

## **DEFICIENCIA EN LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA ESPECÍFICA FRENTE A PROTEÍNAS GAG EN FORMAS CLÍNICAS DEL MAEDI VISNA OVINO**

R. Reina<sup>1</sup>, X. De Andrés<sup>1</sup>, J. M. Pérez de la Lastra<sup>1</sup>, J. Benavides<sup>2</sup>, V. Pérez<sup>2</sup>, E. Biescas<sup>3</sup>, L. Luján<sup>3</sup>, V. Mick<sup>1</sup>, M. Pérez de Villarreal<sup>1</sup>, H. Crespo<sup>1</sup>, G. D. Harkiss<sup>4</sup>, S. Rosati<sup>5</sup>, D. de Andrés<sup>1</sup>, B. Amorena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA. Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja; Navarra; <sup>2</sup> Histología y Anatomía Patológica, Dpto. de Patología Animal: Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n. 24071 León; <sup>3</sup> Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España; <sup>4</sup> Department of Veterinary Pathology University of Edinburgh, Easter Bush Veterinary Centre, Easter Bush, Midlothian, EH25 9RG, United Kingdom; <sup>5</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Leonardo Da Vinci, 44, 1009 Grugliasco (TO) Italia

### **INTRODUCCIÓN**

La inmunodeficiencia causada en la especie humana por el lentivirus HIV es bien conocida. En especies como la humana (Dudhane *et al.*, 1996; Legendre *et al.*, 1998) y la felina (Shimojima *et al.*, 2004) existe una relación entre la infección y la expresión de las moléculas coestimuladoras. Además, en el ganado caprino infectado con el lentivirus de la artritis encefalitis caprina (VAEC), los animales que presentan una sintomatología clínica parecen mostrar una menor respuesta linfoproliferativa, y una menor respuesta Th1 (menor producción de IFN- $\gamma$ ), aumentando la Th2 (mayor producción de anticuerpos frente a antígenos vacunales y mayor producción de IL-4 e IL-5; Fariñas y Zorrilla, 2002). Sin embargo, la posible inmunodeficiencia causada en ovinos por el virus Maedi Visna (VMV), homólogo entre otros a los virus VIH humano y VIF felino y del grupo genético de VAEC (Shah *et al.*, 2004), se halla todavía en vías de estudio, habiéndose constatado hasta la fecha una supresión de la producción de anticuerpos IgG2 frente a este virus en animales infectados por el mismo (Bird *et al.*, 1995). En este estudio, se determina la respuesta linfoproliferativa frente a las proteínas del VMV y se inicia el estudio de la expresión de las moléculas coestimuladoras, previamente identificadas (Terzo *et al.*, 2005), en ovinos con distintas formas clínicas de Maedi Visna.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

**Origen y preparación de muestras.** Se utilizaron 49 ovejas de la raza Rasa Aragonesa: 12 seropositivas al VMV asintomáticas, 30 seronegativas (control) y 7 con afección clínica pulmonar y/o artrítica. Asimismo, se utilizaron 4 ovejas de la raza Assaf con sintomatología clínica nerviosa (2) o pulmonar (2). En los animales con afección clínica, además del examen macroscópico articular, pulmonar y/o del sistema nervioso central se detectó, por inmunocitoquímica y/o por PCR del tejido, la positividad al VMV. Las células mononucleares sanguíneas (PBMCs) se aislaron por flotación (Ficoll-Hypaque,  $d = 1,077$ ; Lymphoprep) a partir de sangre con EDTA tripotásico, para ensayos de PCR y con heparina para ensayos de linfoproliferación. La extracción de DNA se realizó a partir de PBMCs (QUIAamp DNA blood mini kit, Qiagen).

**Ensayo de linfoproliferación.** Se distribuyeron  $10^5$  PBMCs por pocillo en RPMI (GIBCO) conteniendo 10% de suero fetal bovino (GIBCO) con betamercaptoetanol (Roche)  $5 \times 10^{-5}$  M, que fueron enfrentados a 50, 25, 12 y 6  $\mu\text{g/ml}$  de p14, p25 y p17, proteínas recombinantes del VMV, elaboradas en el marco del proyecto EU QLK2-CT-2002-00617. En el mismo ensayo, también se enfrentaron los PBMCs a sus respectivos controles de preparaciones proteicas (Mock). Las reacciones se realizaron por cuadruplicado. Tras cinco días de incubación, se marcaron los PBMCs con  $1\mu\text{Ci/pocillo}$  de Timidina tritiada (Amersham) y se obtuvieron los índices de estimulación (IE) dividiendo las cpm obtenidas en el contador beta, para cada proteína a cada dilución, por las obtenidas en su mock correspondiente. Como control positivo de proliferación se utilizó Concanavalina A (ConA) (Sigma) y como control negativo RPMI con betamercaptoetanol y suero fetal bovino al 10%. Como control positivo de reacción frente a las proteínas Gag del virus, se utilizó una oveja muy respondedora a ellas en el test de linfoproliferación. Resultados con IE por encima de 3 se consideraron positivos.

**Determinación de los niveles de CD80.** Siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Terzo *et al.* (2005), se extrajo el RNA, se realizó una RT-PCR para elaborar el cDNA y seguidamente 2 PCRs, una para el gen constitutivo y otra para CD80. A continuación, se realizó una electroforesis, constatándose las diferencias de expresión de CD80.

