 1965a, Sierra y col., 1987). La necrosis de las células de Kupffer (Colgrove y col., 1969, Sierra y col., 1987) y de los hepatocitos es consecuencia de la replicación viral (Sierra y col., 1987). Los hepatocitos presentan hipercromatosis parieto nuclear y áreas claras redondeadas citoplasmáticas correspondientes, por microscopia electrónica, a centros de replicación vírica (Sierra y col., 1987, Gómez-Villamandos y col., 1989). Igualmente, se observan diferentes grados de degeneración y necrosis de los hepatocitos (Konno y col., 1971, Mebus y col., 1981, Sierra y col., 1987, Gómez-Villamandos y col., 1989).

En la evolución crónica, se observa como cuadro más representativo la proliferación y movilización de células de Kupffer, así como focos de proliferación e infiltración celular. Estos focos, están constituidos por linfocitos, linfoblastos, plasmocitos, células de tipo epitelioides y polimorfonucleares, localizándose tanto en el parénquima como en el tejido conjuntivo interlobulillar. Los vasos muestran imágenes regresivas de sus paredes, con tumefacción y proliferación de las células endoteliales (Galo, 1988).

Ocasionalmente, se observa fibrosis interlobulillar e hiperplasia del conducto biliar (Moulton y col., 1968).

Se ha descrito, la formación de focos de células mieloides (eritroblastos o granuloblastos) alrededor de la venas

centrolobulillares, conjuntivo interlobulillar y área media de los lobulillos (Konno y col., 1971).

## **6. PATOGENIA**

En el curso agudo y subagudo de la PPA, el cuadro histopatológico principal, lo constituye la alteración vascular presente en los distintos órganos. Existen diferentes hipótesis sobre los posibles mecanismos que la generan.

Las hemorragias, pueden deberse al daño vascular causado por la replicación del virus en las células endoteliales (Wilkinson y Wardley, 1978, Quezada, 1988) y plaquetas (Neser y col., 1986); trombocitopenia (Edwards y col., 1985a), formación defectuosa de coágulos de fibrina o por combinación de las dos últimas (Edwards y col., 1984), entre otras.

El virus se replica, fundamentalmente en las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF), sin embargo, existen otras células susceptibles a la infección : hepatocitos (Sierra y col., 1989), células reticulares (Pan, 1987), plaquetas (Neser y col., 1986), megacariocitos (Edwards y col., 1985b), células endoteliales (Quezada y col., 1990, Pérez, 1992), neutrófilos (Casals y col., 1984) y células epiteliales de canaliculos biliares (Pérez, 1992). Únicamente se ha observado replicación del VPPA en estas células, en inoculaciones con aislados de alta virulencia excepto en los megacariocitos.

El tipo de interacción que tiene lugar entre el virus y las células del SMF depende del aislado vírico. Los aislados de alta virulencia, producen citólisis con la consiguiente liberación de sustancias procoagulantes y proteasas (Edwards y col., 1984), mientras que los aislados de moderada virulencia o atenuados, originan infecciones crónicas o persistentes con la aparición de animales portadores (Pan y col., 1970, Hess y col., 1977, Wardley y col., 1979, Mebus y col., 1980).

Se ha descrito replicación "in vitro" del virus en las células endoteliales (Wilkinson y Wardley, 1978), sin embargo en infecciones naturales, hay un incremento en la producción de factor VIII de la coagulación, lo cual indica la ausencia de lesión difusa en las células endoteliales (Edwards y col., 1984). Posteriormente, Quezada y col. (1989) han observado replicación vírica en células endoteliales de los capilares glomerulares, lo cual podría representar el mecanismo desencadenante de la vía extrínseca de la coagulación. Las plaquetas, liberarían hemolisina, ocasionando un daño temprano en los hematies (Wardley y Wilkinson, 1977), que a su vez liberarían tromboplastina y ADP; parámetros incrementados en el curso de la enfermedad aguda. Los niveles del ADP, son un 30% superiores a los valores normales el 4º dpi; presentando los animales anemia hemolítica (Edwards y col., 1984, Anderson y col., 1987).

La trombocitopenia, no se desarrolla al iniciarse la viremia y la fiebre como en la PPC, sino 4-5 días después, retornando a niveles normales a los 13 dpi, a pesar de la presencia continua de grandes cantidades de virus circulante (Edwards y col., 1985). La trombocitopoyesis y el tiempo de supervivencia de las plaquetas, se mantienen en niveles normales (Edward y col., 1984).

Los test de coagulación, también están alterados (incremento del tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de coagulación de trombina), durante la infección con aislados de alta virulencia (Edwards y col., 1984, Anderson y col., 1987). Por otra parte, existe un aumento de los productos fibrinolíticos y de fibrina monómera (Edwards y col., 1985, Naser y col., 1987), probablemente debido a la alteración de la capacidad fagocitaria del S.M.F. (Sánchez-Vizcaíno y col., 1981, Martins y col., 1988b).

Las prostaglandinas (PG) pro y anti-agregantes, producidas por macrófagos, plaquetas y células endoteliales, pueden jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad, provocando la agregación plaquetaria. En el curso de la enfermedad aguda,

se ha observado, un aumento considerable de PGE<sub>2</sub> liberada por los macrófagos, concomitante con una trombocitopenia acentuada y una disminución de la producción de PGI<sub>2</sub> por las células endoteliales; permaneciendo en límites normales el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), producido por los macrófagos y plaquetas (Anderson y col., 1987).

Otro posible mecanismo inductor del consumo de plaquetas, es la formación de inmunocomplejos (IC) (Edward y col., 1985). Animales inoculados con el aislado DR-79, de moderada virulencia, presentan trombocitopenia y anticuerpos anti-VPPA, entre el séptimo y octavo día post-inoculación, siendo más precoz la trombocitopenia en animales previamente sensibilizados. Por otra parte, también existe consumo de complemento, la disminución se inicia entre el quinto y noveno día post-inoculación, siendo más patente entre el decimo-octavo y vigésimo sexto día post-inoculación (Edwards y col., 1985). El consumo de complemento, puede estar motivado, por una disminución en el número de macrófagos al ser infectados por el VPPA. Otra causa, podría ser la captación de complemento, por anticuerpos fijadores ya que la producción de este tipo de anticuerpos, coincide con el descenso acentuado del complemento (Edwards y col., 1985).

Todas estas hipótesis enumeradas anteriormente, se pueden considerar como los mecanismos responsables de la coagulación intravascular diseminada (CID) (McKay, 1968). La CID, está potenciada por ciertas citoquinas, tales como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tisular (TNF- $\alpha$ ), producidas fundamentalmente por los macrófagos. Estas citoquinas, activan las células endoteliales, desequilibrando la homeostasis hacia la coagulación e inflamación (Bevilacqua y col., 1984, 1986).

Según Pan (1987), la CID observada en cerdos muertos en la fase aguda de la enfermedad, es debida a las alteraciones de los vasos sanguíneos, al daño tisular y a la formación de IC solubles. Las lesiones vasculares, afectan principalmente a los vasos de pequeño calibre y capilares del bazo (Konno y col., ,

1972, Moulton y col., 1968, Nunes Petisca y col., , 1977), ganglios linfáticos (Colgrove y col., 1969, Moulton y col., 1968, Nunes Petisca y col., 1977, Mebus y col., 1983), riñón (Pan, 1987, Sánchez-Botija, 1980), piel (Moulton y col., 1968, Galo, 1988), sistema nervioso central (Moulton y col., 1968), pulmón (Pan y col., 1975) e hígado (Sierra y col., 1987).

La formación de IC, es un mecanismo fisiológico de eliminación de virus por las células del SMF del hígado, bazo y pulmón. Los complejos generados, dependen de las concentraciones de Ag y Ac. En exceso de Ac o equivalencia, los complejos son de mayor tamaño, relativamente insolubles y se eliminan rápidamente. Los complejos generados en exceso de antígeno, son solubles, de menor tamaño y circulan durante periodos prolongados. Estos IC se depositan en vasos de pequeño calibre, fundamentalmente en zonas con presión y turbulencia sanguíneas elevadas (glomérulo renal, plexo coroideo y sinovium), originando reacciones de hipersensibilidad.

Los IC formados por Ac de las clases IgG o IgM son capaces de fijar complemento, pudiendo desencadenar procesos inflamatorios graves. Al interaccionar con el complemento, se genera C3a y C5a, que poseen propiedades anafilatóxicas y quimiotácticas e inducen la liberación de aminas vasoactivas por los mastocitos y basófilos. Estas aminas vasoactivas, provocan un incremento en la permeabilidad vascular y atraen células polimorfonucleares, que liberan enzimas lisosómicas, causando daño tisular.

No obstante los IC, también pueden interaccionar con las plaquetas por el receptor Fc, provocando su agregación así como la formación de microtrombos y el aumento de permeabilidad por la liberación de aminas vasoactivas. Por su parte, la formación de microtrombos favorece la CID.

Un modelo experimental desarrollado para estudiar la patología producida por los IC, es la enfermedad del suero. Según

la especie animal en que se desarrolle, los mecanismos patogénicos difieren. Así, en el conejo, el depósito de IC en tejidos, es dependiente de la histamina, liberada en un proceso mediado por IgE y PAF de los basófilos y las plaquetas (Benveniste y col., 1972, 1976), mientras que en la rata, la fuente mayoritaria de tales mediadores son los mastocitos (histamina) y macrófagos (PAF) (Mencia-Huerta y Benveniste, 1979).

En el caso de la PPA, Slauson y Sánchez-Vizcaino (1981) han descrito, que la liberación de aminas vasoactivas por las plaquetas, tiene lugar por una amplificación en la degranulación (antígeno-específica) de los basófilos circulantes, es decir, que la estimulación con antígeno vírico, permitiría la producción policlonal de inmunoglobulina incluida la IgE. Esta inmunoglobulina, situada en la superficie del basófilo, reaccionaría con el antígeno, causando degranulación y liberación de PAF, que activaría la agregación plaquetaria secundaria, con liberación a su vez, de aminas vasoactivas.

En la enfermedad de curso crónico, las lesiones pulmonares constituyen el cuadro histopatológico más representativo. La demostración in vitro de hipersensibilidad retardada en estos animales (Shimizu y col., 1977), sugiere la posibilidad de que la inmunidad celular puede jugar un papel importante en la patogenia de estas lesiones, ya que la necrosis observada en la neumonía intersticial, probablemente no se deba exclusivamente a la acción lesiva del virus.

## II. OBJETIVOS

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La patogenia de la PPA no está totalmente definida, existiendo diferentes hipótesis sobre los mecanismos responsables de las lesiones que causan la muerte de los animales o que les conducen a un estado de crónicos o portadores inaparentes. La mayoría de los trabajos se han centrado fundamentalmente en el estudio de los estadios agudo y subagudo de la enfermedad, siendo menos frecuentes los estudios sobre estadios crónicos. Por este motivo se ha considerado como objetivo principal de este tesis estudiar la evolución de las lesiones histopatológicas en animales infectados experimentalmente con un aislado atenuado.

Los órganos seleccionados para este estudio han sido hígado, pulmón y riñón, por presentar diferente grado de afectación durante la infección y poseer gran riqueza en células del sistema mononuclear fagocitario.

El estudio ha sido centrado en los siguientes objetivos:

- Estudio cronológico de la persistencia del virus en dichos órganos y análisis de las poblaciones celulares infectadas por el virus.
- Realización de un estudio histopatológico del hígado, pulmón y riñón, observándose la evolución de las lesiones desde los primeros estadios hasta un año después de la inoculación (desde la infección aguda hasta la cronicidad)
- Caracterización de los infiltrados inflamatorios y correlación de la presencia de distintas subpoblaciones linfocitarias con la resistencia a la enfermedad.
- Determinación de la posible implicación de la respuesta inmune en la patogenia de la enfermedad.

### III. MATERIALES Y METODOS

## 1. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

### SOLUCIONES

#### Tampón HEPES pH 7,2

Na Cl	0,12 M
K Cl	5 mM
HEPES	20 mM

#### Tampón HEPES - glucosa 0,1% (Tampón de lavado) pH 7,2

Tampón HEPES

Glucosa isotónica al 5%

#### Solución de Cationes

Ca Cl <sub>2</sub>	2%
Mg Cl <sub>2</sub>	1%

#### Solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,4

Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	6	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	mM
Na Cl	0,12	M
K Cl	2,7	mM

#### Solución salina tamponada con TRIS (TBS) pH 7,6

TRIS	0,05	M
Na Cl	0,145	M

El pH se ajusta con HCl 1N.

#### Solución de lavado (ELISA)

NaCl	0,145 M
Tween 20	0,05% (p/v)

#### Solución de sustrato OPD pH 4,8 (ELISA)

Acido cítrico	0,067 M
Citrato sódico	0,108 M

OPD                    2 mg/ml (disuelto en metanol)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                    0,03 %

**Solución para revelado de la peroxidasa**

TRIS HCl pH 7,6            0,048 M  
DAB                        0,6 mg/ml  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%                    0,025 %

**Solución para revelado de la fosfatasa alcalina**

TRIS HCl pH 8,2            0,05 M  
Naftol AS-MX fosfato    0,02 % (p/v)  
DMFA                        2 % (v/v)  
Levamisol                    0,24 ng/ml  
Fast-blue                    1 mg/ml

Se filtra antes de usar.

Ambas soluciones de revelado se preparan inmediatamente antes de su utilización.

**Glicerina tamponada pH 8**

TRIS HCl (pH 8,5)            0,06 M  
Glicerina                    90% (v/v)  
N-Propilgalato                5% (p/v)

**Azul de toluidina**

Azul de toluidina                    20 mg  
NaCl 0,9%                    40 ml  
Etanol 96%                    11 ml  
Saponina saturada en etanol al 50%    1 ml

Se centrifuga a 1.500 g durante 15 minutos. Se lleva a ebullición, se enfría y se pasa a través de un filtro de 0,2  $\mu$ .

## **MEDIOS DE CULTIVO CELULAR**

### **Medio libre**

RPMI-1640 (Flow, Escocia)  
L-Glutamina (Flow) 2 mM  
Piruvato sódico (Flow) 2 mM

### **Medio completo o medio C**

Medio libre

SFB (Flow) 15%

En este medio se cultivan las células de mieloma.

### **Medio completo con hipoxantina o medio CH**

Medio C

Hipoxantina (Sigma, USA) 0,1 mM

Medio para cultivo de los hibridomas.

### **Medio completo con hipoxantina y azaserina o medio CHA**

Medio CH

Azaserina (Sigma) 0,01 mM

Medio de selección de los híbridos. Se utiliza durante los 10-14 primeros días de la fusión.

### **PEG 50%**

Solución para fusionar las células. Se funde el PEG en autoclave a 1 atmósfera durante 15 min. y antes, de que solidifique, se agrega un volumen igual de medio libre. El pH se ajusta entre 7,5-8.

### **Medio de congelación de células**

SFB (inactivado) 95%

DMSO (Merck, Alemania) 5%

### **Medio de adherencia para monocitos-macrófagos**

Tampón HEPES

Medio C 10%

Solución de cationes 1%

Glucosa al 5% 2%

## **2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y POLIMORFONUCLEARES A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA**

Una vez recogida la sangre, en condiciones estériles, con anticoagulante (EDTA 5 mM, concentración final), se añadió una solución de Dextrano T-500 (Pharmacia, Suecia) al 6% en PBS (6 ml por 25 ml de sangre), completando hasta 50 ml con tampón de lavado. Se homogenizó y se dejó sedimentar durante 30 minutos, a continuación, se recogió el sobrenadante, centrifugándose a 400 g, durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón de lavado y se colocó sobre una solución al 45% de Percoll (Pharmacia) en PBS. Este gradiente se centrifugó a 400 g, sin freno, durante 15 min. a 20°C. Se obtuvieron dos fracciones, una interfase formada por células mononucleares y un sedimento de hematíes y células polimorfonucleares.

La interfase, se lavó dos veces con tampón de lavado, centrifugándose a 300 g durante 10 min.

Para eliminar los hematíes del sedimento, se realizó una lisis con agua destilada durante 30 segundos. Se añadió cloruro sódico al 3,5% en la proporción 1:3. Las células, se lavaron a continuación con el tampón de lavado. Posteriormente se hizo recuento celular de ambas fracciones con azul de toluidina, para diferenciar células mononucleares de polimorfonucleares.

### **2.1. SEPARACIÓN DE MONOCITOS Y LINFOCITOS**

Una vez obtenidas las células mononucleares, se incubaron con medio de adherencia a una concentración de  $10^7$  células/ml, en frascos de cultivo de plástico o vidrio (indistintamente), durante 1 hora y 30 min., en un incubador a 37°C y con atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se realizaron 5 lavados con el medio de adherencia para separar las células no adherentes al plástico (linfocitos), de las adherentes (monocitos). Para despegar los monocitos, se añadió EDTA 10 mM en PBS, dejando los frascos de cultivo a 4°C durante 20 min. Pasado este tiempo, se

desprendieron las células con ayuda de una varilla especial; en ambos casos se lavaron las células, centrifugando a 300 g durante 10 min. Una vez realizado el recuento celular y la viabilidad con azul Tripan al 0,2% en PBS, se resuspendieron en medio completo.

Para determinar la pureza de las células adherentes, se efectuó una tinción de esterasas inespecífica (Lagotent y col, 1978).

Los monocitos, se utilizaron para inocular los ratones, así como para el muestreo de los hibridomas y la caracterización de los Acm.

## **2.2. SEPARACIÓN DE LINFOCITOS T Y B**

Se realizó según el método descrito por Pescovitz y col. (1984). Se preparó una columna de vidrio con lana de nylon y se rellenó con ácido clorhídrico 0,1 N. Se lavó con agua destilada hasta conseguir pH 7. Una vez estabilizada, se añadió medio completo a 37°C. Se dejó en estas condiciones durante 30 min. a 37°C y posteriormente se retiró el medio y se pasó la suspensión celular, a una concentración entre 30-50 x 10<sup>6</sup> células mononucleares/ml, incubándose 30 min. a 37°C. Las células no adheridas al nylon (linfocitos T), se eluyeron en medio completo. Para extraer las células adherentes (linfocitos B), se retiró la lana y se despegaron mecánicamente con el émbolo de una jeringuilla. Se efectuó un recuento de ambas poblaciones, y se utilizaron, al igual que en el caso anterior, para la técnica de inmunofluorescencia indirecta en suspensión. El control de pureza de células T, se efectuó mediante la técnica de formación de rosetas con eritrocitos de carnero (Madsen y col., 1980).

## **3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE TIMO, BAZO Y GANGLIO LINFÁTICO DE CERDO**

Se recogieron los órganos, del matadero de Legazpi (Madrid), en solución salina; se disgregaron en medio libre y se

filtraron por una malla metálica, los hematies del bazo se lisaron por un choque osmótico hipotónico con agua destilada, obteniéndose suspensiones celulares, de las que se tomaron unas alícuotas para determinar la viabilidad y el recuento celular.

Estas células, se utilizaron en la inmunización de los ratones (timocitos) y en la caracterización de los hibridomas.

#### **4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

##### **4.1. INMUNIZACIÓN DE LOS RATONES**

Se inmunizaron 4 ratones hembras Balb/c, de 4 semanas de edad, por vía intraperitoneal, dos con  $10^7$  timocitos de cerdo y dos con  $2 \times 10^6$  monocitos de sangre periférica de cerdo. Las inoculaciones se realizaron los días 0, 15 y 24 para los timocitos y los días 0, 20 y 40 para los monocitos. Tres días después de la última dosis, se sangraron los ratones para determinar, mediante un ELISA indirecto, el título de anticuerpos frente a los inmunógenos.

Tres días antes de la fusión, se inoculó por vía intravenosa una dosis de recuerdo.

##### **4.2. CULTIVO DE CÉLULAS DE MIELOMA**

En ambas fusiones, se utilizaron células plasmocitarias de la línea no secretora F(0), derivada del tumor MOP-21. Las células se cultivaron con medio completo, en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, en un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

Al efectuar las fusiones, las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico.

Para la congelación tanto de los mielomas como de los hibridomas, se recogieron las células en tubos de fondo cónico, centrifugándose a 300 g durante 10 min. Una vez retirado el

sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en medio de congelación a una concentración de  $10^7$  células/ml, alicuotándose en criotubos. Se efectuó una congelación progresiva, colocando los criotubos 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y después en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Tras la descongelación en un baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ , las células se lavaron con medio de cultivo.

#### **4.3. PREPARACIÓN DE CAPA NUTRITIVA**

Las placas de cultivo, se sembraron 24 horas antes de efectuar la fusión, con una suspensión de timocitos de ratones Balb/c de 3 semanas de edad. El número de timocitos por pocillo fue de 250.000, 500.000 y  $10^6$  para placas de 96, 48, y 24 pocillos respectivamente.

#### **4.4. FUSIÓN**

Se realizó siguiendo el protocolo de Mínguez y col. (1.988), con ligeras modificaciones. Las células de bazo del ratón inmunizado, se mezclaron con las células de mieloma, en una proporción 5:1 y se fusionaron añadiendo 1 ml de PEG 4.000 al 50%, gota a gota, durante 1,5 min. Seguidamente, se añadieron lentamente 20 ml de medio libre, a una velocidad de 1 ml/min. A continuación, se centrifugaron las células a 200 g, durante 10 min y se resuspendieron en 30 ml de medio CHA. Se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a  $37^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  durante 24 h. Al día siguiente, se desprendió suavemente el tapiz celular, se centrifugaron las células a 400 g durante 5 min y se resuspendieron en medio CHA, sembrándose en placas de cultivo de 96 pocillos, previamente tapizadas con timocitos, a razón de  $3 \times 10^5$  células/pocillo.

#### **4.5. SELECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA FUSIÓN**

Los híbridos se seleccionaron con el medio CHA, durante

10-12 días, renovándose el medio cada 2-3 días. Al cabo de estos días se mantuvieron en medio CH.

La presencia de anticuerpos específicos de interés, se determinó, mediante un ELISA indirecto de los sobrenadantes de los pocillos que presentaban colonias en crecimiento. Las colonias positivas, fueron expandidas a placas de 48 y 24 pocillos sucesivamente, para su posterior clonaje.

#### **4.6. ELISA INDIRECTO**

El muestreo de los hibridomas positivos obtenidos en las distintas fusiones, se realizó mediante un ELISA indirecto, según el método descrito por Epstein y col. (1.985), con algunas modificaciones. Se depositaron, entre 250-300 x 10<sup>3</sup> células por pocillo (timocitos o monocitos según la fusión), resuspendidas en 100 µl, fijándose por calor a 60°C durante 30 minutos.

Antes de utilizar las placas, se neutralizaron con 200 µl de BSA (Sigma) durante 1 hora a 37°C, se lavaron con solución de lavado y se añadieron 100 µl/pocillo de cada sobrenadante de los cultivos, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Como controles negativos, se utilizaron sobrenadantes de cultivo de mieloma y como control positivo, suero de conejo anti-PBL de cerdo. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las placas con solución de lavado 3 veces y se añadió el conjugado, IgG de conejo anti-IgG de ratón marcada con ureasa. Las placas se incubaron 30 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces, igual que en el paso anterior y se añadieron 100 µl del sustrato de la ureasa (CSL, England), volviéndose a incubar durante 30 min. a 37°C, finalizados los cuales, se realizó la lectura de la absorbancia con espectrofotómetro, a 450 y 620 nm.

#### **4.7. CLONAJE**

El clonaje se realizó por dilución límite, a razón de 3,1

y 0,3 células por pocillo. Los pocillos con colonias aisladas y positivas, fueron expandidos y reclonados. Una vez reclonados, se seleccionaron por su distribución histológica en órganos linfoides (ver 3.18.2.1. Técnicas Inmunohistoquímicas).

Los clones que presentaban un patrón histológico interesante, se expandieron nuevamente y se pasaron a frascos de 25 y 75 cm<sup>2</sup>. Una parte de las células, fueron congeladas en nitrógeno líquido y otra parte, inoculadas a ratones para producir líquidos ascíticos.

#### **4.8. PRODUCCIÓN DE LÍQUIDOS ASCÍTICOS**

Se emplearon ratones Balb/c, hembras de más de 6 meses, inyectados vía intraperitoneal con 0,5 - 1 ml de pristano (2, 6, 10, 14 Tetrametil pentadecano) (Sigma), al menos 10 días antes de la inoculación del hibridoma. Estos ratones se inocularon con 0,5 - 2 x 10<sup>7</sup> células por vía intraperitoneal. Los líquidos ascíticos, obtenidos por céntesis peritoneal, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se congelaron en alicuotas a - 40°C.

#### **4.9. DETERMINACIÓN DEL ISOTIPO DE LOS ACM**

Se determinó por la técnica ELISA indirecta, en las mismas condiciones que en el muestreo de los hibridomas. Una vez incubadas las células con los sobrenadantes de cultivo de cada Acm, se añadieron 100 µl/pocillo de los distintos anti-isotipos de inmunoglobulinas de ratón (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgM) y cadenas ligeras (Kappa y Lambda), marcados con peroxidasa (Bio Rad, USA). Tras la hora de incubación a 37°C, se lavaron las placas, revelándose la reacción con 100 µl de OPD/pocillo, frenándose a continuación, con ácido sulfúrico 3N. La lectura de la absorbancia, se realizó con un espectrofotómetro a 450 y 620 nm.

## 5. OTROS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Además de los anticuerpos monoclonales producidos, en la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes Acm:

Acm	Especificidad	Referencia
74.12.4	CD4, Células T cooperadoras	Pescovitz et al. 1984
76.2.11	CD8, Células T citotóxicas	" "
74.22.15	Macrófagos y granulocitos	" "
5 C9	Ig M	Paul et al. 1985
F1C3	Ig G	Malagón et al. 1986
PAL-E	Endotelio	Schlingerman et al. 1985

Todos estos Acm son específicos de cerdo, excepto el PAL-E (anti endotelio humano) (SANBIO, Holanda), que presenta reacción cruzada con endotelio de cerdo.

## 6. PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE CONEJO ANTI FIBRINÓGENO DE CERDO

Se inmunizaron conejos, intradérmicamente con 200-250  $\mu$ g de fibrinógeno de cerdo (Sigma), vehiculado en adyuvante completo de Freund (1ª dosis) y adyuvante incompleto (dosis siguientes), a intervalos semanales, durante 3 semanas. A los diez días de la última dosis, fueron sangrados los conejos de la arteria central de la oreja. La sangre se dejó coagular a 37°C durante 1 hora, y se mantuvo hasta el día siguiente, a 4°C. Se recogió el suero, centrifugándose a continuación a 800 g durante 15 min. Este suero se precipitó, añadiendo sulfato amónico saturado, a una concentración final del 40%, gota a gota, en agitación constante. Se mantuvo durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se lavó 2 veces con sulfato amónico al 40%, centrifugándose a 1.200 g durante 10 min. El sedimento final, se resuspendió en el menor volumen posible y se dializó frente a tampón carbonato-bicarbonato 0,25 M pH 9.

## **7. CONJUGACIÓN DE ANTISUERO DE CONEJO CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCENCIA**

Una vez dializada la fracción de gammaglobulinas, se determinó la concentración protéica y se ajustó a 20 mg/ml. Se añadieron 50  $\mu$ g de isotiocianato de fluoresceína por mg de proteína total y se mantuvo la mezcla en agitación toda la noche a 4°C.

Para separar la proteína conjugada, del fluorocromo libre, se pasó la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrada con PBS. Una vez obtenido el conjugado, se tituló por inmunofluorescencia para determinar la dilución óptima de trabajo.

## **8. CONJUGACIÓN DE SUERO DE CERDO CON ENZIMAS**

### **8.1. PEROXIDASA**

La purificación parcial de las gammaglobulinas de cerdo anti-VPPA se llevó a cabo, siguiendo el método descrito por Arias y col. (1.984).

El marcaje con peroxidasa, se efectuó según el protocolo de oxidación con metaperyodato descrito por Nakane (1.979), con algunas modificaciones. 5 mg de peroxidasa (Sigma), se disolvieron en 1 ml de PBS y se trataron con 0,1 ml de DNFB (Sigma) al 1% en etanol absoluto, a temperatura ambiente. Después de 30 min., se añadieron 0,1 ml de metaperyodato sódico 0,3M, dejando transcurrir la reacción en oscuridad durante 30 min., luego, se cromatografió la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada en PBS, recogándose la fracción coloreada.

1 mg de la peroxidasa activada, se mezcló con 0,1 ml de fracción gammaglobulinica (1 mg/ml) junto con 0,1 ml de tampón carbonato-bicarbonato 1M pH 9,6 y se mantuvieron a 4°C, durante 18 horas. Luego, se añadió 1 mg de borohidruro sódico (Sigma) y

después de media hora, se dializó frente a PBS-25% de glicerina. Finalmente, el conjugado obtenido, se resuspendió en 5 ml de PBS con 1% de BSA y 25% de glicerina y se tituló por ELISA indirecto, conservándose a 4°C con mertiolate al 1/10.000.

## **8.2. FOSFATASA ALCALINA**

Las inmunoglobulinas purificadas, se conjugaron con fosfatasa alcalina siguiendo el método descrito por Avrameas (1969).

2 mg de fracción gammaglobulínica se disolvieron en 0,5 ml de PBS y se mezclaron con 5 mg de fosfatasa alcalina (Sigma), a temperatura ambiente. La mezcla se dializó frente a PBS a 4°C y se añadió glutaraldehído, a una concentración final del 0,2%, incubándose durante 2 horas, a temperatura ambiente. Tras ser dializado frente a PBS y TBS 0,05 M pH 8 a 4°C, se diluyó con TBS 1% BSA y mertiolate al 1/10.000, conservándolo a -40°C.

## **9. INOCULACIÓN DE LOS ANIMALES PROBLEMA CON VPPA**

En este trabajo, se utilizó el aislado de VPPA E-75 (procedente de Lérida), parcialmente atenuado por cuatro pases en la línea celular CV<sub>1</sub> (ATCC, CCL70).

Se utilizaron dieciocho cerdos miniatura, de seis meses de edad, SLA haplotipo dd, desparasitados 2-3 meses antes de iniciar el experimento. Doce, se inocularon vía intramuscular, con 10<sup>4</sup> UHA<sub>50</sub>/ml por animal (nº 7-13) y los seis restantes (nº 1-6), fueron controles sin infectar.

## **10. DETERMINACIÓN DE LA VIREMIA**

A lo largo del experimento, se determinaron los niveles de viremia de los animales inoculados, mediante la técnica de hemoadsorción (Malmquist y col. 1.960). Una vez coagulada la sangre extraída de cada animal, se centrifugó, recogiendo el

coágulo para macerarlo en PBS e inocularlo en cultivos de leucocitos de cerdo, observándose durante 10 días la aparición de hemoadsorción.

El suero, se utilizó para la determinación del título de anticuerpos anti-VPPA (ver 3.18.1.2. Inmunofluorescencia indirecta).

## **11. TOMA DE MUESTRAS Y FIJACIÓN**

Los cerdos, se sacrificaron con pistola de bala cautiva e inmediato degüello. Una vez sangrados, se procedió a realizar la necropsia completa y ordenada, según técnica habitual y se procedió al estudio macroscópico de todos los órganos, seleccionándose los órganos objeto de estudio. Las muestras para el estudio histológico, se fijaron en formol tamponado al 10%, durante 24-48 horas a temperatura ambiente.

## **12. PROCESADO E INCLUSIÓN DE MUESTRAS**

Las piezas para inmunohistología, se tallaron en pequeñas porciones cúbicas de 0,5 x 1 x 0,5 cm y se congelaron rápidamente, según el método descrito por Chu y col. (1.983). Se colocó una gota de OCT (Miles, USA) sobre un disco de corcho y se congeló por los bordes, introduciéndolo en isopentano (Fluka Ag, Alemania), previamente enfriado en nitrógeno líquido. Sobre la parte central líquida, se colocó la pieza a congelar debidamente orientada y recubierta de OCT, efectuándose la congelación total de la pieza. Concluido el proceso, el material se conservó en cajas de poliestireno, individualizado en bolsas de celofán, en congelador de -70°C.

Las piezas para microscopía óptica, se tallaron en porciones de aproximadamente 4 y 2 mm de espesor, según se incluyeran en paraplast o Epon-araldita. Previamente, se deshidrataron en series crecientes de alcoholes, empleando el procesador de tejidos Autotechnicon Mono Mod. 2A (Technicon Corporation, USA);

incluyéndose en parafina sintética "Paraplast" (Sherwood Medical) con punto de fusión entre 56-58°C. A continuación, se confeccionaron los bloques con el conjunto modular de inclusiones Tissue Tek III, (Miles, USA), empleando como soporte cassettes de plástico.

En la inclusión en Epon-Araldita, los cortes se deshidrataron también en series crecientes de etanol, aclarándose a continuación en óxido de etileno. Incluyéndose, en una mezcla de resinas de Epon -Araldita, según Mollenhauer (1.964), polimerizándose en moldes de silicona o cápsulas Been, en estufa a 70°C durante 24 horas.

### **13. REALIZACIÓN DE CORTES**

#### **PARAPLAST**

Se realizaron cortes de 3-4  $\mu$  con un microtomo de parafina, tipo Minot modelo 1512 (Leitz, Alemania), con cuchillas de acero desechables.

#### **EPON-ARALDITA**

Se realizaron cortes de 2-3  $\mu$  en microtomo Minot (Leitz), empleando cuchillas de vidrio tipo Ralph, obtenidas con un tallador de cuchillas modelo 2078 (LKB, Suecia). Los cortes, se deplastificaron con etóxido de sodio y se hidrataron, con pases sucesivos en metanol-benceno, acetona, etanol de 96% y agua destilada.

#### **CONGELACIÓN**

Las piezas a cortar, una vez sacadas del congelador de -70°C, se introdujeron en el criostato (IEC. Daimon, Inglaterra) para equilibrar su temperatura con la de éste.

Se efectuaron cortes de 4 a 6  $\mu$  , que se dejaron secar al

aire, a temperatura ambiente durante 8 horas. Estos cortes, fueron utilizados directamente o conservados a  $-40^{\circ}\text{C}$ , envueltos en papel de aluminio.

#### **14. TINCIONES HISTOLÓGICAS**

Como métodos generales de tinción para microscopía óptica, se emplearon las técnicas de:

- Hematoxilina - Eosina
- Tricrómico de Masson
- Tricrómico de Gallego (IV variante)
- Acido Peryódico de Schiff (P.A.S.)
- Rojo Congo de fluorescencia
- Plata Metenamina
- PTAH
- Azul Prusia
- Carmin de Best
- Rojo Aceite O

#### **15. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Se realizaron técnicas de inmunofluorescencia (directa e indirecta), inmunoperoxidasa e inmunofosfatasa alcalina (indirecta, directa y doble marcaje).

##### **15.1. INMUNOFLUORESCENCIA**

###### **a) Suspensiones celulares**

Se estudió, por inmunofluorescencia indirecta, la reactividad que presentaban los AcM con suspensiones celulares de sangre periférica (PBL totales, monocitos, linfocitos T, B y PMN), timo, bazo y ganglio linfático. Para ello, se incubaron en tubos de 3 ml de polietileno,  $1-2 \times 10^6$  células (previamente lavadas con PBS-ázida 0,01% - BSA 0,1%), con  $100 \mu\text{l}$  de líquido ascítico (diluido 1/100 en el mismo tampón). Se colocaron los

tubos a 4°C, en un baño de hielo fundente con agitación ocasional. A los 45 min, se lavaron las células con el tampón, 2 veces, centrifugándolas cada vez a 300 g durante 10 min. Tras el último lavado, se incubaron con 100 µl de un antisuero de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con isotiocianato de fluorescencia (DAKOPATTS, Dinamarca) diluido 1:20, durante 45 min, a 4°C con agitación ocasional. Las células se lavaron, como en el paso anterior, decantándose el sobrenadante en el último lavado y dejando el sedimento en su volumen residual o resuspendiéndolo en 400 µl del tampón de fijación (PBS-ázida 0,01% - paraformaldehído 1%), dependiendo del sistema utilizado para analizar las muestras (microscopía óptica o citometría de flujo).

