



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

Resumen.....	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 El sarrio <i>Rupicapra pyrenaica pyrenaica</i>	4
1.1.1 Contexto	4
1.1.2 Taxonomía, descripción y distribución actual.....	4
1.1.3 Estado sanitario <i>Rupicapra pyrenaica pyrenaica</i>	6
1.2 Pestivirus	7
1.2.1 Taxonomía y patogenia	7
1.2.2 Pestivirus en <i>Rupicapra p. pyrenaica</i>	8
1.3 Sistema inmune en mamíferos	11
1.3.1 Células y tejidos del sistema inmune adquirido.....	12
1.3.2 Impacto de la infección por pestivirus en la inmunidad adaptativa	14
2. Justificación y objetivos.....	14
3. Metodología	15
3.1 Muestras.....	15
3.2 Procesado histológico	15
3.3 Técnicas para la detección del antígeno	15
3.3.1. Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de linfocitos T con anticuerpo policlonal anti CD3 en tejido formolado	16
3.3.2. IHQ para la detección de linfocitos B con anticuerpo monoclonal anti CD79α en tejido formolado	16
3.3.3 IHQ para la detección de antígeno viral de pestivirus con el anticuerpo monoclonal 15C5 en tejido formolado	17
3.4 Evaluación microscópica	17
3.5 Análisis de datos.....	19
4. Resultados y discusión	20
4.1 Resultados	20
4.1.1 Inmunohistoquímica	20
4.1.2 Estudio estadístico	22
4.2 Discusión	22
5. Conclusiones.....	24
6. Valoración personal.....	24
7. Bibliografía	25

Resumen

El sarrio *Rupicapra p. pyrenaica* es un bóvido silvestre que habita en el Pirineo. Desde el año 2001 la población de este ungulado se ha visto mermada debido a la aparición de una enfermedad causada por un pestivirus conocido como Virus de la Enfermedad de la Frontera (Border Disease Virus) genotipo BDV-4. Los animales afectados presentan un cuadro con caquexia extrema, pérdida del pelaje y comportamiento anormal.

En este *Trabajo Fin de Grado* se ha valorado la población linfocitaria en sarrios afectados por pestivirus mediante su estudio inmunohistoquímico. Para ello se dispuso de muestras de 5 animales no infectados, procedentes de la caza, que hicieron a su vez de controles negativos y otras de 5 animales afectados por la enfermedad. Las muestras procedían de diversos tejidos linfoides secundarios: bazo, linfonodos subcutáneos, mediastínicos, mesentéricos y retrofaríngeos, donde se encuentra la población linfocitaria objeto de estudio.

Una vez recogidas las muestras, fueron procesadas fijándolas en formol. El tejido se incluyó en parafina y se efectuaron cortes seriados de 5 micras sobre portaobjetos gelificados. Posteriormente sobre estos cortes se realizó una prueba inmunohistoquímica (IHQ) para detectar la presencia del antígeno vírico y las poblaciones linfocitarias, con el uso de anticuerpos.

El objetivo del trabajo es conocer si hay diferencias cuantitativas de los dos tipos de células anteriormente descritas en sarrios enfermos con pestivirus en comparación con animales no infectados con el virus. El estudio se basó en la valoración microscópica subjetiva de las diferentes intensidades de tinción con la técnica inmunohistoquímica en cada muestra.

La presencia del virus en los animales afectados se confirmó mediante IHQ. Finalmente se concluye que en las muestras de tejido linfoide de los animales afectados por pestivirus presentaban una disminución significativa de la población de linfocitos B y linfocitos T con respecto a los animales sanos.

Abstract

Immunohistochemistry study of lymphoid tissue in Pyrenean chamois *Rupicapra p. pyrenaica* affected by pestivirus

The Pyrenean chamois *Rupicapra p. pyrenaica* is a free-living bovine who lives in the Pyrenees. Since 2001 the population of this wild ungulate has been decreased due to an outbreak of a previously unreported disease caused by a pestivirus associated to a new genotype of BDV, named BDV-4. Affected animals had cachexia, alopecia and behaviour changes.

In this *End-of-Degree Project* the population of lymphocytes has been valued through immunochemistry study in Pyrenean chamois affected by pestivirus. In order to achieve that, samples of 5 non infected animals, which were considered as negative controls, and other samples of 5 infected animals were used. The samples belong to lymphoid tissue: spleen and subcutaneous, mediastinal, mesenteric and retropharyngeal lymph nodes. This representation of secondary lymphoid tissue was chosen because it contains the investigated lymphocytes.

Once the samples were collected, they were fixed in buffered 10% formalin. The tissue was embedded in paraffin wax and cut in 5 microns pieces over gelled slides. Afterwards, immunohistochemical tests were carried out in the tissue sections in order to detect the presence of viral antigen and different population of lymphocytes. Monoclonal and polyclonal antibodies were used to recognize populations of B and T lymphocytes by immunohistochemistry (IHC).

The goal of this work is to find out if there are quantitative differences between both types of previously appointed cells in pestivirus-positive chamois compared to pestivirus-negative chamois. Immunohistochemical staining was microscopically evaluated by using a semiquantitative intensity scoring system in each sample.

The virus presence in affected chamois was confirmed by IHC. It is finally concluded that the lymphoid tissue samples of pestivirus-affected animals showed a substantial decrease of B and T lymphocytes regarding healthy animals.

1. Introducción

1.1 El sarrio *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*

1.1.1 Contexto

A pesar de la pérdida de diversidad biológica que se está produciendo a nivel mundial, Europa alberga una diversidad natural importante, con zonas de alta variedad y riqueza. Las diferentes características orográficas y condiciones climatológicas que pueden encontrarse a lo largo del continente, permiten la existencia de numerosos ecosistemas, entre los que destaca el ecosistema de alta montaña, cuyo representante principal en el suroeste europeo es el Pirineo.

La cordillera pirenaica presenta un amplio patrimonio en cuanto a especies de flora y fauna. Entre las especies animales cabe destacar la presencia de grandes mamíferos, como oso pardo *Ursus arctos arctos*, ciervo *Cervus elaphus*, corzo *Capreolus capreolus*, jabalí *Sus scrofa* y sarrio *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*. Entre todas estas especies, destaca un ungulado que pasó de estar al borde de la extinción el siglo pasado a tener una población de miles de ejemplares hoy en día, gracias a las políticas de conservación ambiental. Se trata del comúnmente denominado sarrio o rebeco pirenaico *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*, -Bonaparte, 1845- (Herrero *et al.*, 2004).

1.1.2 Taxonomía, descripción y distribución actual

El sarrio es un ungulado silvestre endémico del suroeste europeo. Pertenece al orden *Artiodactyla*, subfamilia *Caprinae*, dentro de la familia *Bovidae*. Al ser un miembro de la subfamilia de los caprinos se asemeja a una cabra, aunque son más estilizados y pequeños que éstas. Ambos sexos poseen cuernos permanentes en forma de ganchos dirigidos ventro-caudalmente de color negro o marrón oscuro y en cuanto al pelaje, en la cabeza y región de la garganta es de color claro con una mancha oscura que cubre el ojo a modo de antifaz, marrón oscuro en el dorso, pecho, patas y flancos y más claro en cuartos traseros y hombro (Herrero *et al.*, 2002).

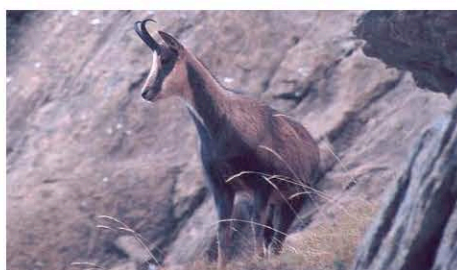


Figura 1. Sarrio *Rupicapra p. pyrenaica* en el Pirineo.

Fue en 1845 cuando Bonaparte describió al rebeco pirenaico otorgándole un nombre específico propio, *Rupicapra pyrenaica*. En la actualidad, atendiendo a datos morfológicos y de variabilidad para isoenzimas, se reconocen un total de 10 subespecies agrupadas en dos especies, *Rupicapra pyrenaica* presente en el suroeste de Europa y *Rupicapra rupicapra* que se distribuye por el resto

de Europa y en el Cáucaso (Pérez-Barbería *et al.*, 2010). Cada una de las diez subespecies de *Rupicapra* está confinada en un sistema montañoso (Domínguez *et al.*, 2009).

La especie *R. pyrenaica* agrupa a los rebecos del suroeste de Europa. Se distinguen las subespecies *R. p. parva* en la Cordillera Cantábrica, *R. p. pyrenaica* en Pirineos y *R. p. ornata* en los montes Abruzos (Italia) (Pérez *et al.*, 2002).

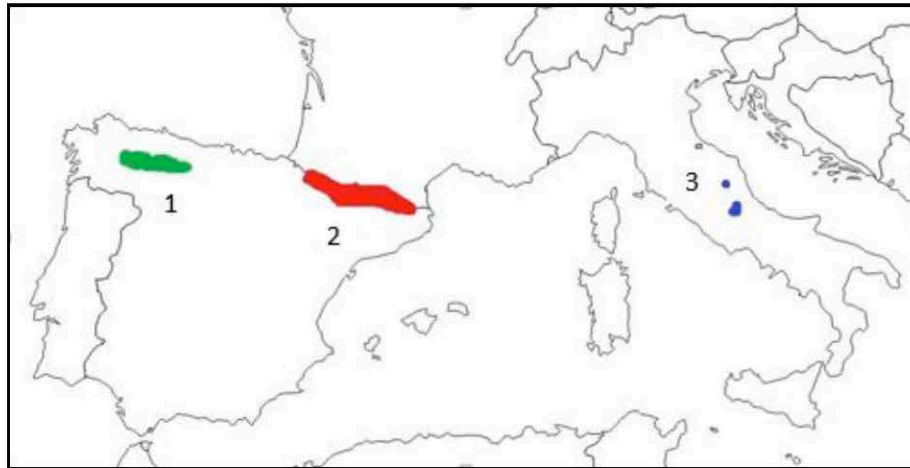


Figura 2. Distribución de *Rupicapra pyrenaica*: (1) *parva*, (2) *pyrenaica*, (3) *ornata*.

