

PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA

Rebeca Porras Mansilla

Tutoras: Ana Doménech Gómez y Esperanza Gómez-Lucía Duato

Dpto. de Sanidad Animal. Fac. de Veterinaria. UCM

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, inflamatorias y hematopoyéticas. Son mediadores esenciales en la homeostasis del sistema inmune y sus funciones pueden resumirse en:

- Regulación de la activación, diferenciación y proliferación de células del sistema inmune.
- Estimulación del crecimiento de precursores hematopoyéticos.
- Comunicación entre células del sistema inmune.
- Funciones efectoras directas.

Estas funciones las realizan al unirse a receptores específicos de la membrana de las células diana iniciando una cascada de transducción de señal intracelular que altera el patrón de expresión génica.

En el marco de la inmunidad natural los macrófagos son las principales células productoras de citoquinas, y en el de la inmunidad adquirida o específica, los linfocitos T CD4⁺ o colaboradores (LTh) (Tizard, 2004).

Las infecciones por retrovirus felinos causan profundos desequilibrios en el sistema inmune del animal, ya que son virus que infectan linfocitos y otras células inmunes alterando su funcionalidad y la síntesis de las citoquinas secretadas por dichas células, por lo que estos cambios podrían contribuir a su patogenia. Tanto el virus de la leucemia felina (FeLV) como el de la inmunodeficiencia felina (FIV) son responsables de la aparición de neoplasias y síndromes mielosupresores cuya manifestación principal es la anemia y una serie de alteraciones debidas al síndrome de inmunodeficiencia que favorece la aparición de infecciones secundarias. Ambas, la anemia y la inmunodeficiencia, son las principales causas de mortalidad en los gatos infectados, pero existen otros trastornos asociados a las infecciones

por estos retrovirus, como alteraciones neurológicas, trastornos de la reproducción, alteraciones oculares, gingivitis, estomatitis, enteritis, poliartritis, etc. (Sellon y Hartmann, 2006).

FIV infecta macrófagos y linfocitos, especialmente los linfocitos T CD4+, originando su apoptosis e inversión del cociente CD4+/CD8+. A diferencia de esto, FeLV no tiene un tropismo tan selectivo y el mecanismo exacto por el que daña al sistema inmune no se conoce bien.

Características de la infección por FeLV

La infección por FeLV, que es la que se va a desarrollar más detenidamente en este trabajo, cursa con (Hartmann, 2006):

- Anemia, por destrucción de los precursores de eritrocitos.
- Inmunodeficiencia, por destrucción de células linfoides y mieloides, originándose una panleucopenia y atrofia del timo. Se altera también la capacidad quimiotáctica de los neutrófilos. Se ha descrito un subtipo, FeLV-T, que origina un cuadro de inmunodeficiencia similar al de FIV.
- Neoplasias: el mecanismo por el que se producen no se conoce totalmente aunque probablemente se deba a la inserción del genoma vírico en el ADN cerca de o interrumpiendo un oncogen celular, originando su activación y sobre expresión y por tanto, la proliferación incontrolada de la célula.

La patogenia de la leucemia felina es muy compleja y, a diferencia de lo que ocurre en la inmunodeficiencia felina, la evolución de la misma está muy influenciada por la capacidad de respuesta inmune del gato, pudiéndose incluso eliminar FeLV en etapas muy iniciales de la infección. Los mecanismos con los que cuenta el sistema inmune del gato para enfrentarse a la infección por FeLV son los siguientes (Doménech *et al.*, 2006):

1. De tipo humoral

- Anticuerpos neutralizantes frente a la proteína de superficie gp70 (impiden la unión del virus al receptor celular por lo que no se produce la entrada al interior de la célula).
- Anticuerpos frente a otros antígenos, como la proteína de la cápside p27.

- Anticuerpos anti-FOCMA (destruyen las células neoplásicas mediante la lisis dependiente del complemento).

2. De tipo celular

- Se ha visto que aparecen linfocitos T CD8+ citotóxicos una o dos semanas después de que se produzca la infección, y previo a la aparición de anticuerpos neutralizantes.
- En los gatos infectados por FeLV la presencia de anticuerpos y, sobretodo, el desarrollo eficaz de la respuesta inmune celular son capaces de eliminar totalmente el virus en muchos animales muy al comienzo de la exposición al mismo, a diferencia de lo que ocurre en los infectados por FIV, que se mantienen así de por vida.

