

BASES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA FORMA RESPIRATORIA DEL PRRS

GÓMEZ-LAGUNA J.¹, RODRÍGUEZ-GÓMEZ I. M.², BARRANCO I.², QUEREDA J. J.³, GARCÍA-NICOLÁS O.⁴, RAMIS G.⁵, PALLARÉS F. J.⁴, CARRASCO L.²

RESUMEN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad de distribución mundial que causa graves pérdidas económicas al sector porcino. Este virus no sólo es importante como agente causal del PRRS sino también por su participación en el desarrollo del Complejo Respiratorio Porcino. Su interacción con las defensas pulmonares, la alteración de la respuesta inmune y su persistencia en los órganos linfoides conlleva a que los cerdos tengan dificultades para luchar contra la enfermedad.

Palabras clave: PRRS, macrófago, citoquinas, proteínas de fase aguda

ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is considered as the most economically important disease of the modern swine industry. The importance of this virus lies in not only being the causative agent of PRRSV, but also due to its implication in the onset of the Porcine Respiratory Disease Complex. The interaction of the virus with pulmonary defenses, the impairment of the immune response as well as the viral persistence in lymphoid organs make overcoming the disease difficult to infected pigs.

Key words: PRRS, macrophage, cytokines, acute phase proteins

¹ Dpto. de I+D+i, CICAP, Pozoblanco, Córdoba, España.

² Dpto. de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

³ Dpto. de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, España

⁴ Dpto. de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas.

⁵ Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España; e-mail: jgomez@cicap.es

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS; del inglés, *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) es una enfermedad causada por un arterivirus conocido por el mismo nombre del síndrome (virus del PRRS, PRRSV), distinguiéndose actualmente dos genotipos del PRRSV, el europeo o tipo I y el americano o tipo II, que presentan importantes diferencias antigénicas y patogénicas entre sí. La forma respiratoria de la enfermedad afecta principalmente a cerdos en transición y cebo, causando una neumonía de tipo intersticial que induce tanto dificultad respiratoria (distrés respiratorio) como mayor susceptibilidad a otros patógenos.

La mayor susceptibilidad que tienen los cerdos que desarrollan la forma respiratoria del PRRS a sufrir infecciones secundarias por otros patógenos, es lo que ha motivado que esta forma de la enfermedad haya cobrado una gran importancia, al ser uno de los principales patógenos implicados en el desarrollo del complejo respiratorio porcino (CRP). El CRP se considera como una enfermedad multifactorial en cuya patogenia tienen un papel destacado distintos factores: i) la ausencia en las explotaciones de medidas de manejo adecuadas; ii) la ausencia o descuido en las medidas de bioseguridad; y, iii) la presencia de patógenos del tracto respiratorio (Tabla 1). Los principales agentes infecciosos implicados en el desarrollo del CRP son tanto víricos, como el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) o el PRRS, como bacterianos, como *Mycoplasma hyopneumoniae*, los cuales van a estar implicados en una mayor susceptibilidad de los animales a infecciones respiratorias por patógenos secundarios, dando lugar a un cuadro respiratorio grave en las naves de transición y cebo, con el consecuente aumento del número de bajas y la merma en los parámetros productivos. Además, la concomitancia de distintos patógenos (primarios y secundarios) agrava el cuadro respiratorio presente en las explotaciones, así, la neumonía intersticial que aparece durante el PRRS se hace más intensa y duradera cuando existe una coinfección con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los cerdos infectados por el PRRSV presentan una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias por otras bacterias como *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y *Salmonella* spp., y otros virus, como el de la influenza porcina (Tabla 2).

Tabla 1. Factores de manejo y agentes infecciosos responsables del desarrollo del Complejo Respiratorio Porcino.