El género *Rupicapra* está adaptado a la vida en la montaña, destacando el uso que hacen de las zonas altas con vegetación abierta, fuertes pendientes y refugios. El sarrio presenta una migración altitudinal dependiendo de la época del año y disponibilidad de alimento (Pérez-Barbería & García-González, 2004), siendo el rango de distribución entre los 1.000 y 2.800 m de altitud. El área de distribución del sarrio *R. p. pyrenaica* comprende la mayor parte del Pirineo, incluyendo los tres países pirenaicos, España, Francia y Principado de Andorra y por ello su estatuto legal es a su vez amplio y variado. Recibe numerosos apelativos, para nombrar las distintas especies en castellano se denomina rebeco o gamuza (*Rupicapra spp.*) seguido de su localización geográfica. Pero en concreto para el *R. p. pyrenaica* se emplea rebeco pirenaico. En Aragón y Navarra se le conoce como “sarrio”, aunque recibe otros nombres como chizarzo, isarzo, eixarzo, craba y segallo. En inglés se utiliza “Pyrenean Chamois o Southern Chamois”; mientras que en Andorra, Francia y Cataluña le llaman “Isard” (Herrero *et al.*, 2002, 2004, 2008).

En el año 2003 se estimó que la población era de unos 53.000 sarrios, distribuidos de la siguiente manera: 14.000 en Aragón, 13.000 en Cataluña, 25.400 en Francia, 300 en Navarra y 600 en el Principado de Andorra (Herrero *et al.*, 2004). El sarrio *R. p. pyrenaica* es considerado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como de “preocupación menor” (LC: Least Concern) dado su incremento numérico y área de distribución (Herrero *et al.*, 2008). Aunque en la actualidad dichos datos pueden ser una sobreestimación, debido al declive de la

misma por los brotes de enfermedad asociados con la infección por pestivirus (Marco *et al.*, 2009b).

El sarrio es una especie de gran interés, tanto desde el punto de vista turístico como cinegético y naturalístico. En Europa su gestión está orientada a varios objetivos aplicables a las subespecies ibéricas: conservación, explotación cinegética, prevención de daños, control de enfermedades, expansión del área de distribución y regulación natural en las áreas protegidas (Pérez-Barbería *et al.* 2010).

1.1.3 Estado sanitario *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*

Las enfermedades en fauna silvestre tienen un papel importante ya que pueden modular la dinámica de la población, siendo el principal factor de mortalidad poblacional (Herrero *et al.*, 2010), y por consiguiente, modificar la biodiversidad de los ecosistemas. Además, el asentamiento de ciertas enfermedades en fauna silvestre dificulta los programas de control y erradicación en el ganado doméstico debido a que muchas de las patologías son compartidas entre ambos. Tampoco hay que olvidar que algunas de estas enfermedades son zoonosis, con especial relevancia en el caso de las especies cinegéticas. En consecuencia, la vigilancia sanitaria de la fauna cinegética es un punto crítico para el control de enfermedades, por lo que es importante establecer planes de vigilancia sanitarios que tengan en cuenta tanto las especies silvestres como las domésticas y hagan hincapié en la salud pública (Arnal, 2011).

La monitorización sanitaria del sarrio se inició en la Comunidad Autónoma de Aragón durante el año 2000. Esta red de vigilancia tiene como objetivo conocer de forma fiable el estado sanitario de la población cinegética. La combinación de las dos formas de vigilancia del sarrio en el Pirineo aragonés, activa y pasiva, permite conocer la situación de los procesos epidémicos, tales como pestivirus, sarna y queratoconjuntivitis infecciosa (QCI); zoonosis como brucelosis, tuberculosis e hidatidosis; y otros procesos patológicos en la especie. En un estudio realizado en un periodo de 10 años en el Pirineo Aragonés se observó que, en ausencia de brotes, la bronco-neumonía no parasitaria era una patología frecuente y periódica, seguida de procesos traumáticos y digestivos (Arnal, 2011). Además, la queratoconjuntivitis infecciosa por *Mycoplasma conjunctivae* fue la responsable de dos picos de mortalidad en el sarrio en 2007 y 2008 (Arnal *et al.*, 2013a) y en el año 2011 se detectó por primera vez la pestivirus del sarrio en el extremo este del Pirineo Aragonés (Arnal *et al.*, 2013b).

1.2 Pestivirus

1.2.1 Taxonomía y patogenia

Los pestivirus son virus patógenos que afectan a mamíferos y pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Dicha familia está compuesta por tres géneros diferentes; los *Hepacivirus*, cuyo único miembro es el virus de la hepatitis C, los *Flavivirus*, principales causantes de enfermedades virales transmitidas por artrópodos como el virus de Louping-ill en ganado ovino y dengue o la fiebre amarilla en los humanos, y finalmente, los *Pestivirus* (Simmonds *et al.*, 2011). La infección en rumiantes por virus del género *Pestivirus* tiene la capacidad de cruzar barreras de especie, afectando a un amplio rango de hospedadores dentro del género *Artiodactyla* (Becher *et al.*, 2003). Existen cuatro especies oficialmente aceptadas por el “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV): virus de la Enfermedad de la Frontera o Border Disease (BDV) aislado en ganado ovino y caprino, virus de la diarrea vírica bovina tipo 1 (BVDV-1) y tipo 2 (BVDV-2), virus de la peste porcina clásica (PPC) y virus Giraffe-1 aislado en jirafa y clasificado provisionalmente (Thiel *et al.*, 2005). Recientes estudios genéticos y de caracterización antigénica proponen que las cepas de BVD pueden ser asignadas dentro de cuatro genotipos, BDV-1, BDV-2, BDV-3 Y BDV-4, siendo este último aislado por primera vez en *Rupicapra p. pyrenaica* (Arnal *et al.*, 2004; Becher *et al.*, 2003). Posteriormente se han identificado otros genotipos ovinos, BDV-5 y BDV-6 (Dubois *et al.*, 2008) y el análisis de secuencias parciales de cepas de aisladas de BDV ovinas y caprinas sugiere la existencia de genotipos adicionales BDV (De Mia *et al.*, 2005; Thabti *et al.*, 2005; Oguzoglu *et al.*, 2009).

Las infecciones por pestivirus provocan en el ganado doméstico grandes pérdidas económicas, produciendo un amplio número de síntomas y signos clínicos. Cursan con una elevada morbilidad, pero baja mortalidad, aunque se han descrito brotes de casos agudos con mortalidad elevada en infecciones por BVDV o BDV. Los animales infectados suelen pasar desapercibidos, aunque algunos muestran fiebre, diarrea, síntomas respiratorios y problemas reproductivos. La infección natural entre individuos tiene lugar por vía oro-nasal o por transmisión vertical (vía trans-placentaria) (OIE, 2008). Se distinguen dos biotipos de pestivirus, diferenciados por su capacidad de producir o no efecto citopático en cultivos celulares. Normalmente, el biotipo no citopático es el ampliamente distribuido, como así ocurre en casi todas las cepas de BDV aisladas. Las consecuencias más serias de la infección por el biotipo no citopático se dan cuando los animales gestantes se infectan y el virus pasa la barrera placentaria, produciendo abortos que pasarían desapercibidos si la infección fuera al inicio de la gestación, muerte al nacimiento o malformaciones que se asocian con una respuesta inmune activa del feto a mediados de la gestación. Cuando se produce la infección y el feto no ha desarrollado su

sistema inmune, pueden nacer infectados (individuos persistentemente infectados, IPIs) no produciendo anticuerpos frente al virus ya que el individuo reconoce al virus como parte propia del organismo (Nettleton & Entrican, 1995).

En el caso de los corderos con infecciones por BDV, éstos suelen nacer pequeños y débiles, mostrando temblores y en algunas razas se observa pigmentación anormal de la lana de color marrón o negro en la zona del cuello o espalda. Los signos clínicos en el ganado bovino infectado por BVDV varían desde aparentemente normales a débiles con dificultad para desplazarse y tetar, teniendo temblores o ceguera. Los IPIs son positivos en la detección del virus y negativos a la presencia de anticuerpos. Por lo general, la reacción inflamatoria, si existe, es débil y con predominio de linfocitos. Los hallazgos patológicos más característicos se localizan en el sistema nervioso central (SNC), con desmielinización, y en la piel, hiperplasia de los folículos primarios y disminución de los secundarios. Aunque algunos animales pueden vivir hasta la madurez sexual y ser eliminadores constantes del virus, suelen morir a los pocos días del nacimiento. Algunos IPIs desarrollan espontáneamente un cuadro diarreico, erosiones extensas en las mucosas, emaciación, descargas oculares y nasales que sucumben con una severa enfermedad de las mucosas del ganado bovino o enfermedad similar a la enfermedad de las mucosas en ganado ovino (Nettleton & Entrican, 1995; Nettleton *et al.*, 1998).