3. Citoquinas

- Es posible que el IFN- α y el IFN- γ ejerzan una acción directamente inmunomoduladora al aumentar la respuesta inmune e impedir la expansión del virus desde las células ya infectadas. El IFN- α también puede tener efectos directos sobre la expresión vírica (Collado *et al.*, 2007).

Relación entre las citoquinas y los retrovirus felinos

Como ya se ha señalado, la infección por los retrovirus suele alterar al sistema inmune y afectar, entre otros, a la expresión de citoquinas. Tanto FIV como FeLV inducen cambios en la síntesis de citoquinas, originando alteraciones de las funciones de las células inmunes (proliferación, desarrollo de apoptosis, etc.) que contribuyen a su patogenia. Estas alteraciones se conocen mejor en FIV, por ser el modelo de estudio del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o virus del SIDA.

La infección por FIV de los linfocitos T CD4+ (principales linfocitos secretores de citoquinas) causa una modificación en la producción de estos mediadores, contribuyendo al profundo desequilibrio de la red de citoquinas en las fases avanzadas de la infección. En las fases iniciales y/o asintomáticas de la infección por FIV, se produce un aumento del IFN- γ y también aumentan el TNF- α y la IL-10 en los linfocitos T del timo y los nódulos linfáticos en comparación con gatos no infectados (Figura 1). Según avanza la infección se produce el descenso de las IL-2, IL-12 y del IFN- γ , aumentando los niveles de la IL-10. Los niveles de IL-4 e IL-6 se mantienen similares a los de los gatos no infectados (Levy *et al.*, 2004). Estos cambios producen un aumento del cociente IL-10/IL-12 de gran importancia en la patogenia

de FIV al originarse un cambio de la respuesta inmune de tipo Th1 a Th2, predominando por tanto la respuesta inmune de tipo humoral que no es la adecuada para patógenos intracelulares (Figura 2). Se produce por tanto una menor respuesta frente a estos patógenos (como por ejemplo frente a *Toxoplasma gondii*) aumentando las infecciones secundarias.

En el caso de la infección por FeLV se ha descrito un incremento del TNF- α , y una disminución de la IL-2 e IL-4, aunque existe controversia en cuanto a las variaciones de IFN- γ . A diferencia de lo comentado en FIV, en este caso no está claro el papel que estas alteraciones pueden tener en la patogenia (Hartmann, 2006).

Khan *et al.* (1993) obtuvieron datos que confirman el aumento de TNF- α y lo relacionaban con la patogenia. Existen tres subgrupos de FeLV (A, B y C) que presentan diferencias en la proteína de superficie gp70. FeLV-A y FeLV-C presentan tropismo por los macrófagos, que son células del sistema inmune que tienen un papel importante en la hematopoyesis al sintetizar citoquinas estimuladoras o inhibitoras de este proceso, pero se ha visto que es FeLV-C el que se expresa en mayor cantidad en estas células, produciendo niveles mayores de TNF- α (Figura 3). Los mayores niveles de expresión de FeLV-C en los macrófagos se correlacionan con los altos niveles de TNF- α , que podrían jugar un papel en la supresión de la hematopoyesis induciendo la aplasia eritrocitaria observada en la infección por este virus. Respecto a la disminución de la IL-2, Tompkins *et al.* (1989) compararon su producción tras estimular con mitógenos linfocitos de sangre periférica aislados de gatos sanos, infectados asintomáticos e infectados en fase clínica. De esta forma, determinaban la funcionalidad de LTh en todos los grupos de gatos incluidos. Con los datos obtenidos (Tabla 1) se llegó a la conclusión de que la inmunosupresión de los linfocitos T colaboradores en los gatos infectados es previa al desarrollo de la fase clínica, lo que puede agravar la patogenia de la enfermedad, y que con el progreso de la fase clínica de la enfermedad los linfocitos T colaboradores tienen menor capacidad de responder a la estimulación con mitógenos y por lo tanto hay menor producción de IL-2.