Complejo Respiratorio Porcino		
<i>Factores de Manejo</i>	<i>Agentes infecciosos</i>	
	Virus	Bacterias
- Temperatura	- PRRS	- <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
- Ventilación	- PCV-2	- <i>Mycoplasma hyorhinis</i>
- Humedad	- SIV	- <i>Pasteurella multocida</i>
- Densidad Animal	- ADV	- <i>Bordetella bronchiseptica</i>
- Limpieza y desinfección	- PRCV	- <i>Haemophilus parasuis</i>
		- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		- <i>Actinobacillus suis</i>
		- <i>Streptococcus suis</i>

PRRS: Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino; PCV-2: Circovirus Porcino tipo 2; SIV: Virus Influenza; ADV: Virus de la Enfermedad de Aujeszky; PRCV: Coronavirus Respiratorio Porcino

Tabla 2. Coinfecciones más frecuentes en el Complejo Respiratorio Porcino.

PRRSV +	<i>M. hyopneumoniae</i>		<i>M. hyopneumoniae</i> +		
	PCV-2				
	SIV				
	PRCV				PCV-2
					SIV
	<i>Pasteurella multocida</i>				<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>A. pleuropneumoniae</i>				<i>A. pleuropneumoniae</i>
	<i>Streptococcus suis</i>				
	<i>Haemophilus parasuis</i>				
<i>Salmonella choleraesuis</i>					

PRRS: Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino; PCV-2: Circovirus Porcino tipo 2; SIV: Virus Influenza; PRCV: Coronavirus Respiratorio Porcino

INTERACCIÓN DEL VIRUS DEL PRRS CON LAS DEFENSAS PULMONARES

La importancia del PRRS en la mayor susceptibilidad de los animales a sufrir infecciones secundarias se puede explicar tanto por el daño que ocasiona el virus a nivel pulmonar, como por su persistencia en los órganos linfoides, principalmente tonsila y nódulos linfáticos, durante largos periodos de tiempo (> 150 días), lo que

está íntimamente relacionado tanto con la interacción de este virus con las barreras de defensa del aparato respiratorio, como con el fallo en la instauración de una respuesta inmune adecuada por parte del organismo frente a este virus.

A continuación vamos a describir brevemente la interacción del PRRSV con las principales barreras de defensa del aparato respiratorio:

- La primera línea de defensa está constituida por el epitelio de las vías aéreas, un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado. Este epitelio se caracteriza por la presencia de células caliciformes y de células ciliadas, lo que le permite capturar las partículas vehiculadas por el aire (como son los patógenos respiratorios) así como, la eliminación de las mismas mediante el movimiento de los cilios. Los animales infectados por el PRRSV sufren la destrucción del sistema mucociliar, lo que impide que se pueda producir tanto la captura como la eliminación de aquellas partículas y/o microorganismos vehiculados por el aire, lo que facilita la progresión de otros patógenos tanto primarios como secundarios.
- La siguiente línea de defensa está representada por el macrófago alveolar porcino (MAP), el cual se encarga, principalmente, de fagocitar y eliminar todas aquellas sustancias extrañas al organismo y que, vehiculadas por el aire inspirado, son capaces de llegar hasta el alveolo. Este macrófago es considerado como la principal célula diana de replicación del PRRSV, el cual al replicarse en los mismos provoca un efecto sobre varias de sus funciones, entre las que se encuentra la fagocitosis, que es la herramienta que tiene este macrófago para capturar y eliminar a los patógenos respiratorios. Además, este virus puede inducir la muerte de estas células, lo que se traduce en una disminución, no sólo de sus funciones sino también de su número y, por tanto, de este mecanismo de defensa, lo que facilita la colonización del alveolo por aquellos patógenos que llegan a alcanzarlo.
- En tercer lugar, y no sólo a nivel pulmonar, sino en la mayoría de los órganos que componen el sistema inmune, el PRRSV es capaz de inducir la apoptosis (o muerte celular programada), tanto de linfocitos como de macrófagos, impidiendo de esta forma el desarrollo de una respuesta inmune eficaz.