Volviendo a la taxonomía, los diferentes aislamientos de pestivirus en rumiantes de vida libre están siendo clasificados como genotipos ya existentes y conocidos en ganado doméstico, como es el caso del genotipo BVDV-1 aislado en alpaca, antílope eland, bisonte americano y europeo, ciervo mulo, ciervo rojo, corzo, pudú, reno, etc. Otros aislamientos en fauna silvestre están próximos a otros pestivirus, pero llegando a formar genotipos diferentes, como son los casos del aislado de la jirafa (Giraffe-1), o el aislado en el berrendo americano (Vilcêk & Nettleton, 2006). Con respecto al género *Rupicapra* se ha detectado serología positiva a pestivirus en el sarrio en el Pirineo aragonés, andorrano y catalán (Arnal *et al.*, 2004; Marco *et al.*, 2008), en el rebeco cantábrico (Falconi *et al.*, 2010) y en la gamuza de los Alpes italianos (Gaffuri *et al.*, 2006; Olde Riekerink *et al.*, 2005).

[1.2.2 Pestivirus en *Rupicapra p. pyrenaica*](#)

[1.2.2.1 Aparición y evolución de la enfermedad](#)

La cronología de la enfermedad se inicia a finales del año 2001, cuando se detecta una mortalidad anormal de isards que estaba diezmando la población en el Pirineo oriental, concretamente en la Reserva Nacional de Caza (RNC) del *Alt Pallars- Arán*, donde la población descendió un 40-45%. Los síntomas y lesiones que presentaban estos animales afectados son la

dificultad de movimientos, cambios de comportamiento y debilidad, siendo fácil avistarlos cerca de torrentes, caminos y carreteras, también se observó caquexia, parasitación abundante por garrapatas, anomalías en la muda, que alternaban zonas alopecicas hiperpigmentadas y zonas con persistencia del pelo invernal en lugar de estival. Esta era la primera vez que un BDV se asociaba con un brote de alta mortalidad en una especie silvestre. Durante el verano de ese mismo año, dejaron de observarse animales enfermos (Marco *et al.* 2007).

Los análisis epidemiológicos y de laboratorio confirmaron que los animales afectados estaban infectados por el mismo virus, un nuevo pestivirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*. La caracterización molecular asignó este pestivirus al grupo de virus del BDV, genotipo BDV-4 (Arnal *et al.*, 2004). Hasta esa fecha no se había descrito un pestivirus en *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*, pero los resultados obtenidos en trabajos posteriores, indicaron que la infección de BDV estaba presente en la población de isards desde al menos 1990, casi 11 años antes del primer brote de la enfermedad (Marco *et al.*, 2011).

Entre los años 2001 y 2002 apareciendo animales afectados en la RNC y Fauna Silvestre (FS) de Orlu en el Pirineo francés (Frölich *et al.*, 2005) y en 2002 se detectó un animal enfermo en el Principado de Andorra (Arnal *et al.*, 2004). Durante los años 2003 y 2004 apenas se observaron rebecos afectados por la enfermedad. Sin embargo, en 2005 y 2006 se vuelve a detectar una mortalidad masiva de rebecos en diferentes brotes que hace temer por su población estimándose una disminución cercana al 76% de sus efectivos en el Pirineo catalán, concretamente en la RNC de *Cerdanya-Alt Urgell* la disminución poblacional fue de un 85,6% y en la del Cadí descendió un 63% (Marco *et al.*, 2009a).

A partir de ahí se comprobó mediante censos como las poblaciones aumentaban año tras año, observándose una mejora progresiva del número de individuos en las zonas donde la virulencia del virus fue muy fuerte. Diez años después, en el verano de 2011, se detectó el primer caso de pestivirus en Aragón en el macizo Maladeta. Progresivamente el virus fue extendiéndose diezmando las poblaciones de sarrios de Este a Oeste alcanzando primero la reserva de caza de Benasque, en 2012 la de Los Circos (Arnal *et al.*, 2013b), en 2013 se detecta en el parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido y en 2014 se diagnostica en la reserva de caza de Viñamala (Fernández de Luco y Arnal; Comunicación personal). Actualmente, según explica el jefe de la sección de Caza y Pesca del Gobierno de Aragón en Huesca, José Luis Alarcón, al interpretar los resultados del censo que se realizó en primavera de 2015, el pestivirus del sarrio está remitiendo porque ha llegado a un punto de inflexión donde se espera que comience la recuperación de las poblaciones afectadas, aunque dicho freno de la enfermedad debe constatararse.

Las actuaciones puestas en marcha se reducen a describir lo que ocurre y contabilizar los ejemplares afectados puesto que la enfermedad resulta poco menos que imposible de tratar. Un aspecto muy destacable de los pestivirus, y que podría estar detrás de las epidemias periódicas que sufren las poblaciones de sarrio, es la complejidad de su ciclo biológico. Como se ha explicado anteriormente, los principales reservorios de estos virus son los IPIs, animales que se han infectado durante la gestación y que no reconocen el virus como extraño. Por tanto, no elaboran anticuerpos y a partir del momento que nacen eliminan gran cantidad de virus al exterior. Esta característica extraordinaria hace que sea una enfermedad complicada de detectar inicialmente, de controlar y de erradicar, ya que puede darse la circunstancia de que animales sanos estén eliminando virus e infectando a otros animales. Pero entre los ungulados salvajes no se conoce la existencia de este tipo de animales, aunque se cree que también se encuentran presentes, y que deben ser los responsables del mantenimiento y propagación de la infección (Marco *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Lesiones

Las manifestaciones clínicas en los sarrios afectados son variables. La mayoría de los animales afectados presenta depresión, debilidad y dificultad en el movimiento (Hurtado *et al.*, 2004). También es común alteraciones en el comportamiento como falta de miedo hacia el ser humano, sin reacción de huida. Otro signo típico es la presencia de zonas en la piel con diferentes grados de alopecia e hiper-pigmentación.

En la necropsia, la caquexia se describe en todos los animales y las infecciones secundarias aparecen con frecuencia, siendo las neumonías lo más común junto con diferentes parasitismos y abscesos. Estudios histopatológicos revelan lesiones inflamatorias microscópicas en cerebro: edema, gliosis, espongiosis y cariorrexis. Los hallazgos patológicos más característicos en la piel son la atrofia folicular, de media a moderada hiperplasia de la epidermis junto con hipermelanosis e hiperqueratosis otoqueratótica y folicular (Marco *et al.*, 2007). A veces, los sarrios afectados presentan diferentes alteraciones hematológicas y de marcadores bioquímicos, siendo los cambios más destacables la anemia y linfopenia. Esto último lleva a un estado de inmunosupresión explicando el gran ratio de infecciones secundarias observadas en los rebecos pirenaicos afectados por la enfermedad (Fernández-Sirera *et al.*, 2011).

1.2.2.3 Diagnóstico

Están descritas varias técnicas de diagnóstico las cuales pueden ser clasificadas en dos tipos atendiendo el objetivo a determinar, por una parte la detección del virus o antígeno viral, y por otra la respuesta inmune de tipo humoral del huésped frente a la acción del agente. Para la

detección del virus se utiliza aislamiento vírico, ELISA para la detección del antígeno y RT-PCR convencional o a tiempo real (rt-PCR); también se ha utilizado inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF). Para la detección de anticuerpos se recomienda el uso de las técnicas de ELISA y SNT, siendo la IDGA menos sensible pero también aceptada (Nettleton & Willoughby, 2008).

Aplicando la técnica inmunohistoquímica se observa antígeno de pestivirus en macrófagos de linfonodos subcutáneos y bazo, en células epiteliales de la piel, riñones y rumen, así como en SNC y médula ósea. La mayor parte de los animales afectados mantienen el virus del biotipo no citopático y ausencia de anticuerpos, por lo que se consideran animales persistentemente infectados (Arnal *et al.*, 2004; Hurtado *et al.*, 2004; Marco *et al.*, 2009b). Solamente se ha identificado el biotipo citopático en un isard procedente del Principado de Andorra, observándose lesiones similares a las descritas en el ganado ovino cuando éste desarrolla el síndrome similar a la enfermedad de las mucosas (Arnal *et al.*, 2004). Posteriormente se han identificado más pestivirus pertenecientes al genotipo BVD-4 en ganado ovino en varios puntos de la Península Ibérica (Valdazo-González *et al.*, 2006; 2007) y en rebaños en rebaños del Pirineo francés (Alzieu *et al.*, 2014)

1.3 Sistema inmune en mamíferos

Para defenderse de los agentes patógenos, el organismo de los mamíferos posee un sistema inmune formado por un conjunto de mecanismos superpuestos que protegen al animal. El conjunto inmunitario está formado por tres sistemas bien definidos: las barreras físico-químicas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido. La primera línea de defensa la constituyen las barreras físico-químicas: la piel, las mucosas, enzimas y proteínas, tos, estornudos, vómito, diarrea, entre otras. El sistema inmune innato desencadena una serie de reacciones químicas y biológicas para atacar al invasor siendo su principal forma de defensa la inflamación, que involucra el aumento de temperatura y aumento en la irrigación sanguínea hacia el área afectada, llevando consigo las diferentes células que el organismo produce con este fin (macrófagos, citoquinas, quimosinas, etc.).

En el caso de los virus, y concretamente los pestivirus, que logran superar ambas barreras, entra en juego una última línea de defensa, el sistema inmune adquirido. Este sistema se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante; y respuesta inmune celular, donde los linfocitos T son las células fundamentales (Tizard, 2009).