Como control negativo, se incubaron las células con el antisuero conjugado con FITC.

Las suspensiones de las distintas poblaciones celulares de sangre periférica, se analizaron con un microscopio de epifluorescencia simultáneamente con iluminación transmitida, para determinar el porcentaje de células que presentaban fluorescencia de membrana, contándose al menos 200 células/Acm estudiado.

Las suspensiones de bazo, timo y ganglio linfático se analizaron con un citómetro de flujo FACSCAN (Beckton Dickinson, USA). En cada muestra, se analizaron un mínimo de 5.000 células/Acm. Los datos se presentan como histogramas, en los que se representa en abscisas el logaritmo de fluorescencia y en ordenadas el número de células totales.

## **b) Secciones histológicas**

En todas las técnicas, se utilizaron cortes de congelación sin fijación química previa, excepto en la determinación de antígeno vírico por inmunofluorescencia directa, en la cual, los cortes se fijaron en acetona fría, durante 10 minutos.

## 1. Directa

El ensayo directo se efectuó para los siguientes estudios:

- Determinación de antígeno vírico en cortes de congelación de hígado, pulmón y riñón, de cada uno de los animales inoculados con el VPPA, según la técnica descrita por Bool y col. (1.969). Se incubaron las preparaciones con un suero de cerdo anti-VPPA marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), diluido 1:20 en PBS. Como control negativo, se utilizó un suero de cerdo anti-VPPC marcado con FITC.
- Determinación de la presencia de depósitos de inmunocomplejos (C3 y gammaglobulinas totales) y fibrina, en riñón y pulmón de los cerdos inoculados.

Las preparaciones, se incubaron durante 30 min. con los siguientes antisueros marcados con FITC, diluidos en PBS:

- Suero de conejo anti-gammaglobulinas totales de cerdo (1:25)
- Suero de conejo anti-C3 de cerdo (Cappel, USA) (1:20)
- " " " anti-fibrinógeno de cerdo (1:20)

Una vez transcurrido el período de incubación, se lavaron las preparaciones, 3 veces en PBS, durante 5 minutos cada vez, montándose en glicerina tamponada pH 8, para observarlas al microscopio de epifluorescencia.

## 2. Indirecta

Con esta técnica se realizaron los siguientes estudios:

- Determinación de los niveles de anticuerpos específicos frente al VPPA, en los sueros de los animales problema, desde la 1ª semana post-inoculación

hasta la fecha de sacrificio. Se siguió la técnica descrita por Sánchez Botija y col. (1969).

- Análisis de la presencia de depósitos de IgM, IgG e IgA en riñón y pulmón de los animales infectados, según la técnica descrita por Slauson y col. (1981).

En primer lugar, las preparaciones se incubaron durante 30-45 min con los siguientes antisueros:

- Acm anti-IgM de cerdo (5C9) (sobrenadante de cultivo sin diluir)
- Acm anti-IgG de cerdo (F1C3) (líquido ascítico 1:20)
- Suero de conejo anti IgA de cerdo (Miles Yeda, Israel) (1:40)

Tras las incubaciones, se lavaron las preparaciones en PBS, como en la técnica directa, revelándose la reacción con antisueros marcados con FITC (DAKOPATTS): suero de conejo anti-Ig de ratón en los dos primeros casos y suero de cabra anti-Ig de conejo para el suero policlonal, diluidos en PBS (1:50), durante 30 min. Lavadas las preparaciones, se montaron en glicerina tamponada para examinarlos al microscopio.

## **15.2. INMUNOPEROXIDASA E INMUNOFOSFATASA ALCALINA.**

### **1. Indirectas**

Estas técnicas de inmunoperoxidasa e inmunofosfatasa alcalina se efectuaron para los siguientes estudios:

- Selección de los Acm por su distribución histológico, en órganos linfoides (timo, bazo y ganglios).
- Reactividad de los Acm en hígado, riñón y pulmón.
- Variaciones cualitativas y cuantitativas de las

poblaciones linfoides, en los órganos estudiados de los cerdos inoculados con VPPA.

- Caracterización de infiltrados inflamatorios focales en dichos órganos.

Todas las incubaciones, se realizaron en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los lavados entre cada dos etapas consecutivas, se efectuaron, 2 veces con TBS 50 mM pH 7,6 (5 min. cada vez), mientras que los lavados de los cromógenos se hicieron con agua destilada.

En ambos casos, se siguió la metodología descrita por Mínguez y col., (1988) con algunas modificaciones. Los cortes secos, se incubaron con los Acm diluidos 1:40 - 1:80, en TBS 50 mM con 1% de BSA, durante 45 min. Tras los lavados, se incubaron con inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas con peroxidasa o fosfatasa alcalina, diluidas 1:20 en TBS 50 mM, con 30% de suero de cerdo. A los 45 min., una vez lavadas, las preparaciones se incubaron con los cromógenos. En el caso de la inmunoperoxidasa, la reacción de la diaminobencidina con el peróxido de hidrógeno se dejó desarrollar durante 12 min., obteniéndose un color pardo. Contrastándose la preparación con hematoxilina de Carazzi (30 sg). Posteriormente, las preparaciones se deshidrataron y se montaron en Depex (Serva, Alemania). La presencia de peroxidasa endógena, no pudo inhibirse con los métodos normalmente utilizados ya que se neutralizaba la reacción de anticuerpos monoclonales.

En el caso de la inmunofosfatasa alcalina, la fosfatasa endógena se inhibió con levamisol (Sigma), revelándose la reacción durante 25 min. con naftol AS-MX fosfato (Sigma) y fast-blue (Sigma), obteniéndose un color azul intenso. Las preparaciones, se contrastaron con rojo nuclear nuclear (45 sg.), montándose con gelatina tamponada.

## **2. Directas**

Se realizaron, para determinar la presencia de virus en los órganos estudiados. Para ello, se incubaron las preparaciones con un suero policlonal de cerdo anti-VPPA conjugado con peroxidasa o con fosfatasa alcalina (diluido 1:20 en TBS 50 mM), durante 30 min. revelándose la reacción, una vez lavadas las preparaciones, con el cromógeno correspondiente.

En la técnica de inmunoperoxidasa, se realizó un control negativo de virus, incubando la preparación con la solución cromógena de la peroxidasa para diferenciar el antígeno vírico, de los eosinófilos que presentan peroxidasa endógena y por tanto se tiñen también de color pardo.

## **3. Ensayo de doble marcaje con peroxidasa y fosfatasa alcalina**

Esta técnica, se realizó para determinar qué poblaciones celulares de los órganos estudiados, estaban infectadas por el VPPA. Para ello, en primer lugar, se efectuó una inmunofosfatasa alcalina indirecta con los diferentes AcM y a continuación, se hizo una inmunoperoxidasa directa, incubando IgG de cerdo anti-VPPA marcadas con peroxidasa (diluido 1:10 en TBS), durante 45 min. Tras el revelado de esta segunda reacción, se montaron las preparaciones con gelatina tamponada para su estudio microscópico. Las células con doble marcaje, presentaban una tinción citoplásmica de color pardo y una tinción de membrana de color azul, que se correspondía con la expresión de antígeno vírico y de antígenos de membrana respectivamente.

En todas estas técnicas inmunoenzimáticas, se incluyeron como controles un AcM irrelevante, tampón de dilución y soluciones de cromógenos.

## **16. ESTUDIO MICROSCÓPICO E ICONOGRAFÍA**

Las observaciones de microscopía óptica, se llevaron a cabo en un microscopio Orthoplan, provisto de cámara Orthomat transistorizada (Leitz), con la que se obtuvieron las micrografías.

Las preparaciones de inmunofluorescencia, se observaron en un microscopio Ortholux con dispositivo de fluorescencia por luz incidente Ploewopak 2.1 (Leitz), provisto de cámara WILD, con la que se realizaron las micrografías.

## **17. ANÁLISIS DE IMÁGENES**

Las preparaciones inmunohistológicas seleccionadas para el estudio de las variaciones cuantitativas de las poblaciones celulares, se analizaron con un microscopio AH-2 (VanoX-T) (OLYMPUS, Japon), con cámara de vídeo JVC-CCD conectado a un ordenador ADI DM 1502 y un programa VIDS-III para sistemas de medidas analíticas.

## IV. RESULTADOS

## **1. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Se realizaron 2 fusiones, una con timocitos de cerdo y otra con células adherentes al plástico de sangre periférica de cerdo.

De la fusión con timocitos, se seleccionaron, por un ELISA indirecto, diez colonias positivas, de las cuales, una vez clonadas y expandidas, se seleccionaron tres hibridomas por su patrón histológico en órganos linfoides.

Estos 3 Acm (2B8, 1C5, 1E7) pertenecían a la subclase IgG2a y poseían cadena ligera tipo Kappa.

En la fusión frente a células adherentes, se detectaron mediante ELISA indirecto, nueve pocillos con colonias secretoras, de las cuales, una vez clonadas y expandidas, se seleccionó por su distribución histológica en órganos linfoides, un hibridoma (1G1), el cual pertenecía a la subclase IgG2b y cadena ligera tipo Kappa.

La monoclonalidad de estos anticuerpos, se comprobó mediante un espectro electroforético de los líquidos ascíticos.

## **2. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES**

### **2.1. REACTIVIDAD CON SUSPENSIONES CELULARES**

Con el fin, de determinar el porcentaje de reactividad de los Acm producidos con diferentes subpoblaciones leucocitarias sanguíneas y con células de timo, bazo y ganglio (obtenidas según 3.4.1, 3.4.2. y 3.5 de Materiales y Métodos), se realizó una inmunofluorescencia indirecta en suspensión. En sangre periférica, el Acm 1G1, obtenido de la fusión con células adherentes al plástico, reaccionó preferentemente con macrófagos (P+) y polimorfonucleares (PMN) (52,3 y 57,6 % respectivamente). Los Acm 1C5, 2B8 y 1E7, obtenidos de la fusión con timocitos de cerdo, reconocieron porcentajes elevados y similares, tanto de

leucocitos totales como de las diferentes estirpes celulares (Tabla I).

Al realizar el mismo estudio, con las suspensiones celulares de timo, ganglio y bazo y analizar los resultados por citometría de flujo, se observó que los Acm 2B8, 1C5 y 1E7, reaccionaban prácticamente con la totalidad de las células, en los tres órganos estudiados (Fig. 1). El Acm 1G1, en el timo reconoció un bajo porcentaje de células (8%), en ganglio y bazo, reaccionó con el 32 y 41% de las células, respectivamente (Fig. 2) (Tabla II).

**TABLA I**

<b>Acm</b>	<b>PBL</b>	<b>P<sup>+</sup></b>	<b>P<sup>-</sup> N<sup>-</sup></b>	<b>P<sup>-</sup> N<sup>+</sup></b>	<b>PMN</b>
<b>1G1</b>	<b>26±4,2</b>	<b>52,3±15,5</b>	<b>24,4±8,3</b>	<b>38,5±16,9</b>	<b>57,6±10,5</b>
<b>2B8</b>	<b>85,5±4,8</b>	<b>80,6±2,5</b>	<b>64,4±7,8</b>	<b>56,3±13,5</b>	<b>53,3±7,5</b>
<b>1C5</b>	<b>86,5±4,9</b>	<b>71,6±9,2</b>	<b>66,7±8,3</b>	<b>58,5±12,8</b>	<b>46±15,8</b>
<b>1E7</b>	<b>60,5±2,1</b>	<b>61,3±6,8</b>	<b>60,2±17,9</b>	<b>54,3±9,5</b>	<b>54,5±6,9</b>

Porcentajes de células reconocidas por los Acm 1G1, 2B8, 1C5 y 1E7, en suspensiones celulares sanguíneas de leucocitos totales (PBL), monocitos-macrófagos (P<sup>+</sup>), linfocitos T (P<sup>-</sup> N<sup>-</sup>), linfocitos B (P<sup>-</sup> N<sup>+</sup>) y polimorfonucleares (PMN). Los datos, están expresados como la media ± la desviación estandar de cuatro experimentos. El porcentaje de células fluorescentes específicas, se calculó sustrayendo a la fluorescencia total, la fluorescencia basal obtenida con el conjugado.

**TABLA II**

<b>Acm</b>	<b>TIMO</b>	<b>GANGLIO</b>	<b>BAZO</b>
<b>1G1</b>	<b>8,1±1,5</b>	<b>32,4±6,4</b>	<b>41±8,1</b>
<b>2B8</b>	<b>94±0,8</b>	<b>83,5±2,8</b>	<b>86,6±4,1</b>
<b>1C5</b>	<b>96±0,3</b>	<b>85,9±3,5</b>	<b>90,6±7,7</b>
<b>1E7</b>	<b>96,2±0,5</b>	<b>86,3±4,1</b>	<b>91±4,9</b>

Porcentajes de células reconocidas por los Acm 1G1, 2B8, 1C5 y 1E7 en suspensiones celulares de timo, ganglio y bazo. Los datos están expresados como la media  $\pm$  la desviación estandar de cuatro experimentos. El porcentaje de células fluorescentes específicas, se calculó sustrayendo a la fluorescencia total, la fluorescencia basal obtenida con el conjugado.

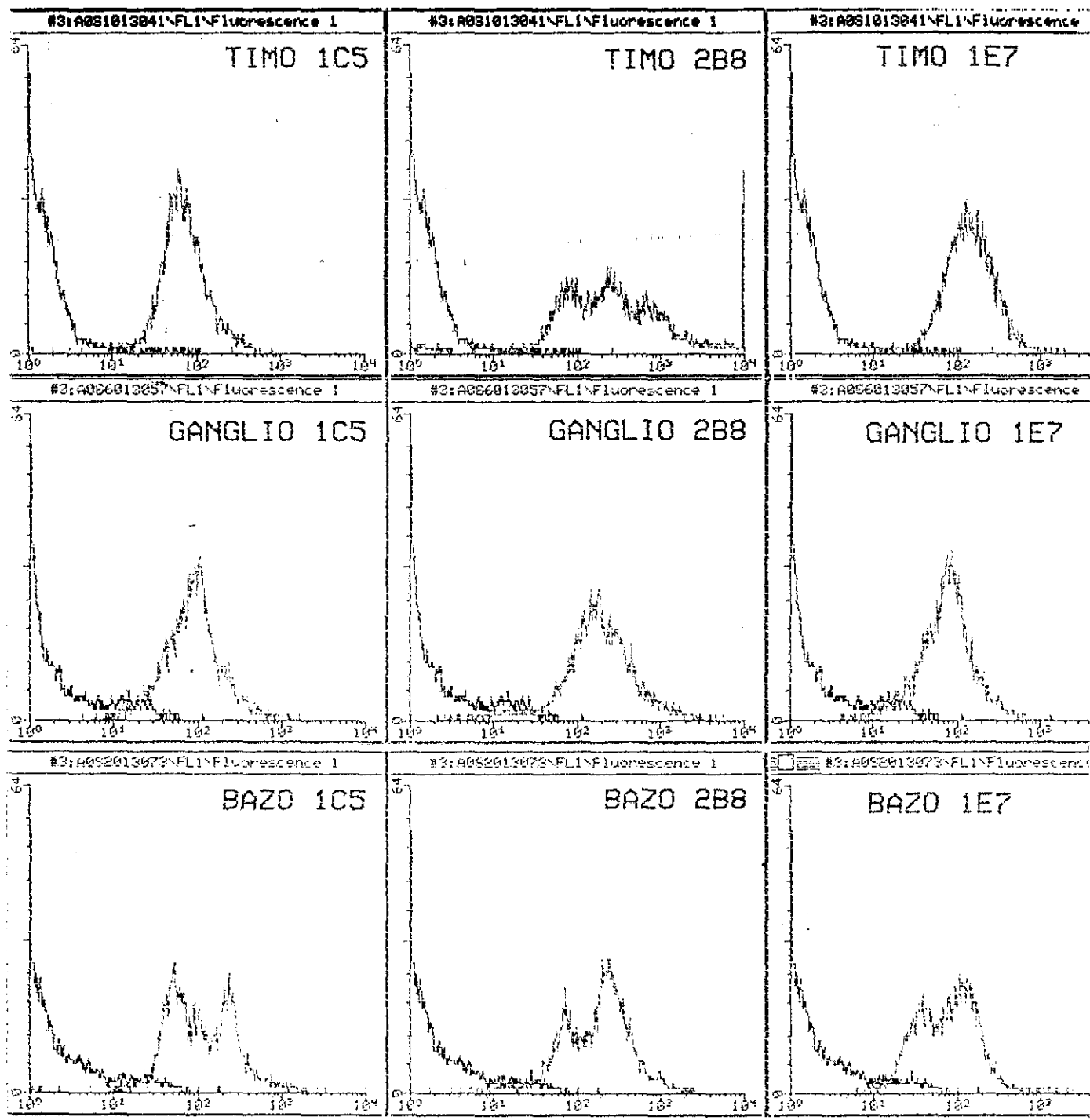
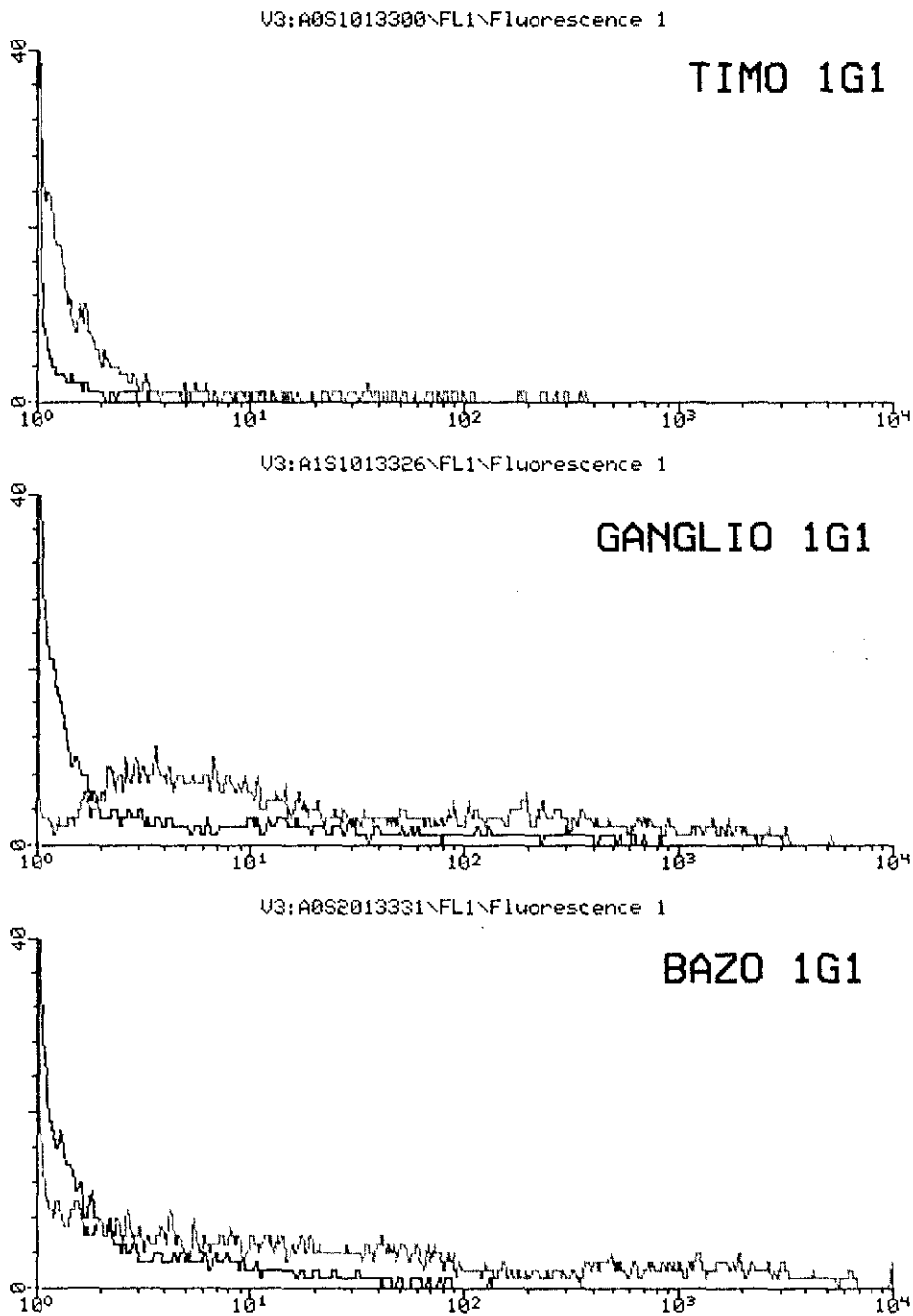


Fig. 1. Histogramas de las células reconocidas en timo, ganglio y bazo, por los AcM 1C5, 2B8 y 1E7 (color gris) y los controles negativos (color negro). Intensidad de fluorescencia (lg) en abcisas frente a células totales en ordenadas.



**Fig. 2.** Histogramas de las células reconocidas en timo, ganglio y bazo por el AcM 1G1 (color gris) y los controles negativos (color negro). Intensidad de fluorescencia (lg) en abscisas frente a células totales fluorescentes en ordenadas.

## **2.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

Se estudió la distribución de las células reconocidas por los distintos anticuerpos monoclonales, mediante técnicas de inmunoperoxidasa e inmunofosfatasa alcalina indirectas. Como patrones de distribución histológica, se utilizaron los anticuerpos monoclonales: anti-CD4 (74.12.4), anti-CD8 (76.2.11) y anti-macrófagos (74.22.15). Esta caracterización, se realizó en cortes histológicos de criostato, de órganos linfoides (timo, bazo y ganglios linfáticos) y órganos no linfoides (hígado, pulmón y riñón) de cerdos sanos, sin fijación previa.

### **2.2.1. ORGANOS LINFOIDES**

#### **TIMO (Fig. 3)**

Los Acm 2B8, 1C5 y 1E7, reaccionaron prácticamente con la totalidad de las células de la corteza y médula tímica; siendo la tinción, más intensa en la zona medular que en la zona cortical. El Acm 1C5, también reaccionó con los endotelios. El Acm 1G1 reaccionó, intensamente células aisladas de la zona cortical y en la zona medular, con grupos dispersos de células, así como células localizadas en el límite cortico-medular del timo. Los tabiques conjuntivos también se tiñeron con este Acm.

#### **GANGLIO (Fig. 4)**

Con los Acm 2B8, 1C5 y 1E7, se observó una tinción intensa y difusa de las áreas interfolicular y paracortical. En los folículos linfoides, tiñeron numerosas células de los centros germinales, existiendo una diferencia neta entre la intensidad de marcaje de la corona y el resto del folículo, sobre todo, con el Acm 1C5. Este Acm, además reaccionó con los endotelios de arteriolas y vénulas post-capilares.

El Acm 1G1 reaccionó con células de las áreas interfoliculares y de los centros germinales de los folículos

linfáticos; además, tiñó de forma intensa, algunas células de los senos.

#### **BAZO (Fig. 5)**

En la pulpa blanca, los Acm 2B8 y 1E7 reconocieron un alto porcentaje de células de los MLPA y de la zona marginal, mientras que el Acm 1C5 solamente reaccionó con algunas células dispersas de los MLPA y de la zona marginal. Los tres Acm presentaron una tinción débil en folículos.

En la pulpa roja, con los Acm 2B8 y 1E7, se observaron numerosas células teñidas, siendo el marcaje menos intenso con el Acm 1C5. Este último, también teñía las vainas elipsoidales que rodean a los capilares arteriales terminales (elipsoides).

Con el Acm 1G1, se observó un marcaje intenso tanto en la pulpa blanca como roja. En la pulpa blanca, reaccionó con células redondeadas, en los centros germinales de los folículos secundarios y con células de morfología estrellada, en los MLPA. En la pulpa roja, la tinción fue intensa en los elipsoides y en algunas células aisladas de los cordones.

La tinción, en general, fue de membrana y en ocasiones intracitoplásmica.

En el bazo, los elipsoides, cuando se tiñeron, presentaron una tinción de fondo.

Fig. 3. Caracterización histológica de los anticuerpos monoclonales en cortes de criostato de timo de cerdo. Inmunofosfatasa alcalina indirecta, revelada con fast-blue y contrastada con rojo nuclear.

a) Acm 2B8: Tinción de zona cortical y medular , la intensidad de reacción es mayor en la zona medular (M) que en la cortical (C) X 416.

b) Acm 1C5: Tinción semejante a la del Acm 2B8. Observese la tinción de las vénulas post-capilares ( → ) X 416.

c) Acm 1E7: Tinción uniforme de la zona medular y cortical X 350

d) Acm 1G1: Detalle de grupos dispersos de células teñidas en el límite cortico-medular X 1040.

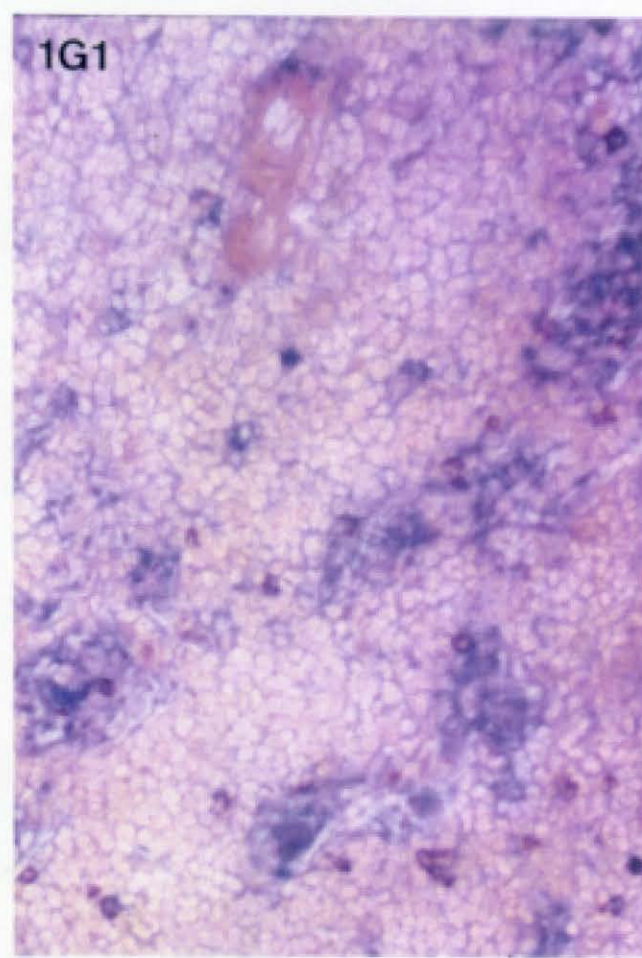
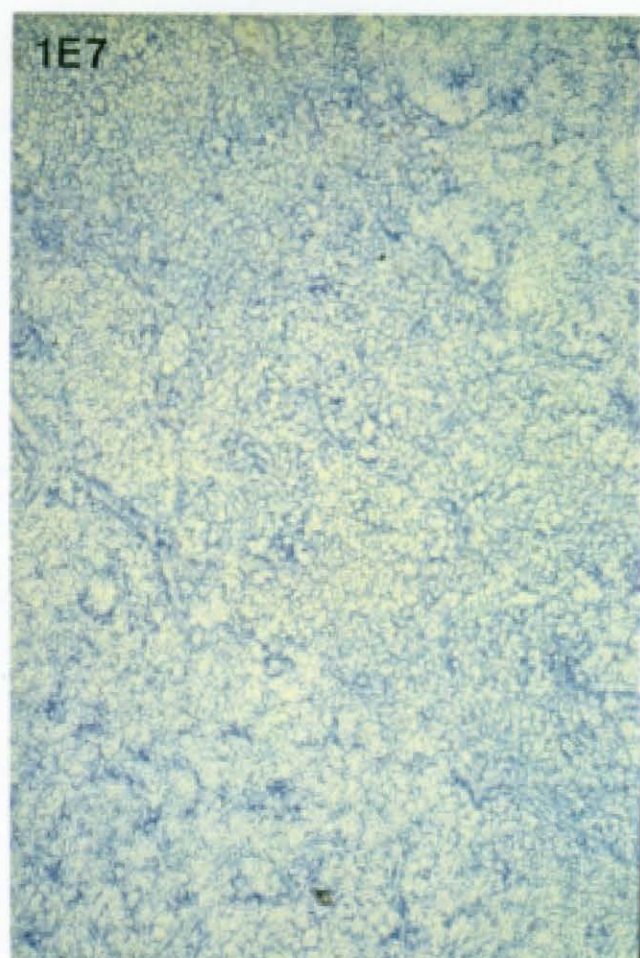
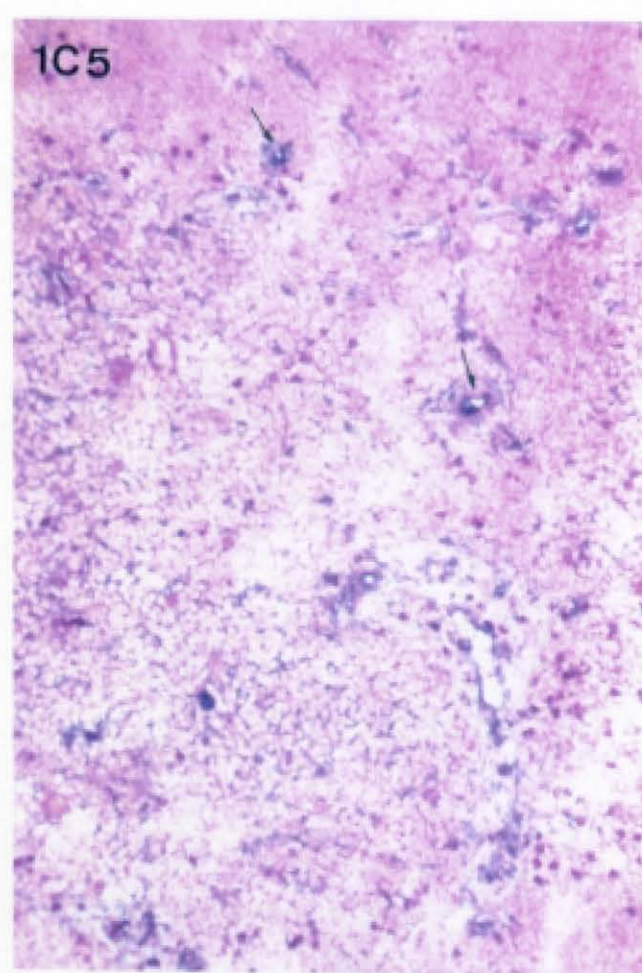
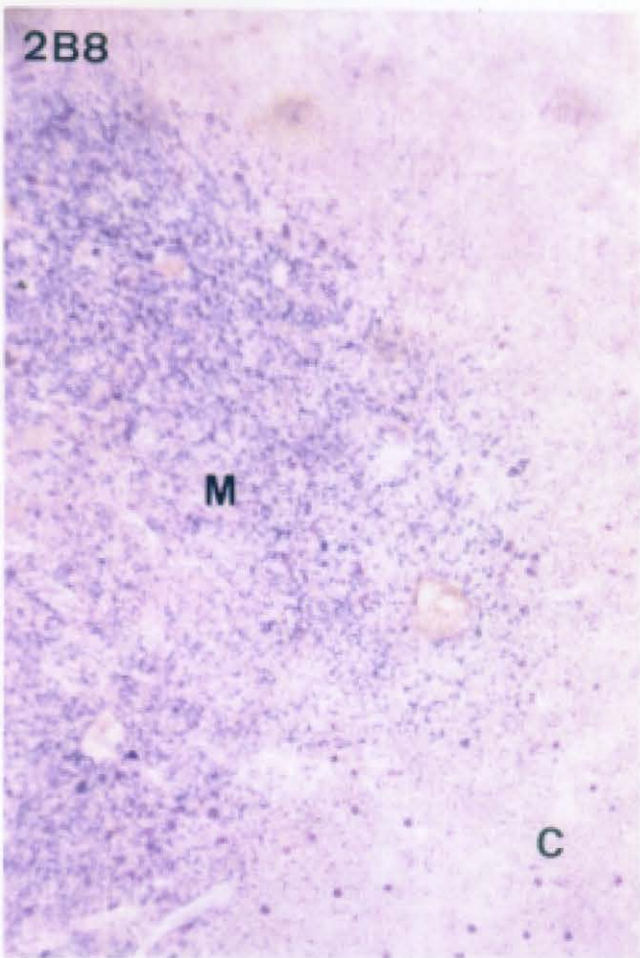


Fig. 4. Caracterización histológica de los anticuerpos monoclonales en cortes de criostato de ganglio de cerdo. Inmunofosfatasa alcalina indirecta revelada con fast-blue.

a) Acm 1E7: Tinción difusa y uniforme del ganglio linfático. X 350.

b) Acm 2B8: Tinción de la zona paracortical, con dos patrones diferentes, uno más intenso en células dispersas en el seno central y uno difuso en el resto del parénquima. X 350.

c) Acm 1C5: Tinción de los centros germinales de folículos linfoides, área interfolicular y vénulas post-capilares. X 416.

d) Acm 1G1: Detalle de folículo linfoide y área interfolicular, Observese la tinción intensa de la zona T- dependiente. X 3500.