El escaso conocimiento de las variaciones en las citoquinas en la infección por FeLV puede deberse en parte a:

a) los pocos datos disponibles hasta la fecha por la falta de estudios exhaustivos sobre el tema, a diferencia de lo ocurrido en FIV,

b) que los escasos estudios se han realizado tanto en células en cultivo como en linfocitos aislados de gatos sanos y enfermos, por lo que es difícil comparar y extrapolar los resultados, c) porque hasta donde tenemos constancia, no se han analizado las variaciones en los niveles de citoquinas según avanza la infección relacionándolo, por tanto, con la patogenia de la misma, en comparación con gatos no infectados.

Planteamiento del trabajo

Nuestro objetivo principal es estudiar los niveles de citoquinas en gatos infectados con FeLV para entender mejor la patogenia de este virus y plantear mejores estrategias de tratamiento y prevención, para lo cual emplearemos una técnica molecular (RT-PCR) en sangre entera de gatos.

El empleo de sangre entera en vez de otras muestras posibles, como células inmunes aisladas de sangre, posee algunas ventajas: los resultados obtenidos reflejan con más precisión lo ocurrido *in vivo*, se ahorra tiempo y se reducen los costes derivados de los procesos de aislamiento celular y posterior purificado, la manipulación de la muestra en este caso es mínima y se evita la posible influencia que los procedimientos de separación celular podrían tener en los niveles de ARNm de las citoquinas. La sangre, una vez extraída, debe mantenerse en anticoagulante de tipo EDTA y procesarse en las 8 horas posteriores a su obtención, para asegurar que las poblaciones celulares presentes en ella se mantengan viables.

Las citoquinas incluidas en el estudio (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α) son secretadas por macrófagos y/o por linfocitos T colaboradores, e intervienen tanto en la respuesta inmune celular como humoral. Los *primers* para estas citoquinas no han sido diseñados por nosotros, se encuentran publicados y son específicos de gato (Gelain *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo este objetivo, actualmente estamos poniendo a punto la técnica para la detección de citoquinas, usando dos líneas celulares felinas, una de ellas de linfocitos infectados por FeLV (FL74) y la otra de fibroblastos sin infectar, que nos sirve de control (CRFK) (Figura 4). A partir de estas células se extrae el ADN siguiendo un protocolo convencional (que emplea fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol) y se realiza una PCR convencional siguiendo el protocolo descrito por G_[EG1]elain *et al.*, 2006. Mediante esta técnica comprobamos que los *primers* elegidos permiten detectar los genes que codifican para

las citoquinas en estudio. Por otro lado, se extrae el ARNm de las células (mediante el kit comercial QIA amp[®] RNA Blood Mini Kit, QIAGEN) y se calcula su concentración y pureza midiendo las densidades ópticas con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. A partir del ARNm extraído, se obtiene su ADN complementario mediante Superscript[™] III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) y realizamos con éste una RT-PCR (Gelain *et al.*, 2006) para determinar en este caso la expresión de cada uno de los genes de las citoquinas.

Hemos elegido el GAPDH como gen constitutivo que se expresa siempre independientemente de las circunstancias como control de las reacciones de PCR y para poder cuantificar el nivel de expresión de las citoquinas. A pesar de las dificultades de la técnica descritas por otros investigadores que han trabajado en ello anteriormente, nuestros resultados preliminares son prometedores. Una vez optimizada la RT-PCR, ya que de momento se aprecian varias bandas para cada amplificación, realizaremos lo descrito anteriormente para los cultivos celulares pero a partir de sangre entera de gatos tanto infectados como sanos (Figura 5) para determinar los perfiles de citoquinas en ambos y así poder comparar y entender mejor la patogenia de este virus.

Este trabajo está financiado por el Grupo de Investigación UCM “Retrovirus Animales”, UCM 920620.

BIBLIOGRAFÍA

Collado VM, Gómez-Lucía E, Miró G, Porras R, Tejerizo G, Martín S, Doménech A. 2007. Comparación de la acción del IFN- α y el IFN- ω sobre células crónicamente infectadas por FeLV. *IX Congreso Nacional de Virología de de la Sociedad Española de Virología (SEV)*, Zaragoza, 11-14 de Abril. Pag. 199.

Doménech A, Collado VM, Martín S, Gómez-Lucía E. 2006. Patogenia de la leucemia y de la inmunodeficiencia felinas. En: *Retrovirosis felinas I*, Canis et felis (Editorial Alacanthis), 82: 36-54.