1.3.1 Células y tejidos del sistema inmune adquirido

Los linfocitos B y T se producen en el tejido linfoide primario donde a su vez comienzan una maduración inicial. Para que dichas células puedan participar en el sistema inmune deben ser capacitadas en el tejido linfoide secundario. El tejido linfoide primario se corresponde con los órganos linfoides primarios que son el timo y la médula ósea. Los órganos linfoides secundarios, formados en su caso por tejido linfoide secundario, histológicamente se dividen en órganos no encapsulados asociados a mucosas (MALT) y en encapsulados, que son el bazo y los linfonodos.

Dada la naturaleza del pestivirus, en el presente estudio son de interés el bazo y los linfonodos, utilizados para estudiar el contenido de linfocitos B y T de los sarrios *Rupicapra p. pyrenaica*.

1.3.1.1 Células del sistema inmune adquirido

Los linfocitos B y T se originan a partir de un progenitor linfoide común en la médula ósea, pero los linfocitos B maduran en la médula ósea y los T lo hacen en el timo. Una vez estimulados, se diferencian hacia células efectoras y llevan a cabo su actividad inmune en los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos B se convertirán en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y los linfocitos T se encuentran divididos en varios tipos con unas funciones determinadas: los linfocitos T Helper en células secretoras de citocinas, los linfocitos T citotóxicos en células con capacidad citolítica y los linfocitos T regulador en células con capacidad supresora. También pueden generarse células de memoria, que permitirán al sistema inmune recordar contactos previos con un antígeno específico y responder de forma más rápida y contundente en sucesivas exposiciones al mismo antígeno (González *et al.* 2005).

La principal divergencia funcional entre ambos linfocitos es que las células T son las mediadoras en la inmunidad celular y los linfocitos B se encargan de la síntesis de anticuerpos, encargados de la inmunidad humoral. A diferencia de las células fagocíticas que son capaces de responder a estímulos variados (antígenos) y de defender al mamífero contra una variedad de microorganismos, los linfocitos son células leucocitarias altamente especializadas. Cada linfocito presenta en su membrana un tipo de receptor específico, el cual es capaz de interaccionar sólo con un antígeno en concreto. El receptor específico en los linfocitos B es el BCR ("B cell receptor"), que es una inmunoglobulina de membrana capaz de reconocer antígenos tanto solubles como en la superficie de estructuras (virus, bacterias, parásitos). En el caso de los linfocitos T según el receptor específico TCR ("T cell receptor") que presenten, se clasifica en los diferentes tipos linfoides (Day & Schultz, 2014).

En una muestra de sangre o corte histológico no es posible determinar individualmente cuales pueden ser células B o T ya que presentan un tamaño y morfología similares, ambas son células

redondeadas con poco citoplasma y escasos gránulos. Esta característica hace que sea necesario utilizar técnicas especiales para diferenciarlos. Cabe destacar que en el caso de la sección de tejido, la localización microanatómica puede ser útil para esta identificación (la mayoría de linfocitos foliculares son células B y la mayoría de los linfocitos paracorticales o son células T). Pero con el objetivo de identificar con mayor precisión estas células, los inmunólogos han desarrollado técnicas basadas en los receptores específicos que poseen ambas células. Estos receptores (BCR y TCR) están formados por una serie de moléculas únicas localizadas en su membrana exterior y que son identificadas usando antisuero o anticuerpos monoclonales o policlonales. En el caso de un estudio realizado sobre los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos en dos ciervos PI con BVDV, para caracterizar los linfocitos presentes en las secciones de tejido linfóide fueron utilizados los anticuerpos CD3 y CD79 α como marcadores de células T y células B, respectivamente (Duncan *et al.*, 2008).

1.3.1.2 Órganos linfoides secundarios

Los linfocitos B y T tras una maduración inicial en la médula ósea y el timo respectivamente, se localizan principalmente en el tejido linfóide asociado a mucosas, bazo y linfonodos, principalmente y también se encuentran en sangre circulante.

El bazo es un órgano que posee una cápsula de tejido conectivo, de la que salen hacia el interior numerosas trabéculas que delimitan compartimentos, en los que se distinguen dos tipos de tejidos, la pulpa roja que es una red de sinusoides con macrófagos encargados de destruir eritrocitos y plaquetas viejas, y la pulpa blanca cuya función es inmune (Day & Schultz, 2014). Los linfocitos B de la pulpa blanca se localizan en sus

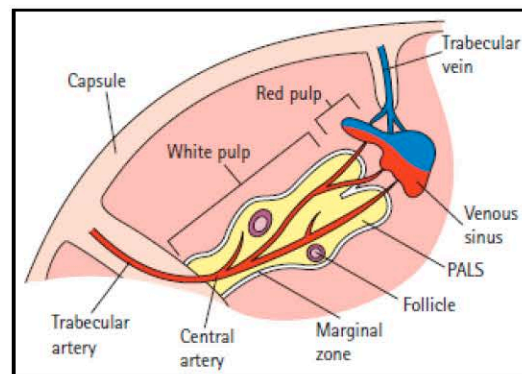


Figura 3. Estructura del bazo (Day & Schultz, 2014).

folículos y centros germinales. Mientras que los linfocitos T están en la vaina periarteriolar que rodea las arteriolas de la pulpa blanca del bazo (González *et al.* 2005).

La red de linfonodos se encuentra repartida en las áreas periféricas y viscerales del organismo. El fluido linfático, linfa, drena en el linfonodo por los vasos aferentes, entrando primero en el seno subcapsular, que contiene macrófagos encargados de captar antígenos y eliminarlos, también pueden funcionar como células presentadoras de antígenos (CPA). Posteriormente la

linfa se filtra por el tejido cortical y paracortical hasta el seno medular, abandonando el linfonodo a través de los vasos linfáticos eferentes (Day & Schultz, 2014). La médula contiene la mayoría de las células plasmáticas, que forman los cordones medulares, aunque también hay macrófagos, células T y células B. El área cortical, está compuesta por una población de linfocitos B en folículos primarios y secundarios rodeados de la paracorteza. Y los linfocitos T se localizan entre dichos folículos y la corteza profunda (área parafolicular) de los ganglios linfáticos, así como en su área paracortical (González *et al.* 2005).

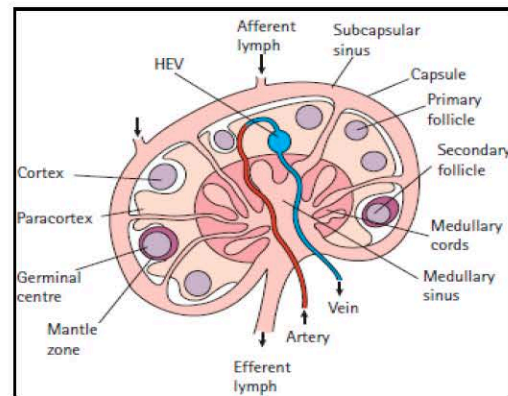


Figura 4. Estructura de un linfonodo (Day & Schultz, 2014).

1.3.2 Impacto de la infección por pestivirus en la inmunidad adaptativa

En la literatura científica no está definida la forma en la que afecta el pestivirus sobre la población linfocitaria en los sarrios. No obstante, sí se encuentra descrito en el caso de otros pestivirus que afectan a ovino o bovino (Duncan *et al.*, 2008; Hussin *et al.* 1994; Burrells *et al.*, 1989; Rondón, 2006).

2. Justificación y objetivos

Desde el año 2001 la población pirenaica de este ungulado salvaje se ha visto mermada debido a la aparición de una enfermedad causada por un pestivirus conocido como Virus de la Enfermedad de la Frontera, genotipo BDV-4. Los animales afectados presentan un cuadro con caquexia extrema, pérdida del pelaje y comportamiento anormal.

Los pestivirus además de producir alteraciones de tipo reproductivo, respiratorio o entérico tienen un especial tropismo por las células del sistema inmune, produciendo un efecto inmunosupresor (Nettleton & Willoughby, 2008; Drew *et al.*, 2015). Por este motivo, este Trabajo Fin de Grado pretende valorar la población linfocitaria en sarrios afectados por pestivirus mediante su estudio inmunohistoquímico. El objetivo concreto del estudio es conocer el aumento o disminución de la población celular de linfocitos B y T, en órganos linfoides secundarios, de sarrios enfermos con pestivirus en comparación con animales sanos no infectados con el virus.

3. Metodología

3.1 Muestras

Para valorar la población linfocitaria en sarrios sanos y sarrios afectados por pestivirus así como para visualizar la localización del antígeno viral, se emplearon muestras de órganos linfoides secundarios, bazo y linfonodos, pertenecientes a 5 animales sanos y 5 animales afectados por pestivirus. Los considerados animales enfermos fueron positivos a la detección de antígeno de pestivirus mediante un test de ELISA de captura, mientras que los animales denominados sanos fueron negativos al test.

3.2 Procesado histológico

Las muestras fueron introducidas en formol tamponado al 10%. En el procesado histológico, las muestras conservadas en formol eran talladas en pequeños trozos de 3-4 mm de espesor e introducidas en casetes de plástico en formol tamponado al 10%. Una vez fijadas, eran lavadas con agua corriente durante media hora antes de su inclusión en parafina. Posteriormente se deshidrataban utilizando un inclusor automático con alcoholes en concentración creciente. La inclusión en parafina se facilitó con una mezcla al 50% de xilol en un primer baño y en un segundo baño sólo con parafina (ambos baños a 56°C). Después los bloques se confeccionaron de manera semiautomática mediante la unidad formadora de bloques. Las piezas incluidas en parafina o bloques, fueron cortados a un grosor de 5 µm con un microtomo de rotación, al que se le acoplan cuchillas desechables. Los cortes obtenidos se depositaban en la superficie del agua de un baño maría a 37°C para favorecer su estiramiento. Las secciones de las muestras eran retiradas del baño con portaobjetos gelificados, específicos para la prueba de inmunohistoquímica y se guardaban en estufa a 37°C durante 12h para su secado.