**ELISA.** Se determinó la seropositividad al VMV utilizando el test ELISA Elitest (MV Diagnostics).

**PCR.** El VMV en sangre se detectó por PCR de la región Gag p17-p25 (amplicones de 480-500 nt), utilizando cebadores generados en el proyecto EU CRAF-1999-70356 y por Rimstad *et al.* (1993), y de la región LTR (amplicones de 281 a 325 nt), según metodología de Extramiana *et al.* (2002) y utilizando cebadores de Sonigo *et al.* (1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Ensayos de linfoproliferación.** En todos los casos clínicos analizados, se observó una respuesta linfoproliferativa específica muy baja (por debajo del umbral de positividad (Tabla 1). Ninguno de dichos animales mostró positividad al ensayo de linfoproliferación en ninguna de las diluciones antigénicas, y sus IE oscilaban entre 0 y 1,96. Los IE obtenidos para los restantes animales se hallaban entre 10 y 107. Así, los IE obtenidos en animales seropositivos sin sintomatología clínica y los animales libres de VMV fueron muy superiores. También lo fue la reactividad frente a las proteínas testadas ( $P < 0,05$ ), con una sola excepción, la proteína p17, al comparar los grupos “seronegativos” y “clínicos” ( $P > 0,05$ ). En su conjunto, estos resultados indican una “inmunodeficiencia”, no descrita hasta el momento, en el sistema inmune de ovinos afectados (con independencia de la forma clínica). Estos resultados son compatibles con los obtenidos por Fariñas y Zorrilla (2002) en VAEC, cuando observan inhibición de la proliferación en cabras clínicamente afectadas con VAEC.

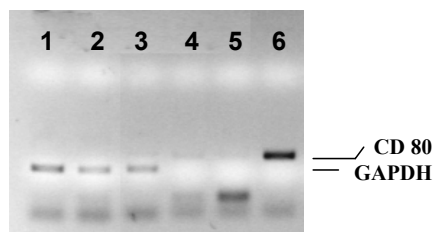
**Expresión de la molécula coestimuladora CD80.** En 3 de las 4 ovejas con afección clínica pulmonar y/o nerviosa en las que se estudió la expresión de CD80 por RT-PCR, se observó que dicha expresión fue deficiente, mientras que fue normal en el animal utilizado como control, carente de síntomas clínicos y reaccionante en linfoproliferación (Fig. 1). Estos resultados, aunque muy preliminares, sugieren que la expresión de CD80 podría estar alterada en algunos animales afectados, y serían compatibles con las observaciones en HIV de Dudhane *et al.* (1996) para la menor

expresión de CD80 en monocitos infectados, y de Legendre *et al.* (1998) para la mayor respuesta Th2 asociada a la disminución de CD80.

**Tabla 1.** Porcentaje y proporciones de positividad (superando un umbral de índice de estimulación IE = 3) en el ensayo de linfoproliferación al enfrentar antígenos Gag del VMV con PBMCs procedentes de animales seronegativos, seropositivos sin síntomas clínicos y seropositivos clínicamente afectados.

Proteína	Porcentaje y proporción (positivos/testados) de animales con respuesta linfoproliferativa (IE ≥3)		
	Seronegativos	Seropositivos no afectados clínicamente	Seropositivos afectados clínicamente
p25	33 (10/30)	75 (9/12)	0 (0/11)
p17	23 (5/22)	71 (5/7)	0 (0/11)
p14	45 (10/22)	100 (5/5)	0 (0/11)

**Fig. 1.** Ejemplo ilustrativo de la inhibición de la expresión de la molécula coestimuladora CD80 en dos animales seropositivos clínicamente afectados (calles 1, 4 y 2, 5) y expresión normal en un animal sin afección clínica y con respuesta en linfoproliferación (calles 3, 6) frente a los antígenos Gag de VMV. Calles 1, 2 y 3: Producto amplificado del gen GAPDH. Calles 4, 5, y 6: Producto amplificado del gen CD80.



#### AGRADECIMIENTOS

Financiado por CICYT AGL2003-08977-C03-01, EU QLK2-CT-2002-00617 y LIFE-CRAFT No. CRAF-1999-70356).

#### REFERENCIAS

- Bird *et al.***, 1995. *Clin Exp Immunol* 102: 274-80.  
**Dudhane *et al.***, 1996. *AIDS Res Hum Retrovir* 12: 885-92.  
**Extramiana *et al.***, 2002. *Small Rum Res* 44: 109-17.  
**Fariñas y Zorrilla**, 2002. *XXVII Jornadas la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*. pp 583-5.  
**Rimstad *et al.***, 1993 *Am J Vet Res* 54: 1858-62.  
**Shah *et al.***, 2004. *Virology* 319: 12-26.  
**Sonigo *et al.***, 1985. *Cell* 42: 369-82.  
**Terzo *et al.***, 2005. *Vet Immunol Immunopath* 103: 9-19.  
**Legendre *et al.***, 1998. *Int Immunol* 10: 1847-51.  
**Shimojima *et al.***, 2004. *Science* 303: 1192-5.