INTERACCIÓN DEL PRRSV CON LA RESPUESTA DE FASE AGUDA

La respuesta de fase aguda (RFA) surge como consecuencia de la alteración de la homeostasis normal por diversos estímulos como pueden ser la infección, el desarrollo de un proceso inflamatorio, una situación de estrés, un traumatismo o cualquier tipo de daño tisular. Esta RFA se desencadena por la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en el lugar de la lesión. Estas citoquinas, que se liberan al torrente sanguíneo, llegan al hígado e inducen la producción de las proteínas de fase aguda (PFA) por los hepatocitos. Las PFA se clasifican como “positivas” o “negativas” en función del aumento o disminución de su concentración sérica, respectivamente. La haptoglobina (Hp), proteína C-reactiva (CRP), amiloide A sérica (AAS), y la “Pig-Major acute phase protein” (Pig-MAP) se consideran como las principales PFA en el cerdo. En general se acepta que las PFA son inductores de una reacción proinflamatoria y de la fiebre, pero su sobreexpresión puede llevar también a una respuesta anti-inflamatoria. Por lo tanto, las PFA son utilizadas en la actualidad como posibles marcadores biológicos en el control del bienestar animal y del estatus sanitario, tanto a nivel de explotaciones como a nivel individual. Por otra parte, las PFA también se están utilizando para determinar la virulencia de diferentes aislados de bacterias o virus, o la eficacia de las vacunas.

El PRRSV se caracteriza, a diferencia de la mayoría de los patógenos, por inducir una pobre producción de citoquinas proinflamatorias a lo largo de la infección, lo que sería una de las razones por las que no se produce ni una sintomatología respiratoria evidente ni alteraciones sistémicas como la aparición de un cuadro febril, por lo que en los animales inoculados experimentalmente con el PRRSV contrasta la ausencia de un incremento de la temperatura rectal con el desarrollo de una intensa neumonía intersticial.

Estudios previos sobre la patogenia de otras enfermedades respiratorias han sugerido que, durante las infecciones pulmonares, la respuesta inflamatoria puede activarse de manera eficiente a nivel local en el pulmón, mientras que la concentración sérica de las citoquinas proinflamatorias puede no presentar cambios significativos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado un aumento significativo en la expresión *in situ* de IL-1 α , IL-6 y TNF- α en el pulmón de cerdos infectados con un aislado europeo del PRRSV, existiendo una correlación significativa entre la expresión tisular de estas citoquinas y el desarrollo de la neumonía intersticial típica de esta enfermedad. Por otra parte, se sabe que la infección por el PRRSV induce una modulación de la respuesta inmune evitando el establecimiento de una respuesta

inmune eficiente en el animal infectado. Por lo tanto, la falta de cambios significativos en la concentración sérica de las citoquinas proinflamatorias puede apuntar a una estrategia del virus para escapar de la respuesta inmune del huésped, previniendo así la activación de los hepatocitos para inducir una RFA eficiente.

La Hp es una PFA que modula la respuesta inmune por medio de interacciones complejas con diferentes mediadores. Estudios previos han demostrado un aumento en la concentración sérica de Hp coincidiendo con el aumento en la expresión de IL-6 y TNF- α , de forma que estas citoquinas podrían inducir una leve RFA a partir de la cual se indujera la síntesis de Hp. No obstante, también se ha observado un aumento de Hp relacionado con un aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, lo que se podría originar a través de la interacción con el receptor CD163. El receptor CD163 actúa eliminando los complejos hemoglobina-Hp en circulación, de manera que disminuye la hemoglobina disponible para otros patógenos. De este modo, se ha descrito igualmente como la interacción de la Hp con el receptor CD163 da lugar a la liberación de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10. Estos resultados apuntan a que la Hp jugaría un papel importante en la patogenia de la enfermedad, estando involucrada esta PFA en la modulación de la respuesta inmune, probablemente a través de la inducción de ciertas citoquinas.