3.3 Técnicas para la detección del antígeno

Una vez preparados los portaobjetos, la técnica empleada para la detección de antígeno celular en las muestras fue la inmunohistoquímica (IHQ). El objetivo de este procedimiento histopatológico era detectar, amplificar y hacer visible un antígeno determinado (generalmente una proteína). En una primera fase de la técnica se utiliza un anticuerpo primario, dirigido específicamente contra el antígeno buscado. En una segunda fase de la técnica se utiliza un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa que reacciona frente al anticuerpo primario. Finalmente, para visualizar el conjunto se emplea una solución de diaminobencidina que permite, mediante una simple reacción química local, colorear y hacer visible al microscopio la cadena de anticuerpos. La inmunohistoquímica es una técnica diagnóstica que permite visualizar la localización y distribución del antígeno dentro de una célula o tejido.

Para el presente estudio, la técnica IHQ utilizada ha sido de tipo indirecto, donde se han empleado tres tipos de anticuerpos, dos anticuerpos monoclonales, el denominado 15C5, específico frente la glicoproteína de gp48 (Erns) de BVDV, BDV y CSFV (Corapi *et al.*, 1990; Thür *et al.*, 1997) y otro que reconoce las poblaciones linfocitarias de linfocitos B (Manson *et al.*, 1995). Un tercer anticuerpo es policlonal que reconoce poblaciones de linfocitos T (Manson *et al.*, 1989).

3.3.1. Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de linfocitos T con anticuerpo policlonal anti CD3 en tejido formolado

En la técnica se utilizó el anticuerpo policlonal primario de conejo frente a CD3 de humana, específico frente a las células T (DAKO, Polyclonal Rabbit, Anti-Human CD3, Nº de catálogo A 0452, Edición 11.05.04) y un kit comercial con un anticuerpo secundario unido a un polímero marcado con peroxidasa-HRP (Sistema EnVision™Rabbit, DakoCytomation, Dinamarca A/S). Para la recuperación antigénica fue necesario pre-tratar los tejidos utilizando calor y como solución de desenmascaramiento el tampón citrato 10mM pH6 en olla presión durante 3 minutos. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena tisular se utilizó la solución bloqueante de la peroxidasa ChemMate™ de Dako (DakoCytomation, Dinamarca A/S), siguiendo las instrucciones del fabricante y como cromógeno se aplicó la diaminobencidina (DAB) del mismo kit comercial. Como control positivo se emplearon cortes en parafina de linfonodo subcutáneo de un sarrio sano. El control de la técnica fue un mismo corte de linfonodo al que no se añade anticuerpo primario (Anexo 1).

3.3.2. IHQ para la detección de linfocitos B con anticuerpo monoclonal anti CD79α en tejido formolado

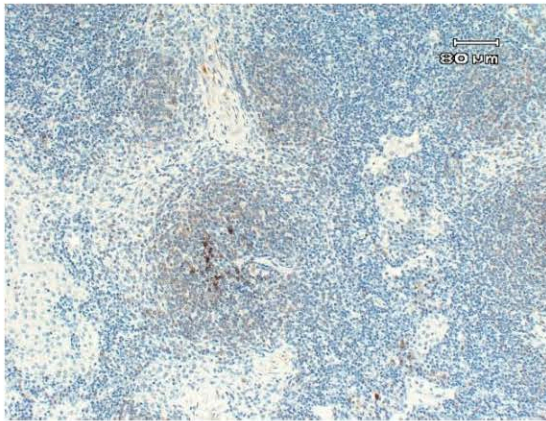
En la técnica se utilizó el anticuerpo monoclonal primario de ratón frente a CD79α de humana, específico frente a las células B (Thermo Scientific, Mouse Monoclonal Antibody, Anti-Human CD79α, Clone HM47/A9, Cat.MS-357-P) y un kit comercial con un anticuerpo secundario unido a un polímero marcado con peroxidasa-HRP (Sistema EnVision™Mouse, DakoCytomation, Dinamarca A/S). Para la recuperación antigénica, bloqueo de la peroxidasa endógena y revelado se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la visualización de células T. Como control positivo se emplearon cortes en parafina de linfonodo subcutáneo de un sarrio sano. El control de la técnica fue un mismo corte de linfonodo al que no se añade anticuerpo primario (Anexo 1).

3.3.3 IHQ para la detección de antígeno viral de pestivirus con el anticuerpo monoclonal 15C5 en tejido formolado

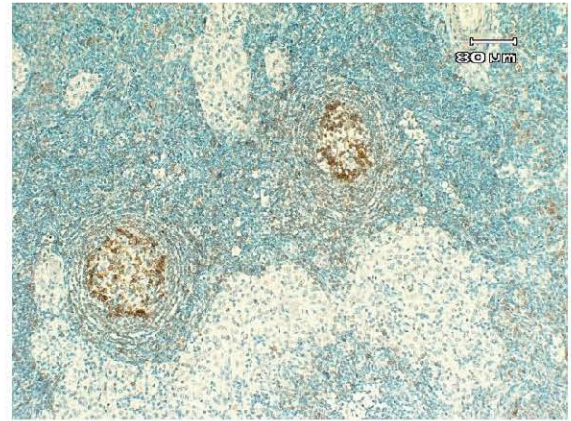
El anticuerpo monoclonal 15C5 específico frente al antígeno del pestivirus se utilizó en muestras formoladas con el mismo kit comercial que utiliza un anticuerpo secundario unido a un polímero marcado con peroxidasa-HRP (Sistema EnVision™ Mouse, DakoCytomation, Dinamarca A/S). En este caso, la recuperación antigénica se realizó con un pretratamiento enzimático con tripsina y quimiotripsina. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con H₂O₂ al 3% en metanol. El revelado se realizó con el cromógeno DAB. Como control positivo se emplearon cortes en parafina de linfonodo preescapular de un sarrio positivo a pestivirus, Chamois-1 mediante aislamiento vírico (Arnal *et al.*, 2004). El control de la técnica fue un mismo corte de linfonodo del isard positivo Chamois-1 al que no se añade anticuerpo primario.

3.4 Evaluación microscópica

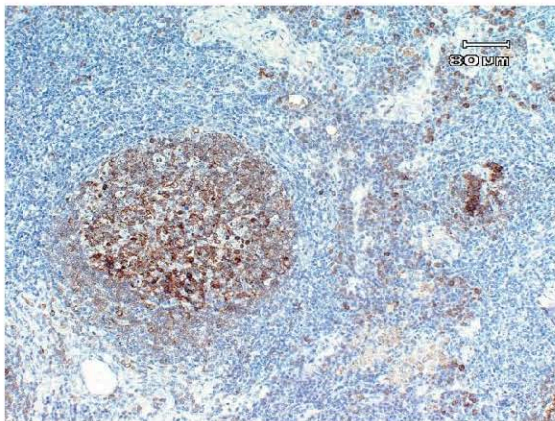
Todas las muestras de tejido linfoide de los 10 animales fueron evaluadas en el presente estudio. En total 30 secciones de bazo, 24 de linfonodos mesentéricos, 30 de linfonodos mediastínicos, 30 de linfonodos subcutáneos y 30 de linfonodos retrofaríngeos. Para llevar a cabo este examen se utilizó el microscopio con los siguientes objetivos: (x1) con el que se obtiene una visión general del órgano; (x4) para observar las divisiones estructurales del tejido; (x 10) para estudiar la distribución celular. Específicamente, en la valoración de la prueba de IHQ con el anticuerpo monoclonal 15C5, se observó la existencia de tinción en las muestras o no, es decir, si eran positivas a pestivirus o negativas. En el caso de las inmunohistoquímicas para la detección de CD79α y de CD3, fueron evaluadas según el nivel de intensidad de la tinción observada microscópicamente, clasificándolo con un sistema de puntuación (Fig.5). En este sistema se utilizó el símbolo positivo (+) para detallar cada nivel; donde (+) significa que apenas se aprecia tinción; (++) representa que hay tinción débil o escasa; (+++) expresa que el nivel de tinción es moderado con una distribución uniforme, la tinción es citoplasmática; y (++++) simboliza la tinción citoplasmática más intensa (Duncan *et al.*, 2008).



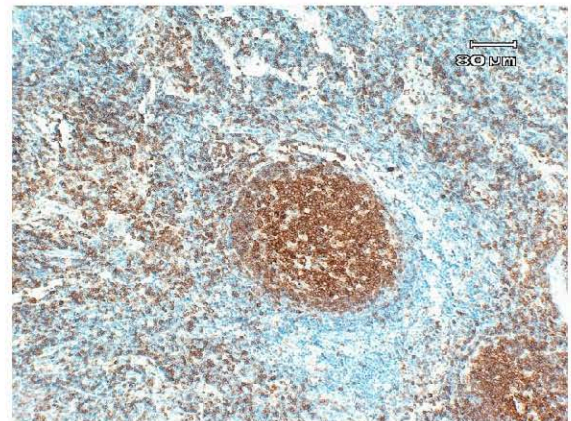
CD79α. Nivel 1 (+) de intensidad de la tinción.