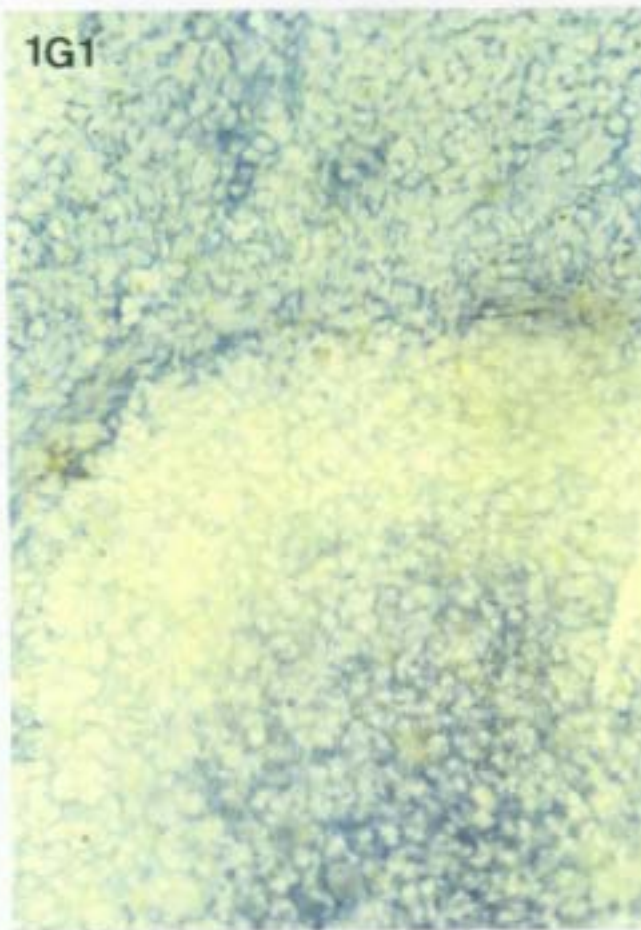
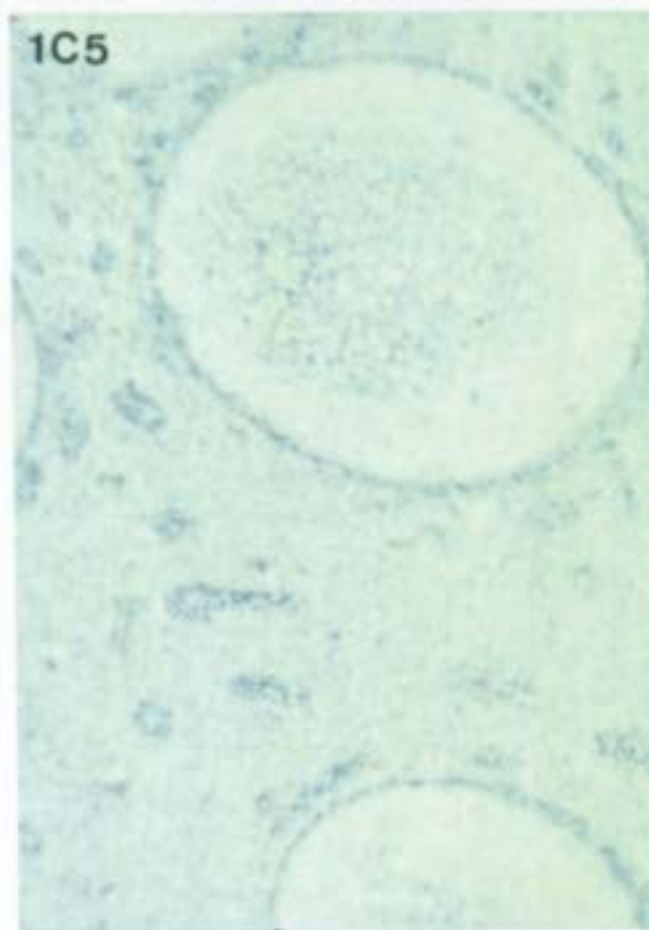
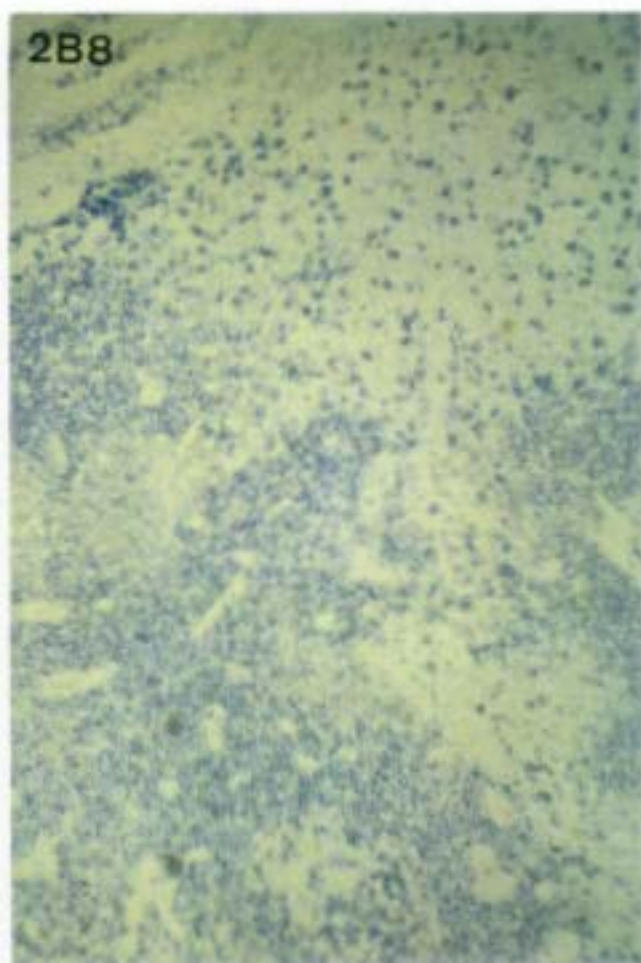
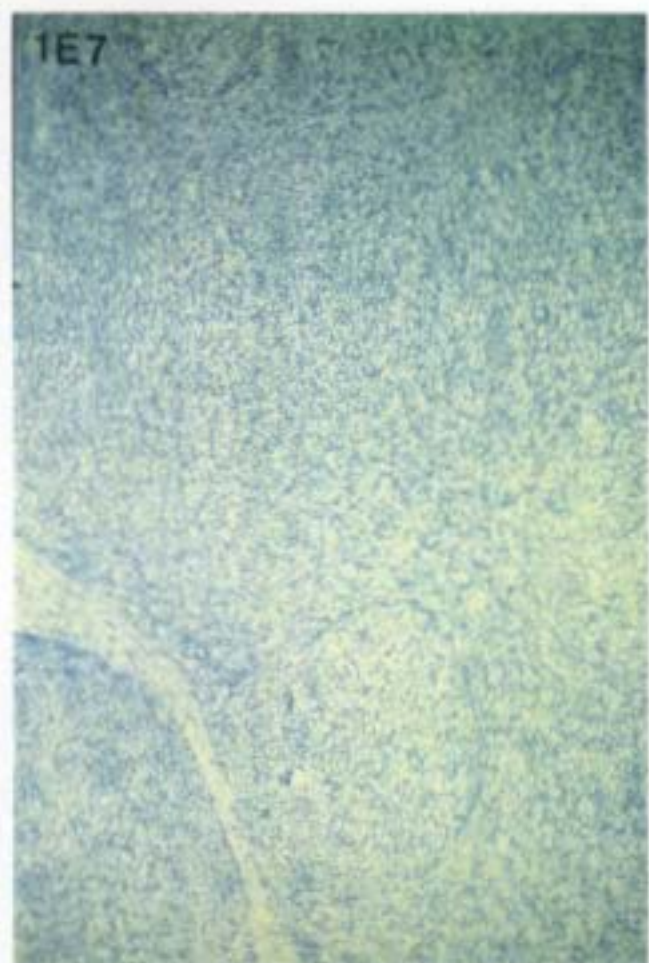


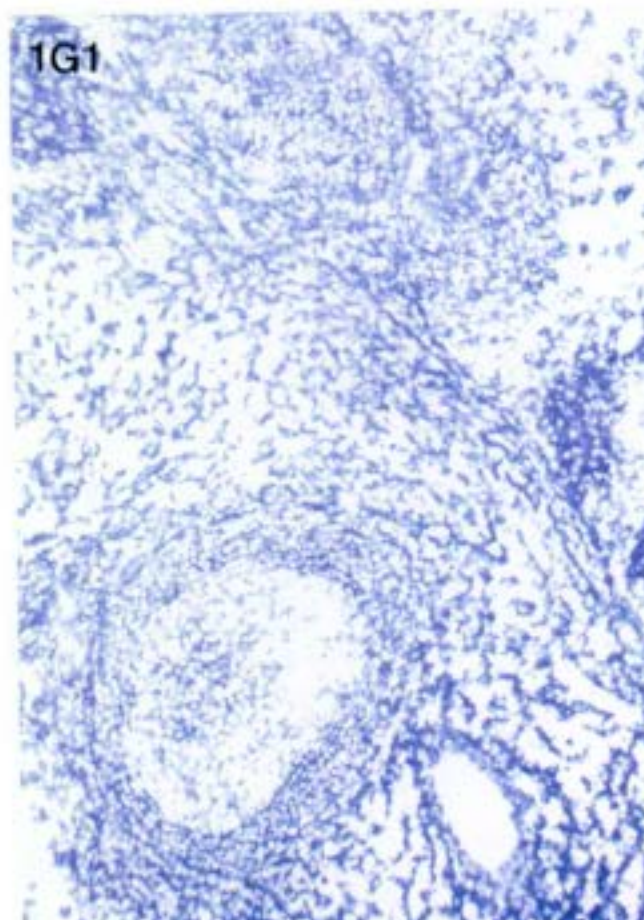
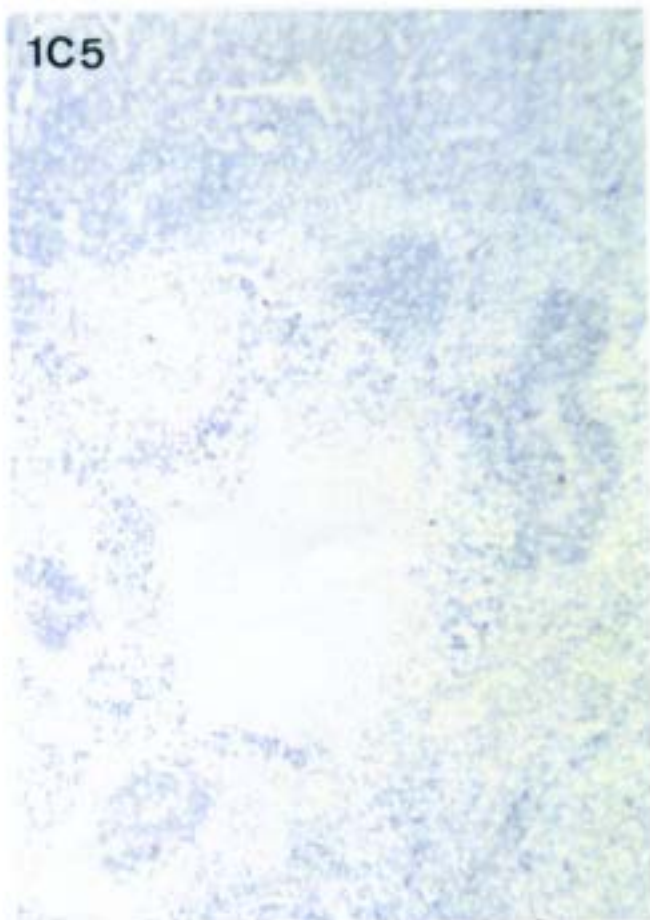
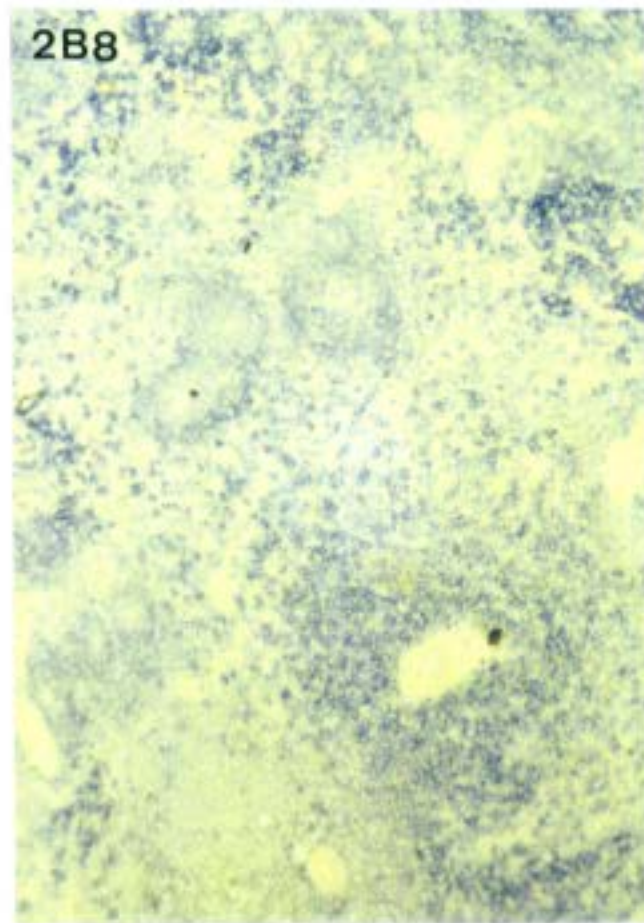
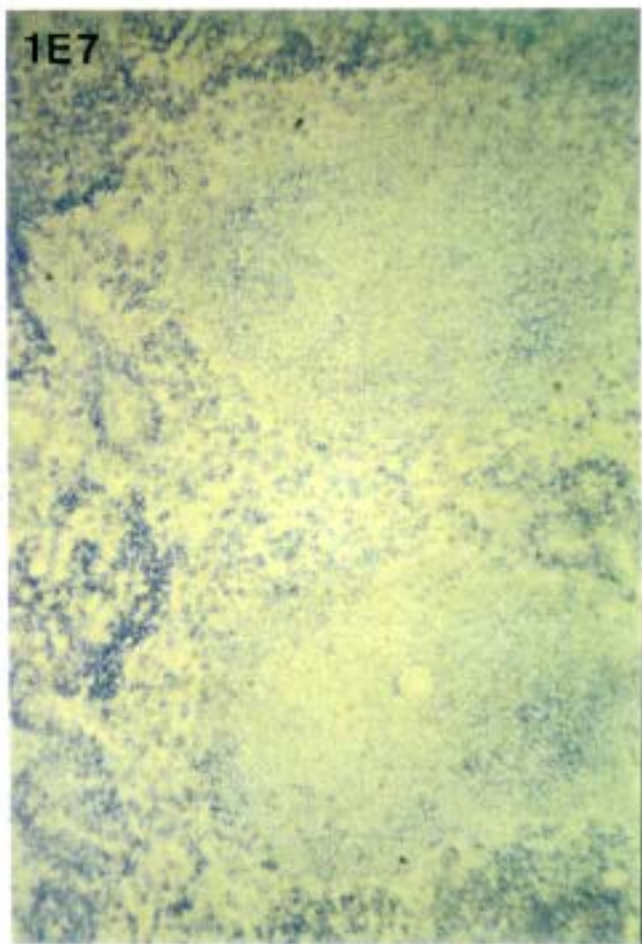
Fig. 5. Caracterización histológica de los anticuerpos monoclonales en cortes de criostato de bazo de cerdo. Inmunofosfatasa alcalina indirecta, revelada con fast-blue.

a) Acm 1E7: Tinción de los manguitos linfáticos periarteriolares (MLPA), zona marginal y pulpa roja. Las células de la zona marginal son fuertemente positivas. X 350.

b) Acm 2B8: Tinción de los MLPA y zona marginal. X 416.

c) Acm 1C5: Células positivas en la zona marginal, tinción tenue en elipsoides y pulpa roja. X 416.

d) Acm 1G1: Tinción en folículo, con una neta diferencia entre la corona y el centro germinal, patrón de tinción parcheado en el MLPA e intenso en células de la zona marginal, pulpa roja y elipsoides. X 416.



### **2.2.2. ORGANOS NO LINFOIDES**

Una vez efectuada la caracterización de los Acm en órganos linfoides, se estudió la distribución que presentaban en hígado, pulmón y riñón, estudiándose además la distribución de los Acm 74.12.4, 76.2.11, 74.22.15 y PAL-E.

#### **HIGADO (Fig. 6)**

Los Acm 74.12.4., 76.2.11. y 2B8 tiñeron células redondeadas circulantes, localizadas preferentemente en zona perilobulillar, siendo el marcaje muy abundante con el 2B8 y limitado con los otros dos.

Los Acm 74.22.15 y 1G1, marcaron intensamente células de Kupffer y polimorfonucleares circulantes en los sinusoides, presentando una tinción de membrana y citoplásmica. El endotelio de los sinusoides, vena centrolobulillar y espacios porta reaccionó con el Acm 1G1. El patrón de tinción del Acm PAL-E estuvo restringido al área periportal.

#### **PULMON (Fig. 6)**

En este órgano reaccionaron los Acm 2B8, 74.12.4, 76.2.11 y 74.22.15. Los anticuerpos anti-CD4+ y anti-CD8+, marcaron un escaso número de células, de morfología redondeada, distribuidas por el parénquima. Los Acm 74.22.15 y 2B8 tiñeron, intensamente, numerosas células de diversa morfología; algunas, localizadas en las luces alveolares o que hacían prominencia en ellas.

Todos estos Acm reaccionaron también con el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), variando el número de células positivas, según el Acm utilizado. Así, el Acm 2B8 reaccionó con prácticamente la totalidad de las células, mientras que los otros tres Acm, solamente tiñeron algunas células de los folículos.

El Acm PAL-E, reaccionó de forma difusa con el endotelio de capilares alveolares y arteriolas pulmonares.

#### **RIÑÓN (Fig. 7)**

En la zona cortical, se observó que los Acm 1G1, 2B8, 74.22.15, 74.12.4 y 76.2.11, marcaban algunas células aisladas en los glomérulos, que en el caso de los Acm 1G1 y 74.22.15, en ocasiones, se correspondían con polimorfonucleares. También reaccionaron con células intersticiales, de núcleo redondeado y citoplasma escaso. El número de células teñidas fue variable, dependiendo del Acm. Con los Acm 74.12.4., 74.22.15, 76.2.11 y 1G1, el marcaje fue escaso, resultando más abundante con el Acm 2B8. En la zona medular, todos los Acm tiñeron células intersticiales dispersas, siendo mayor el número de células reconocidas por el Acm 76.2.11 que por el resto de los Acm.

El Acm PAL-E no tiñó los capilares glomerulares, sin embargo reaccionó con el endotelio de los capilares del espacio intersticial intertubular, sobre todo en la zona medular.

Los Acm 1C5 y 1E7, que en órganos linfoides presentaban unos patrones definidos, en los órganos no linfoides estudiados, presentaban una tinción de fondo, sin un patrón determinado. Este mismo, fenómeno se produjo con el Acm 1G1 en pulmón, que a pesar, de reaccionar debilmente, con algunas células, dió mucho fondo inespecífico. Con el fin de desestimar, que la falta de definición fuera debida a fallos técnicos, se realizó la técnica de forma reiterada y simultáneamente con Acm conocidos, obteniéndose siempre los mismos resultados.

Fig. 6. Caracterización histológica de los anticuerpos monoclonales en cortes de crióstato de hígado y pulmón. Inmunoperoxidasa indirecta, revelada con diaminobencidina y contrastado con hematoxilina de Carazzi.

a) Acm 2B8: Tinción de células de morfología linfoide, presentes en los sinusoides hepáticos. X 350.

b) Acm 2B8 : Tinción de células linfoides, macrófagos alveolares e interseptales. X 875.

c) Acm 1G1: Tinción de células de Kupffer, endotelio de los sinusoides hepáticos y células de morfología linfoide. X 350.

d) Acm PAL-E: Patrón de tinción difuso en los capilares alveolares y arteriolas pulmonares. X 350.

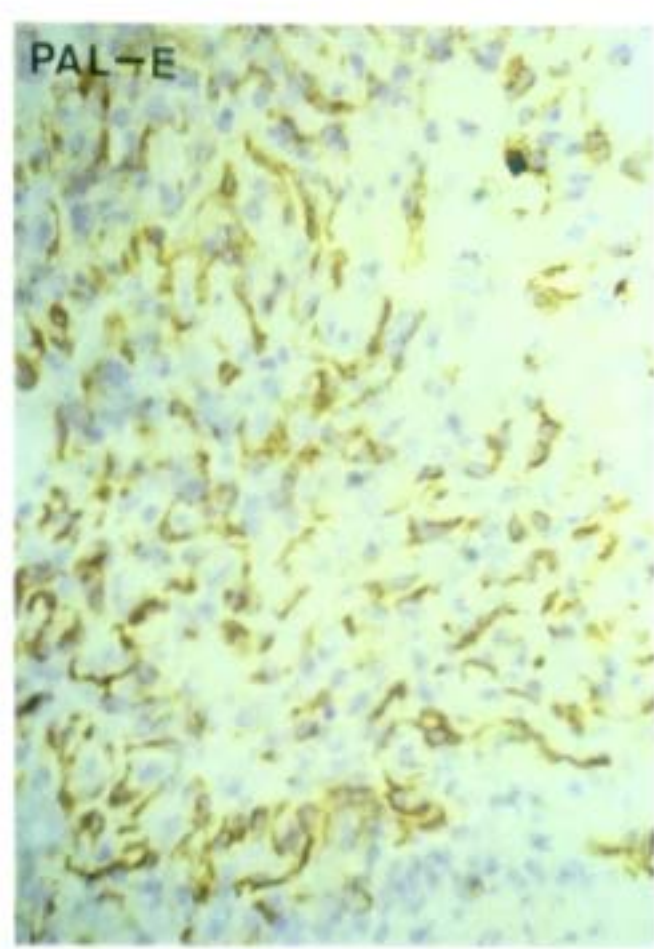
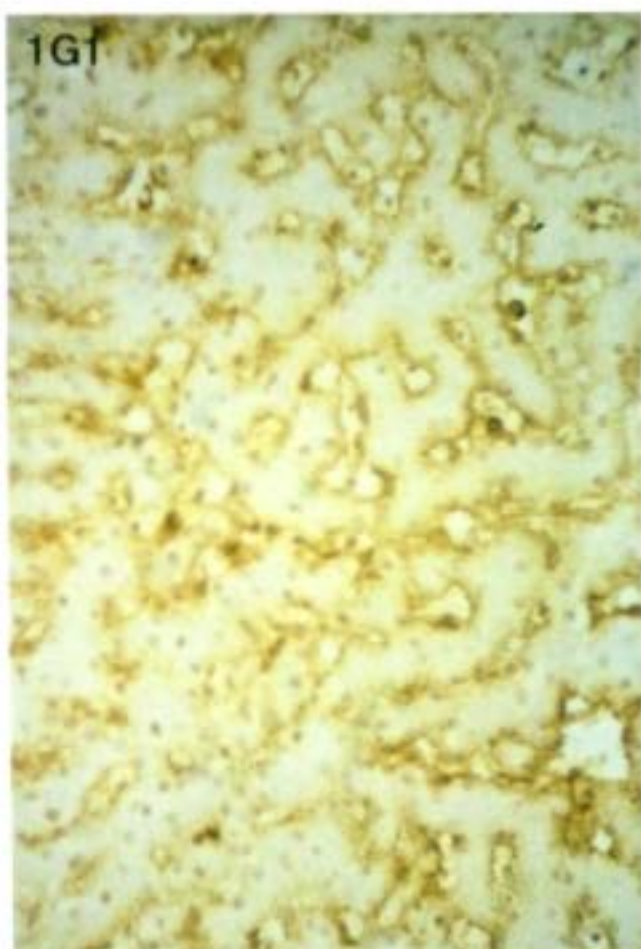
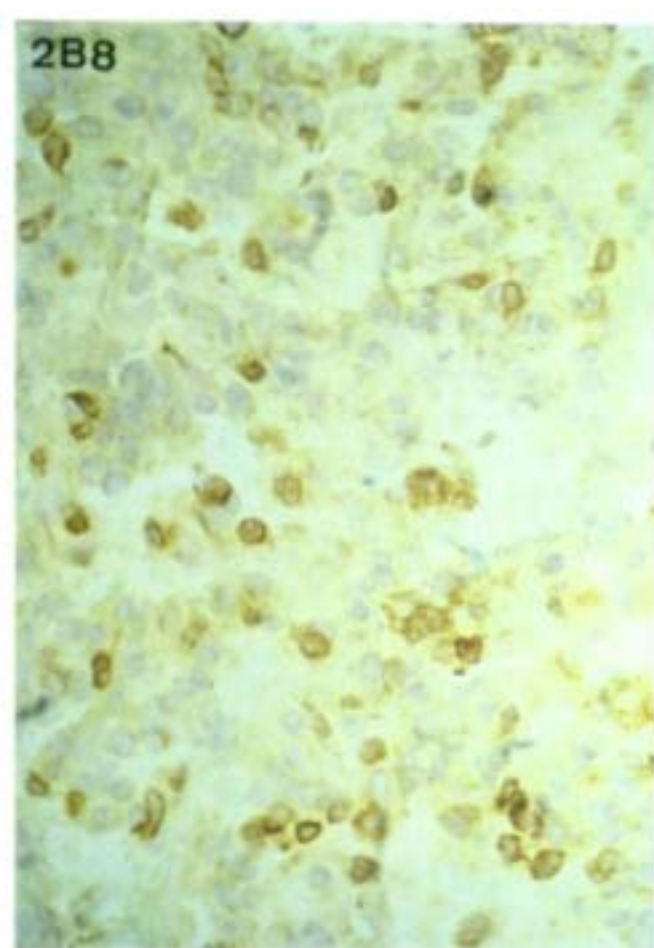
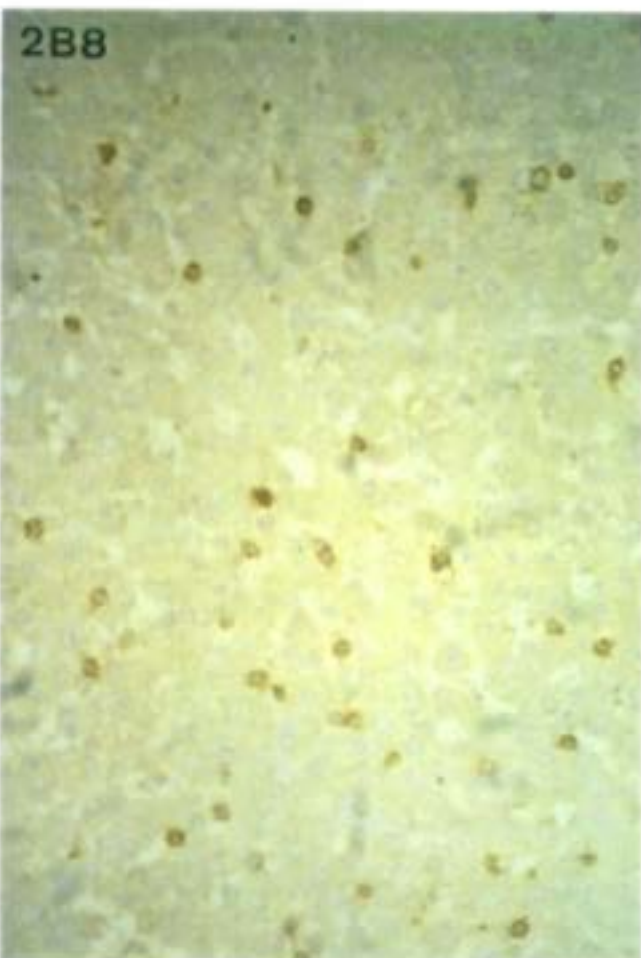
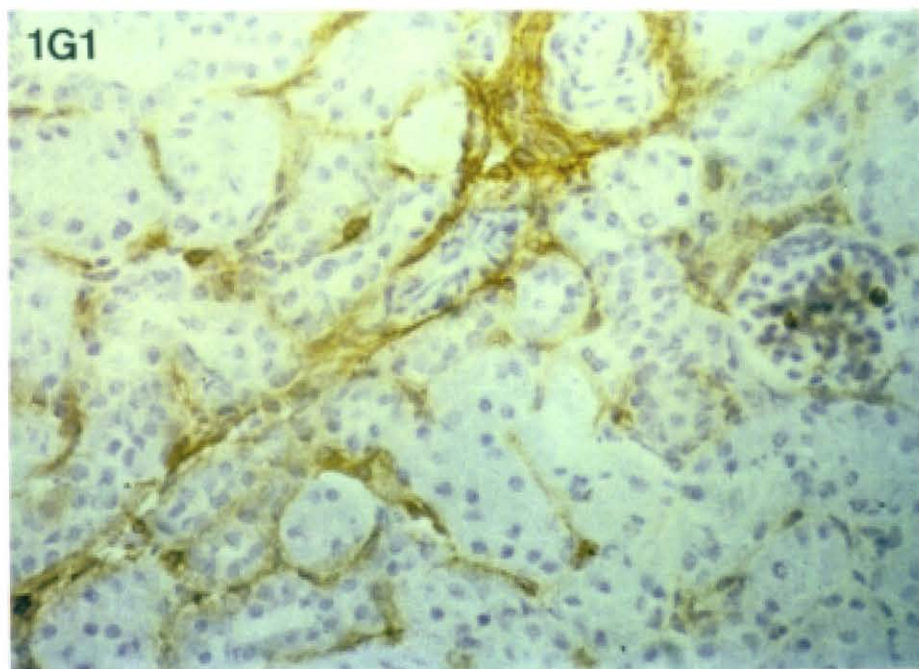
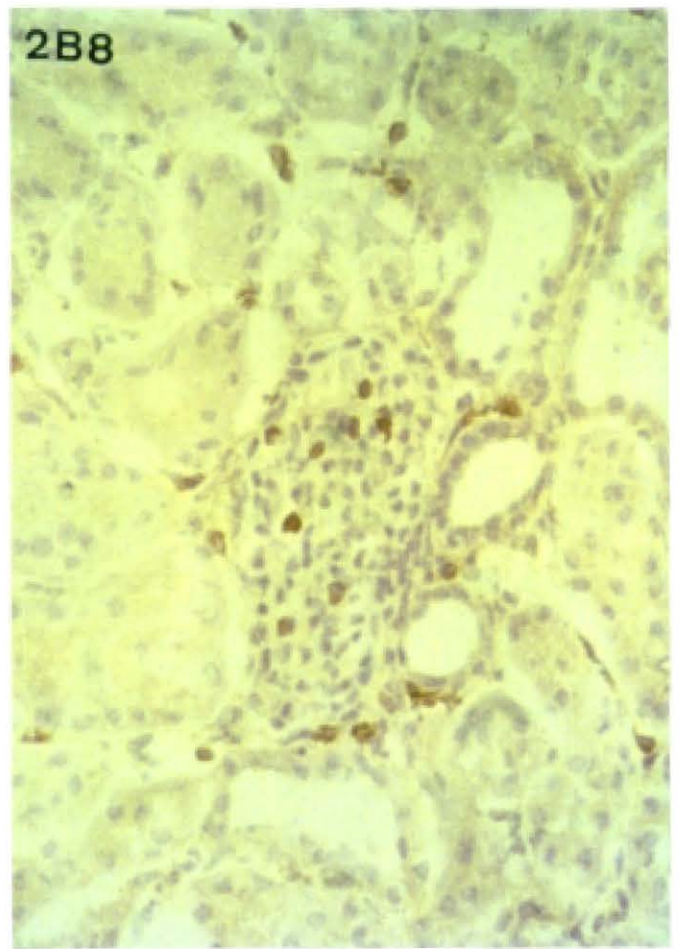
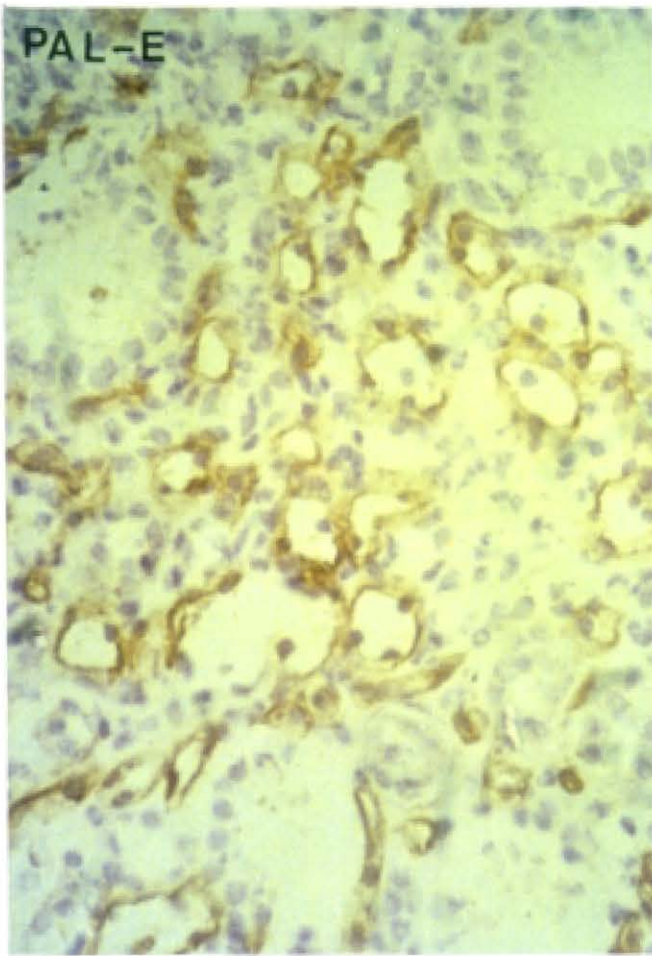


Fig. 7. Caracterización histológica de los anticuerpos monoclonales en cortes de criostato de riñón. Inmunoperoxidasa indirecta, revelada con diaminobencidina y contrastado con hematoxilina de Carazzi.

a) Acm PAL-E : Tinción difusa del endotelio de los capilares intersticiales. X 875.

b) Acm 2B8 : Tinción de células intraglomerulares y células aisladas en el espacio intersticial intertubular. X 875.

c) Acm 1G1 : Tinción de macrófagos intersticiales y de escasas células intraglomerulares. X 875.



### 3. CURSO CLINICO Y PAUTA DE SACRIFICIO

Durante la primera semana post-inoculación, los animales comenzaron a presentar signos clínicos de enfermedad: postración, anorexia, fiebre, eritemas y cianosis en piel. Dado que el índice de mortalidad tras la inoculación es imprevisible, por tratarse de un parámetro multifactorial (vía de inoculación, dosis, aislado vírico, tipo de animal, etc), decidimos el primer día que murió un cerdo (8 dpi) sacrificar otro "in extremis", con el fin, de obtener material en condiciones óptimas, evitando de esta forma las posibles alteraciones post-mortem. Entre los días 9 y 13 post-inoculación murieron cuatro cerdos más. A partir del día 14 post-inoculación, cesó la mortalidad, comenzando a recuperarse los animales supervivientes. Fue entonces, cuando establecimos la pauta de sacrificio a seguir para los animales supervivientes y controles (Tabla III).

Se tomaron temperatura y muestras periódicas de sangre, determinándose la viremia, cinética de aparición de anticuerpos y persistencia viral. Los animales supervivientes, fueron virémicos hasta el día 41 post-inoculación. Los anticuerpos específicos del VPPA, se detectaron por IFI, a partir del día 26 p.i., presentando unos títulos de 1/40-1/80. Los niveles de anticuerpos, fueron aumentando en las sangrías siguientes, hasta 1/5.120 a los 82 dpi. A partir de esta fecha, los títulos decrecieron progresivamente hasta el final del experimento.

T A B L A III

Fecha sacrificio (d.p.i.)	Nº de Cerdo	
	Control	Inoculado
8	1	7
30	2	8
90	3	9
120	4	10
150	5	11
365	6	12-13

#### 4. EXPRESION DE ANTIGENO VIRICO EN HIGADO, PULMON Y RIÑON

En el hígado, la expresión de antígeno vírico fue máxima en fechas tempranas post-inoculación (8 y 30 días) (Fig. 8a), apareciendo ampliamente distribuido en sinusoides y algunos espacios porta. A tiempos tardíos, se detectó, de forma aislada, en algunos sinusoides. De los dos animales sacrificados al año post-inoculación, solamente se observó antígeno vírico en uno de ellos (nº 12) (Fig. 8b), localizándose en un espacio porta.

En el pulmón, al igual que en el hígado, la expresión fue máxima a los 8 y 30 dpi, disminuyendo en fechas posteriores. Al año post-inoculación, el cerdo nº 12 fue positivo (Fig. 8c), mientras que el nº 13 resultó negativo. La positividad, se detectó en los tres casos, en macrófagos de los septos interalveolares y macrófagos alveolares desprendidos.

La expresión antigénica en riñón, quedó restringida a los animales sacrificados a los 8 y 365 dpi (nºs 7 y 12) (Fig. 8d), localizándose preferentemente, en células del intersticio intertubular de la zona cortical, no detectándose en la zona medular (Tabla IV).