Recientemente se ha llevado a cabo una clasificación de los aislados del PRRSV en función de si son inductores de TNF- α , de IL-10 o de ninguna de estas citoquinas. El TNF- α juega un importante papel en la respuesta inflamatoria, ya que esta citoquina puede actuar como una citoquina antiviral, protegiendo a las células de la infección por determinados virus, o eliminando de forma selectiva a las células infectadas por virus de una forma independiente al interferón. Así, se ha descrito que la adición de TNF- α recombinante porcino es capaz de inhibir la replicación *in vitro* del PRRSV, observándose igualmente una reducción en la expresión de esta citoquina tras la infección de macrófagos alveolares porcinos con el PRRSV. La pobre expresión de TNF- α observada en las infecciones experimentales con algunas cepas del PRRSV, puede apuntar a un mecanismo de evasión del virus para evitar la respuesta inmune del huésped, evitando así la inducción de una eliminación eficiente del PRRSV.

Por su parte, la IL-10 es una citoquina conocida como inmunomoduladora, ya que es capaz de desarrollar, entre otras, acciones anti-inflamatorias al impedir una síntesis adecuada de citoquinas proinflamatorias. En este sentido, se ha propuesto que esta citoquina puede desempeñar un papel importante en la patogenia de la enfermedad al inhibir la síntesis de interferón gamma (IFN- γ), una de cuyas funciones es la de impedir la replicación vírica. De este modo, al igual que la IL-10 puede impedir

la producción de IFN- γ , esta citoquina, la IL-10, podría estar también impidiendo el desarrollo de una respuesta proinflamatoria más marcada en los animales infectados por el PRRSV, lo que se traduciría en una respuesta sistémica a la enfermedad, al producirse un aumento de la concentración de las citoquinas proinflamatorias en circulación.

La menor expresión de citoquinas proinflamatorias en la infección por el PRRSV, con respecto a otras infecciones víricas, también podría estar relacionada con la expresión de niveles más bajos de PFA, ya que las citoquinas proinflamatorias actúan como inductoras de la producción de PFA por los hepatocitos. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se observó una expresión temprana de Hp y Pig-MAP, mientras que la concentración sérica de CRP y AAS mostró un aumento más tardío. La CRP y la AAS son PFA que desarrollan varias funciones biológicas relacionadas con la respuesta inmune. La CRP participa en la activación del complemento y opsonización, e induce la producción de citoquinas por los macrófagos, mientras que la AAS es quimiotáctica para monocitos, linfocitos T y leucocitos polimorfonucleares. Por lo tanto, el aumento tardío observado en ambas PFA puede contribuir al establecimiento de una respuesta inmune ineficiente por parte de los animales infectados.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que tanto la saliva como el jugo de carne representan unas muestras biológicas muy útiles para la medición y monitorización de las PFA a lo largo de la infección con el PRRSV, presentando importantes ventajas respecto al suero, al permitir una toma de muestras menos invasiva y de fácil acceso en el caso de la saliva, disminuyendo tanto el estrés de los animales, como del tiempo empleado para el muestreo de los mismos, ya que en los casos de jugo de carne, la toma de muestra en la cadena de sacrificio es mucho más rápida y cómoda que la toma de sangre.

CONCLUSIÓN

A modo de conclusión nos gustaría destacar que el PRRSV es capaz de desarrollar diversos mecanismos que conllevan una alteración de la respuesta inmune a nivel local, como es la destrucción del sistema mucociliar y la disminución de las funciones y del número de los macrófagos alveolares, y la inducción de apoptosis de células inmunes competentes (como linfocitos y macrófagos). Todos estos mecanismos impiden que el animal que está infectado por el PRRSV pueda establecer una respuesta inmune eficaz, lo que junto a la disminución en la actividad bactericida de

los macrófagos podría explicar la persistencia de este virus en el animal, así como, el aumento en la prevalencia de infecciones secundarias concomitantes, las cuales se observan con frecuencia en el CRP.