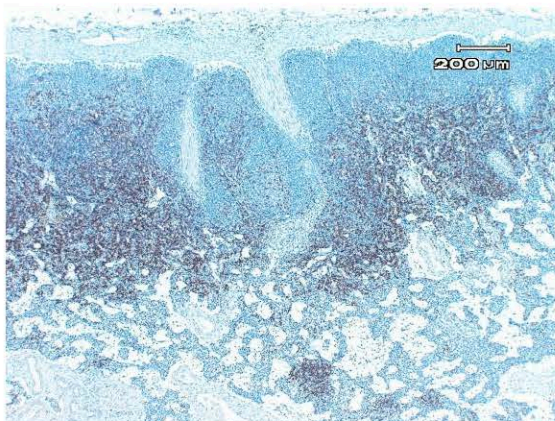
CD79α. Nivel 2 (++) de intensidad de la tinción.



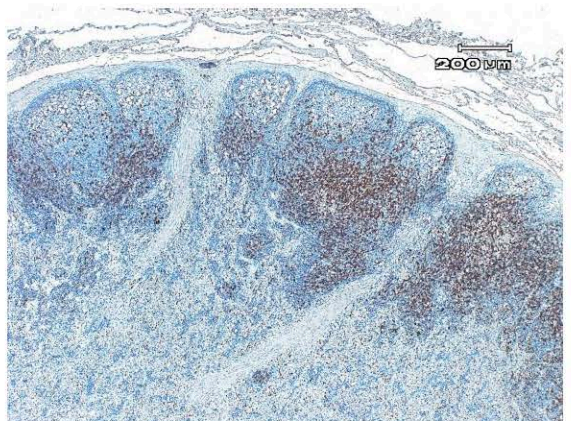
CD79α. Nivel 3 (+++) de intensidad de la tinción.



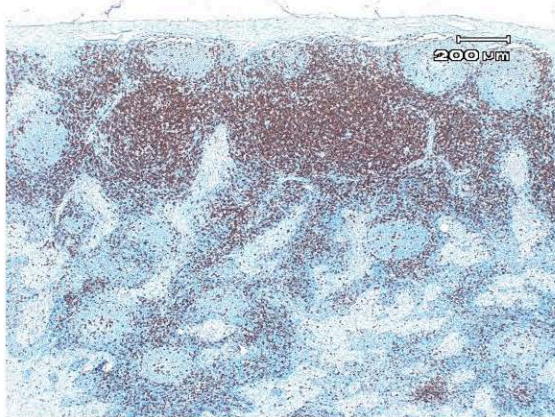
CD79α. Nivel 4 (+++) de intensidad de la tinción.



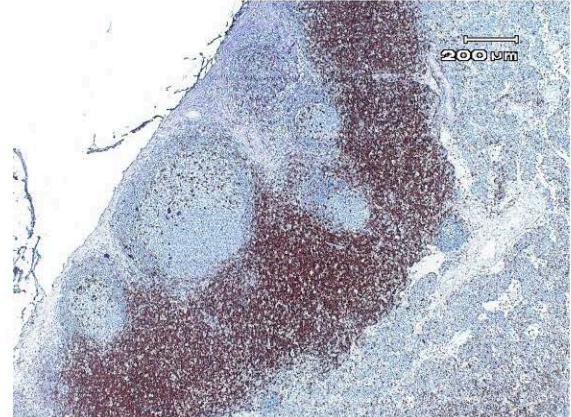
CD3. Nivel 1 (+) de intensidad de la tinción.



CD3. Nivel 2 (++) de intensidad de la tinción.



CD3. Nivel 3 (+++) de intensidad de la tinción.



CD3. Nivel 4 (+++) de intensidad de la tinción.

Figura 5. Niveles de intensidad de tinción

Todos los denominados animales enfermos mostraron reacción positiva a la tinción con el anticuerpo frente a pestivirus 15C5, mientras que los animales sanos fueron negativos. Las células principalmente marcadas fueron macrófagos localizados en los senos medulares.

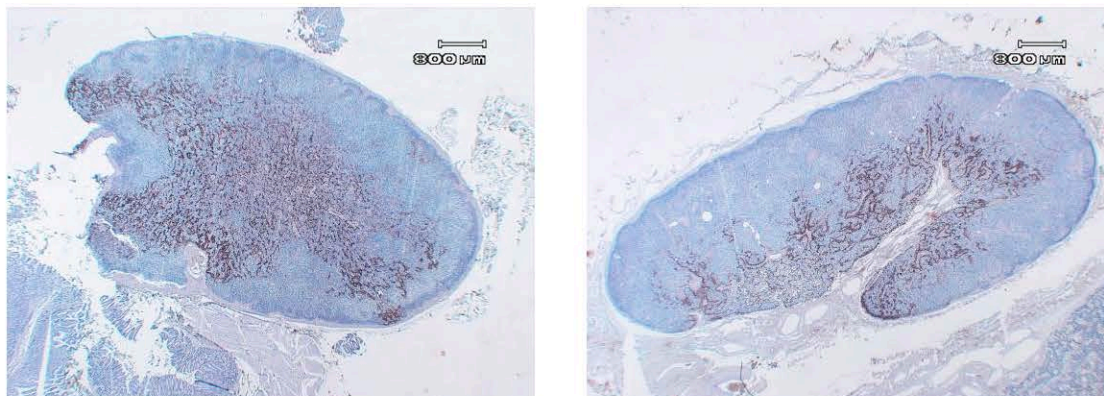


Figura 6. IHQ-MAb15C5. Inmunorreacción frente al antígeno de pestivirus en los senos medulares.

3.5 Análisis de datos

Los datos de cada animal se encontraban registrados en una base de datos creada con el programa FileMaker Pro. Los datos incluyen la fecha de entrada del animal, la procedencia, datos biométricos, edad, sexo, así como resultados de necropsias y resultados de analíticas realizadas para la detección de pestivirus.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un estudio estadístico mediante la prueba U de Mann-Whitney (U-test), con el objeto de comparar las distribuciones de los dos grupos de animales (animales sanos y enfermos). Antes de aplicar dicha prueba se comprobó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene, ya que el U-test lo requiere. Se estableció un 5% ($p < 0,05$) de nivel de significación estadística. Se calcula el “tamaño del efecto”, el cual permite comprender con mayor profundidad la diferencia entre dos grupos. El U-test nos proporciona el valor Z que es utilizado para calcular el tamaño del efecto con la fórmula $r = Z/\sqrt{N}$ donde N es el tamaño total de la muestra ($N = n_1 + n_2$, número de linfonodos o bazo valorados de animales sanos y enfermos). El signo no importa, así que se ofrece el valor absoluto de r, siendo 0,1 un tamaño de efecto pequeño, 0,3 medio y 0,5 grande (Doménech, 1996; Saravia, 2015)

Para llevar a cabo todas estas pruebas y cálculos fue utilizado un software libre llamado R (R Core Team, 2015).

4. Resultados y discusión

4.1 Resultados

Un total de 10 animales fueron estudiados, todos procedentes de Aragón. En primer lugar, se diferenciaron dos grupos, el de animales sanos y el de animales enfermos. El método utilizado para realizar esta división previa al estudio, fue la técnica ELISA para la detección de antígeno viral de pestivirus específico frente a la proteína NS3 (Bio-X BVDV antigen ELISA kit) a partir de muestras formadas por extractos de bazo o piel (Arnal, 2011). Cada grupo estaba constituido por cinco individuos, a su vez, de cada individuo se estudió el tejido linfóide de 5 órganos: bazo, linfonodo mesentérico, linfonodo mediastínico, linfonodo subcutáneo y linfonodo retrofaríngeo. Dentro de cada grupo principal (individuos sanos y enfermos) se realizaron tres pruebas de inmunohistoquímica sobre las diferentes muestras de órganos linfoides secundarios. En total 144 muestras fueron evaluadas en el presente trabajo, en concreto, 30 muestras de 10 bazos, 24 muestras de 8 linfonodos mesentéricos, 30 muestras de 10 linfonodos mediastínicos, 30 muestras de 10 linfonodos subcutáneos y 30 muestras de 10 linfonodos retrofaríngeos.

4.1.1 Inmunohistoquímica

4.1.1.1 Individuos sanos

En ninguna sección tisular de los animales clasificados anteriormente como sanos se encontró tinción positiva del antígeno del pestivirus. Así como en los controles negativos tampoco se halló inmunotinción positiva.

Tabla 1. Tinción de células T con CD3 y células B con CD79 α en animales sanos

REFERENCIA	TEJIDO	CD79 α	CD3
S-828/14	Mesentérico	+.+.+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+.+	+.+.+.+
	Retrofaríngeo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Subcutáneo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Bazo	+.+.+.+	+.+.+
S-836/14	Mesentérico	+.+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+	+.+.+
	Retrofaríngeo	+.+	+.+.+
	Subcutáneo	+.+	+.+
	Bazo	+.+.+.+	+.+.+.+
S-873/14	Mesentérico	+.+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+	+.+.+.+
	Retrofaríngeo	+.+	+.+.+.+
	Subcutáneo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Bazo	+.+.+.+	+.+.+.+

REFERENCIA	TEJIDO	CD79 α	CD3
S-877/14	Mesentérico	+.+.+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+.+	+.+.+
	Retrofaríngeo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Subcutáneo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Bazo	+.+.+.+	+.+.+
S-943/14	Mesentérico	+.+.+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+.+	+.+.+.+
	Retrofaríngeo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Subcutáneo	+.+.+.+	+.+.+.+
	Bazo	+.+.+	+.+.+

La cantidad de linfocitos B y T detectados en los tejidos inspeccionados se observa normal.