TABLA IV

D.P.I.	Nº cerdo	Hígado	Pulmón	Riñón
8	7	+++	+++	+
30	8	++	++	-
90	9	+	-	-
120	10	+/-	+/-	-
150	11	ND	ND	ND
365	12	+	+	+
"	13	-	-	-

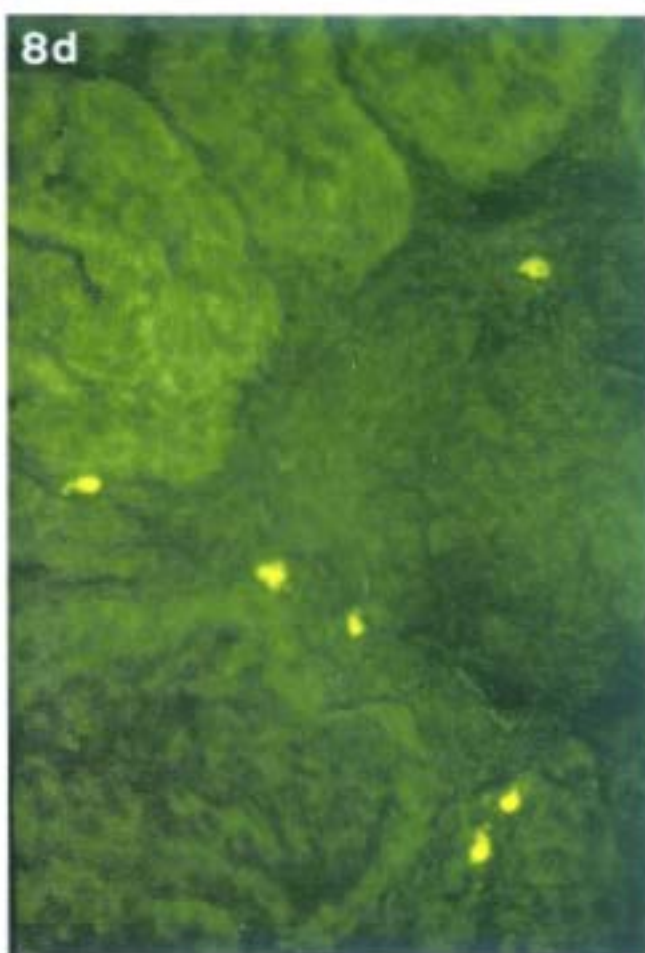
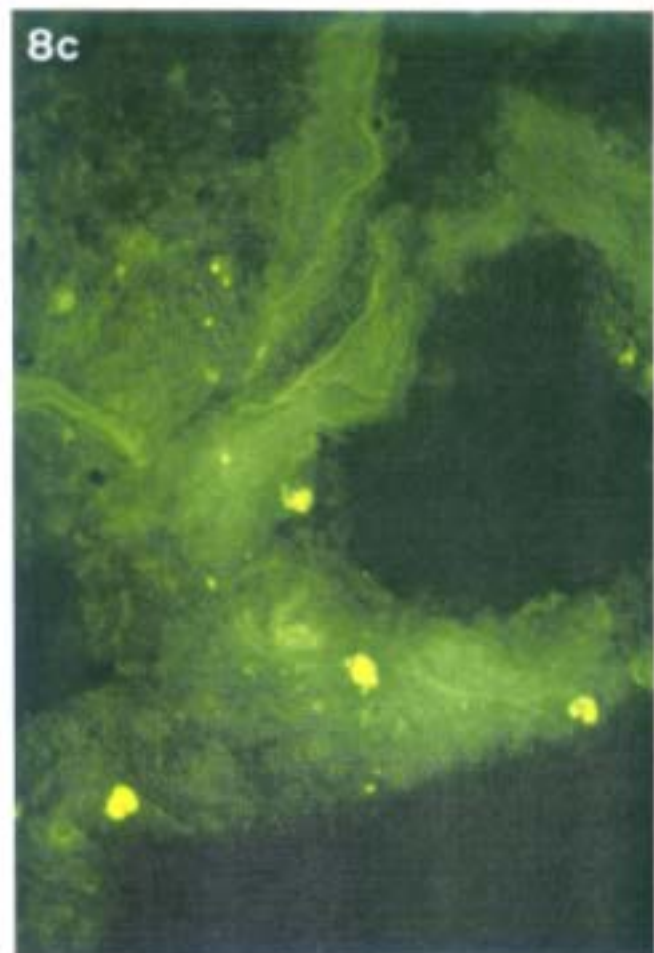
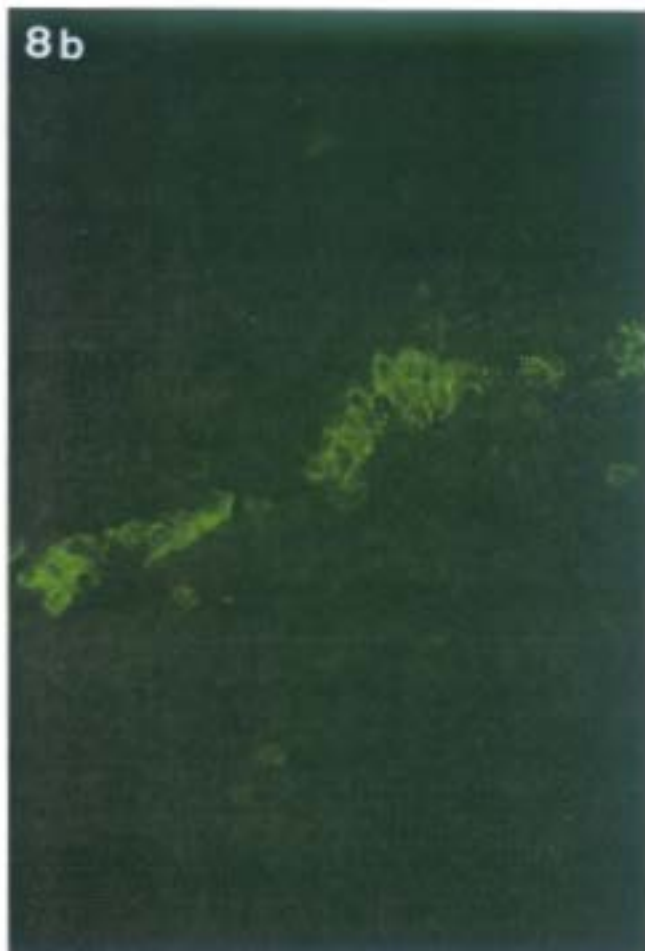
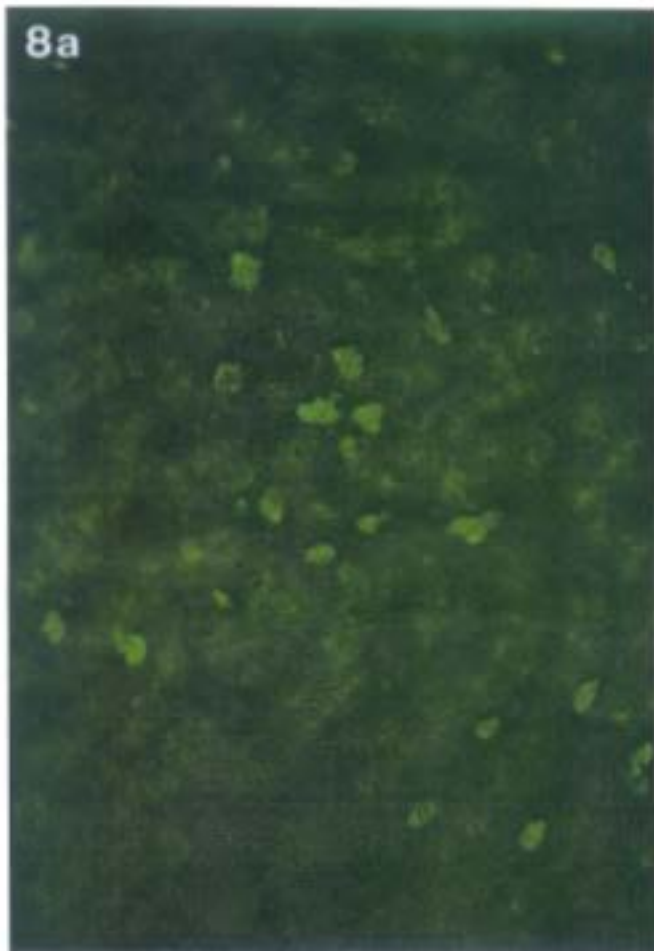
Detección de antígeno vírico por IFD en cortes histológicos de criostato. La extensión del marcaje está cuantificada en una escala de: +/- dudoso, + mínimo, ++ moderado y +++ abundante.

ND: no determinado.

Control negativo de virus: suero policlonal anti-VPPC/FITC. Los animales testigos fueron negativos en todas las fechas.

Fig. 8. Expresión de antígeno vírico. Inmunofluorescencia directa en secciones de criostato de hígado (a,b), pulmón (c) y riñón (d) incubados con un suero anti- VPPA conjugado con FITC.

- a) Abundantes células de Kupffer positivas, 8 dpi (nº7). X 875.
- b) Acúmulos de células positivas en espacio porta, 365 dpi (nº 12). X 875.
- c) Positividad en macrófagos septales y libre en bronquiolo, 365 dpi (nº 12). X 875.
- d) Células positivas intraglomerulares y en el espacio intersticial intertubular, 365 dpi (nº 12). X 875.



## 5. SUSCEPTIBILIDAD CELULAR FRENTE AL VPPA

Este estudio, se realizó por inmunohistoquímica de doble marcaje, en los tres órganos objeto del experimento, siendo demostrativos los resultados de hígado y pulmón. En riñón, los resultados no fueron concluyentes, debido probablemente, a la fosfatasa alcalina endógena que enmascaró la reacción.

En el hígado, se utilizaron los Acm 74.22.15 y 1G1 (anti-macrófagos y granulocitos), 2B8 (pan-leucocitario) y PAL-E (anti-endotelio humano).

El número de células con doble expresión, 74.22.15 o 1G1/VPPA, fue reducido (2-10 células/corte estudiado) (Figs. 9a, 9c), sin embargo, se detectó positividad en todos los animales inoculados. Con el Acm 2B8, la positividad solamente fue manifiesta a los 30 y 120 dpi, siendo también reducida. Las células dobles positivas, se localizaron, preferentemente en zona peri y mediolobulillar.

Con el Acm PAL-E, no se observó doble tinción en ninguno de los animales inoculados (Fig. 9b). Los resultados se resumen en la Tabla V.

En el pulmón, se estudió la doble expresión con los mismos Acm que en el hígado, observandose células dobles positivas unicamente con el Acm 2B8 (2-4 células/corte estudiado), a los 8 y 365 dpi (n°s 7 y 12) (Fig. 9d). En el resto de los animales, no se observaron células dobles positivas con ninguno de los Acm.

TABLA V

D.P.I.	Nº cerdo	Acm			
		74.22.15	1G1	2B8	PAL-E
8	7	+	++	-	-
30	8	+	+	+	-
90	9	-	+	-	-
120	10	+	+	+	-
150	11	ND	ND	ND	ND
365	12	+	-	-	-
"	13	+	+	-	-

Resultados de doble marcaje con peroxidasa (virus) y fosfatasa alcalina (Acm: 74.22.15, 1G1, 2B8 y PAL-E), en secciones de hígado de los animales inoculados y sacrificados a los distintos tiempos post-infección. El número de células dobles positivas está cuantificado como: - negativo, + mínimo, ++ moderado. ND: no determinado.

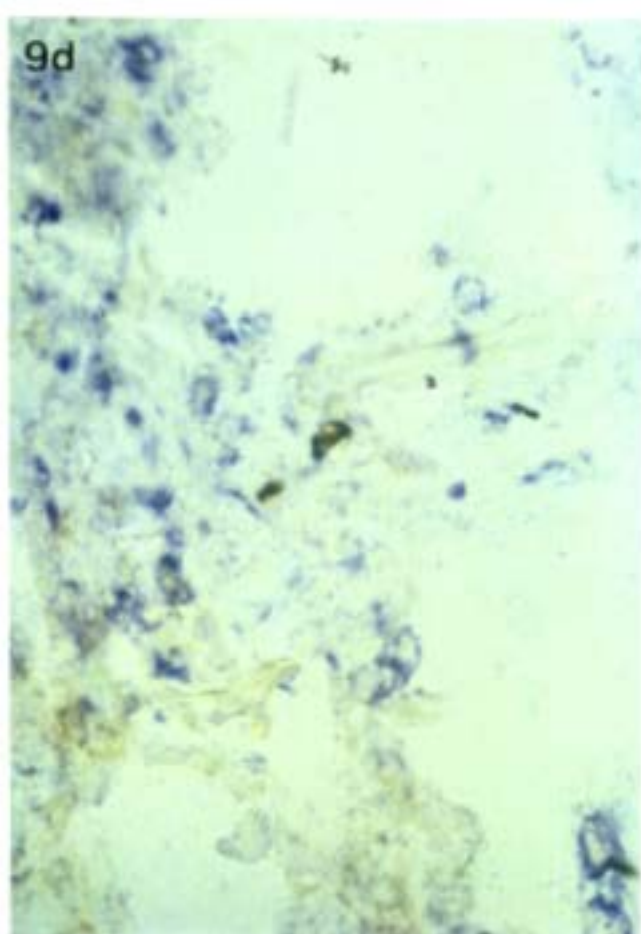
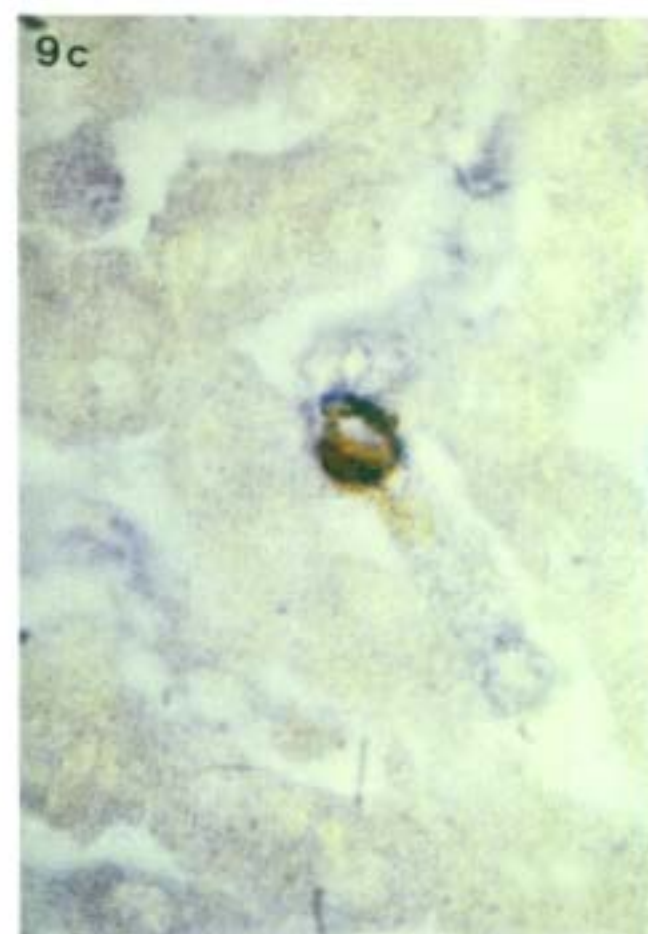
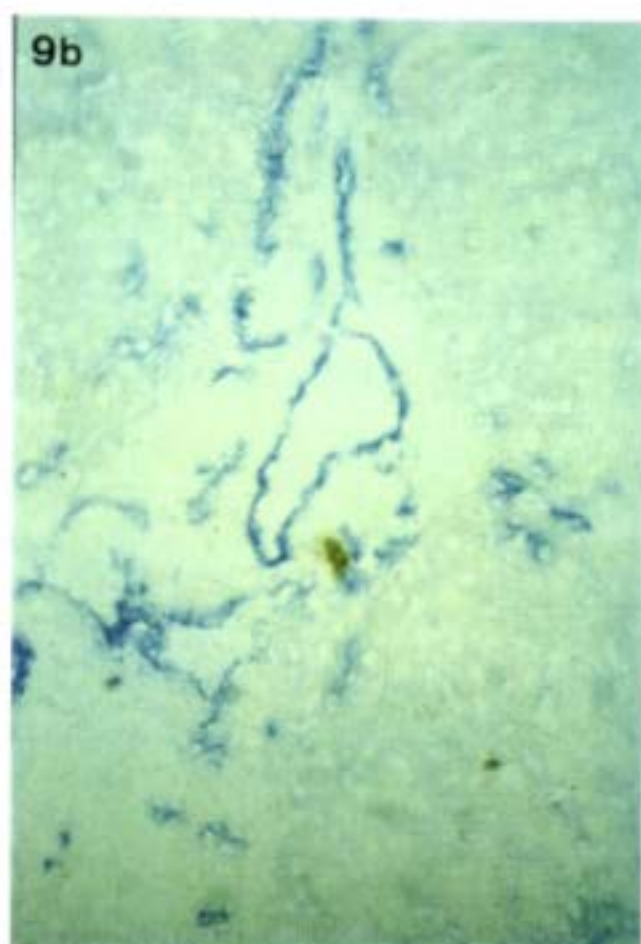
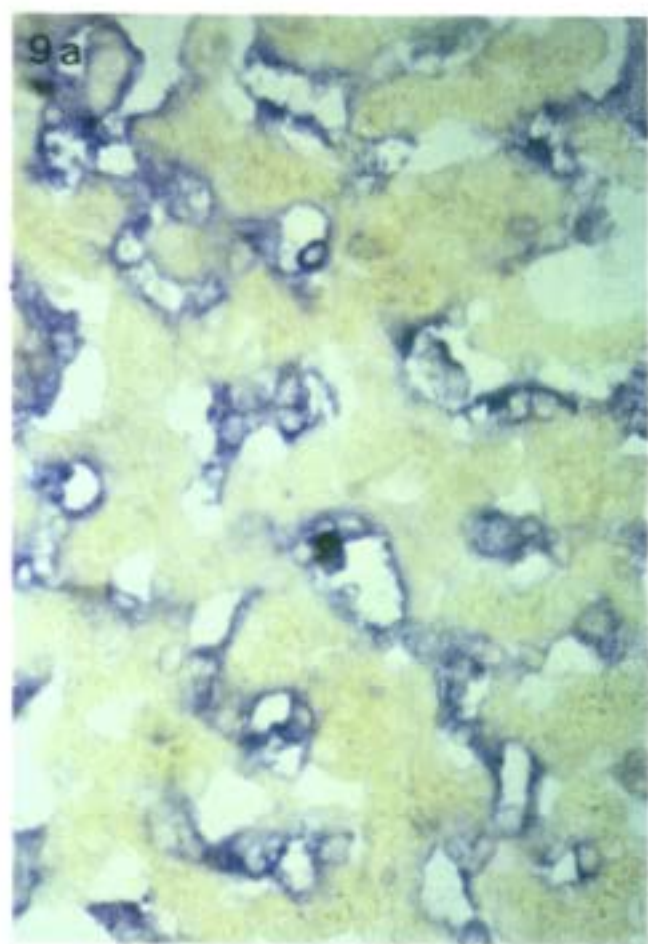
Fig. 9. Doble expresión de antígenos de membrana y vírico. Inmunofosfatasa alcalina -inmunoperoxidasa. Las secciones histológicas se incubaron con los Acm: 1G1 (a), PAL-E (b), 74.22.15 (c) y 2B8 (d), un antisuero de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y un suero policlonal anti-VPPA, conjugado con peroxidasa.

a) Presencia de antígeno vírico en una célula de Kupffer, el resto de las células sólo reaccionaron con el Acm, 365 dpi (nº13). X 1400.

b) Tinción del endotelio de los vasos del espacio porta y antígeno vírico libre, 365 dpi (nº 12). X 350.

c) Detalle de célula de Kupffer con antígeno vírico, 120 dpi (nº 10). X 3500.

d) Macrófago septal con antígeno vírico, 365dpi (nº 12). X 350.



## **6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO**

Las lesiones macroscópicas e histológicas de los cerdos que murieron de enfermedad aguda, fueron coincidentes con las encontradas en el cerdo sacrificado a los 8 dpi (nº 7), por lo tanto, se tomó este como modelo de la fase aguda.

En la descripción de las lesiones, generalmente distinguiremos, el cerdo sacrificado en fase aguda (cerdo nº 7), del grupo de supervivientes, animales recuperados y asintomáticos, que se sacrificaron según la pauta indicada en la Tabla IV.

### **6.1. HIGADO**

El hígado del cerdo sacrificado "in extremis" a los 8 dpi (nº 7), presentó una congestión intensa, con salida de sangre al corte, siendo más acentuada en los lobulillos subcapsulares. Los animales supervivientes, sacrificados en los diferentes fechas, no mostraron alteraciones macroscópicas de interés.

Histológicamente, se observó congestión tanto en las arteriolas y venas de los espacios porta, como en los sinusoides y venas centrolobulillares, preferentemente en los lobulillos subcapsulares; siendo más notable a los 120 (nº 10) y 365 dpi (nº 12). En estas fechas, apareció una marcada congestión centrolobulillar. En el cerdo nº 13 (365 dpi), se observaron imágenes que podrían corresponderse con trombos organizados en espacios porta así como un marcado edema en algunos lobulillos, haciéndose patente el espacio de Disse (Fig. 10). En los espacios porta y venas centrolobulillares, de los cerdos nºs 7, 8 y 9 (8, 30 y 90 dpi), se observaron vestigios de mallas de fibrina (PTAH +), no encontrándose en los demás animales problema.

En general, todos los animales inoculados presentaron una arquitectura lobulillar conservada, excepto en los lobulillos subcapsulares. Estos lobulillos, en ocasiones, estaban rodeados

por amplias zonas de tejido conjuntivo (nº 7 y 9), donde se localizaban neovasos y diferentes tipos celulares (Fig. 11). A los 150 dpi (nº 11), los hepatocitos de estos lobulillos, tenían el núcleo vacuolizado, posiblemente debido a cariólisis. El tejido conjuntivo interlobulillar y portal del cerdo nº 13 (365 dpi) era hiper celular, con abundantes células de núcleo pequeño, irregular y picnótico de aspecto fibroblástico.

Los hepatocitos adyacentes a las áreas congestivas, presentaron diversos estadios de degeneración y necrosis. A los 8 dpi, se observaron focos necróticos en todo el parénquima, con imágenes de necrosis cariorrética, apareciendo, ocasionalmente, a los 30 y 90 dpi hepatocitos con núcleos picnóticos e irregulares y citoplasma intensamente acidófilos.

El aspecto general de los lobulillos, en los animales sacrificados a los 30, 90, 120 y 150 dpi (nºs 8, 9, 10, 11), fue de hiper celularidad, debido a la discreta atrofia que presentaban los hepatocitos, sobre todo, de la zona perilobulillar. El tamaño nuclear fue normal y los citoplasmas, generalmente de aspecto pulverulento. Destacando abundantes hepatocitos con hiper cromatosis parietonuclear (nº 10). En los cerdos nº 10 y 11 se apreciaron hepatocitos con granulaciones citoplasmáticas PAS+, Carmin de Best +, resistentes a la diastasa (Figs. 12, 13).

A los 365 dpi, si bien el tamaño de los hepatocitos fue semejante al de el animal testigo (nº 6), aparecían determinados lobulillos, en los cuales, los núcleos presentaron cromatina parieto-nuclear; observándose, en localización perilobulillar, necrosis focales de hepatocitos con presencia de infiltrado inflamatorio (nº 12) (Fig. 15).

Los sinusoides hepáticos próximos a la vena centrolobulillar, del cerdo sacrificado en fase aguda (8 dpi), presentaron una marcada dilatación, proporcionando una imagen lacunar. Las células de Kupffer, normalmente aparecían tumefactas, con citoplasmas vacuolizados, llegando con relativa

frecuencia a la necrosis. En ocasiones, había células de Kupffer rodeadas por hematies, formando imágenes de hemoadsorción (Fig. 14).

En los animales supervivientes, se observó una ligera hiperplasia de las células Kupffer a los 90 y 150 días post-inoculación respecto a los animales control (n°s 3 y 5), mientras que a los 120 y 365 dpi (n°s 10 y 12), las células de Kupffer próximas a la vena centrolobulillar, mostraban gránulos citoplasmáticos de color pardo, positivas a la reacción del hierro, mediante la técnica Azul de Prusia (Fig. 16). Asimismo, en algunos sinusoides del cerdo n° 12 (365 dpi), se observaron células de Kupffer, distribuidas al azar, con citoplasma vacuolizado (Rojo aceite 0 +).

En zonas del parénquima, donde existía necrosis de hepatocitos, se observaron discretos infiltrados inflamatorios, localizados en el tejido conjuntivo interlobulillar, espacios porta y sinusoides.

En fechas tempranas post-inoculación (8 y 30 dpi), fue notable la presencia de infiltrados focales, en el tejido conjuntivo interlobulillar y espacios porta así como difusos en los sinusoides. Asimismo, en los sinusoides, se observaron abundantes eosinófilos dispersos o formando pequeños focos en espacios porta, sobre todo, en el cerdo n° 7.

En los animales supervivientes, estos infiltrados aparecían de forma puntual, exceptuando el animal sacrificado a los 150 dpi, en el cual, los infiltrados fueron abundantes, de pequeño tamaño, localizados en la zona perilobulillar de los lobulillos subcapsulares (n° 11). En uno de los animales sacrificado al año post-inoculación (n° 12), también se observaron focos inflamatorios periportales. En todos los animales, se observaron infiltrados difusos, constituidos principalmente por linfocitos, macrófagos y eosinófilos, que la mayoría de las veces presentaban necrosis cariorrética.

Los infiltrados focales observados por H-E, fueron coincidentes en la mayoría de los casos con los identificados por inmunohistoquímica. En el tejido conjuntivo interlobulillar, los infiltrados reaccionaron preferentemente, con los Acm que reconocían linfocitos, mientras que en los espacios porta y sinusoides, fueron los linfocitos T8 y macrófagos, las células que formaban los infiltrados (Fig. 17) (Tabla VI).

Con relación a los infiltrados difusos presentes en los sinusoides, realizamos una cuantificación, por análisis de imágenes, de linfocitos T4, T8 y macrófagos, con los Acm 74.12.4, 76.2.11 y 74.22.15 respectivamente, en distintas fechas post-inoculación (8, 30, 90 y 365 dpi). Las determinaciones correspondientes a los 120 y 150 dpi no se pudieron realizar por las modificaciones morfológicas que presentaban las muestras.

#### **LINFOCITOS CD8 (Fig. 18a)**

El número de células que expresaban CD8 estaba incrementado en fechas tempranas post-infección (8 y 30 dpi). En fechas posteriores, los valores fueron inferiores (90 dpi) o similares (365 dpi) a los controles.

#### **LINFOCITOS CD4 (Fig. 18b)**

Los niveles de linfocitos T4 a los 8 dpi fueron inferiores a los niveles basales, observándose un moderado incremento a los 30 y 90 dpi. Al año post-inoculación los valores fueron semejantes a los mostrados por los animales testigo.

#### **MACROFAGOS (Fig. 18c)**

Se observó un aumento considerable del número de macrófagos a los 8 y 30 dpi. Estos valores retornaron a niveles basales a los 90 dpi, experimentando un nuevo incremento al año post-inoculación (Fig. 18c).

**TABLA VI**

DPI	nº Cerdo	Acm				
		74.22.15	1G1	2B8	74.12.4	76.2.11
8	7	EP/S			TCIL	EP/S
30	8	TCIL	EP	TCIL/S		EP
120	10					TCIL
365	12	EP/S				EP/S
365	13					EP

Tipificación de infiltrados focales en hígado por inmunohistoquímica indirecta con Acm.

EP: espacio porta, S: sinusoides, TCIL: tejido conjuntivo interlobulillar.

Fig. 10. Congestión y edema acentuado, en sinusoides hepáticos. Hepatocitos con citoplasmas vacuolizados, 365 dpi (nº 13). Tricrómico de Masson. X 1400.

Fig. 11. Necrosis de hepatocitos, infiltrado inflamatorio y células en cariorexis en lobulillo subcapsular, 30 dpi (nº 8). Tricrómico de Masson. X 875.

Fig. 12. Presencia de glucógeno en hepatocitos, 150 dpi (nº 11). Carmin de Best. X 875.

Fig. 13. Control de diastasa, 150 dpi (nº 11). Carmin de Best. X 875.

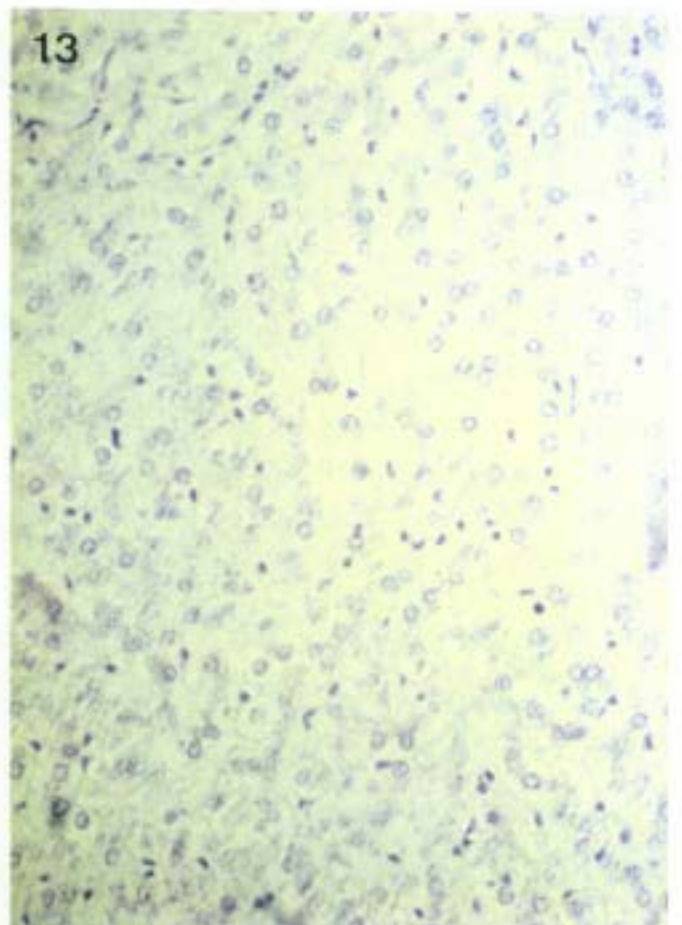
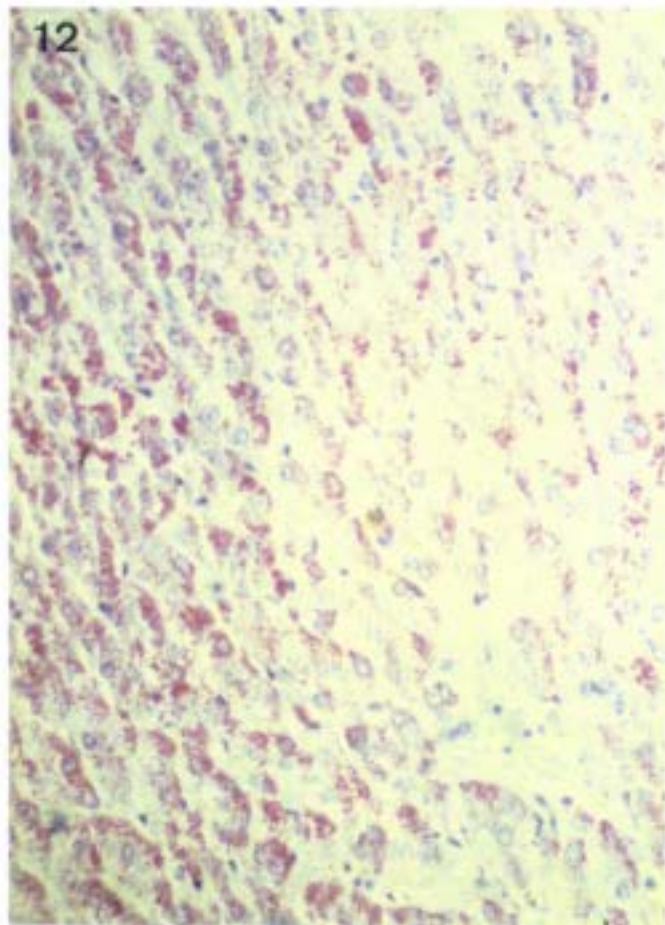
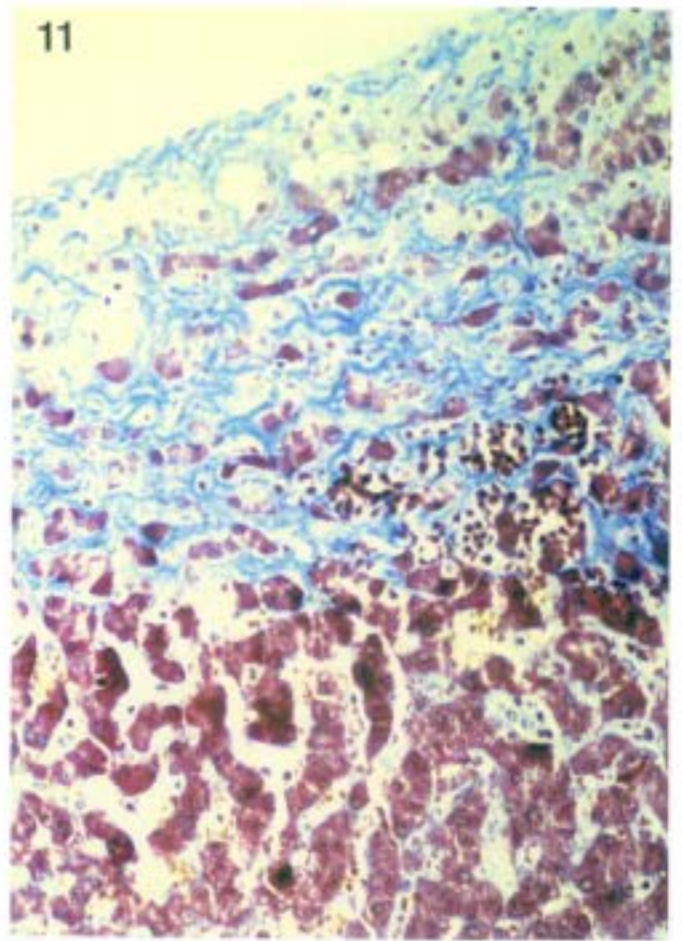
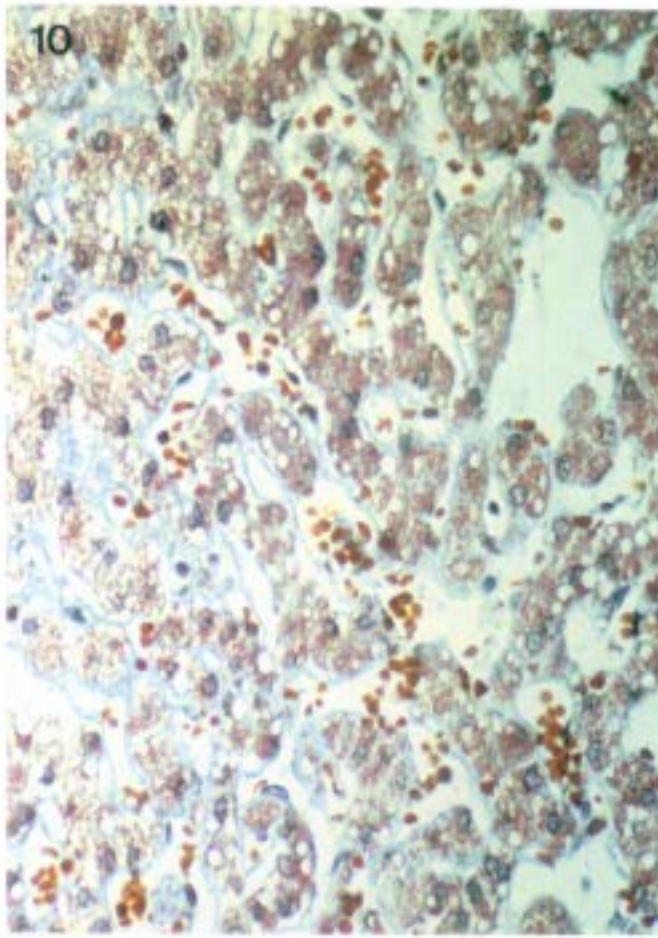


Fig. 14. Detalle de células de Kupffer en necrosis, rodeadas de hematíes. Hepatocitos con cromatina parieto-nuclear, 8 dpi (nº 7). H-E. X 3500.

Fig. 15. Necrosis de hepatocitos e infiltrado perilobulillar de células linfoides y polimorfonucleares, 365 dpi (nº 12). H-E. X 875.