Gelain ME, Meli M, Paltrinieri S. 2007. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *J. Feline Med. Surg.*, 8: 389-399.

Hartmann K. 2006. Feline leukaemia virus infection, pp 105-131. *En Infectious Diseases of the dog and cat*, 3^a ed. (Greene CE, ed): Saunders Elsevier, St. Louis (Mo).

Khan KN, Koociba GJ, Wellman MN. 1993. Macrophage tropism of Feline leukemia virus (FeLV) of subgroup C and increased production of TNF α by FeLV infected macrophage. *Blood*, 81: 2585-2590.

Levy JK, Liang Y, Ritchey JW, Davidson MG, Tompkins WA, Tompkins MB. 2004. Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6 and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells. *Vet Immun Immunopathol.*, 2004; 98: 101-111.

Sellon RK, Hartmann K. 2006. Feline immunodeficiency virus infection. pp 131-142. *En Infectious Diseases of the dog and cat*, 3^a ed. (Greene CE, ed): Saunders Elsevier, St. Louis (Mo).

Tizard IR, 2004. *Veterinary immunology: an introduction*. Saunders. Philadelphia, p.p 428-440.

Tompkins MB, Ogilvie GK, Gast AM, Franklin R, Weigel R, Tompkins WA. Interleukin-2 suppression in cats naturally infected with Feline Leukemia virus. *J Biol Response Hod.*, 1989: 86-96.

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos de sangre periférica (PBLs) que producen IL-2 en los gatos sanos, infectados con FeLV asintomáticos e infectados con desarrollo de cuadro clínico, tras la estimulación con los mitógenos ConA (concavalina A), A2/PMA (Ca + ionóforo A23187 + forbol-12-miristato-13-acetato). Todos los gatos infectados-asintomáticos que no respondieron a A2/PMA tampoco lo hicieron a ConA. (Adaptado de Tompkins *et al*, 1989).

ESTIMULACIÓN DE PBLs	SANOS	INFECTADOS CON FeLV ASINTOMÁTICOS	INFECTADOS CON FeLV SINTOMÁTICOS
ConA	79	59	33
A2/PMA	100	92	44

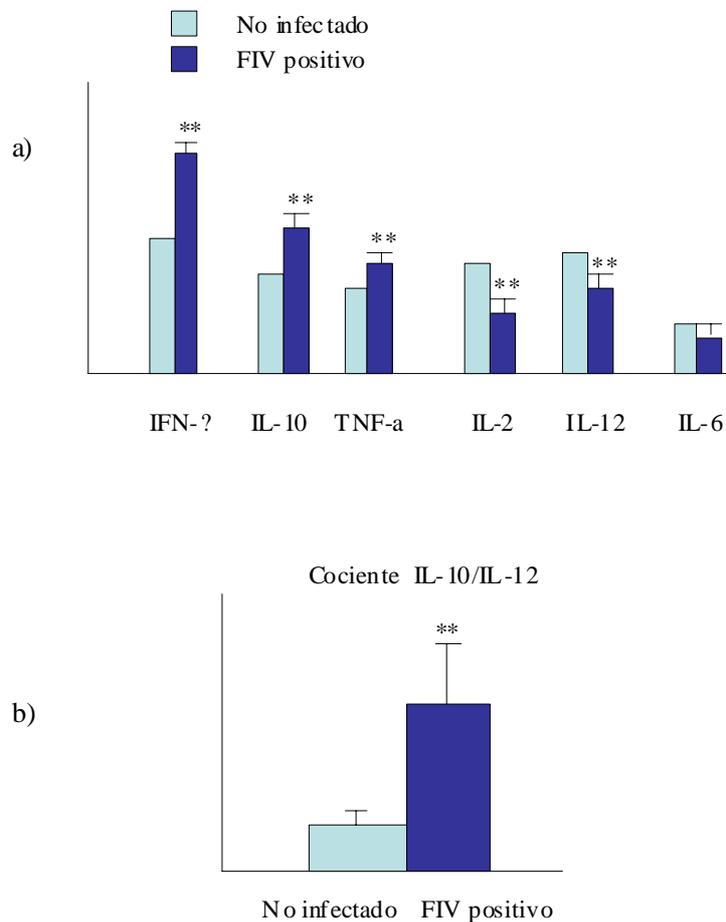


Figura 1. Variación en el patrón de citoquinas durante la infección por FIV en comparación con animales no infectados. a) Niveles de interferón (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α), y de las citoquinas IL-10, IL-12, IL-2, IL-6. b) Alteración del cociente IL-10/IL-12. ** Estadísticamente significativo. Adaptado de Levy *et al.*, 2004 (Doménech *et al.*, 2006)