4.1.1.2 Individuos enfermos

En todas las muestras, tanto de bazo como de linfonodos, de los animales clasificados previamente como enfermos, se encontró tinción positiva del antígeno del pestivirus. Concretamente en los linfonodos, el antígeno viral se encontraba en macrófagos localizados en los senos, con mayor representación en los medulares. Sin embargo, la presencia de macrófagos infectados en el bazo no era tan llamativa como en los linfonodos, siendo escasas las células positivas al antígeno viral.

Tabla 2. Tinción de células T con CD3 y células B con CD79 α en animales enfermos

REFERENCIA	TEJIDO	CD79 α	CD3
S-102/12	Mesentérico	++.+	++.+
	Mediastínico	++.+	++.+
	Retrofaríngeo	++.+	++.+
	Subcutáneo	++.+	++.+
	Bazo	+	++.+
S-233/14	Mesentérico	++.+	++.+
	Mediastínico	++.+	++.+
	Retrofaríngeo	++.+	++.+
	Subcutáneo	++.+	++.+
	Bazo	++.+	++.+
S-307/13	Mesentérico	No evaluado	No evaluado
	Mediastínico	++.+	++.+
	Retrofaríngeo	++.+	++.+
	Subcutáneo	+	++.+
	Bazo	++.+	++.+
S-421/12	Mesentérico	+	++.+
	Mediastínico	++.+	++.+
	Retrofaríngeo	++.+	++.+
	Subcutáneo	++.+	++.+
	Bazo	+	+

REFERENCIA	TEJIDO	CD79 α	CD3
S-838/12	Mesentérico	+.+	+.+.+.+
	Mediastínico	+.+.+.+	+.+
	Arco	+.+	+.+.+
	Subcutáneo	+.+.+	+.+.+
	Bazo	+.+	+.+

La depleción de linfocitos B es manifiesta, observándose tanto en los linfonodos como en el bazo, con respecto a los animales sanos.

4.1.2 Estudio estadístico

Con el fin de valorar la posible relación entre la expresión de linfocitos T y B frente a la variable estar enfermo o sano aplicamos la prueba U de Mann-Whitney. Para ello comparamos los resultados obtenidos en la evaluación microscópica de la inmunohistoquímica para la detección de CD79 α y de CD3 (linfocitos B y T), en bazo y en linfonodos, entre animales sanos y enfermos.

Si planteamos la hipótesis nula H_0 = la expresión de linfocitos B/T con inmunohistoquímica es igual en sanos y enfermos y la alternativa H_1 = la expresión es diferente (menor en enfermos que en sanos) y aplicamos la prueba de U de Mann-Whitney, los resultados obtenidos se observan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resultados estadísticos CD3 y CD79 α .

	CD3		CD79 α	
	Bazo	Linfonodos	Bazo	Linfonodos
U-Mann-Whitney	2,7386	4,3413	2,6117	3,682
p	0,007937	6,48E-06	0,01587	8,65E-05
r	0,8660254	0,6951635	0,8258966	0,5895907
Efecto	Grande	Grande	Grande	Grande

4.2 Discusión

Los virus que afectan al sistema inmune pueden clasificarse en los que atacan a los tejidos linfoides primarios y los que atacan a los tejidos linfoides secundarios. Ambos tipos de virus pueden producir inmunodeficiencias graves. La pérdida de linfocitos es común en las infecciones víricas, ya que la supervivencia y persistencia del virus puede ocasionar inmunodepresión o en el peor de los casos inmunosupresión. Como consecuencia de esta alteración en el tejido linfoide se suele observar linfopenia, como es en el caso en la peste porcina africana, la cual cursa con una gran destrucción de linfocitos T como B en los linfonodos, el bazo, el timo y las Placas de Peyer. Otros casos similares son los causados por el pestivirus de la diarrea vírica bovina y por el

pestivirus de la enfermedad de la frontera (Border Disease Virus), que infectan preferentemente linfocitos T CD8⁺ interfiriendo en su función citotóxica e inmunorreguladora (Tizard, 2009).

En este trabajo se confirma la presencia de antígeno viral de pestivirus en el tejido linfoide de animales enfermos y su ausencia en los animales sanos mediante la prueba de IHQ-MAb15C5. Las células positivas al virus, principalmente macrófagos, se encontraban en la pulpa roja del bazo y en los senos de los linfonodos, siendo más llamativa su presencia en las muestras de linfonodo.

Un hecho relevante fue que los linfocitos T se detectaron en menor proporción con respecto a los animales sanos, aunque esta disminución no era tan acusada como la observada en la población de linfocitos B. Este hallazgo también fue observado en un estudio similar realizado en ciervos de cola blanca persistentemente infectados por BVDV (Duncan *et al.*, 2008).

Con respecto al análisis estadístico, todos los casos evaluados el p-valor es menor a 0,05 y el efecto es grande, por lo que se rechaza la hipótesis nula a favor de la alternativa, comprobándose que la expresión de linfocitos B/T valorada con la técnica de inmunohistoquímica no es igual en animales sanos que en enfermos. Estos resultados permiten afirmar que la expresión de linfocitos B y T, tanto en bazo como en linfonodos, es menor en animales enfermos que en sanos.

El efecto inmunodepresor del virus ha sido deducido en este estudio debido a que se observa la disminución de dos de los componentes del sistema inmunitario adquirido (linfocitos B y T) por lo que se puede considerar como uno de los efectos que se produce en la enfermedad objeto de estudio, la pestivirosis del sarrío *Rupicapra p. pyrenaica*.

5. Conclusiones

1-.El estudio inmunohistoquímico para la detección de linfocitos T (CD3) y linfocitos B (CD79 α) ha evidenciado que existe una disminución cuantitativa de ambos tipos celulares asociada a la infección por pestivirus.

2-. La mayor presencia de antígeno de pestivirus se detecta en macrófagos localizados en los senos medulares de los linfonodos con el uso del anticuerpo monoclonal 15C5.

Conclusions

1-.The immunohistochemistry study for lymphocytes B and T detection has shown that it exists a quantitative decrease of both cell types associated to pestivirus infection.

2-.The highest presence of pestivirus antigen is detected in macrophages located in medullary sinuses of lymph nodes with the use of monoclonal antibody 15C5.

6. Valoración personal

Esta última asignatura de la titulación ha supuesto un reto y a la vez, una gran fuente de aprendizaje y evolución como estudiante de veterinaria.

El tema de la investigación junto a fauna silvestre me interesaba. Elegí la propuesta que me expusieron el Dr. Fernández de Luco y la Dra. Arnal Barrera porque el tema resultaba atractivo a la vez que complejo, ya que no existían estudios previos a cerca de cómo afectaba el pestivirus a la población linfocitaria del sarrio *Rupicapra p.pyrenaica*.

Gracias a este trabajo he podido conocer cuál es el sistema de funcionamiento del SEDIFAS (Servicio de Diagnóstico de Fauna Silvestre) de la Universidad de Veterinaria de Zaragoza, el cual lleva mucho esfuerzo y años de experiencia a sus espaldas. Mis tutores además de enseñarme una parte del trabajo de la sala de necropsias, me han instruido en el posterior procesamiento de las muestras, la realización de las diferentes pruebas inmunohistoquímicas y tinciones sobre ellas, junto con su posterior análisis microscópico.

El hecho de haber podido realizar tantas tareas me ha enriquecido a nivel formativo. Debo mostrar mi mayor agradecimiento a los profesores Fernández de Luco y Arnal por su labor de dirección, su dedicación y sus consejos, que han sido mi guía para elaborar este trabajo.

7. Bibliografía

- Alzieu, J.P., Nussbaum, S., Malavieille, R., Desclaux, X., Goyeau, K. Bonadéi, M., Rameil, M., Huguet, A., Duran, S., Corbiere, F., Meyer, G., Villarubias, S. & De Macedo, F. et coll.** (2014) Données épidémiologiques et diagnostiques obtenues dans le département de l'Ariège sur la pestivirus de l'isard et la border disease des ovins. Journée Scientifique Pestivirus de l'isard, Toulouse, 24 Septembre 2014.
- Arnal, M.** (2011) Estudio sanitario del sarrio *Rupicapra pyrenaica pyrenaica* en el Pirineo aragonés. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Departamento de Patología Animal. 221 pp.
- Arnal, M., Fernández-de-Luco, D., Riba, L., Maley, M., Gilray, J., Willoughby, K., Vilcèk, S. & Nettleton, P.F.** (2004) A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). Journal of General Virology, 85: 3653–3657.
- Arnal, M., Herrero, J., de la Fe, C., Revilla, M., Prada, C., Martínez-Durán, D., Gómez-Martín, A., Fernández-Arberas, O., Amores, J., Contreras, A., García-Serrano, A. & Fernández de Luco, D.** (2013a) Dynamics of an infectious keratoconjunctivitis outbreak by *Mycoplasma conjunctivae* on Pyrenean chamois *Rupicapra p. pyrenaica*. Plos One, 8 (4): 1-12.
- Arnal, M., Herrero, J., Martínez, D., Prada, C., Fernández-Arberas, O., Arteaga, Z., García-Serrano, A. & Fernández de Luco, D.** (2013b) Pyrenean Western expansion of chamois pestivirus epidemic: Preliminary data. Abstracts II International Rupicapra Symposium. Bellver de Cerdanya, Spain. 24- 25 October 2013, pp.65-66.
- Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H. & Thiel, H.J.** (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification. Virology, 311: 96–104.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. & Dubovi, E.J.** (1990) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. American Journal of Veterinary Research, 51: 1388-1394.
- Day M. J. & Schultz, R.D.** (2014) Veterinary immunology: principles and practice. Second edition. CRC Press by Taylor & Francis Group, LLC. 326 pp.
- De Mia, G.M., Greiser-Wilke, I., Feliziani, F., Giammarioli, M. & De Giuseppe, A.** (2005) Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. Journal of Veterinary Medicine. B: Infectious Disease and Veterinary Public Health, 52: 206–210.
- Doménech, J.M.** (1996) Métodos estadísticos en Ciencias de la Salud. Unidad 9. Editorial Signo, Barcelona. 83pp.
- Domínguez, A., Rodríguez, F., Albornoz, J. & Pérez, T.** (2009) El rebeco cantábrico, filogeografía e historia evolutiva. Pp. 70-102. En: Pérez-Barbería, F. J., Palacios, B. (Eds.). El Rebeco Cantábrico (*Rupicapra pyrenaica parva*). Conservación y Gestión de sus poblaciones. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Naturaleza y Parques Nacionales, Madrid. 501 pp.