Fig. 16. Hemosiderina en células de Kupffer. Hepatocitos con cromatina parieto - nuclear, 120 dpi (nº 10). Azul de Prusia. X 350.

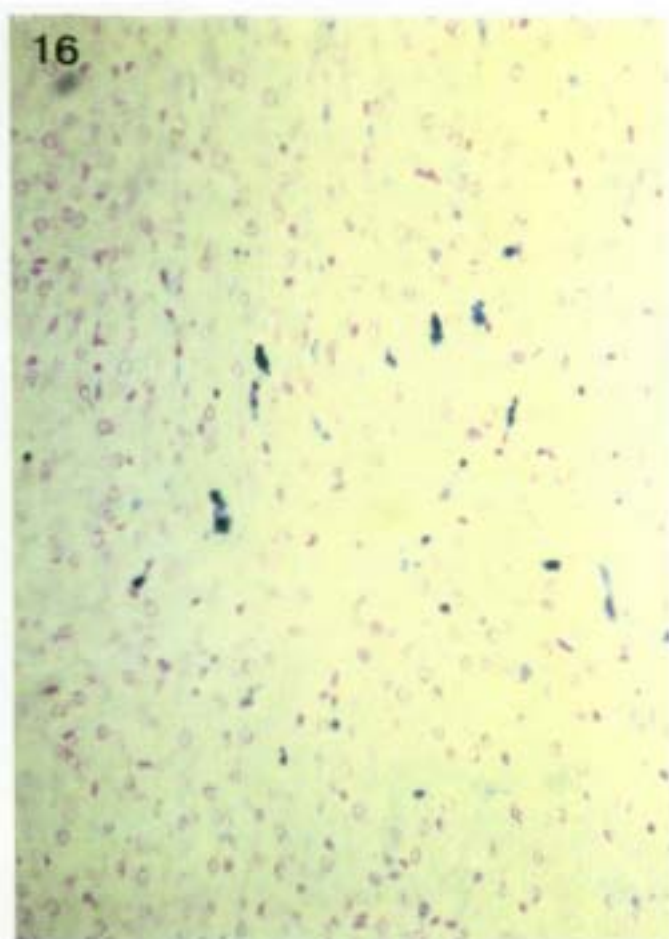
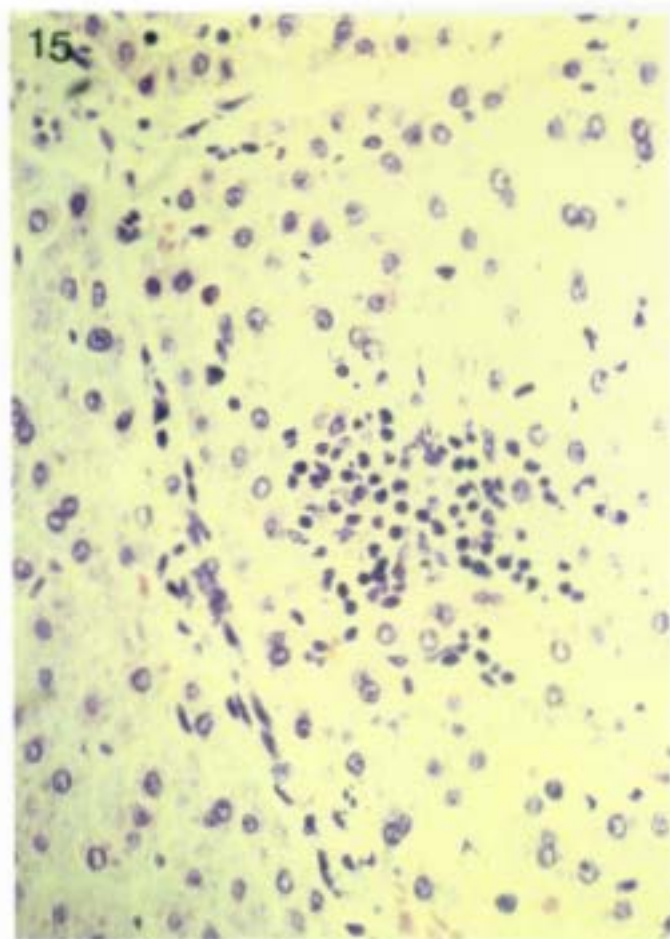
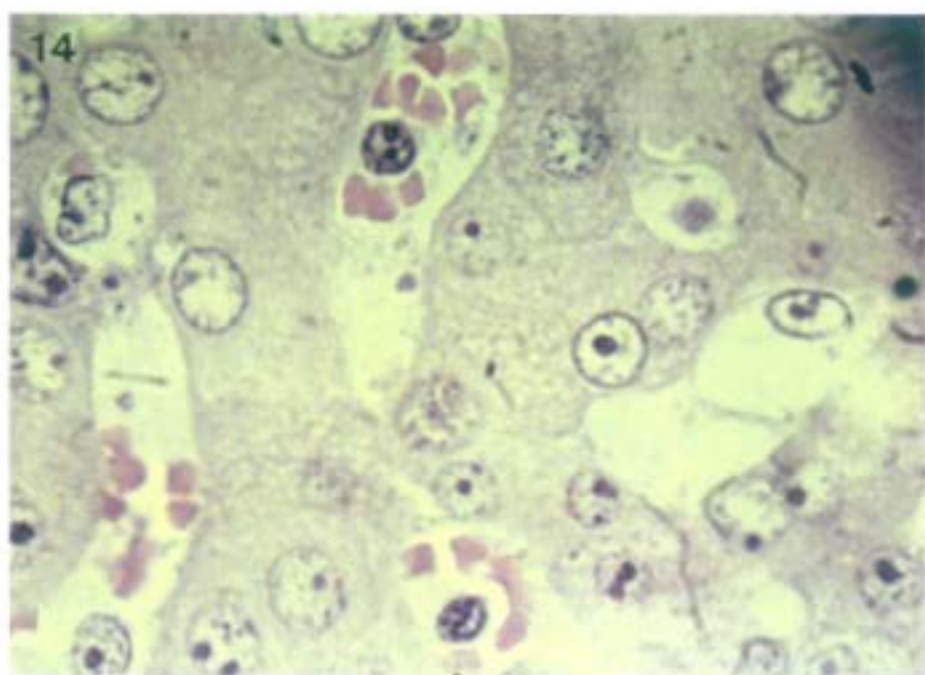


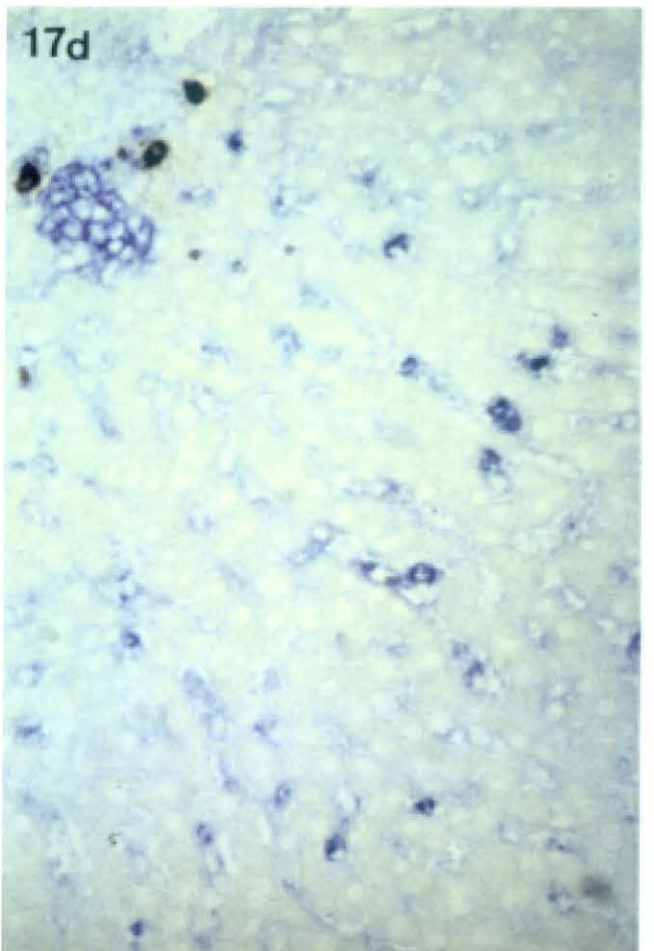
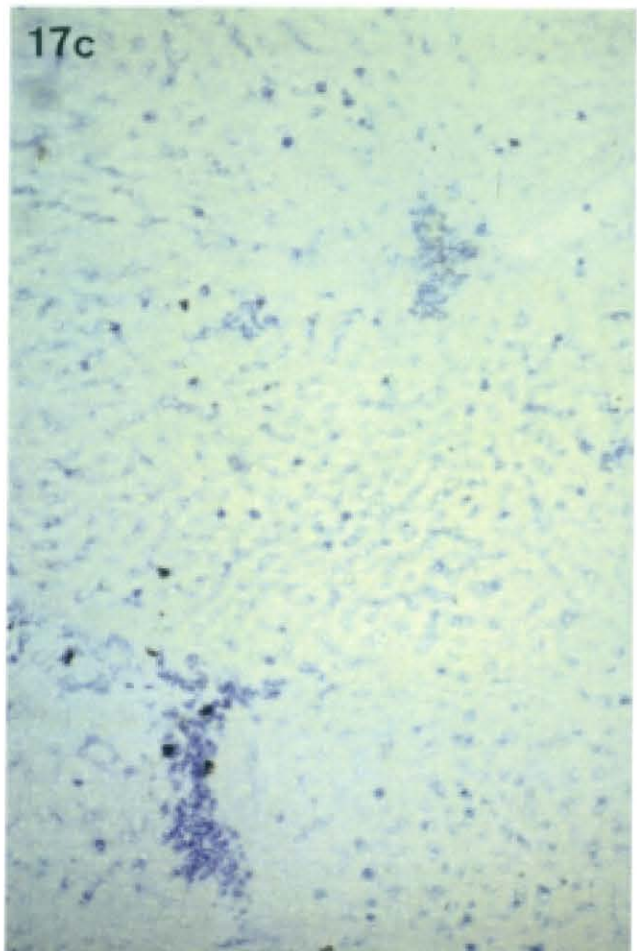
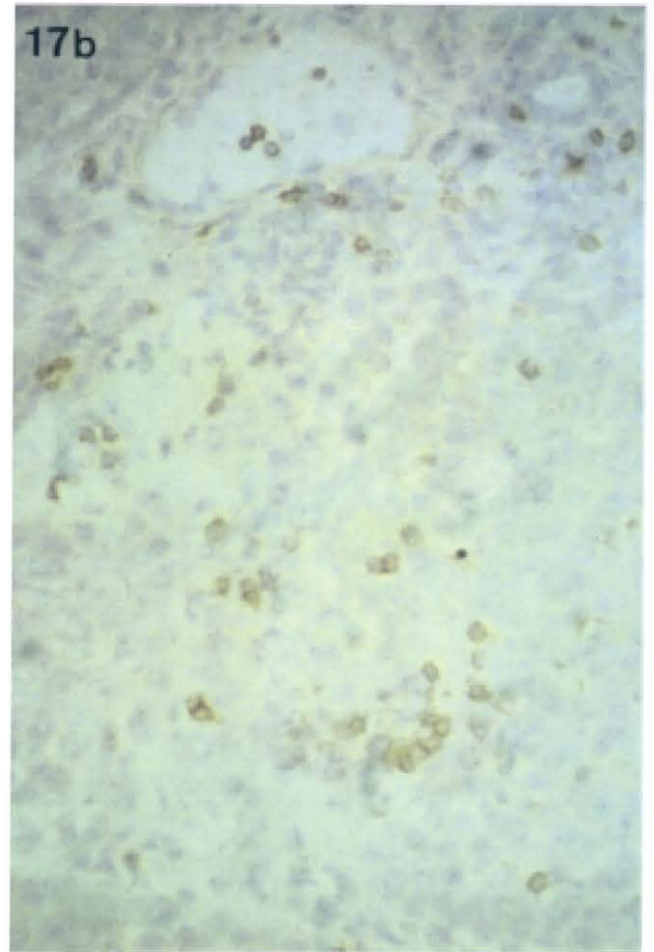
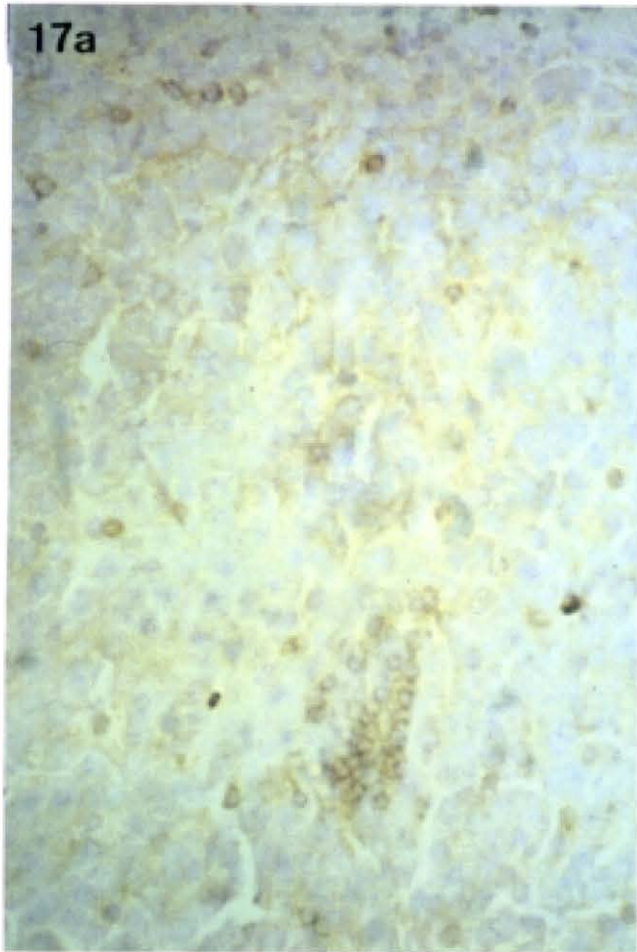
Fig. 17. Tipificación de infiltrados en hígado. Inmunoperoxidasa indirecta. Las secciones histológicas se incubaron con los Acm: a) 2B8, b) 76.2.11, c, d) 74.22.15

a) Infiltrado en parénquima hepático, 30 dpi (nº 8). X 875.

b) Infiltrado focal y difuso de linfocitos CD8+, 30 dpi (nº 8). X 875.

c) Infiltrados de macrófagos en espacios porta y en sinusoides, 365 dpi (nº 12). Doble tinción: inmunofosfatasa alcalina (Acm 74.22.15) - inmunoperoxidasa (suero anti-VPPA). X 350.

d) Detalle de infiltrado focal de macrófagos y virus libre, 365dpi (nº 12). Doble tinción. X 875.



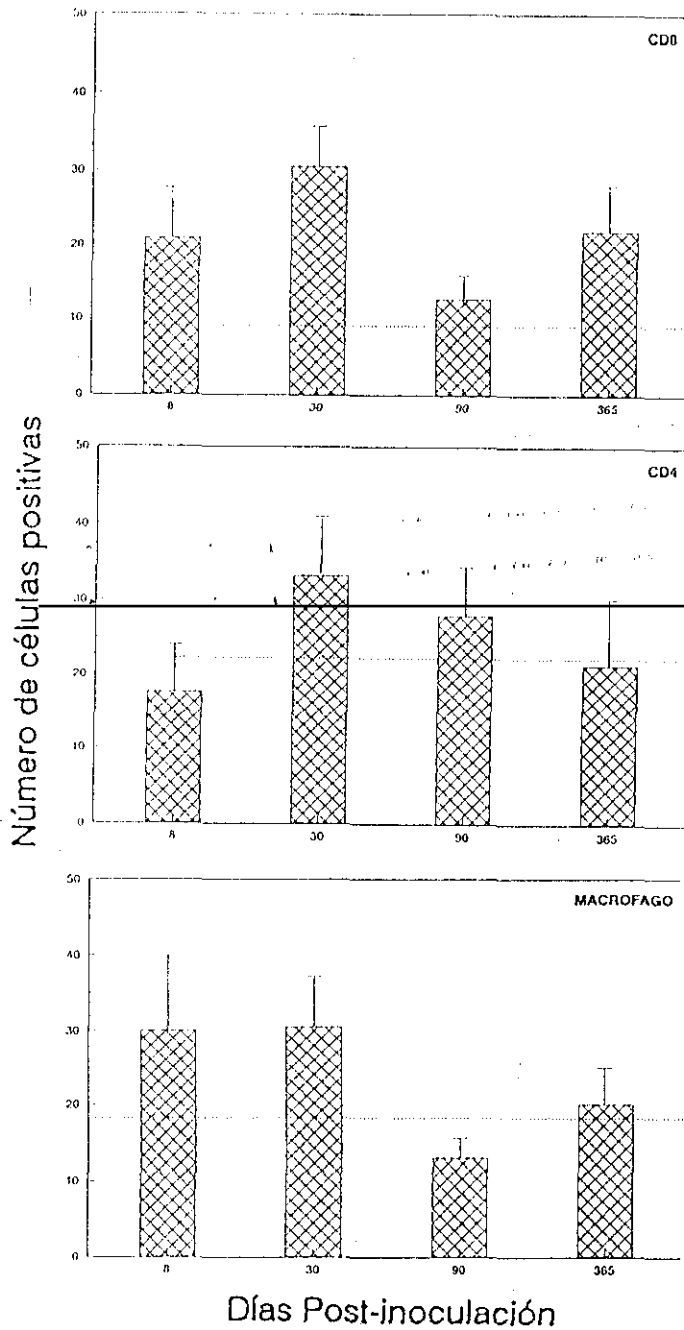


Fig.18. Cuantificación de infiltrados difusos en hígado. Los resultados se expresan, como la media del número de células positivas a : CD8 (a), CD4 (b) y macrófagos (c)  $\pm$  la desviación estandar, del recuento de siete campos de  $380 \times 500 \mu\text{m}$  por corte histológico de cada animal. Excepto a los 365 dpi, que corresponde a la media  $\pm$  la desviación estandar de la media de los dos animales sacrificados en esa fecha. La línea base (....), representa el valor medio del número de células positivas a dichos Acm, en los cortes histológicos de los seis animales testigo.

## 6.2. PULMON

Macroscópicamente, a la apertura de la cavidad torácica del cerdo sacrificado en la fase aguda (8 dpi), observamos un contenido de líquido serohemorrágico, en una cantidad aproximada de 400-500 cc. Los pulmones presentaron un incremento de tamaño con bordes redondeados, destacando sobre todos, el dorsal. La pleura visceral estaba engrosada, con aspecto turbio, observándose a su través, lobulillos congestivos y hemorrágicos. La distribución de estos lobulillos no presentó ningún patrón característico, sino que aparecían al azar en todos los lóbulos de ambos pulmones. Los tabiques interlobulillares mostraron una marcada dilatación. El aspecto de los pulmones, fue de órganos pesados y de consistencia aumentada. Al realizar presión sobre ellos dejaban fóvea persistente, demostración del intenso edema que sufrían.

La superficie de corte del órgano, apareció con aspecto marmóreo y gelatinoso, al igual que el tejido conjuntivo subpleural.

La imagen de los lobulillos, fue de macidez y al realizar presión sobre ellos, fluía de bronquios y bronquiolos abundante líquido espumoso de tonalidad rojiza.

Los rasgos macroscópicos dominantes en los pulmones de los animales supervivientes fueron la presencia de congestiones y atelectasias discretas; apareciendo engrosamientos de pequeña intensidad en la pleura visceral. Las zonas, que generalmente estaban más afectadas, fueron los lóbulos fundamentales en los bordes dorsal y caudal de ambos pulmones.

En la superficie de corte, aparecían lobulillos atelectásicos y enfisematosos, sin localización definida. Los animales testigos sacrificados simultáneamente a los inoculados, aparecieron sin alteraciones macroscópicas de interés.

Histológicamente, la lesión común a todos los animales inoculados, fue la presencia de congestión tanto en las arteriolas como vénulas pulmonares, siendo más significativa en los capilares alveolares. Estas alteraciones fueron más acentuadas en el animal sacrificado a los 8 dpi, en el que aparecieron numerosos vasos de mediano calibre, ocupados en su totalidad por una masa constituida por abundantes hematies, células nucleadas (neutrófilos y monocitos) y células endoteliales desprendidas, en las que frecuentemente, se observaron imágenes de cariorrexis. El contenido vascular, unas veces ocupaba toda la luz, constituyendo trombos oclusivos (Fig. 19) y otras, la localización fue más parietal. Con la tinción del PAS, este contenido dió reacción positiva, sin embargo, no revelamos su positividad con la tinción de la PTAH y con el suero policlonal anti-fibrinógeno de cerdo. En la mayoría de estos vasos trombosados, se observaron infiltrados perivascuales de células redondas, constituidos principalmente por células plasmáticas y macrófagos, que a veces formaban manguitos perivascuales.

En los animales supervivientes, las arteriolas de mediano y pequeño calibre tenían las paredes engrosadas (30, 150 y 365 dpi), proporcionando imágenes similares a vasculitis (Fig. 20). En general, las luces de las arteriolas contenían hematies más o menos abundantes y alguna célula nucleada, sin embargo en el animal sacrificado a los 90 dpi, aparecían algunas arteriolas con un contenido de detritus amorfo en el que se localizaron numerosas células redondas, generalmente linfocitos y macrófagos, no pudiéndose observar ninguna célula de núcleo alargado que pudiese recordar a fibroblastos. Mediante la técnica de tricrómico de Masson no observamos la presencia de fibras de colágeno. Estos trombos fueron parietales u oclusivos, no apareciendo señales de infarto en las preparaciones estudiadas.

Todos los animales inoculados, excepto los n°s 10 y 13 (120 y 365 dpi), presentaron linfangiectasia, observándose en las luces capilares, células mononucleares. Estas alteraciones, se

observaron junto a edema de tabiques interlobulillares (8, 30, 150 y 365 dpi) o fibrosis (90 y 150 dpi). Los bronquios y bronquiolos no presentaron alteraciones de interés y solo en un caso, se observó una discreta fibrosis peribronquial (nº 12) (365 dpi).

Una lesión peculiar del animal sacrificado a los 8 dpi, fue la presencia de abundantes detritus celulares, en los alveolos de algunos lobulillos (Fig. 21). Estos detritus, estaban constituidos por hematias y abundantes células nucleadas en cariorrexis, sin posibilidad de distinguir el tipo celular al que pertenecían. Estas células necróticas, también se observaron en algunos bronquiolos y bronquios. Junto a estos lobulillos con células necróticas, se distinguían otros enfisematosos, pero en general el aspecto histológico principal del órgano, fue de consolidación generalizada, con engrosamiento de paredes alveolares y alveolos atelectásicos.

Las lesiones histológicas pulmonares de los animales supervivientes a la infección, fueron generalmente homogéneas a los distintos tiempos post-infección. En las luces alveolares de los animales supervivientes, generalmente no se apreciaron células descamadas, salvo en el animal sacrificado a los 30 dpi y en los dos animales sacrificados al final del experimento (365 dpi), que presentaron abundantes hematias (nº 12) y numerosos macrófagos alveolares desprendidos así como algunas células alveolares (nº 13). Los cerdos nº 8 y 11 (30 y 150 dpi), presentaron hipertrofia de las bandas de músculo liso, situadas en el extremo apical, entre alveolos adyacentes y que actúan a modo de esfínteres, apareciendo generalmente en zonas próximas a alveolos enfisematosos.

El aspecto histológico dominante en la mayoría de los animales supervivientes, fue de consolidación pulmonar, debida a la presencia de atelectasias generalizadas junto a lobulillos enfisematosos (30, 90 y 120 dpi) (Fig. 22), no encontrándose ningún pulmón con enfisema generalizado. Generalmente, esta

atelectasia iba ligada a la presencia de paredes alveolares muy engrosadas (30, 90, 120, 150 dpi), sin evidenciarse fibrosis mediante el tricrómico de Masson.

En el animal sacrificado a los 30 dpi, junto al engrosamiento de tabiques alveolares, se observaron capilares muy prominentes en la luz alveolar que contenían una sustancia hialina eosinófila. Los animales sacrificados a los 120 y 150 dpi, presentaban capilares alveolares muy dilatados, alguno de ellos, con macrófagos intravasculares hipertróficos (Fig. 23). Por inmunofluorescencia, no detectamos depósitos de inmunoglobulinas y C3, en ninguno de los casos.

En los últimos estadios de la experiencia (120, 150 y 365 dpi), las pleuras estaban engrosadas por abundantes fibras de colágeno, generalmente separadas por edema, y abundantes células fibroblásticas y neovasos.

Como manifestaciones exudativa-infiltrativas dentro del cuadro general inflamatorio que sufrían los pulmones, hemos de destacar, la presencia infiltrados difusos o constituyendo pequeños focos inflamatorios. La localización de los infiltrados focales, fue peri ó yuxtavascular (30 y 150 dpi), parenquimatosa (30 dpi) o subpleural (120 dpi). Por inmunohistoquímica, estos infiltrados, reaccionaron preferentemente con los anticuerpos monoclonales que reconocen linfocitos (74.12.4, 76.2.11 y 2B8).

Respecto a los infiltrados difusos, únicamente se observó un moderado incremento en el número de células, que expresaban CD4 y CD8, a los 90 y 120 dpi (Fig. 24b, 24c), así como un aumento en el número de macrófagos, a los 120 dpi (Fig. 24a). El resto de los animales inoculados, no presentaron variaciones cuali- cuantitativas respecto a los animales testigo.

La presencia de eosinófilos, más o menos abundantes, fue constante en todos los animales inoculados.

Fig. 19. Trombo en vaso de mediano calibre, 8 dpi (nº 7). H-E. X 875.

Fig. 20. Vasculitis en arteriola, infiltrado inflamatorio, consolidación y atelectasia, 120 dpi (nº 10). Gallego. X 875.

Fig. 21. Neumonitis intersticial, 8 dpi (nº7). H-E. X 875.

Fig. 22. Consolidación, engrosamiento de tabiques interalveolares e infiltrado inflamatorio, 30 dpi (nº8). H-E. X 875.

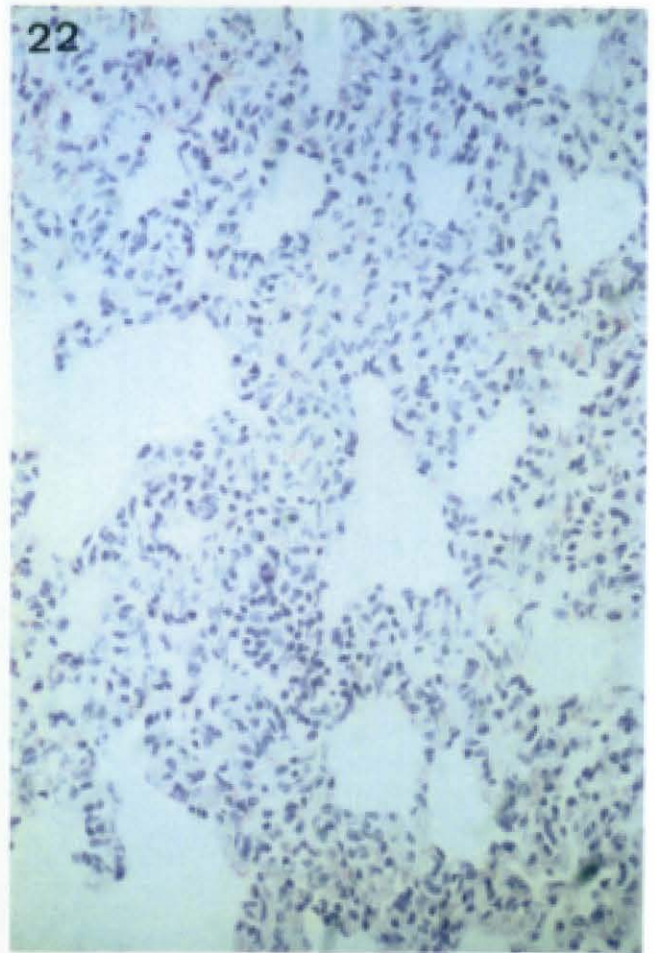
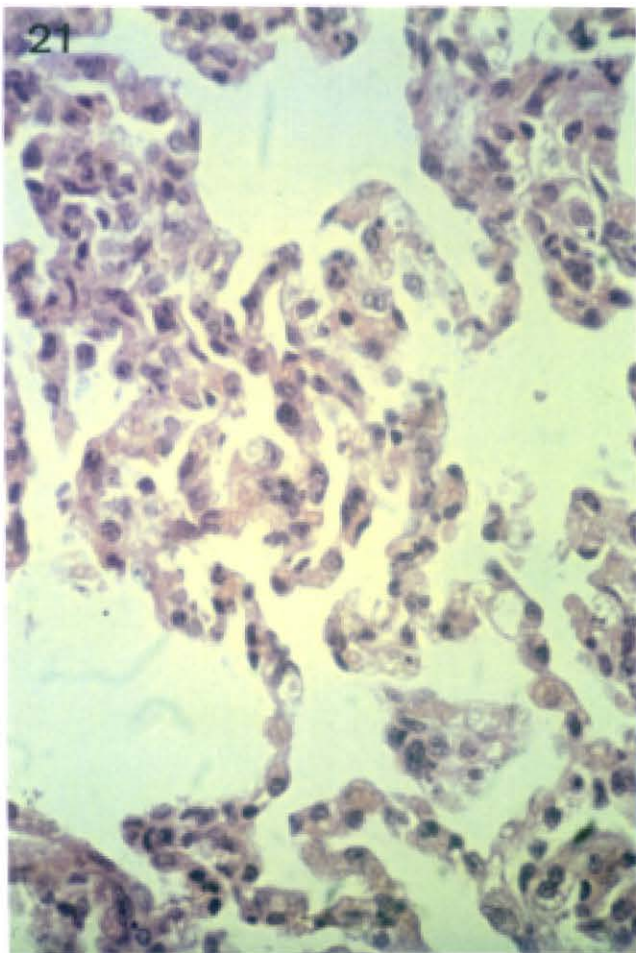
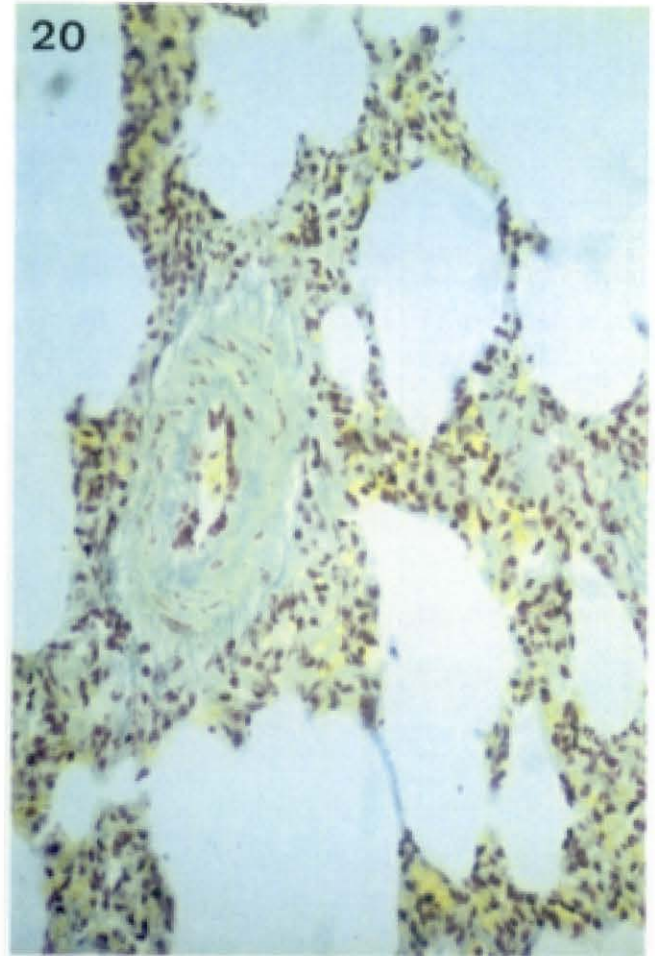
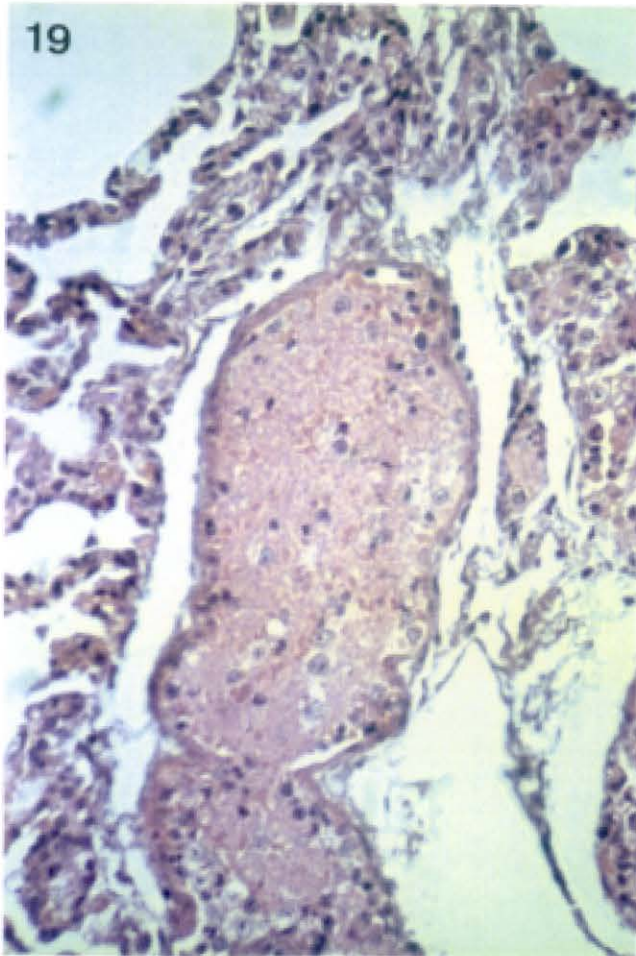
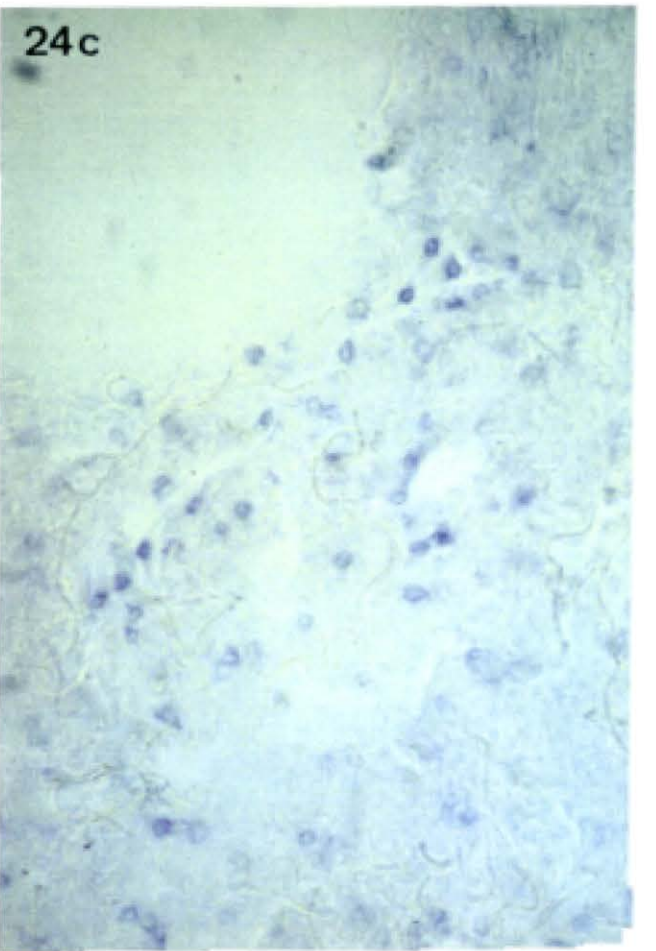
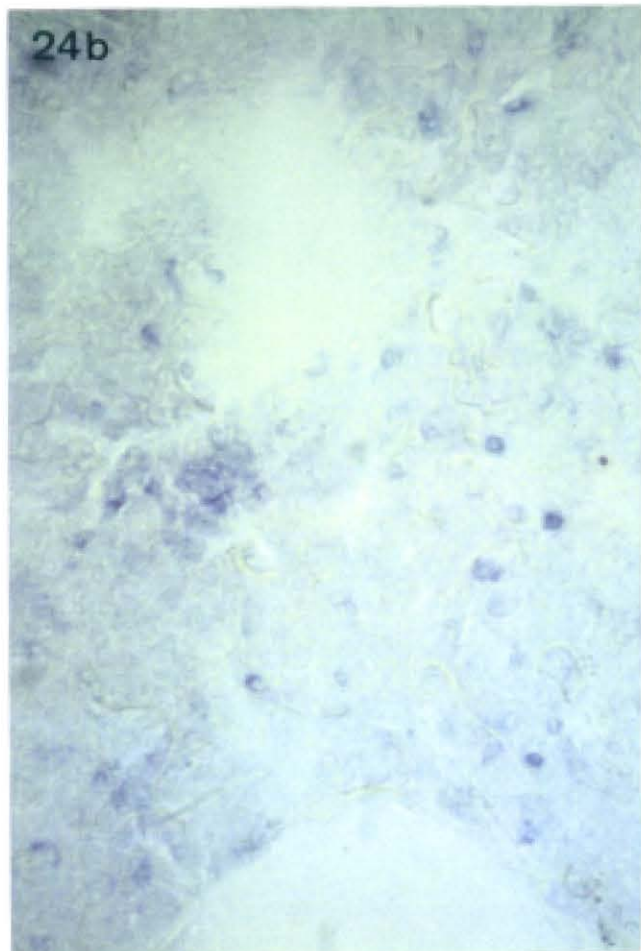
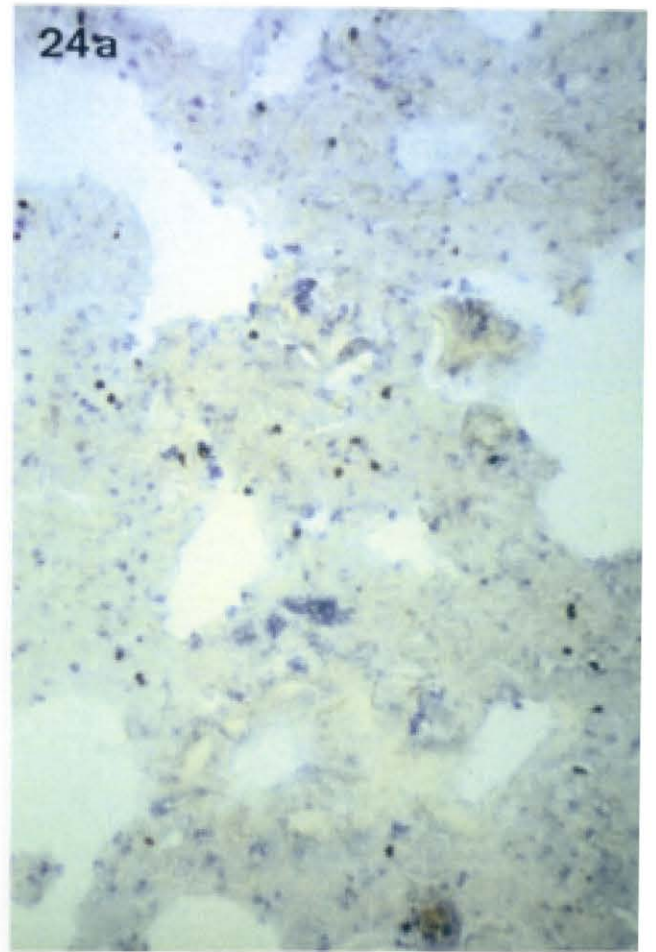
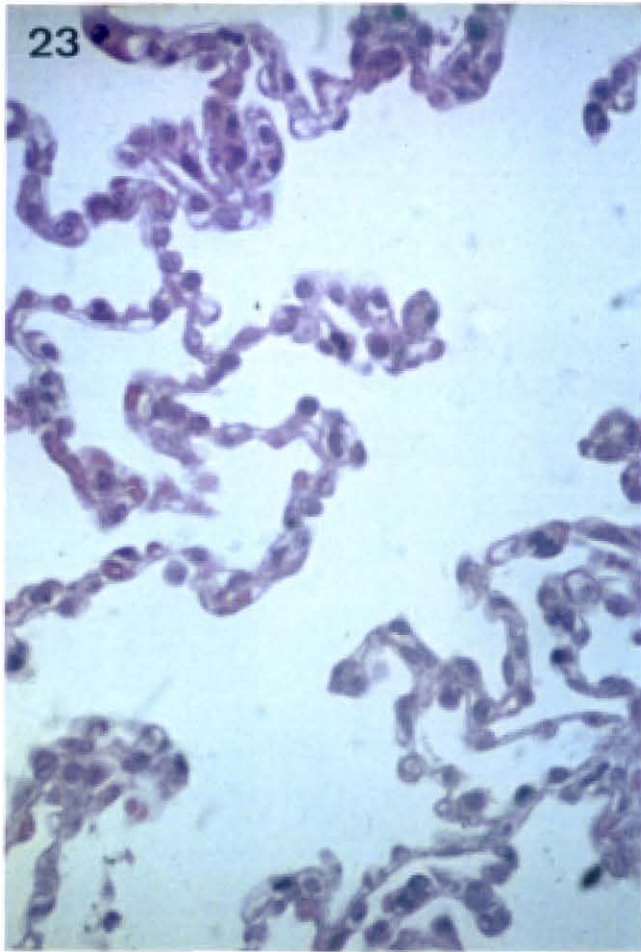