Por otro lado, los estudios realizados sobre el papel de las PFA en el PRRS señalan que la Hp y la Pig-MAP serían las más útiles para la monitorización de las fases tempranas de la infección por este virus. Además, el PRRSV sería capaz de modular la respuesta inmune al inducir una mayor expresión de Hp en las fases tempranas, y a una expresión tardía y errática de TNF- α , CRP y AAS, lo que haría viable el establecimiento de una viremia prolongada, al evitar una eliminación eficaz de este virus.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, número de proyectos AGL2006-04146/GAN y AGL2009-12438/GAN.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- Asai T, Mori M, Okada M, Uruno K, Yazawa S, Shibata I. Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70:143–148.
- Barranco I, Gómez-Laguna J, Rodríguez-Gómez IM, Salguero FJ, Pallarés FJ, Carrasco L. Differential Expression of Proinflammatory Cytokines in the Lymphoid Organs of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Pigs. *Transbound Emerg Dis* 2011 Aug 16. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01252.x.
- Barranco I, Gómez-Laguna J, Rodríguez-Gómez IM, Salguero FJ, Pallarés FJ, Bernabé A, Carrasco L. Immunohistochemical detection of extrinsic and intrinsic mediators of apoptosis in porcine paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 139 (2-4):210-216.
- Darwich L, Díaz I, Mateu E. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res* 2010; 154(1-2):123-132.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt 7): 1943-1951.
- Gimeno M, Darwich L, Diaz I, de la Torre E, Pujols J, Martín M, Inumaru S, Cano E, Domingo M, Montoya M, Mateu E. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res* 2011; 42(1): 9.
- Gómez-Laguna J, Rodríguez-Gómez IM, Barranco I, Pallarés FJ, Salguero FJ, Carrasco L. Enhanced expression of TGF protein in lymphoid organs and lung, but not in serum, of pigs infected with a European field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 2012; 158 (1-2):187-193.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallarés FJ, Rodríguez-Gómez IM, Barranco I, Carrasco L. Acute phase proteins as biomarkers in animal health and welfare. Book chapter of Acute phase pro-

- teins as early non-specific biomarkers of human and veterinary diseases. *Intech*. April, 2011. Chapter 12, 259-298. ISBN 978-953-307-873-1.
- Gómez-Laguna J, Gutiérrez A, Pallarés FJ, Salguero FJ, Cerón JJ, Carrasco L. Haptoglobin and C-reactive protein as biomarkers in the serum, saliva and meat juice of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J* 2010; 185(1):83-87.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Barranco I, Pallarés FJ, Rodríguez-Gómez IM, Bernabé A, Carrasco L. Cytokine expression by macrophages in the lung of pigs infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Comp Pathol* 2010; 142(1):51-60.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallarés FJ, Fernández de Marco M, Barranco I, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Van Reeth K, Carrasco L. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33(6):e51-e58.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, De Marco MF, Pallarés FJ, Bernabé A, Carrasco L. Changes in lymphocyte subsets and cytokines during European porcine reproductive and respiratory syndrome: increased expression of IL-12 and IL-10 and proliferation of CD4(-)CD8(high). *Viral Immunol* 2009, 22(4):261-271.
- Gutiérrez AM, Martínez-Subiela S, Soler L, Pallarés FJ, Cerón JJ. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132(2-4):218-23.
- Martínez-Lobo FJ, Díez-Fuertes F, Segalés J, García-Artiga C, Simarro I, Castro JM, Prieto C. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet Microbiol* 2011; 154(1-2):58-68.
- Parra MD, Fuentes P, Tecles F, Martínez-Subiela S, Martínez JS, Muñoz A, Cerón JJ. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53(10):488-93.
- Qiao S, Feng L, Bao D, Guo J, Wan B, Xiao Z, Yang S, Zhang G. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin act in synergy to amplify the inflammatory response of infected macrophages. *Vet Microbiol* 2011; 149(1-2):213-20.
- Renukaradhya GJ, Alekseev K, Jung K, Fang Y, Saif LJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral Immunol* 2010; 23(5):457-66.
- Rodríguez-Gómez IM, Gómez-Laguna J, Barranco I, García-Nicolás O, Pallarés FJ, Ramis G, Carrasco L. El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino como llave de entrada al Complejo Respiratorio Porcino. *Tierras*, Otoño 2011. Vol 184, 42-45.
- Van Gucht S, van Reeth K, Pensaert M. Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3):960-6.