-
- Drew, T., Kirkland, P. & Lung, O.** (2008) Bovine viral diarrhoea In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ed: OIE, World Organisation for Animal Health. Cap. 2.4.8. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf
- Dubois, E., Russo, P., Prigent, M. & Thiery, R.** (2008) Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary Microbiology*, 130: 69-79.
- Duncan, C., Ridpath, J., Palmer, M.V., Driskell, E. & Spraker, T.** (2008) Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20:289-296.
- Falconi, C., Oleaga, A., López-Olvera, J. R., Casais, R., Prieto, M. & Gortázar, C.** (2010) Prevalence of antibodies against selected agents shared between Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) and domestic goats. *European Journal of Wildlife Research*, 56 (3): 319-325.
- Fernández-Sirera, L., Mentaberre, G., López-Olvera, J.R., Cuenca, R., Lavín, S. & Marco, I.** (2011) Haematology and serum chemistry of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) naturally infected with a border disease virus. *Research in Veterinary Science*, 90: 463-467.
- Frölich, K., Jung, S., Ludwig, A., Lieckfeldt, D., Gilbert, P., Gauthier, D. & Hars, J.** (2005) Detection of a Newly Described Pestivirus of Pyrenenan Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *Journal of Wildlife Diseases*, 41: 606-610.
- Gaffuri, A., Giacometti, M., Tranquillo, V.M., Magnino, S., Cordioli, P. & Lanfranchi, P.** (2006) Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the Central Italian Alps. *Journal of Wildlife Diseases*, 42: 685-690.
- González, A., Fernández, E. & Lorenzo, S.** (2005) LINFOCITOS T Y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. Serie 9, Nº. 33, 2005* (Ejemplar dedicado a: Enfermedades del sistema inmune (VI). Inmunofisiología e implicaciones patológicas del sistema inmune (I)), pp. 2162-2173.
- Herrero, J., Escudero, E., Fernández de Luco, D. & García-González, R.** (Eds.) (2004) El Sarrio Pirenaico *Rupicapra p. pyrenaica*: Biología, Patología y Gestión. *Actas de las Primeras Jornadas Pirenaicas sobre el Sarrio. Marzo 2003, Jaca (Huesca). Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Zaragoza. Serie investigación, 46pp.*
- Herrero, J., Garin, I., García-González, R., García-Serrano, A. & Aldezabal, A.** (2002) El sarrio en Aragón. Cuadernos de caza y pesca de Aragón. Editorial Prames. Gobierno de Aragón, Zaragoza.
- Herrero J., Garin I., Prada C. & García-Serrano A.** (2010) Inter-agency fosters the recovery of the Pyrenean chamois *Rupicapra pyrenaica pyrenaica* at its western limit. *Oryx* , 44 (4): 529-532.
- Herrero, J., Lovari, S. & Berducou, C.** (2008) *Rupicapra pyrenaica*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <http://www.iucnredlist.org>

-
- Hurtado, A., Aduriz, G., Gomez, N., Oporto, B., Juste, R.A., Lavín, S., López-Olvera, J.R. & Marco, I.** (2004) Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 796–800.
- Hussin, A.A. & Woldehiwet, Z.** (1994) Effects of experimental infection with Border disease virus on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of lambs. *Research in Veterinary Science*, 56: 201-207.
- Marco, I., Cabezón, O., Rosell, R., Fernández-Sirera, L., Allepuz, A. & Lavín, S.** (2011) Retrospective study of pestivirus infection in Pyrenean chamois (*Rupicapra Pyrenaica*) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain). *Veterinary Microbiology*, 149: 17-22.
- Marco, I., López-Olvera, J.R., Rosell, R., Vidal, E., Hurtado, A., Juste, R., Pumarola, M. & Lavín, S.** (2007) Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Veterinary Microbiology*, 120: 33–41.
- Marco, I., Rosell, R., Cabezón, O., Beneria, M., Mentaberre, G., Casas, E., Hurtado, A., López-Olvera, J.R. & Lavín, S.** (2009a) Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). *Research in Veterinary Science*, 87: 149-153.
- Marco, I., Rosell, R., Cabezón, O., Mentaberre, G., Casas, E., Velarde, R., López-Olvera, J.R., Hurtado, A. & Lavín, S.** (2008) Epidemiological study of border disease virus infection in southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Veterinary Microbiology*, 127: 29–38.
- Marco, I., Rosell, R., Cabezón, O., Mentaberre, G., Casas, E., Velarde & R., Lavín, S.** (2009b) Border disease virus among chamois, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 448-451.
- Mason, D.Y., Cordell, J., Brown, M., Pallesen, G., Ralfkiaer, E., Rothbard, J., Crumpton, M., & Gatter, K.C.** (1989) Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *Laboratory techniques. Journal of Clinical Pathology* 1989, 42: 1194-1200.
- Mason, D.Y., Cordell, J.L., Brown, M.H., Bors,t J., Jones, M., Pulford, K., Jaffe, E.; Ralfkiaer. E., Dallenbach, F. & Steinert, H.** (1995) CD79α: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*, 86: 1453-1459.
- Nettleton, P.F. & Entrican, G.** (1995) Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal*, 151: 615-642.
- Nettleton, P.F., Gilray, J.A., Russo, P. & Dlisi, E.** (1998) Border disease of sheep and goats. *Veterinary Research*, 29: 327–340.
- Nettleton, P.F. & Willoughby, K.** (2008) Border Disease. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. Ed: OIE, World Organisation for Animal Health. Cap 2.7.1. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.01_Enfermedad_frontera.pdf

- Oguzoglu, T.C., Tan, M.T., Toplu, N., Demir, A.B., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., Ozkul, A., Alkan, F., Burgu, I., Haas, L. & Greiser-Wilke, I.** (2009) Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Veterinary Microbiology*, 135: 374–379.
- OIE, World Organization for Animal Health.** (2008) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris, France. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/accessonline/>
- Olde Riekerink, R.G., Dominici, A., Barkema, H.W. & de Smit, A.J.** (2005) Seroprevalence of pestivirus in four species of Alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Veterinary Microbiology*, 108: 297-303.
- Pérez-Barbería, F.J. & García-González, R.** (2004) Rebeco-Rupicapra pyrenaica. En: enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Eds.: Carrascal, L.M. & Salvador, A., Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Pérez-Barbería, F.J., García-González, R. & Palacios, B.** (2010) Rebeco - *Rupicapra pyrenaica*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Cassinello, J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Pérez, J.M., Granados, J.E., Soriguer, R.C., Fandos, P., Márquez, F.J. & Crampe, J.P.** (2002) Distribution, status and conservation problems of the Spanish Ibex, *Capra Pyrenaica*, Mammalia: Artiodactyla. *Mammal Review*, 32: 26-39.
- R Core Team** (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rondón, I.** (2006) Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e Inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba* 11 (1): 694-704.
- Simmonds, P., Becher, P., Collet, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Meyers, G., Monath, T., Pletnev, A., Rice, C.M., Stiansny, K., Thiel, H.J., Weiner, A. & Bukhet, J.** (2011) Flaviviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. editors. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego. pp. 1003–1020.
- Thabti, F., Letellier, C., Hammami, S., Pépin, M., Ribière, M., Mesplède, A., Kerkhofs, P. & Russo, P.** (2005) Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Archives of Virology*, 150: 215–229.
- Thiel, H.J., Collett, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R. & Rice, C.M.** (2005) Family flaviviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, New York, pp. 981–998.
- Thür, B.; Hilbe, M.; Strasser, M. & Ehrensperger, F.** (1997) Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *American Journal of Veterinary Research*, 58: 1371-1375.
- Tizard, I.** (2009) *Veterinary Immunology: An Introduction*. 8th Ed. Saunders Elsevier. Missouri, United States. 529 pp.

-
- Valdazo-González, B., Álvarez-Martínez, M. & Greiser-Wilke, I.** (2006) Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Veterinary Microbiology*, 117: 141–153.
- Valdazo-González, B., Álvarez-Martínez, M. & Sandvik, T.** (2007) Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *The Veterinary Journal*, 174: 316-324.
- Vilcæk, S. & Nettleton, P.F.** (2006) Pestiviruses in wild animals. *Veterinary Microbiology*, 116: 1-12.