Fig. 23. Capilares alveolares dilatados, algunos con macrófagos intravasculares y neumocitos hipertróficos, 120 dpi (nº 9). H-E. X 1400.

Fig. 24. Tipificación de infiltrados inflamatorios en pulmón, 120 dpi (nº 9).

a) Infiltrados inflamatorios focales y difusos de macrófagos, virus libre en el parénquima pulmonar. Doble tinción de inunofosfatasa alcalina (Acm 74.22.15) - inmunoperoxidasa (suero anti-VPPA conjugado con peroxidasa). X 350

b y c) Detalle de infiltrados inflamatorios focales y difusos de linfocitos CD8+. Inunofosfatasa alcalina indirecta (Acm 76.2.11) X 875.



### 6.3. RIÑON

Macroscópicamente, los riñones del animal sacrificado "in extremis" en fase aguda tenían una forma típica, eran hipertróficos, pesados, y friables, de un color pardo muy oscuro, casi negro. Aparecían intensamente congestivos con numerosas petequias prominentes y confluentes sobre la superficie de órgano. La superficie de corte hacía prominencia y decapsulaba relativamente bien, arrastrando algunos puntos del parénquima, existiendo límite neto entre cortical y medular. Se observaron petequias, tanto en la zona cortical como en la medular, con equimosis en pelvis renal. Estas lesiones, fueron menos acentuadas en los animales supervivientes.

Histológicamente, en el cerdo sacrificado a los 8 dpi, se apreciaron unos capilares glomerulares congestivos, otros trombosados y algunos con aspecto normal (Fig. 25). Los capilares glomerulares trombosados, presentaban en su interior material acidófilo, PAS positivo, de forma focal. Este material acidófilo, se tiñó intensamente con la PTAH y el conjugado fluorescente de suero policlonal anti-fibrinógeno de cerdo (trombos de fibrina) (Fig. 26). En el espacio urinario de algunos glomérulos se observaron hematies así como contenido protéico. Esos trombos, también aparecían en arterias y arteriolas interlobulares, produciendo generalmente necrosis isquémicas en amplias zonas corticales.

Los túbulos contorneados proximales y distales, contenían en las luces, eritrocitos y numerosos cilindros hialinos, PAS + PTAH +. Las células epiteliales de los túbulos proximales presentaron cariorrexis difusa y degeneración hialinogutular. Estas imágenes de cariorrexis, también se observaron en células intersticiales del espacio intertubular, próximas a áreas intensamente hemorrágicas.

En los animales supervivientes, la enfermedad cursó con un alto grado de uniformidad, observándose hialinosis segmentaria

y focal (Fig. 27), desde el día 30 al 365 post-inoculación. Los glomérulos de la corteza yuxtamedular fueron los más afectados, siendo evidentes las alteraciones entre un 10 y 30%, por corte estudiado. El volumen glomerular, estaba incrementado por una sustancia hialina PAS +, Rojo Congo -, que expandía el mesangio. El aumento de matriz mesangial, se acompañaba de incremento de células mesangiales, siendo prácticamente inexistente el espacio urinario. En algunos casos (90, 120 y 365 dpi), hubo extravasación de material protéico (acidófilo, PAS +) al espacio urinario, con presencia ocasional de macrófagos espumosos y vacuolizados (120 dpi). Las células epiteliales parietales presentaron hiperplasia e hipertrofia (30, 90, 150 dpi) (Fig. 28), constituyendo ocasionales semi-lunas, que a veces formaban sinequias con el pelotón vascular (90 dpi) . A los 150 dpi, la cápsula de Bowman estaba engrosada de forma irregular (plata Metenamina).

Los capilares glomerulares estaban dilatados, con membranas basales engrosadas, que por PAS, plata Metenamina y tricrómico, presentaban doble contorno o imágenes semejantes (30, 150 y 365 dpi) (Fig. 29). La membrana basal glomerular, del animal sacrificado a los 90 dpi, era festoneada, no uniforme (Fig. 31). Los podocitos aparecían hipertróficos y casi desprendidos de la membrana basal glomerular (30,90 y 365 dpi) (Fig. 32).

A los 30 y 365 dpi, se observaron posibles depósitos, que por la localización subendotelial, podrían corresponderse con los depósitos de C3, detectados por IF en todos los animales supervivientes. Los glomérulos presentaron un patrón granular discontinuo de C3 (Fig. 30b), así como una tinción mesangiocapilar con un patrón difuso, finamente granular para IgM (Fig. 30a). A los 120 y 365 dpi, las membranas basales tubulares, mostraron una tinción moderadamente intensa para C3. En ningún caso, reaccionaron con IgA, presentando una tinción discreta (niveles basales) para IgG y gammaglobulinas totales.

Los animales testigo fueron negativos para IgM y C3,

presentando una fluorescencia basal (tinción mesangial) para IgG, en todos los casos (Tabla VII).

TABLA VII

Nº Cerdo	8	9	10	11	12-13
Fecha de Sacrificio (dpi)	30	90	120	150	365
Gammaglobulinas					
Totales	1+	1+	1+	1+	1+
IgM	4+	4+	ND	3+	3+
IgG	ND	1+	1+	0	1+
IgA	0	0	0	0	0
C3	2+	3+	2+	1+	1+

Detección de inmunocomplejos por IF en riñones de los cerdos supervivientes. La intensidad de la fluorescencia está cuantificada en una escala de 0 (negativo) a + 4 (máximo).

N.D.: no determinado

La alteración más extendida en los túbulos de la zona cortical y medular, fue la degeneración vacuolar de las células epiteliales. Esta degeneración, se iniciaba en la zona basal celular, observándose numerosas células acidófilas, ocasionalmente desprendidas de la membrana basal tubular, que constituían cilindros celulares (90, 120 y 365 dpi) (Fig. 34). A los 120 dpi, en las luces de algunos tubulos de la zona cortical, se observaron mallas finas acidófilas semejantes a fibrina, que sin embargo, resultaron PTAH negativo, al realizar la técnica en paralelo con controles positivos.

En el espacio intersticial intertubular, las arteriolas y algunos capilares estaban congestivos, de forma más acentuada en la zona medular. Frecuentemente observamos trombos hialinos similares a los descritos en los glomérulos y cambios parietales como hipertrofia, edema subendotelial y fibrosis periarteriolar (nº 13) (Fig. 32), restringidos en su mayor parte a arteriolas y arterias interlobulares. Los infiltrados inflamatorios difusos unicamente fueron evidentes a los 8 dpi, fecha en la cual observamos un moderado incremento en el número de macrófagos (identificados por los Acm 1G1 y 74.22.15) y de linfocitos T4 (Acm 74.12.4). En los animales supervivientes no observamos modificaciones con respecto a los animales controles.

En la tipificación de las células que habían proliferado en los glomérulos de los animales supervivientes, observamos un ligero incremento en el número de macrófagos (90 y 365 dpi) (Fig. 34a), no encontrando diferencias con los Acm que reconocen linfocitos T4 ni T8 respecto de los controles.

Con relación a la presencia de infiltrados inflamatorios focales, hemos de señalar que el animal que presentó mayor número de infiltrados y una reactividad más amplia con el panel de Acm utilizados fue el animal sacrificado a los 30 dpi (Figs 34b, 34c). A los 120 y 365 dpi, fueron menos abundantes e inexistentes a los 90 y 150 dpi.

Los infiltrados intertubulares observados a los 30 dpi, estaban constituidos por macrófagos y linfocitos indistintamente, sin embargo este tipo de infiltrados a los 120 y 365 dpi mostró un marcaje selectivo, bien de linfocitos, concretamente de linfocitos T4 (n°s 10 y 12) bien de macrófagos (n° 13).

Los infiltrados yuxtavasculares y yuxtaglomerulares observados a los 30, 120 y 365 dpi (Fig. 34d), también reaccionaron exclusivamente con un único AcM (Tabla VIII).

TABLA VIII

DPI	Nº Cerdo	Reactividad Acm				
		74.22.15	1G1	2B8	76.2.11	74.12.4
30	8	IT	IT/G		IT/V	IT
120	10	V		IT		IT
365	12			IT		IT
"	13	IT	G	V		

Tipificación de infiltrados focales en riñón por inmunohistoquímica indirecta con Acm.

IT: Intersticio intertubular

V: " peri o yuxtavascular

G: yuxtaglomerular

Fig. 25. Panorámica de la zona cortical del riñón. Glomérulos trombosados y cilindros hialinos, 8 dpi (nº 7). H-E. X 350.

Fig. 26. Detalle de trombos de fibrina en capilares glomerulares ( ▶ ), 8 dpi (nº 7). PTAH. X 1040.

Fig. 27. Hialinosis glomerular ( ▶ ). Glomerulos en diferentes estadios evolutivos, 90 dpi (nº 9). Tricrómico de Masson. X 1040.

Fig. 28. Hiperplasia de células epiteliales ( → ), asas capilares dilatadas y de paredes rígidas ( ▶ ), 90 dpi (nº 9). Tricrómico de Masson. X 1040.

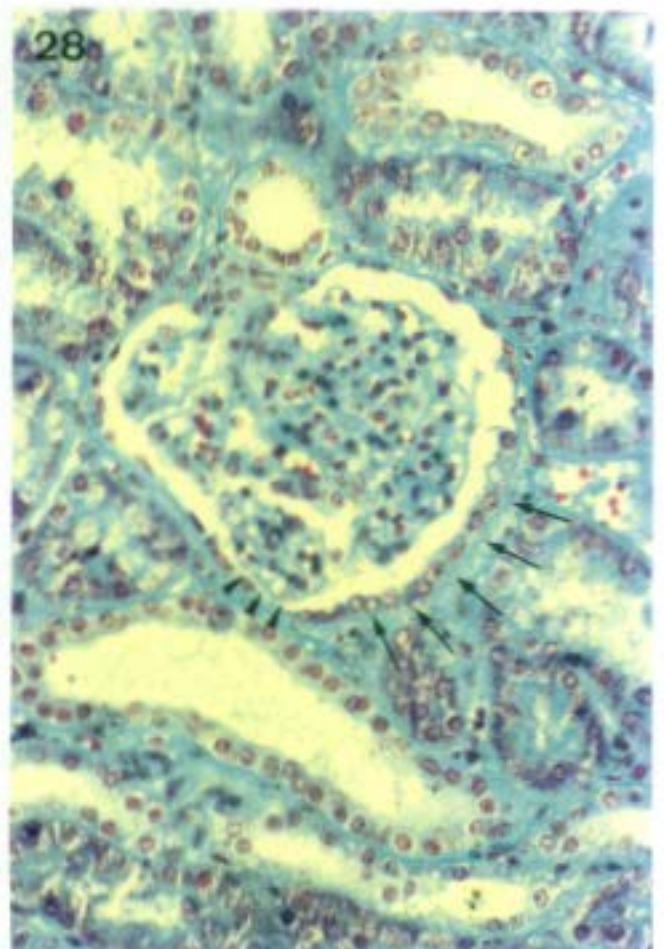
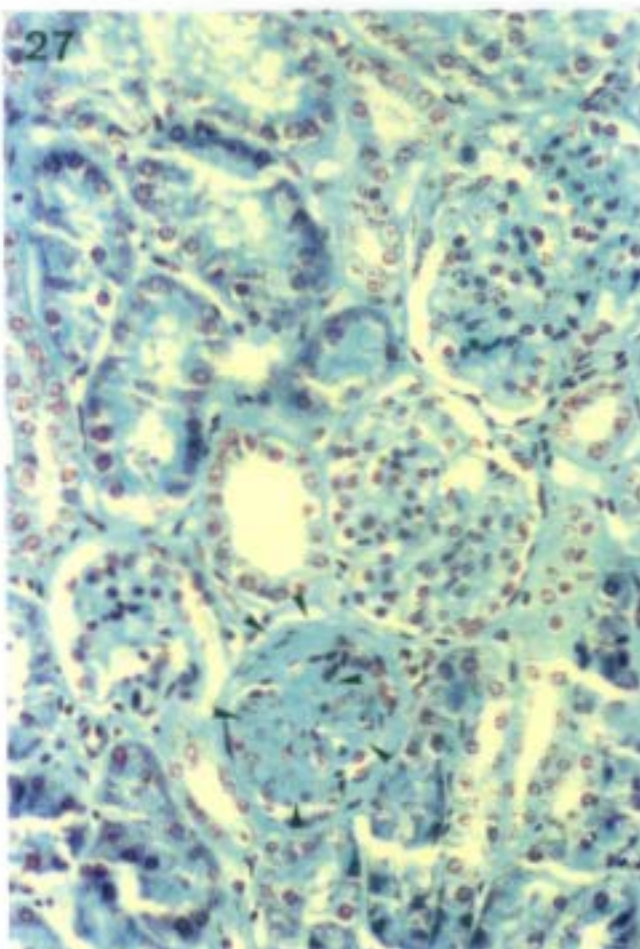
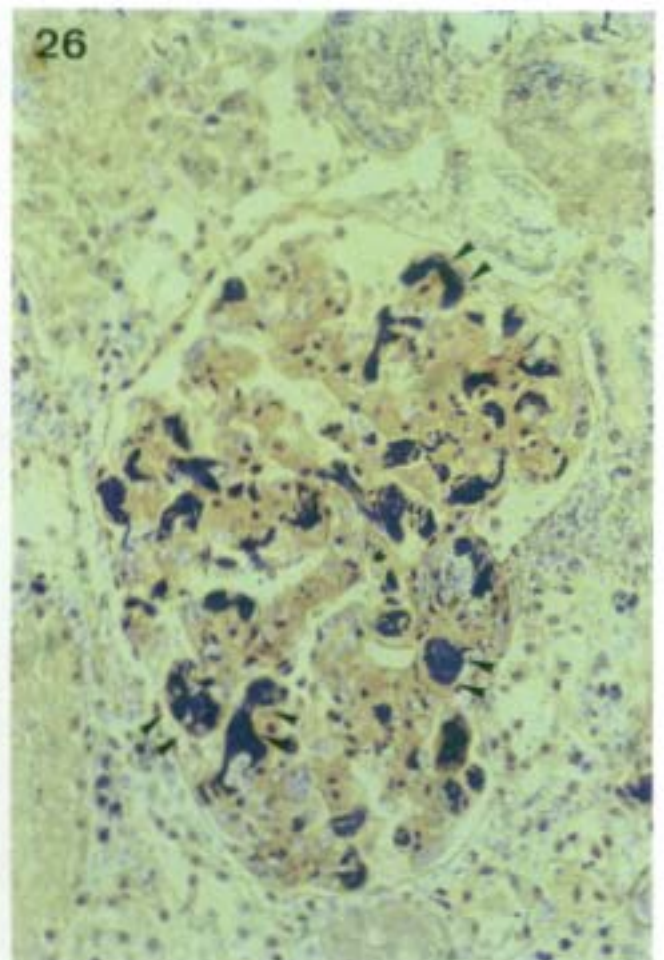
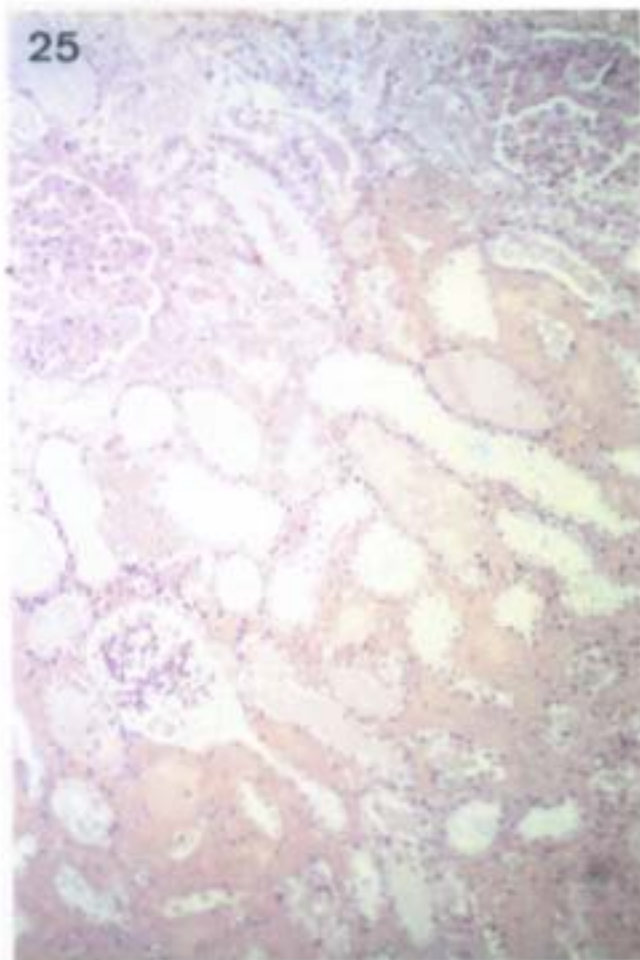


Fig. 29. Imágenes de doble contorno en la membrana basal de los capilares glomerulares ( ▶ ), 150 dpi (nº 10). Tricrómico de Masson. X 4160.

Fig. 30. Detección de depósito de inmunocomplejos de IgM y C3 por inmunofluorescencia indirecta. a) Tinción mesangial de IgM ( 30 dpi). b) Tinción discontinua de C3 ( 90 dpi) X 1040.

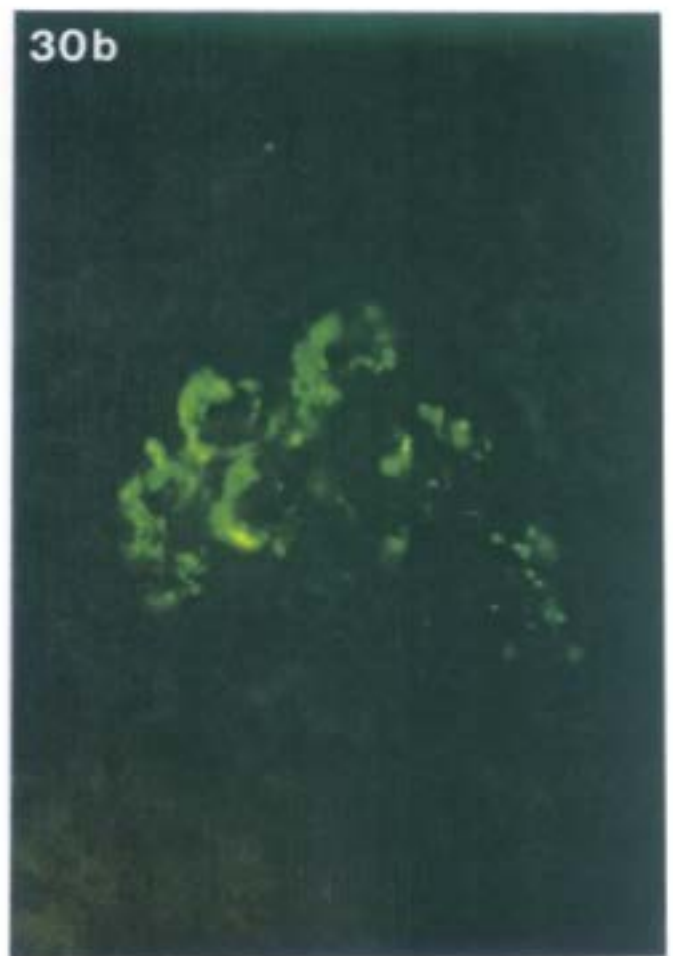
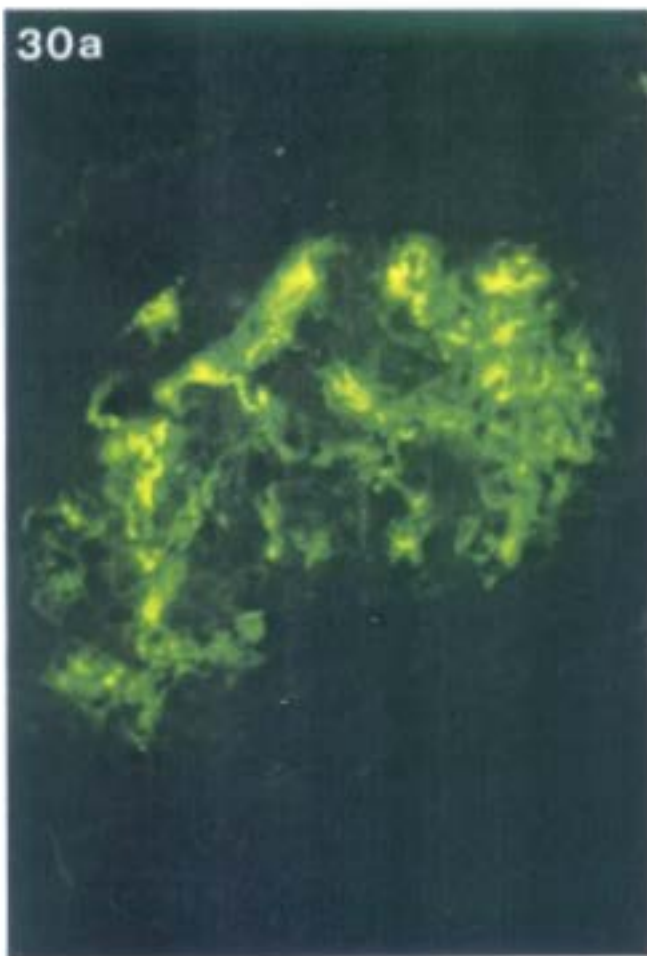
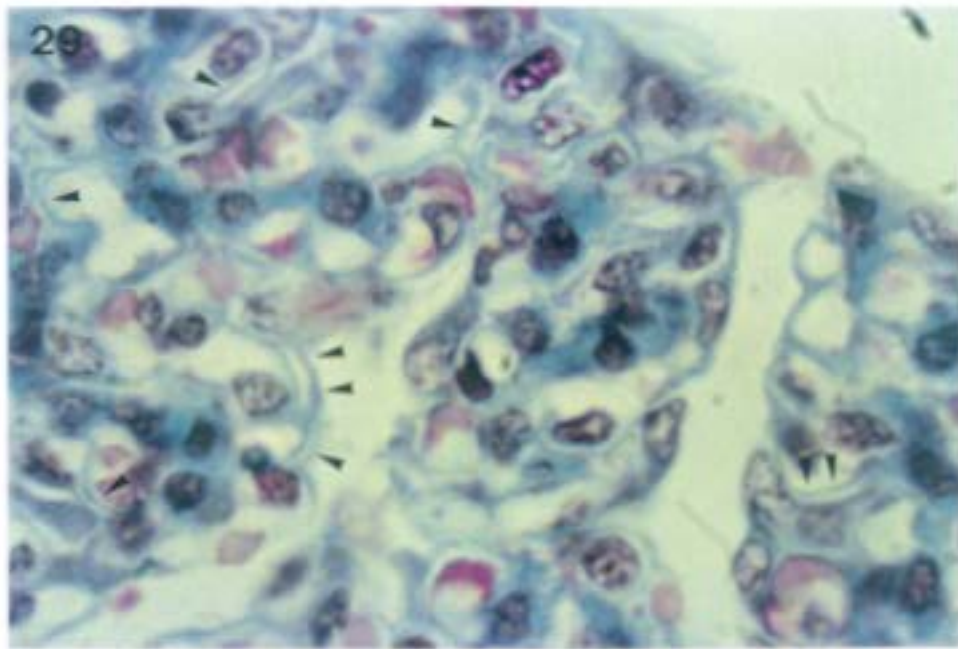


Fig. 31. Membrana basal de capilares glomerulares de contorno festoneado, 90 dpi (n° 9). Plata metenamina. X 3500.

Fig. 32. Podocitos hipertróficos ( → ), 30 dpi (n° 8). H-E. X 3500.

Fig. 33. Trombo arteriolar ( → ) y fibrosis periarteriolar ( † ), 365 dpi (n° 13). H-E. X 1040.

Fig. 34. Cilindros celulares en túbulo contorneado, 365 dpi (n° 12) H-E. X 1400.

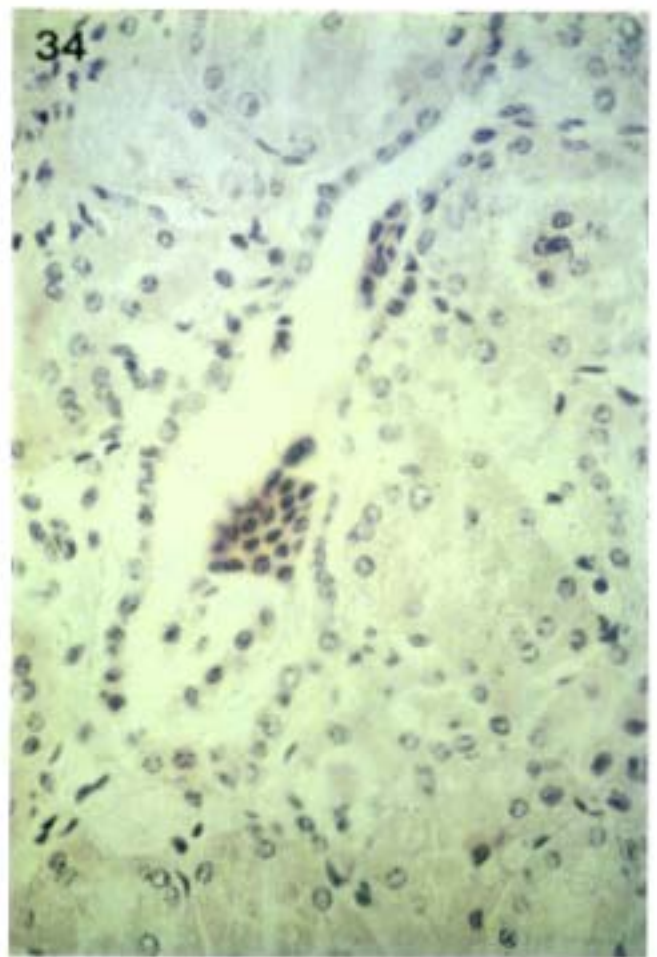
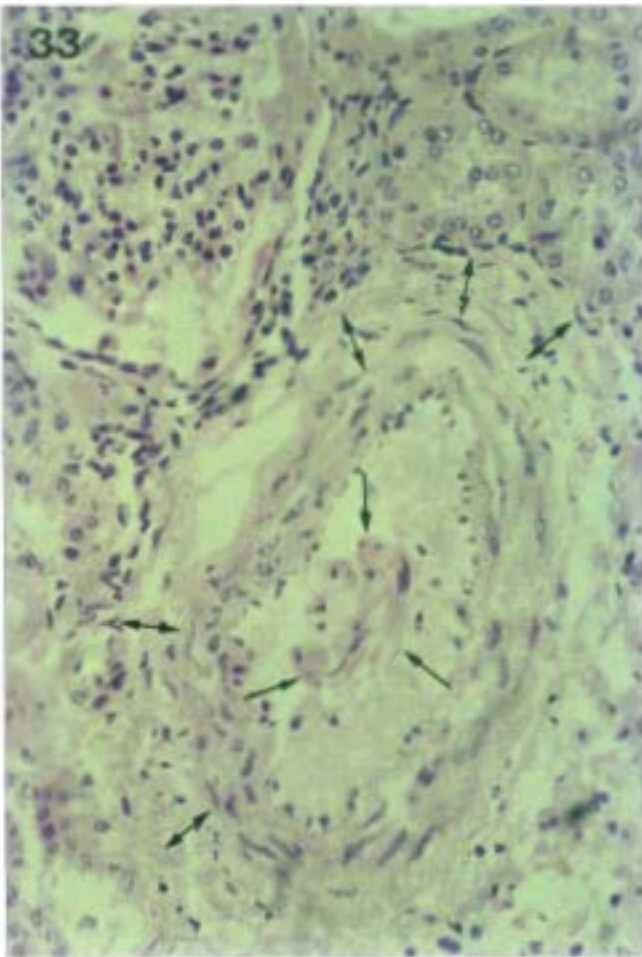
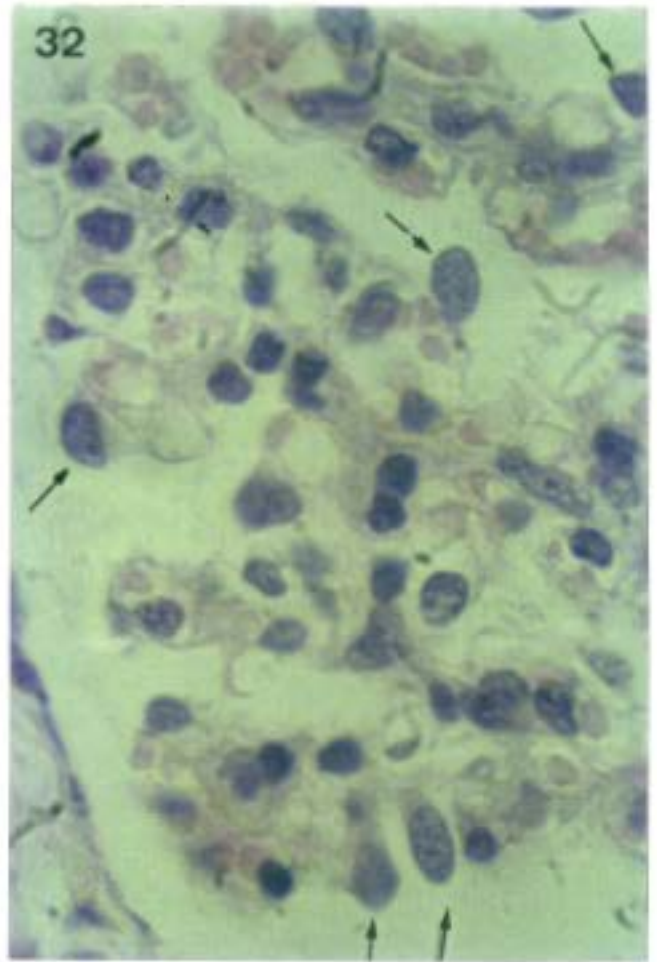
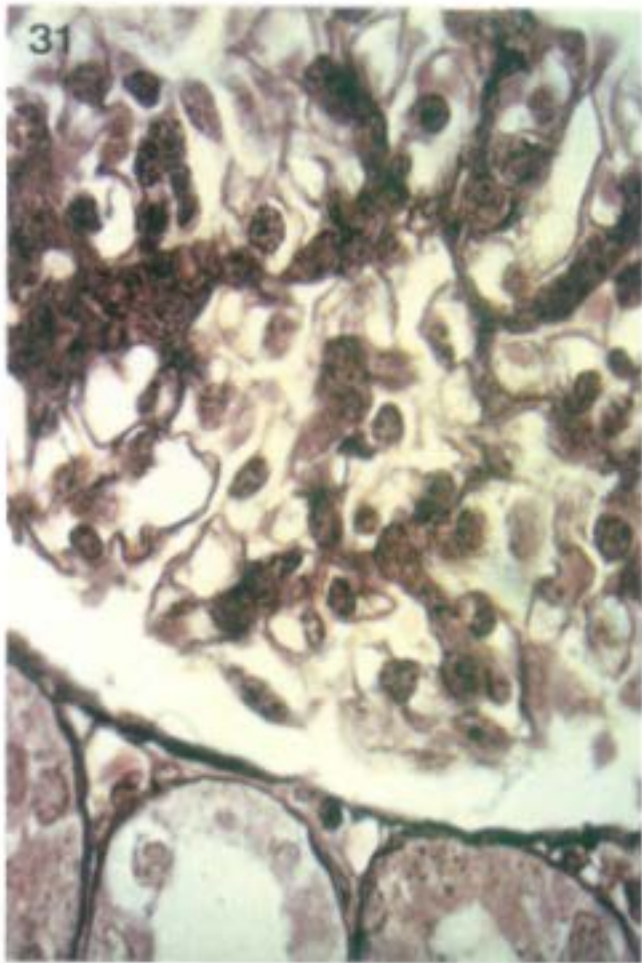