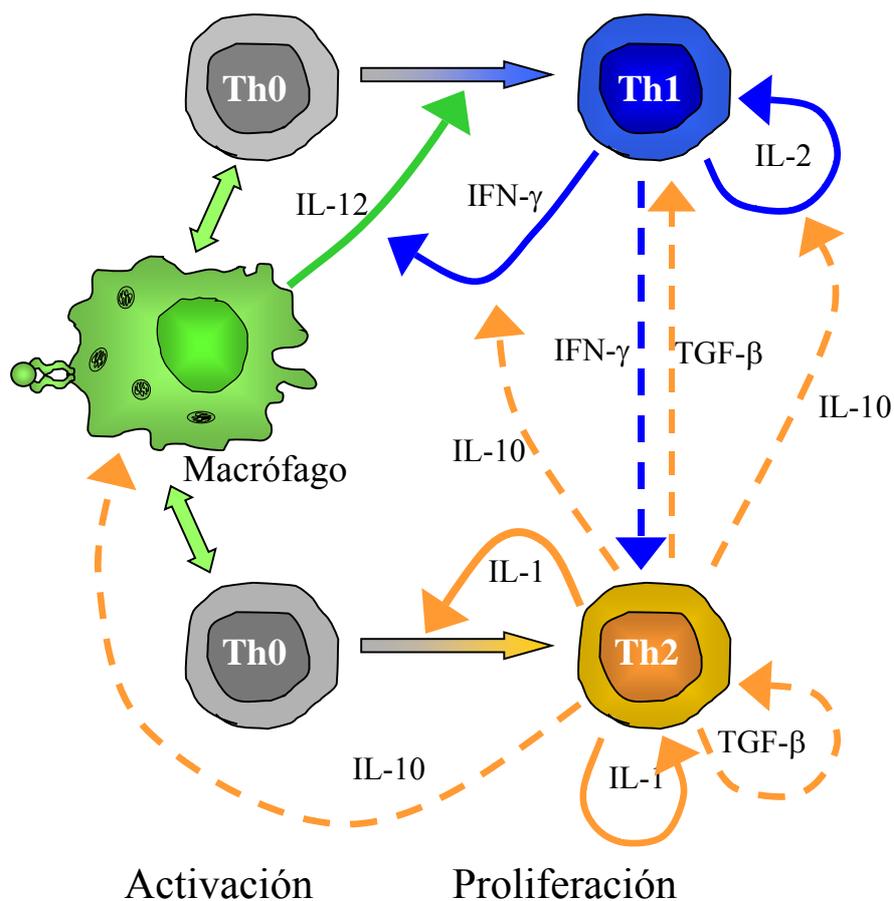


Figura 2. Citoquinas principales secretadas por los linfocitos Th1 y Th2. Tras la presentación de antígeno por una célula apropiada, los linfocitos T se diferencian en linfocitos Th1, que intervienen fundamentalmente en la inmunidad celular, y Th2, que intervienen fundamentalmente en la respuesta humoral. Líneas continuas representan señales positivas o favorecedoras. Líneas discontinuas representan señales negativas o inhibitorias.