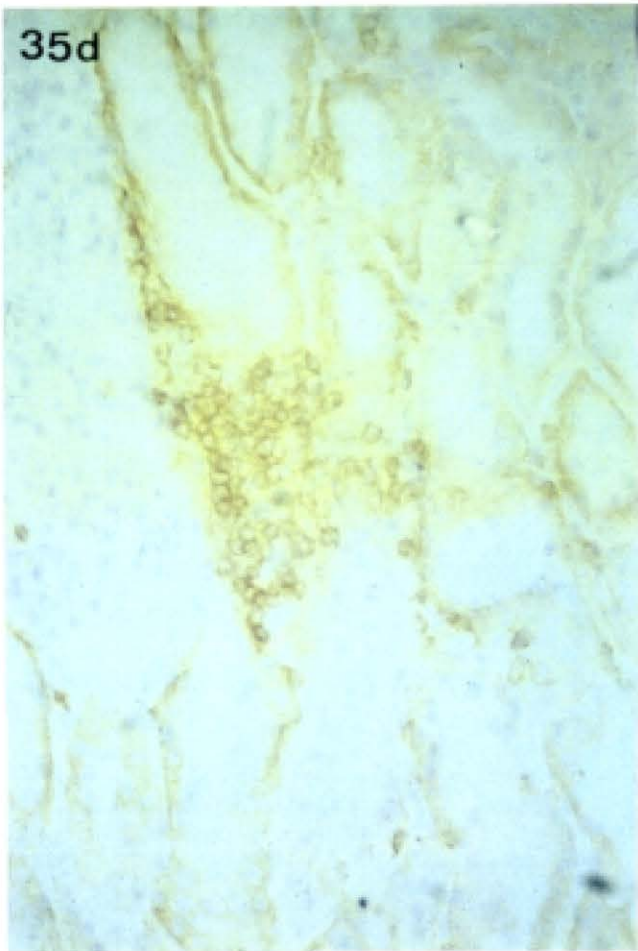
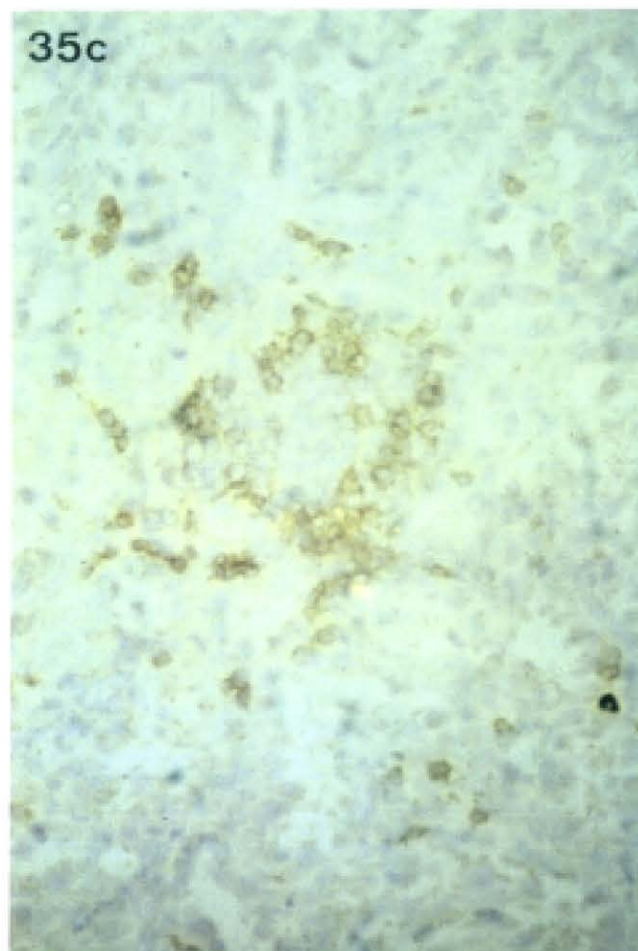
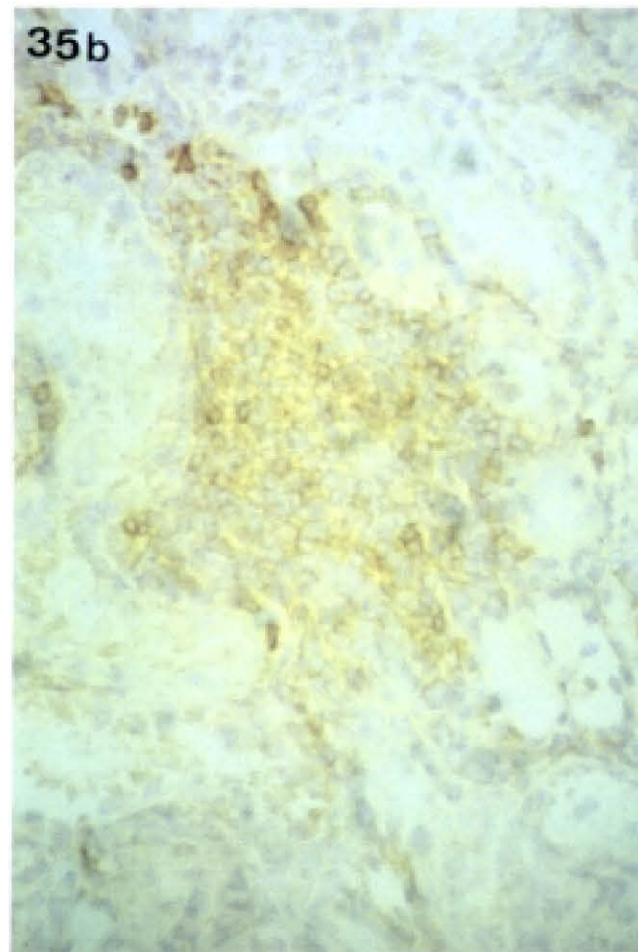
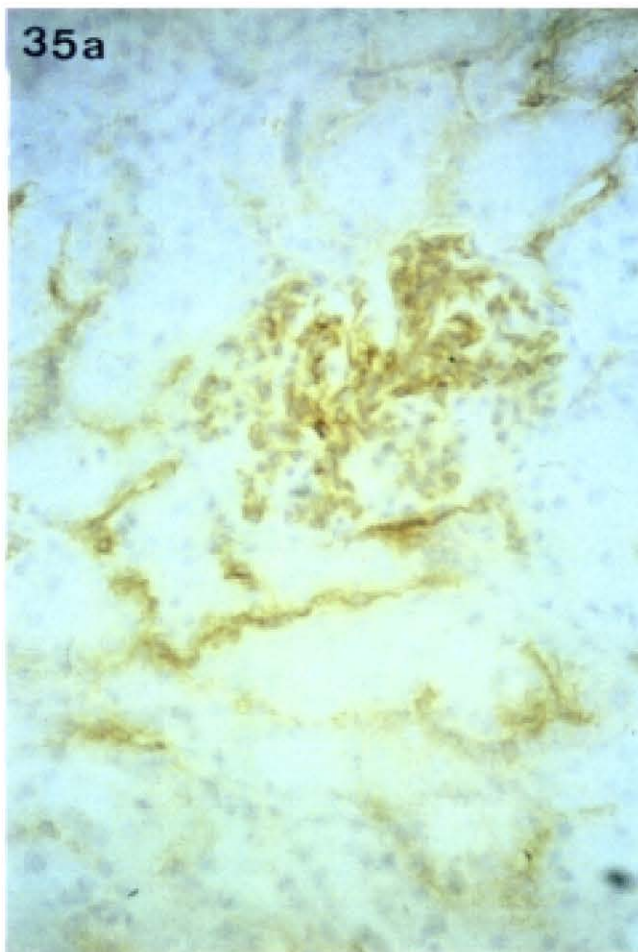
Fig. 35. Tipificación de infiltrados inflamatorios en riñón. Inmunoperoxidasa indirecta. Las secciones histológicas se incubaron con los Acm: a) 1G1 b) 74.22.15 c) 76.2.11 d) 2B8 y un antisuero de ratón, conjugado con peroxidasa. La reacción se reveló con diaminobencidina y se contrastó con hematoxilina de Carazzi.

a) Tinción mesangial y en macrófagos intersticiales intertubulares, 365 dpi (nº 13). X 875.

b) Infiltrado intersticial de macrófagos en límite cortico-medular. 30 dpi (nº 8). X 875.

c) Infiltrado de linfocitos CD8+ en zona cortical. 30 dpi (nº 8). X 875.

d) Infiltrado yuxtaglomerular. 365 dpi (nº 13). X 875.



## V. DISCUSSION

En este trabajo, se ha realizado una infección experimental en doce cerdos miniatura, singénicos SLA dd, con el aislado atenuado del VPPA, España-75. Esta inoculación, nos ha permitido, por una parte, estudiar la acción del virus sobre distintas poblaciones celulares y la persistencia vírica y por otra, estudiar el desarrollo de las lesiones histopatológicas a lo largo de la infección.

Para poder estudiar la acción del virus sobre las diferentes poblaciones celulares, se utilizaron anticuerpos monoclonales. Si bien, actualmente, se dispone de anticuerpos monoclonales específicos de macrófagos porcinos (Lunney y col., 1984, Minguez y col., 1989), no se han descrito anticuerpos monoclonales frente a células dendríticas, endoteliales o epiteliales. Estas células son susceptibles a la infección por el virus de la Peste porcina africana (Pan, 1987; Quezada y col., 1989; Pérez, 1992) y al igual que los macrófagos, pueden actuar como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T (Poher y col., 1983, Unanue y col., 1984).

Con relación a las células dendríticas, en un principio, utilizamos, el Acm 33D1, específico de células dendríticas de ratón (Nussenzweig y col., 1982). Este Acm, no reaccionó con ningún tipo celular de los órganos linfoides porcinos. Por consiguiente, tratamos de obtener anticuerpos monoclonales frente a células dendríticas porcinas, inmunizando los ratones con células mononucleares adherentes al plástico, obtenidas a partir de sangre. Esta fracción celular está constituida, fundamentalmente, por macrófagos y una mínima proporción de células dendríticas (Van Voorhis y col., 1982). El Acm seleccionado de esta fusión, el 1G1, si bien, no fue selectivo de células dendríticas, reconoció células de morfología estrellada en los manguitos linfáticos periarteriolas del bazo, que podrían ser compatibles con células dendríticas. Los porcentajes de reactividad del anticuerpo monoclonal, con las

suspensiones celulares y la distribución histológica que presenta en órganos linfoides y no linfoides, son similares a los descritos para anticuerpos monoclonales englobados en el grupo de diferenciación (CD), CD68. Este antígeno, presente en monocitos-macrófagos, determinados linfocitos, basófilos, neutrófilos y ciertas células de tejidos no hematopoyéticos, es una glicoproteína de 110 KDa (Pulford y col., 1990). Aunque en nuestro caso, ha sido imposible determinar con exactitud qué proteína reconoce, por las características histológicas que presenta, podríamos sugerir que nuestro anticuerpo monoclonal es compatible con los anticuerpos incluidos en este grupo de diferenciación (CD).

En cuanto a las células endoteliales, unicamente se ha descrito replicación, en inoculaciones con aislados virulentos (Quezada y col., 1989). Con el fin de comprobar si existía infección, con un aislado atenuado, utilizamos el Acm PAL-E (específico de endotelio humano). Este anticuerpo monoclonal, presenta reacción cruzada con el endotelio de otras especies, entre ellas, la porcina (Schlingemann y col., 1985).

Respecto al estudio del desarrollo de las lesiones histopatológicas a lo largo de la infección, en el hígado, el grado de afectación que presentan los hepatocitos, difiere según la fecha de sacrificio. La necrosis masiva, que presentan los hepatocitos en fechas tempranas post-inoculación, probablemente no se deba a la acción lesiva del virus sobre dichas células. Tal vez, sea consecuencia de las alteraciones vasculares existentes, de la liberación de citoquinas, por los linfocitos y macrófagos, que infiltran el parénquima hepático o liberación de enzimas lisosomales por las células de Kupffer y monocitos infectados. La presencia de corpúsculos de inclusión, en los citoplasmas de las células de Kupffer y la ausencia de estas imágenes en los hepatocitos, sostienen esta afirmación. Nuestros resultados, apoyan los obtenidos por Sierra y col. (1986) que observan, por microscopía electrónica, replicación vírica en células de Kupffer y no en hepatocitos de animales inoculados con este mismo aislado

vírico (España-75). La necrosis de los hepatocitos, ha sido descrita en inoculaciones con aislados de alta y moderada virulencia (Moulton y col., 1968; Konno y col, 1971, Mebus y col. 1981), sin embargo, sólomente se ha observado replicación, en hepatocitos de animales inoculados con aislados virulentos (Colgrove y col. 1969, Sierra y col. 1987, 1989).

Los vestigios de mallas de fibrina PTHA (+), observados en las venas centrolobulillares y espacios porta de los animales sacrificados a los 8, 30 y 90 dpi, en ningún caso son depósitos patentes como los observados en los capilares glomerulares de estos mismos animales. De hecho, la presencia de trombos en el hígado, es un hallazgo inusual en la Peste porcina africana (Moulton y col., 1968). En la reacción generalizada de Shwartzman, modelo experimental de coagulación intravascular diseminada, los capilares portales, aparecen ocluidos por trombos de fibrina y el parenquima hepático de las regiones subcentrales y periportales está salpicado de focos necróticos (Robbins, 1975).

La necrosis de las células de Kupffer, observada fundamentalmente a los 8 y 30 dpi, es consecuencia de la replicación del VPPA en estas células del sistema mononuclear fagocítico. Esta lesión, coincide con la máxima expresión de antígeno vírico, observado por inmunofluorescencia directa e inmunohistoquímica de doble marcaje con los anticuerpos monoclonales anti-macrófagos y granulocitos (1G1 y 74.22.15).

La hiperplasia de las células de Kupffer (90 y 150 dpi), también ha sido descrita por Konno (1971) en la forma subaguda de la enfermedad y Gómez-Villamandos y col. (1989) en la enfermedad aguda. De forma paralela, en estos animales existe una menor expresión de antígeno vírico. Esta disminución, posiblemente esté motivada, por la eliminación de gran cantidad de virus durante las primeras semanas post-inoculación (Wilkinson col., 1981) y el restablecimiento de la capacidad funcional de los macrófagos (Mebus y Gregg, 1985; Sánchez-Vizcaino y col. 1981).

Los trabajos existentes sobre persistencia del VPPA, muestran el tropismo que presenta el virus por el tejido linfoide. McVicar (1984), detecta virus infeccioso en ganglios linfáticos y amígdalas, de animales infectados de forma persistente, a los 70, 85 y 92 dpi; observando cantidades mínimas y de forma ocasional, en bazo, riñón y médula ósea. Wilkinson y col (1981), detectan virus infeccioso en hígado, pulmón y riñón hasta la 5ª semana post-pirexia, tras la inoculación con el aislado vírico Malta/78. En nuestro caso, visualizamos de forma nítida antígeno vírico, por IFD, en los hígados de los tres primeros animales sacrificados (nº 7, 8 y 9) y en el nº 12 (365 dpi). Por inmunohistoquímica (doble marcaje), con los Acm anti-magróforo, observamos antígeno vírico en todos los animales.

En ninguno de los animales inoculados, hemos observado células endoteliales que expresasen antígeno vírico, coincidiendo en esta observación con Sierra y col. (1987).

El fenómeno de hemadsorción, que presentan algunos aislados del virus de la PPA, ha servido para clasificarlos y como técnica de diagnóstico, pero por el momento, se desconoce su significado biológico. Gómez-Villamandos y col. (1989) y Sierra y col. (1991), han observado por primera vez este fenómeno "in vivo", en los sinusoides hepáticos de animales inoculados con los aislados E-70 virulento y E-75 atenuado a los 3 y 9 dpi respectivamente. Nosotros, también hemos observado estas imágenes de hemadsorción a los 8 dpi, no apareciendo en fechas posteriores, lo cual confirma, que dicho fenómeno tiene lugar en estadios tempranos de la infección.

Moulton y col. (1968) y Konno y col. (1971) han descrito la presencia de infiltrados inflamatorios, próximos a las zonas de necrosis tisular. Nosotros, por medio de Acm hemos tipificado, por primera vez, las poblaciones leucocitarias que participan en estos infiltrados. En este estudio, hemos utilizado los anticuerpos cedidos por la Dra J. Lunney y los producidos por nosotros, 1G1 y 2B8. Este último, seleccionado de la fusión con

timocitos de cerdo y que presenta unos patrones de distribución histológica en órganos linfoides, más amplios, que los de los Acm 74.12.4, específico de linfocitos CD4 y el 76.2.11, específico de linfocito CD8, reacciona prácticamente con la totalidad de las células, en los tres órganos. Sin embargo, existe heterogeneidad en cuanto a la intensidad. La diferente intensidad observada en los cortes de inmunohistoquímica, se refleja también en los histogramas de citometría de flujo. Por las características que presenta este Acm, es evidente, que reconoce epítipo/s expresados en la mayoría de las poblaciones linfoides. Podría ser compatible con, el antígeno común leucocitario (CD45) o con el antígeno de función leucocitaria (LFA-1, CD18). La ausencia de reactividad con otros tipos celulares no linfoides, excluye la similitud con antígenos como, el SLA clase-I, presente en la mayoría de las células.

Las células, que preferentemente formaron parte de los focos inflamatorios fueron macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos T8. Las células fagocíticas, pueden ser atraídas a las zonas de inflamación por los componentes C2a, C3a, C5a del complemento. La activación del sistema de complemento, puede tener lugar por la formación de inmunocomplejos (vía clásica). Esta posibilidad, es válida en la Peste porcina africana, a partir de la primera semana post-inoculación, fecha en que, se detectan anticuerpos específicos frente al VPPA (Sánchez-Vizcaino y col., 1981) y los niveles de virus en sangre son máximos (Genovesi y col., 1988).

En fases previas a la aparición de anticuerpos, el componente C3b del complemento, puede unirse a glicoproteínas virales, expresadas en la superficie de las células infectadas y desencadenar la cascada del complemento (Oldstone y Lampert, 1979). En la Peste porcina africana, no se ha demostrado la lisis de células infectadas por la vía alternativa, desconociéndose en qué punto falla este mecanismo. Tal vez, suceda como en infección por el HIV, en la cual, sí se activa la vía alternativa pero no tiene lugar la lisis por el sistema del complemento (Yerfenof y col., 1991).

La presencia de infiltrados inflamatorios focales y difusos de linfocitos CD8+, puede estar relacionada con la patogenicidad del aislado vírico utilizado en la inoculación de los animales. Así, virus infectivo de la PPA induce, preferentemente la proliferación "in vitro" de células CD8+. Esta respuesta poliferativa, es bloqueada por Acm anti-CD8 y anti-CD4; este hecho les sugiere a los autores, que las células CD4+ son necesarias en la expansión de las células CD8, como fuente de linfoquinas (Canals y col.,1991).

Los focos inflamatorios de macrófagos, observados en uno de los animales sacrificados al año post-inoculación, son indicativos de lesión crónica (Galo, 1988), lesión motivada, al menos en parte, por la presencia de virus en dicho órgano.

En el estudio cronológico, sobre las variaciones cualitativas y cuantitativas de las poblaciones leucocitarias, que infiltran el hígado, hemos observado una disminución de linfocitos CD4+ y un incremento paralelo de linfocitos CD8+ y de macrófagos a los 8 dpi. Ambos incrementos, se mantienen a los 30 dpi y disminuyen a los 90 dpi. Estas poblaciones celulares, podrían estar implicadas, en la recuperación clínica de los animales.

Concretamente, los linfocitos CD8+, pueden actuar como linfocitos citotóxicos, eliminando células infectadas por el virus (Taylor y Askonas, 1986). En Peste porcina africana, Martins y col.(1988) y Mendoza (1990), han demostrado, que dicho mecanismo citotóxico funciona en animales recuperados de la infección. Por otra parte, las células CD8+ activadas, producen interferon gamma y factor de necrosis tumoral, linfoquinas que actúan sinérgicamente, inhibiendo la replicación vírica (Wong y col., 1988). Otra vía alternativa de actuación de los linfocitos CD8+, podría ser, através de la liberación de factor o factores solubles, distintos a los descritos, como se ha demostrado, en la infección de linfocitos CD4+ por el virus de la inmunodeficiencia humana (Walker y col.,1991).

El incremento en el número de macrófagos, durante la fase aguda y subaguda de la enfermedad, es un dato ampliamente descrito en la bibliografía. En general, en cualquier tipo de infección se produce una activación de los macrófagos; concretamente, las células de Kupffer, desempeñan un papel fundamental en el control de la diseminación vírica, durante la fase virémica. Los títulos máximos de viremia fueron registrados a los 30 días post-inoculación.

El número de linfocitos CD4+, aumentó a partir del día 30 post-inoculación, manteniéndose la misma tasa en la siguiente fecha de sacrificio (90 dpi). Estos datos, podrían sugerir la posible activación de dichas células y la consiguiente activación policlonal de células B. Genovesi y col. (1988), también describen un incremento en el número de leucocitos totales en sangre periférica, en fechas posteriores a la fase aguda de la enfermedad. El animal sacrificado a los 90 dpi, fue el que presentó el título máximo detectado de anticuerpos específicos del VPPA. La disminución de linfocitos CD8+ y de macrófagos, puede estar relacionado, con la ausencia de virus en sangre.

En los animales sacrificados al final de la experiencia, observamos, exclusivamente, un aumento en el número de macrófagos, permaneciendo los linfocitos en valores basales. Este incremento, se corresponde con la presencia de infiltrados focales también de macrófagos.

Además de los infiltrados mencionados, hemos de resaltar, la presencia de eosinófilos en los sinusoides hepáticos y espacios porta de los animales sacrificados, en fechas tempranas (8 y 30 dpi), siendo más abundantes en el primer animal (nº 7).

No se han descrito modificaciones sanguíneas en el número de eosinófilos, ni en la fase aguda ni en animales supervivientes a la inoculación con el aislado de moderada virulencia DR-II (Genovesi y col., 1988). Sin embargo, la presencia de eosinófilos

en el hígado de cerdos afectados de PPA aguda, es constante (Maurer y col., 1958; Moulton y col., 1968; Colgrove y col., 1969; Mebus y col., 1979; Arias y col., 1986; Gómez-Villamandos y col., 1989).

En visones infectados por vía placentaria, con el virus de la enfermedad aleutiana (ADV), Porter y col. (1977), describen la presencia de un acúmulo exagerado de eosinófilos en los tejidos de estos animales. Todos los animales examinados a los 33 días de vida, presentaban eosinófilos, mezclados con grupos de células linfoides, constituyendo entre el 1 y 15% del total de células infiltradas. Los autores, correlacionan la existencia de eosinófilos, con la presencia de antígeno viral libre.

Los eosinófilos, pueden ser atraídos a las zonas de inflamación por los mediadores de la anafiláxis (SRS-A, ECF, PAF e histamina), liberados por las células fagocíticas, como respuesta a una amplia variedad de estímulos (Sánchez-Crespo y col., 1980, Sánchez-Vizcaíno y col., 1981, Cheville, 1988). Los enzimas liberados por los eosinófilos, pueden neutralizar los mediadores de la inflamación ; desempeñando un papel relevante en la homeostasis. Los eosinófilos, se han definido clásicamente, como células efectoras en las reacciones de hipersensibilidad y reacciones frente a parásitos, sin embargo, pueden actuar como células presentadoras de antígeno. Recientemente, se han descrito nuevas características funcionales. Estas células, son capaces de liberar IL-1 y expresar moléculas de clase II y el receptor p55 para la IL-2 en su superficie. Todas estas características, le confieren al eosinófilo, la capacidad de interaccionar con las células CD4+. El comportamiento de los eosinófilos, como célula presentadora de antígeno difiere, en el sistema murino, del observado en los macrófagos, necesitan mayor cantidad de antígeno y la inducción de la producción de IL-2 es menor (Del Pozo y col. 1991). Estos estudios sugieren, una actividad de los eosinófilos a considerar, ya que la funcionalidad de los macrófagos está seriamente comprometida durante la fase aguda de la enfermedad, sobre todo, durante las primeras semanas post-infección.

Dentro del estudio histopatológico realizado en pulmón, hemos observado, que todos los animales inoculados, presentaban consolidación generalizada y neumonitis intersticial. Este tipo de neumonitis, ha sido descrito con anterioridad en la PPA, por Moulton y Coggins (1968), tanto en la enfermedad aguda como en la crónica. Estos autores, observan una intensificación de las lesiones en la enfermedad de curso crónico. La neumonitis intersticial o alveolitis, es el primer cambio referido por Moulton y col. (1975), en animales infectados crónicamente con el aislado Lisboa-60, atenuado. Este cuadro lesional, se manifiesta por la formación de focos inflamatorios de células mononucleares, que posteriormente entran en necrosis. En estadios avanzados de necrosis, las lesiones quedan encapsuladas y los lóbulos adyacentes desarrollan hiperplasia perivascular y peribronquial, mayoritariamente de células plasmáticas (Hess y col., 1974). En nuestros casos, los focos inflamatorios no presentaron necrosis. En los trabajos consultados sobre la evolución crónica de la Peste porcina africana, los animales inoculados con distintos aislados atenuados, que superan la fase aguda de la enfermedad, son posteriormente contraprobados con el virus homólogo virulento. Nuestros animales supervivientes no fueron sometidos a la contraprueba, este hecho, podría ser la causa del desarrollo de un cuadro lesional menos grave. La intensificación de las lesiones, en animales vacunados con vacuna muerta y posteriormente contraprobados con virus vivo, ha sido descrito en enfermedades virales persistentes (Porter y col., 1972, Crawford y col., 1978). El mecanismo por el cual, se agudiza la enfermedad no está definido, aunque se ha atribuido, al desarrollo de una reacción tipo Arthus frente a antígeno viral replicante.

Las imágenes de vasculitis, observadas en los animales supervivientes, son similares a las descritas por Pan y col. (1975), en la PPA de curso crónico. En las enfermedades persistentes, esta lesión está motivada por el depósito de inmunocomplejos en los vasos. En nuestro caso, no hemos

demostrado la presencia de IgG, IgM, antígeno vírico ni complemento en los vasos, por lo tanto no podemos afirmar que dichas lesiones, se hayan inducido por el depósito de IC.

Con relación a la persistencia del virus en el pulmón, hemos detectado antígeno vírico prácticamente en todos los animales, incluso en uno de los sacrificados al año. Esta observación, no ha sido descrito anteriormente, en animales sometidos a una única inoculación con un aislado atenuado. El animal sacrificado un año después de la inoculación, que además presentó antígeno vírico en hígado y riñón, fue probablemente un portador inaparente (Mebus y Dardiri, 1979), si bien, hubiera sido necesario corroborarlo mediante la detección de material genético del virus ( p.e. con la técnica de PCR), para demostrar tal hecho.

En cuanto a la presencia de infiltrados inflamatorios, en el pulmón, a diferencia del hígado y riñón, fue en fechas tardías (90 y 120 dpi), cuando se observó un moderado infiltrado inflamatorio, compuesto por linfocitos (T4 y T8) y macrófagos. Este hecho, podría estar correlacionado con el tropismo que presentan los aislados atenuados por el pulmón y la predisposición al desarrollo de lesiones crónicas en dicho órgano.

Respecto al estudio histopatológico de los riñones, observamos que todos los animales inoculados desarrollaron glomerulopatía. El animal sacrificado a los 8 dpi, presentó la morfología de la fase aguda: trombosis de capilares glomerulares e intertubulares. A nivel glomerular, observamos edema, vacuolización de las células endoteliales y depósitos de fibrina, que ocluían las luces capilares. En la fase aguda, Anderson y col. (1987), Pan (1987) y Quezada (1989), han encontrado evidencias de coagulación intravascular diseminada (CID). Quezada y col., observan imágenes histológicas de CID en los animales inoculados con el aislado atenuado E-75, no apareciendo esta lesión en inoculaciones con el aislado E-70 virulento. Otros datos hematológicos, que corroboran la existencia de CID, son las

alteraciones de los parámetros de la coagulación, tales como incremento de los productos de degradación de la fibrina (Edwards y Dodds, 1984) y disfibrinogenemia (Edwards y Dodds, 1985).

Los efectos cuantitativos de la CID, son dependientes del grado de saturación del SMF y de su capacidad para eliminar los agregados de fibrina de la circulación. La producción de CID en ratas, de forma experimental, es más efectiva, si se administran previamente bloqueadores del SMF (Galera-Davison y col., 1989). En animales inoculados con el aislado del VPPA, DR-II de moderada virulencia, la capacidad fagocítica de SMF está afectada durante la primera semana post-inoculación; recuperándose dicha actividad en las semanas siguientes (Mebus y Gregg, 1985). Esta disminución de la funcionalidad del SMF durante la infección por el VPPA, probablemente, dificulte el aclaramiento de los agregados de fibrina de la red capilar, sobre todo en zonas como el ovillo glomerular.

Otras características de la glomerulopatía de la fase aguda, fueron la exudación protéica al espacio urinario, acompañada en ocasiones, de hiperplasia de las células parietales de la cápsula de Bowman. Esta lesión, podía verse con frecuencia en el polo glomerular opuesto al hilio, proyectándose a veces, en el túbulo proximal, en forma de cilindros hialinos. La salida de exudado rico en proteínas y fibrina, se debe a un incremento de la permeabilidad, e indica una alteración de la barrera de filtración glomerular, producida por la trombosis capilar.

Las imágenes de cariorrexis observadas en las células epiteliales de los túbulos y en las células intersticiales, probablemente sea consecuencia de la hipoxia que sufren dichas células, motivada por las alteraciones vasculares.

Los animales supervivientes, presentaron glomerulonefritis segmentaria y focal con hialinosis. Este tipo de glomerulonefritis y otras lesiones no agudas observadas en los cerdos supervivientes, probablemente se produzcan por cambios

indirectos en el sistema inmune, de forma similar a como se produce la neumonía de la fase crónica de la enfermedad (Pan y col., 1975). Las características de esta glomerulonefritis fueron: incremento del volumen glomerular a expensas de un aumento de matriz y células mesangiales, con extravasación ocasional de material proteínico al espacio urinario. Esta extravasación, iba asociada a una hipertrofia de las células epiteliales parietales, con formación ocasional de semilunas y sinequias con la cápsula de Bowman. La hipertrofia de los podocitos, las imágenes de doble contorno en la membrana basal, así como la oclusión de los capilares glomerulares por sustancia hialina, fueron otras alteraciones observadas en los animales supervivientes.

Por inmunofluorescencia, se observaron depósitos de IgM y C3 en la pared capilar y en el mesangio. Los depósitos de inmunocomplejos (Sánchez-Vizcaino y Slauson,, 1981) y la interacción del virus con las células del SMF (Pan, 1987; Minguéz y col., 1988), podrían estar implicados en el daño glomerular. El daño glomerular puede originarse, además, por acción directa de anticuerpos o complemento, por interacción con neutrófilos o independiente de las células inflamatorias, como en la nefritis experimental de Heymann (Glassoch y col., 1968). El tipo de glomerulonefritis desarrollada, depende de la localización de los IC y de la respuesta glomerular, variando los cuadros histopatológicos según estos parámetros (Kincaid-Smith y Whitworth , 1987).

En nuestros casos, los depósitos de IC (C3 e IgM) en los glomérulos de los cerdos supervivientes y las lesiones histológicas observadas, son indicativos de glomerulonefritis segmentaria y focal, de acuerdo con la clasificación de lesiones renales de la OMS (Churg y Sobin, 1982). Los datos ultraestructurales, aportados por Quezada (1989), de fusión pedicular de los podocitos y el engrosamiento de la membrana basal, concuerdan con este tipo de glomerulonefritis.

Slauson y Sánchez-Vizcaíno (1981), describen una disminución en los valores sanguíneos del complemento hemolítico (CH 50) y depósitos de inmunocomplejos de IgG y C3, en los riñones de cerdos sacrificados a los 35 dpi, con el aislado atenuado E-75 del VPPA. Los riñones de estos animales no presentaban lesiones morfológicas, tal vez motivado por la fecha de sacrificio.

En el SIDA, enfermedad vírica humana, cuya patogenia no está totalmente definida, también se ha descrito glomerulonefritis segmentaria y focal. La lesión, se caracteriza por hiperplasia localizada y vacuolización de las células epiteliales viscerales. Los inmunocomplejos son frecuentemente de IgM y C3, con unos patrones semejantes a los nuestros, sin embargo se pueden depositar también, otras clases de inmunoglobulinas (Rao y col., 1987). Por otra parte, este tipo de glomerulopatía, es una de las descritas en visones infectados de forma espontánea con el virus de la enfermedad aleutiana (Nieto y col., 1991). El desarrollo de glomerulonefritis, de causa inmune, es frecuente, en el curso de diversas enfermedades víricas de los animales domésticos: peste porcina clásica, hepatitis canina infecciosa, diarrea viral bovina y anemia infecciosa equina (Slauson y Lewis, 1979) y en la leishmaniasis canina (Castaño y col., 1990), cuyo agente causal infecta, al igual que el virus de la peste porcina africana, células del sistema mononuclear fagocítico.

Un dato de gran interés aportado por nosotros, es la presencia de macrófagos, en los ovillos glomerulares y en los infiltrados intersticiales. Este incremento, lo describen Matsumoto y Atkins (1989) y Van Goor y col. (1991), en casos de glomeruloesclerosis segmentaria y focal. Este dato indica, que si la duración del experimento hubiera sido mayor, probablemente, el cuadro histopatológico habría sido ese tipo de glomerulopatía.