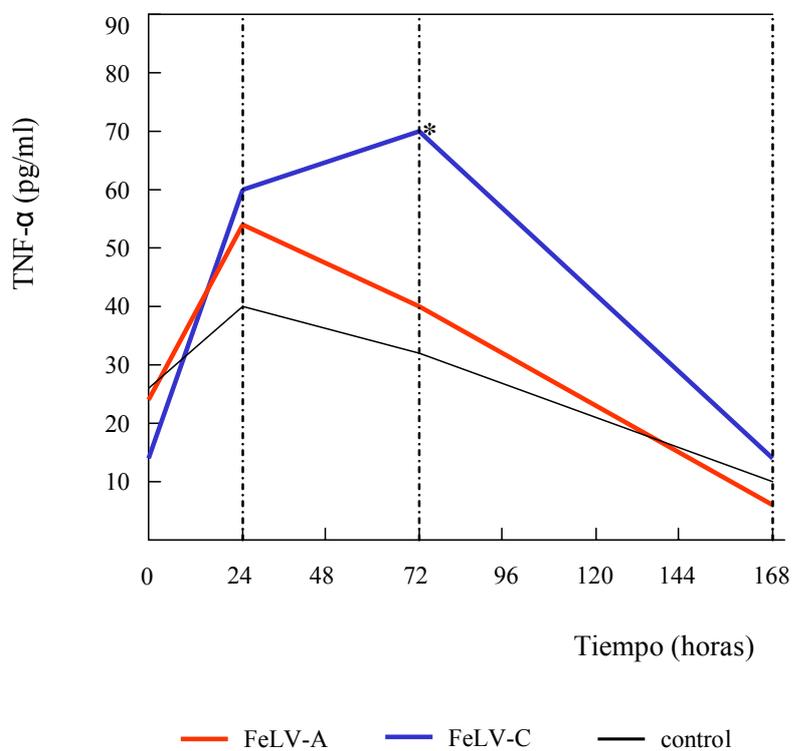


Figura 3. Niveles de TNF- α en el sobrenadante de cultivos de macrófagos felinos inoculados con FeLV-A o FeLV-C en comparación con controles sin inocular. *: significativamente diferente de FeLV-A y control.

Adaptado de Khan *et al.*, 1993.

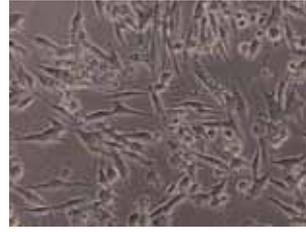
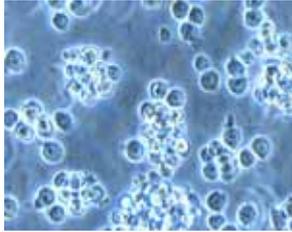


Figura 4. Líneas celulares empleadas en el estudio: izquierda: FL74 (linfocitos felinos infectados por FeLV); derecha: CRFK (fibroblastos felinos).

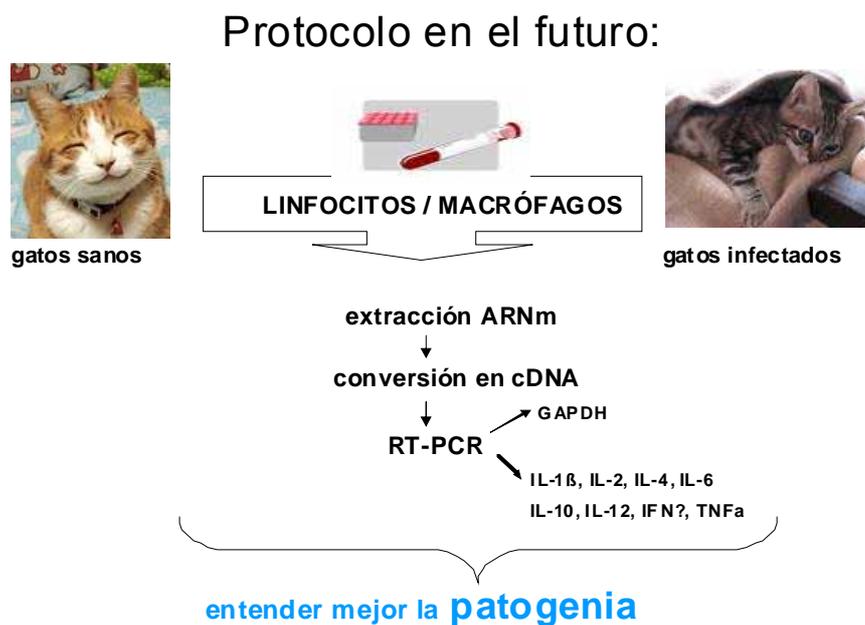


Figura 5. Protocolo de trabajo. Una vez puesta a punto la técnica, se realiza lo descrito para los cultivos celulares pero a partir de sangre entera de gatos tanto infectados como sanos.