La enfermedad del suero y la nefritis nefrotóxica, son dos modelos experimentales de daño glomerular por mecanismos inmunes, en los cuales los macrófagos juegan un papel fundamental (Hunsicker y col., 1979). Los monocitos-macrófagos, a través de

la liberación de IL-1, inducen la proliferación de las células mesangiales y estimulan la secreción de una proteinasa neutra, degradante de la membrana basal glomerular. Además, pueden ser una fuente local de mediadores procoagulantes, responsables del depósito de fibrina (Tipping y col., 1987). Por otra parte, se ha descrito recientemente, que las células mesangiales liberan IL-1. Esta IL-1 actúa como regulador autocrino, para estimular la proliferación mesangial e inducir la secreción de prostaglandina E (PGE) por las células mesangiales (Lovett y col., 1986,1987).

No se puede descartar, que la glomerulonefritis segmentaria, sea consecuencia de la evolución de las alteraciones trombóticas glomerulares de una fase aguda superada. La glomerulonefritis de la toxemia de la gestación, presenta cuadros histológicos de trombosis intracapilar difusa. En la glomerulonefritis de la piometra en animales y la pre-eclampsia en la especie humana, se ha observado, que estos trombos de fibrina pueden ser reemplazados posteriormente, por hialinosis segmentaria, trombos hialinos o áreas translúcidas (Kincaid-Smith y Witworth, 1987). Los intensos depósitos de fibrina que mostraba el animal sacrificado a los 8 dpi, fueron aclarados progresivamente a los 30 y 120 dpi.

Tanto en la Peste porcina africana como en dichas enfermedades que cursan con CID, las células de la cápsula de Bowman hacen prominencia, presentando el citoplasma aumentado y vacuolizado; esta alteración puede ser consecuencia de una reabsorción de las proteínas en el espacio urinario, resultado, de una sobrecarga de la capacidad de glomerular, para aclarar los macromoléculas no filtradas. En la fase de resolución de estas glomerulonefritis, durante la reconstrucción de la membrana basal, aparece un doble contorno o imagen de giralda, similar al observado por nosotros y que se presenta en la glomerulonefritis mesangiocapilar. Esta imagen, en ocasiones persiste durante meses (Kincaid-Smith y col., 1987). Otros autores, consideran que este patrón de la membrana, puede deberse

a la continuación de la matriz mesangial, que rodea los pelotones vasculares. Si bien, esto podría ser objeto de estudios posteriores, los hallazgos encontrados en los cerdos supervivientes, podrían representar el desarrollo de una fase aguda no suficientemente grave, como para causar la muerte de los animales.

## VI. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1- La expresión de antígeno vírico, en hígado y pulmón, fue máxima a los 8 y 30 días post-inoculación. En el riñón únicamente se observó antígeno vírico, a los 8 y 365 días post-inoculación.

2- Se observó persistencia de virus en el hígado, pulmón y riñón de uno de los dos animales sacrificados al año post-inoculación.

3- En el hígado, la máxima expresión de antígeno vírico fue paralela al incremento de linfocitos T8 y de macrófagos, incremento que se manifestó tanto en infiltrados inflamatorios focales como difusos.

4- Las lesiones más relevantes en el hígado fueron, degeneración y necrosis, de hepatocitos y células de Kupffer.

5- Los pulmones presentaron como lesión común, consolidación generalizada. En los animales supervivientes, se observó además vasculitis y pleuritis.

6- Los riñones presentaron, en la fase aguda, trombosis intraglomerular e intratubular con depósito de fibrina. En los animales supervivientes, se identificó glomerulonefritis segmentaria y focal, por depósito de IgM y C3 con hialinosis.

7- Los infiltrados inflamatorios, en pulmón y riñón, presentaron mayor heterogeneidad que en el hígado, en cuanto a su composición celular.

## VII. BIBLIOGRAFIA

ALCAMÍ, A., CARRASCOSA, A.L. and VIÑUELA, E. (1989). Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into VERO cell. *Virology* **168**: 393-398.

ALCARAZ, C., LAVIADA, M.D. y ESCRIBANO, J.M. (1988). Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas inducidas por el virus de la Peste porcina africana y sus propiedades antigénicas. *Med. Vet.* **5 (7-8)**: 353-358.

ALCARAZ, C., PASAMONTES, B., RUIZ GONZALVO, F. and ESCRIBANO, J.M. (1989). African swine fever virus induced proteins on plasma membranes of infected cells. *Virology* **168**: 406-408.

ALMENDRAL, J.M., BLASCO, R., LEY, V., BELOSO, A., TALAVERA, A. and VIÑUELA, E. (1984). Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology* **133**: 258-270.

ANDERSON, E.C., WILLIAMS, S.M. FISHER-HOCH, S.P. and WILKINSON, P.J. (1986). Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and haemorrhage in acute African swine fever. *Res. Vet. Sci.* **42**: 387-394.

ARIAS, M.L., NOGAREDA, M.A. y SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1984). Aislamiento, purificación y cuantificación de inmunoglobulinas G en distintas especies animales. *Ann.INIA, Ser. Ganadera* **20**: 121-135.

AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T. and GUESDON, J.L. (1978). Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* **8**: 7-23.

BENVENISTE, J., EGIDO, J. and GUTIERREZ-MILLET, V. (1976). Evidence for the involvement of the IgE basophil system in acute serum sickness of rabbits. *Clin. Exp. Immunol.* **26**: 449-457.

BENVENISTE, J., HENSON, P.M. and COCHRANE, C.G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the

role of IgE, basaphils and platelet-activating factor. J. Exp. Med. **136**: 1356-1372.

BEVILACQUA, M.P., POBER, J.S., MAJEAU, G.R., COTRAN, R.S. and GIMBRONE, M.A. (1984) Interleukin (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. J. Exp. Med. **160**: 618-623.

BEVILACQUA, M.P. POBER, J.S. MAJEAU, G.R., FIERS, W., COTRAN, R.S. and GIMBRONE, M.A. (1986). Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in human vascular endothelium: Characterization and comparison with the actions of interleukin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 4533-4537.

BOOL, P.H., ORDAS, A. and SANCHEZ BOTIJA, C. (1969). Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. Bull. Off. Int. Epiz. **72**: 819-839.

CANALS, A., ALONSO, F., TOMILLO, J. and DOMINGUEZ, J. (1991). Analysis of T lymphocyte subsets proliferating to infective and UV inactivated ASF viruses. Vet. Microbiol. (en prensa).

CARRASCO, L., SIERRA, M.A., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. y QUEZADA, M. (1989). Lesiones del pulmón de cerdos inoculados experimentalmente con el virus de la Peste porcina africana. Anaporc **76**: 41-42.

CARRASCOSA, J.L., CARAZO, J.M., CARRASCOSA, A.L., GARCÍA, N., SANTISTEBAN, A. and VIÑUELA, E. (1984). General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. Virology **132**: 160-172.

CASAL, I., ENJUANES, L. and VIÑUELA, E. (1984). Porcine leucocytes cellular subsets sensitive to ASFV in vitro. J. Virol. **52**: 37-46.

CASTAGNOLI, B. (1969). Diagnosi differenziale clinica ed

anatomopatologica fra Peste swina africana e clássica. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. **23**: 955-958.

CASTAÑO, M., GOMEZ, M., PEÑA, L., FLORES, J.M. and GONZALEZ, M. (1990). Immunohistological study on kidneys from dogs with spontaneous leishmaniasis. Schweiz. Arch. Tierzheilk. **132**: 421-422.

CHEVILLE, N.F. (1988). Introduction to Veterinary Pathology. Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

CHU, A.C., BHOGAL, B. and BLACK, M.M. (1983). Immunocytochemistry in dermatology. En "Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology" pp: 302-333. Eds. J.M. Polack y S. Van Noorden. Wright, PSG.

CHURG, J. and SOBIN, L.H. (1982). Renal Disease classification and atlas of glomerular disease. Igaku-shoin, Tokio. New York, Medical Publishers.

CRAWFORD, T. B. CHEEVERS, W.P., KLEVJER-ANDERSON, P. and McGUIRE, T.C. (1978). Equine infectious anaemia: virion characteristics, virus-cell interaction and host responses. En "Persistent viruses" pp: 727-749. Eds. J.G. Stevens, G.J. Todaro y C.F. Fox. Academic Press, New York.

COGGINS, L. (1974). African swine fever virus. Pathogenesis. Prog. Med. Virol. **18**: 48-63.

COGGINS, L., MOULTON, J.E. and COLGROVE, G.S. (1968). Studies with Hind: Attenuated African swine fever virus. Cornell Vet. **58**: 525-540.

COLGROVE, G.S., HAELTERMAN, E.O. and COGGINS, L. (1969). Pathogenesis of African swine fever in young pigs. Am. J. Vet. Res. **30**: 1343-1359.

DE BOER, C.J., HESS, W.R. and DARDIRI, A.H. (1969). Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from African swine fever. Arch. Ges. Virusforsch **27**: 44-54.

DE PAULA LYRA T.M. (1982). Programme of control against African swine fever in Brasil. CEC/FAO Expert consultation on African swine fever research. Comm. Eur. Comm. **EUR/8466 EN**: 25-35.

DEL POZO, V., DE ANDRES, B., MARTIN, E., CARDABA, B., FERNANDEZ, J.C., GALLARDO, S., PALOMINO, P. y LAHOZ, C. (1991). Eosinófilos murinos estimulan la producción de IL-2 en el hibridoma T 3D0.11.10. Inmunología **10**, Suplemento 1. XVII Congreso Nacional Sociedad Española de Inmunología.

EDWARDS, J.F. and DODDS, W.J. (1984). Coagulation changes in African swine fever virus infection. Am. J. Vet. Res. **45**: 2414-2420.

EDWARDS, J.F. and DODDS W.J. (1985). Platelet and fibrinogen kinetics in healthy and African swine fever-affected swine: [<sup>75</sup>Se] Selenomethionine-labelling study. Am. J. Vet. Res. **46**: 181-184.

EDWARDS, J.F., DODDS, W.J. and SLAUSON, D.O. (1985a). Megakaryocytic infection and trombocytopenia in African swine fever. Vet. Pathol. **22**: 171-176.

EDWARDS, J.F., DODDS, W.J. and SLAUSON, D.O. (1985b). Mechanism of thrombocytopenia in African swine fever. Am. J. Vet. Res. **46**: 2058-2061.

ENJUANES, L., CARRASCOSA, A.L., MORENO, M.A. and VIÑUELA, E. (1976). Titration of African swine fever (ASF) virus. J. Gen. Virology **32**: 471-477.

ENJUANES, L., CARRASCOSA, A.L. and VIÑUELA, E. (1976). Isolation

and properties of the DNA of ASFV. *J. Gen. Virology* **32**: 479-492.

EPSTEIN, S.L. and LUNNEY J.K. (1985). A cell surface ELISA in the mouse using only poly-L- lisine as cell fixative. *J. Immunol. Meth.* **76**: 63-72.

ESCRIBANO, J.M. and TABARÉS, E. (1987). Proteins specified by African swine fever virus. V. Identification of immediate early, early and late proteins. *Arch. Virol.* **92**: 221-232.

ESPARZA, I., GONZÁLEZ, J.C. and VIÑUELA, E. (1988). Effect of interferon- $\alpha$ , inteferons and tumor necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.*, **69**: 2973-2980.

ESTEVEES, A., MARQUES, M.I. and COSTA, J.V. (1986). Two-Dimensional analysis of African swine fever virus proteins induced in infected cells. *Virology* **152**: 192-206.

FORMAN, A.J., WARDLEY, R.C. and NORLEY, S.G. (1983). Interactions of porcine alveolar macrophages and bone marrow cells with African swine fever virus and virus-infected cells. *Vet. Microbiol.* **8**: 163-177.

GALERA-DAVIDSON, H., LOPEZ-GARRIDO, J., ORTEGA-MEDINA, I., GONZALEZ-CAMPORA, R. and RUBI-URIA, J. (1989). Disseminated intravascular coagulation in Wistar rats. *Am. J. Pathol.* **134**: 719-721.

GALO, A.J. (1988). Peste suina africana crónica. Contribuicao para o diagnóstico por provas de afinadade citoquímica e imunocitoquímica en cortes histológicos. *Rep. Trab. L.N.I.V.* **20**: 3-43.

GARCIA-BARRERO, B., SANZ, A., NOGAL, M.L., VIÑUELA, E. and ENJUANES, L. (1986). Monoclonal antibodies of African swine fever virus: antigenic differences among field virus isolates and

viruses passaged in cell culture. J. Virol. **58** : 385-392.

GARCIA E COSTA and ALVES DE MATOS, A.P. (1980). Alteracoes ultraestructurais do rim in suinos infectados experimentalmente con o virus da peste suina africana aguda. Rep. Trab. L.I.N.V., **12**: 33-38.

GLASSOCK, R.J., EDGINGTON, T.S., WATSON, J.J. and DIXON, F.J. (1968). Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. II. The pathogenetic mechanism. J. Exp. Med. **127**: 573-580.

GENOVESI, E.V., KNUDSEN, R.C., WHYARD, T.C. and MEBUS, C.A. (1988). Moderately virulent ASF virus infection: Blood cell changes and infective virus distribution among blood components. Am. J. Vet. Res. **49**: 338-344.

GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., SIERRA, M.A., MOZOS, E. and BERNABE, A. (1989). Lesiones del hígado de cerdo en la Peste porcina africana experimental. Anaporc **76**: 38-40.

GONZALEZ JUARRERO, M. (1990). Estudios comparativos de la expresión de antígenos y producción de interferon durante la infección con aislados de diferente patogenicidad del virus de la Peste porcina africana. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

GONZALEZ, S., MENDOZA, C., SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. and ALONSO, F. (1990). Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation. Vet. Immunol. Immunopathol. **26**: 71-80.

HESS, W.R. (1981). ASF a reassessment. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. **25**: 39-69.

HESS, W.R. and DETRAY, D.E. (1960). The use of leukocyte cultures for diagnosing African swine fever. Bull. Epiz. Dis. Afri. **8**:

317-320.

HORTIGÜELA, O. (1990). Evolución de la respuesta humoral en animales infectados con el virus de la Peste Porcina Africana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

HUNSICKER, L.G., SHEARER, T.P., PLATTNER, S.B. and WEISENBURGER, D.G. (1979). The role of monocytes in serum sickness nephritis. *J. Exp. Med.* **150**: 413-425.

INFORME DE LA SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMAL. (1988). Dirección General de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

INFORME DE LA SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMAL. (1990). Dirección General de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

KINCAID-SMITH, P. and WHITWORTH, J.A. (1987). The kidney: A clinicopathological study. Ed. Blackwell S.P. Oxford.

KNUDSEN, R.C. and GENOVESI, E.V. (1987a). In vivo and in vitro effects of moderately virulent African swine fever virus on mitogenesis of pigs lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **15**: 323-336.

KNUDSEN, R.C., GENOVESI, E.V. and WHYARD, T.C. (1987b). In vitro immune serum-mediated protection of pig monocytes against African swine fever virus. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 1067-1071.

KONNO, S., TAYLOR, W.D. and DARDIRI, A.H. (1971). Acute African swine fever. Proliferative phase in lymphoreticular tissue and the reticuloendothelial system. *Cornell Vet.* **61**: 71-84.

KONNO, S., TAYLOR, W.D., HESS, W.R. and HEUSCHELE, W.P. (1972). Spleen pathology in African swine fever. *Cornell Vet.* **3**: 486-506.

LAGOTENT, A., BANDALI, K, and HAWKINS, A. (1978). Differentiation of human T cells by a esterase staining. Fedn. Proc. **42**: 321-327.

LOVETT, D.H., RESCH, K. and GEMSA, D. (1987). Interleukin I and the glomerular mesangium. II. Nonokine stimulation of mesangial cell prostanoid secretion. Am. J. Pathol. **129**: 543-551.

LOVETT, D.H., SZAMEL, M., RYAN, J.L. STERZEL, R.B., GEMSA, D. and RESCH, K. (1986). Interleukin I and the glomerular mesangium: I. Purification and characterization of a mesangial cell derived autogrowth factor. J. Immunol. **136**: 3700-3705.

LUNNEY, J.K. and PESCOVITZ, M.D. (1988). Differentiation antigens of Swine Lymphoid tissues. En "Differentiation Antigens in Lymphohemopoietic Tissues". pp: 421-454. Eds. Masayuki Miyasaka y Zdenek Trnka. Marcel Dekkar, Inc. New York.

MADSEN, M., JOHNSON, H.E., HANSEN, P.W. and CHRISTIANSEN, S.E. (1980). Isolation of human T and B lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation. Characterization of the isolated subpopulations. J. Immunol. Meth. **33**: 323-336.

MALAGON, M.J., DOMINGUEZ, J., ARIAS, M. y SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1986). Aplicación del AM FIC3 para la cuantificación de IgG porcina mediante un ELISA. Med. Vet. **3 (7-8)**: 379-383.

MALMQUIST, W.A. and HAY, D. (1960). Hemadsorption and cytophatic effect produced by ASFV in swine bone marrow and buffy coat cultures. Am. J. Vet. Res. **21**: 104-108.

MANSO RIBEIRO, J.J., ROSA AZEVEDO, J.A., TEIXEIRA, J.D.O., BRACO FORTE, M.C., RODRIGUES RIBEIRO, A.M., OLIVEIRA, E., NORONHA, F., GRAVE PEREIRA, C. and DIAS VIGARIO, J. (1958). An atypical strain of Swine fever virus in Portugal. Bull. Off. Int. Epiz. **50**: 516-534.

MARTINS, C., MEBUS, C., SCHOLL, T., LAWMAN, M., and LUNNEY, J.

(1988). Virus-specific CTL in SLA-inbred swine recovered from experimental African swine fever (ASFV) infection. *Annals N.Y. Acad. Sci.* **532**: 462-464.

MARTINS, C., SCHOOL, T., MEBUS, C.A., FISCH, H. and LAWMAN, M. (1988). Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Viral Immunol.* **1**: 177-190.

MATSUMOTO, K. and ATKINS, R.C. (1989). Glomerular cells and macrophages in the progression of experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Pathol.* **134**, 933-945.

MAURER, F.D., GRISEMER, R.A. and JONES, T.C. (1958). The pathology of African swine fever. A comparison with Hog cholera. *Am. J. Vet. Res.* **19**: 517-539.

MCKAY, D.G. (1968). Disseminated intravascular coagulation. *Proc. Royal Soc. Med.* **61**: 1129-1134.

McVICAR, J.W. (1984). Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.* **45**: 1535-1541.

MEBUS, C.A. (1987). Pathobiology and Pathogenesis. En: "African Swine Fever", pp: 21-29. Ed. Y. Becker, Martins Nijhoff Publishing, Boston.

MEBUS, C.A. and DARDIRI, A.H. (1979). Additional characteristics of disease caused by the African swine virus isolated from Brazil and the Dominican Republic. *Proc Annu. Meet. U.S. Anim. Health. Assoc.* **83**: 227-239.

MEBUS, C. A. and DARDIRI, A.H. (1980). Western Hemisphere isolates of African swine fever virus : Asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation. *Am. J. Vet.* **41**: 1867-1869.

MEBUS, C. A. and GREGG, D. A. (1985). Evaluation of in vivo macrophage phagocytosis in African swine fever infection. Seminario Hispano-Norteamericano sobre Peste Porcina Africana. Madrid.

MEBUS, C.A., Mc VICAR, J.W. and DARDIRI, A.H. (1982). Comparison of the pathology of high and low virulence African swine fever virus infections. Comm. Eur. Comm. **EUR 8466**: 183-194.

MENCIA-HUERTA, J.M. and BENVENISTE, J. (1979). Platelet-activating factor and macrophages. I. Evidence for the release from rat and mouse peritoneal macrophages and not from mastocytes. Eur. J. Immunol. **9**: 409-414.

MENDOZA, C. (1990). Estudio de los mecanismos citotóxicos de protección frente al virus de la Peste porcina africana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

MENDOZA, C., VIDEGAIN, S.P. and ALONSO, F. (1991). Inhibition of natural killer activity in porcine mononuclear cells by African swine fever virus. Res. Vet. Sci., **51**: 317-321.

MINGUEZ, I., RUEDA, A., DOMINGUEZ, J. and SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. (1988). Double labeling immunohistological study of African swine fever virus-infected spleen and lymph nodes. Vet. Pathol. **25**: 193-198.

MOLLENHAUER, H.H. (1964). Plastic embedding mixture for use in electron microscopy. Stain Technol. **39**: 111-114.

MONTGOMERY, R.E. (1921). On a form of a swine fever occurring in British East African (Kenya Colony). J. Comp. Path. Therap. **34**: 159-191.

MONTGOMERY, R.E. (1921). ON a form a swine fever occurring in British East African (Kenya Colony). J. Comp. Path. Therap. **34**: 243-262.

MOULTON, J.E. and COGGINS, L. (1968). Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet.* **58**: 364-388.

MOULTON, J.E., PAN, I.C., HESS, W.R., DE BOER, C.J. and TESSLER, J. (1975). Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 27-32.

MOURA NUNES, J.F., VIGARIO, J.D., CASTRO PORTUGAL, F.L., FERREIRA, C. and ALVES DE MATOS, A.P. (1977). Structure of African swine fever virus (ASFV). CEC/FAO Expert consultation on Hog cholera/Classical swine fever and ASF research. *Comm.Eur.Comm.* **EUR/5904 EN**: 543-554.

MOURA NUNES, J.F., VIGARIO, J.D. and TERRINHA, A.M. (1975). Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells. *Arch. Virol.* **49**: 59-66.

NAKANE, P. (1979). Preparation and standardization of enzymelabeled conjugates. En "Immunoassays in clinical laboratory" pp: 81-87. Eds. R.M. Nakamura, W.R. Dito y S.E. Tucker. Liss, New York.

NASH, A. A. (1984). Viruses as regulators of delayed hypersensitivity T-cell and suppressor T- cell function. En "Concepts in Viral Pathogenesis" pp: 225-230. Eds. A.L. Notkins y M. B. A. Oldstone. Springer-verlag, New York.

NESER, J.A., PHILLIPS, T., THOMSON, G.R., GAINARU, M.D. and COETZEE, T. (1986). African swine fever. I. Morphological changes and virus replication in blood platelets of pig infected with virulent haemadsorbing and non-haemadsorbing isolates. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **53**: 133-141.

NIETO, J, M., ALVAREZ, C., FLORES, J. M. and ROMANO ,J. (1991). Glomerular lesions in Aleutian disease of mink (*Mustela vison*): A morphological and differential morphometrical study. *Histol.*

Histopathol. **6**: 141-148.

NORLEY, S.G. and WARDLEY, R.C. (1982). Complement-mediated lysis of African swine fever virus-infected cells. *Immunology* **46**: 75-83.

NORLEY, S.G. and WARDLEY, R.C. (1983a). Effector mechanism in the pig. Antibody-dependent cellular cytolysis of African swine fever virus infected cells. *Res. Vet. Sci.* **35**: 75-79.

NORLEY, S.G. and WARDLEY R.C. (1983b). Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine-fever virus infection. *Immunology* **49**: 593-597.

NORLEY, S.G. and WARDLEY, R.C., 1984. Cytotoxic lymphocytes induced by African swine fever virus infection. *Res. vet. Sci.* **37**: 255-257.

NUNES PETISCA, J.L. (1965a). Etudes anatomo-pathologiques et histopathologiques sur la Peste porcine africaine (virose L) au Portugal. *Bull. Off. int. Epiz* **63 bis**: 103-142.

NUNES PETISCA, J.L. (1965b). Quelques aspects morphologiques des suites a la vaccination contre la Peste porcine africaine au Portugal. *Bull. Off. int. Epiz.* **63 bis**: 193-237.

NUNES PETISCA, J.L. and MARTINS GONCALVES, J.M. (1977). The evolution of the histopathological picture on pig experimentally infected with acute African swine fever virus. (I-Lymph nodes, spleen, thymus and bone marrow). *Agric. Res. Semin. on Classical Swine Fever and African Swine Fever. Comm. Eur. Comm.* **EUR/5904 EN**: 612-627.

NUNES PETISCA, J.L. and MARTINS CONCALVES, J.M. (1978). Evolucao do quadro histopatológico em suínos infectados experimentalmente com o virus da Peste suína africana aguda. (II. Fígado, pulmão e vírus). *Rep. Trab. L.N.I.V.* **10**: 17-22.

NUSSENZWEIG, M.G., STEINMAN, R.M., WITMER, M.D. and GUTCHINOV, B. (1982). A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 161-165.

OLDSTONE, M. B. A., and LAMPERT, P. W. (1979). En "Springer Seminars in Immunopathology" pp: 261-283. Eds. P.A. Miescher y H.J. Müller- Eberhard. Spriger-Verlag, New York.

OROPESA, P.R. (1971). Preliminary report on the ASF epizootic in Cuba. Methodos of diagnosis and control. Bull. Off. int. Epiz.: 415-437.

ORTÍN, J., ENJUANES, L. and VIÑUELA, E. (1979). Cross-linking in African swine fever virus DNA. J. Virology **31**: 579-583.

PABST, R. and BINNS, R.M. (1989). Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several merhanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. Immunological Reviews **108**: 83-109.

PAN, I.C. (1987). Spontaneously susceptible cells and cell culture methodologies for African swine fever virus. En. "African Swine Fever", pp: 81-125. Ed. Y. Becker, Martinus Nijhoff Publishing. Boston.

PAN, I.C., MOULTON, J.E. and HESS, W.R. (1975). Immunofluorescent studies on chronic pneumonia in swine with experimentally induced ASF. Am. J. Vet. Res. **36**: 379-386.

PAN, I.C., SHIMIZU, M. and HESS, W.R. (1980). Replication of African swine fever virus in cell cultures. Am. J. Vet. Res. **41**: 1357-1367.

PAUL, P.S., VAN DENSEN, R.A. and MENGEHING, W.L. (1985). Monoclonal precipitating antibodies to porcine immunoglobulin M. Vet.Immunopath. **8**: 311-328.

PEREZ, J. (1992). Peste porcina africana experimental (aislados E70 y E75): Estudio inmunohistopatológico del hígado y pulmón. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

PESCOVITZ, M.D., LUNNEY, J.K. and SACHS, D.H. (1984). Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* **133**: 368-374.

PLOWRIGHT, W., PERRY, C.T. and GREIG, A. (1974). Sexual transmission of African swine fever virus in the tick *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res. Vet. Sci.* **17**: 106-113.

PLOWRIGHT, W., PERRY, C.T. and PIERCE, M.A. (1970). Transovarial infection with African swine fever in the argasid ticks, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res. Vet. Sci.* **11**: 582-584.

POBER, J.S., GIMBRONE, M.A. Jr., COTRAN, R.S., REIZZ, C.S., BURAKOFF, S.J., FIERS, W. and AULT, K.A. (1983). Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human  $\gamma$ -interferon. *J. Exp. Med.* **157**: 1339-1353.

POLO JOVER, F. and SANCHEZ BOTIJA, C. (1961). African swine fever in Spain. *Bull. Off. Int. Epiz.* **55**: 107-147.

PORTER, D. D., LARSEN, A. E. and PORTER, H. G. (1980). Aleutian Disease of Mink. *Adv. Immunol.* **29**: 261-186.

PULFORD, K.A.F., SIPOS, A., CORDELL, J.L., STROSS, W.P. and MANSON, D.Y. (1990). Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Intern. Immunol.* **2**: 973-980.

QUEZADA, M. (1988). Morfopatología del riñón de cerdo en la Peste porcina africana experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

QUEZADA, M., MOYANO, T., CARRASCO, L. y JOVER, A. (1989). Lesiones del riñón de cerdos inoculados experimentalmente con el virus Peste porcina africana. *Anaporc* **76**: 36-37.

RAO, R.K.S., FRIEDMAN, E.A. and NICASTRI, A.D. (1987). The types of renal disease in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1062-1068.

RIVERA, E.M. (1982). African swine fever in the Dominican Republic. CEC/FAO Expert consultation on African Swine Fever research. *Comm. Eur. Comm.* **EUR/8466 EN**: 17-24.

RUIZ GONZALVO F., CABALLERO C., MARTINEZ, J. and CARNERO, M.E. (1986a). Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever resistant pigs. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1858-1862.

RUIZ GONZALVO, F., CARNERO, M.E., CABALLERO, C. and MARTINEZ, J. (1986b). Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1249-1252.

SALAS, M.L., KUZNAR, J. and VIÑUELA, E. (1981). Polyadenylation, methylation and capping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. *Virology* **113**: 484-491.

SANCHEZ BOTIJA, C. (1962). Studies on ASF in Spain. *Bull. Off. Int. Epiz.* **58**: 707-727.

SÁNCHEZ BOTIJA, C. (1963). Reservorios del virus de la PPA. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de hemoadsorción. *Bull. Off. Int. Epiz.* **60**: 895-899.

SANCHEZ BOTIJA, C. (1965). Present characteristics of ASF in Spain. Report of de FAO/OIE Int. Mtg. on Hog cholera and ASF. **31**.

SANCHEZ BOTIJA, C. y ORDAS ALVAREZ, A. (1980). Peste Porcina

Africana. En "Patología y Clínica del ganado porcino", pp 119-154. Ed. Noticias Neosan. Barcelona.

SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS, A. and GARCIA GONZALEZ, J. (1969). Investigation of the presence of antibodies in pigs in outbreaks of ASF with low mortality. Bull. Off. int. Epiz. **72**: 841-847.

SANCHEZ-CRESPO, M., ALONSO, F. and EGIDO, J. (1980). Platelet-activating factor in anaphylaxis and phagocytosis. I. Release from human peripheral polymorphonuclears and monocytes during the stimulation by ionophore A23187 and phagocytosis but not from degranulating basophils. Immunology **40**: 645-655

SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. (1987). African swine fever diagnosis. En "African Swine Fever" pp 63-71. Ed. Y. Becker, Martinus Nijhoff Publishing. Boston.

SANCHEZ-VIZCAINO, J.M., MEBUS, C.A., MC VICAR, J.W. and VALERO, F. (1982). Studies of humoral and cell-mediated immunity in pigs and piglets infected with different field isolates of African swine fever virus. CEC/FAO. Expert consultation on African Swine Fever research. Comm. Eur. Comm. **EUR/8466 EN**: 195-205.

SÁNCHEZ-VIZCAINO, J.M., SLAUSON, D.O., RUIZ-GONZALVO, F. and VALERO, F. (1981). Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. Am. J. Vet. Res. **42**: 1335-1341.

SANTARÉN, J.F. and VIÑUELA E. (1986). African swine fever virus-induced polypeptides in vero cells. Virus Research **5**: 391-405.

SANTURDE, G., RUIZ GONZALVO, F., CARNERO, M.E. and TABARES, E. (1988). Genetic stability of African swine fever virus grown in monkey kidney cells. Arch. Virol. **98**: 117-122.

SCHLAFER, D., MEBUS, C.A. and Mc VICAR, J.W. (1984). African

swine fever in neonatal pigs: passively acquired protection form calostrum or serum of recovered pigs. Am. J. Vet. Res. **45** (7): 1367-1372.

SCHLINGEMANN, R.O., DINGJAN, G.M., EMIS, J.J., BLOK, J. WARNAAR, S.O. and RUITER, D.J. (1985). Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium. Lab. Invest. **52**: 71-76.

SHIMIZU, M., PAN, I.C. and HESS, W.R. (1977). Cellular immunity demonstrated in pigs infected with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res, **38**: 27-31.

SIERRA, M.A., BERNABE, A., MOZOS, E., MENDEZ, A. and JOVER, A. (1987). Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. Vet. Pathol. **24**: 460-462.

SIERRA, M.A., CARRASCO, L., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., J.C., MARTIN DE LAS MULAS, J., MENDEZ, A. and JOVER, A. (1990). Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. J. Comp. Path, **102**: 323-334.

SIERRA, M.A., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., CARRASCO, L. FERNANDEZ, A., MOZOS, E. and JOVER, A. (1991). In vivo study of hemadsorption in African swine fever virus infected cells. Vet. Pathol., **28**: 178-181.

SIERRA, M.A., QUEZADA, M., FERNÁNDEZ, A., CARRASCO, L., GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C., MARTÍN DE LAS MULAS, J. and SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1989). Experimental African swine-fever. Evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. Vet. Pathol. **26**: 173-176.

SIMEÓN, R.E. (1982). Development in Cuba of a programme for the eradication of African swine fever in 1980. CEC/FAO Expert consultation on African Swine Fever research. Comm. Eur. Comm. **EUR/8466 EN**: 36-41.

SISSON, J.G.P. and OLDSTONE, M.B.A. (1980). Antibody- mediated destruction of virus-infected cells. *Adv. Immunol.* **29**: 209-260.

SLAUSON, D.O. and SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1981). Leukocyte-dependent platelet vasoactive amine release and immune complex deposition in African swine fever. *Vet. Pathol.* **18**: 813-826.

TABARÉS, E., MARCOTEGUI, M.A., FERNANDEZ, M. and SÁNCHEZ BOTIJA, C. (1980). Proteins specified by African swine fever virus. I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties. *Arch. Virol.* **66**: 107-117.

TERPSTRA, C. (1987). Differential diagnosis between African Swine Fever and Hog Cholera. En "African Swine Fever" pp: 73-80. Ed. Y. Becker, Martinus Nijhoff Publising. Boston.

TIPPING, P., WORTHINGTON, L. and HOLDSWORTH, S. (1987). Quantitative and characterization of glomerular procoagulant activity in experimental glomerulonephritis. *Lab. Invest.* **56**: 155-159.

UNANUE, E.R., BELLER, D. I., LU, C. Y. and ALLEN, P. M. (1984). Antigen Presentation: Comments on its regulation and mechanism. *J. Immunol.* **132**: 1-5

URZAINQUI, A., TABARÉS, E. and CARRASCO, L. (1987). Proteins synthesized in African swine fever virus-infected cells analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Virology* **160**: 286-291.

VAN GOOR, H., FIDLER, V., WEENING, J.J. and GROND, J. (1991). Determinants of focal and segmental glomerulosclerosis in the rat after renal ablation. *Laboratory Investigation* **64**: 754-765.

VAN VOORHIS, W.C., HAIR, L.S., STEINMAN, R.M. and KAPLAN, G. (1982). Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **11**: 1172-1187.

VIGARIO, J.D., RELVAS, M.E., FERRAZ, F.P., RIBEIRO, J.M. and PEREIRA, C.G. (1967). Identification and localization of genetic material of African swine fever virus by autoradiography. *Virology* **33**: 173-175.

VIÑUELA, E. (1985). African swine fever virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**: 151-170.

WALKER, M. C., ERICKSON, L.A., HSUEH, C.F. and LEVY, A.J. (1991). Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J. Virology* **65** : 5921-5927.

WARDLEY, R.C. (1982). Effect of African swine fever on lymphocyte mitogenesis. *Immunology* **46**: 215-220.

WARDLEY, R.C., HAMILTON, F. and WILKINSON, P.J. (1979). The replication of virulent and attenuated strains of African swine fever virus in porcine macrophages. *Arch. Virol.* **61**: 217-225.

WARDLEY, R.C., NORLEY, S.G., WILKINSON, P.J. and WILLIAMS S. (1985). The role of antibody in protection against African swine fever virus. *Vet. Immunol. Immunopath.* **9**: 201-212.

WARDLEY, R.C. and WILKINSON, P.J. (1977). The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. *Arch Virol.* **55**: 327-334.

WERBER, H.I., EMANCIPATOR, S.N., TYKOCINSKI, M.L. and SEDOR, J.R. (1987). The interleukin 1 gene is expressed by rat glomerular mesangial cells and is augmented in immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.* **138**: 3207-3212.

WESLEY, R.D. and TUTHILL, A.E. (1984). Genome relatedness among African swine fever virus field isolates by restriction endonuclease analyses. *Preventive Vet. Med.* **2**: 53-62.

WILKINSON, P.J. and WARDLEY, R.C. (1978). The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. *Br. Vet. J.* **134**: 280-282.

YEFENOF, E., ASJO, B., and KLEIN, E. (1991). Alternative complement pathway activation by HIV infected cells: C3 fixation does not lead to complement lysis but enhances NK sensitivity. *International Immunology* **3**: 395-401.