

Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino

Characteristics of the immune response of pigs infected with porcine rubulavirus

Jesús Hernández*
Julio Reyes-Leyva**
Humberto Ramírez***
Olivia Valenzuela†
Edgar Zenteno‡

Abstract

Porcine rubulavirus is responsible for blue eye disease in porcine, which is characterized by neurological signs, corneal opacity and high mortality in young pigs. Reproductive disorders such as epididymitis and testicular atrophy are also common in sexually mature pigs. Since its identification at the beginning of 1980's, many researches have identified the main molecular, pathological, biological and immunological characteristics of the disease. This review discusses the recent advances related to the humoral and cellular immune response to porcine rubulavirus. The importance of the Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) protein as an inducer of specific antibodies during infection and the importance of CD4+CD8- lymphocytes during early immune responses and CD4+CD8+ lymphocytes in memory response are also discussed.

Key words: PORCINE RUBULAVIRUS, ANTIBODIES, CD4+CD8- AND CD4+CD8+ LYMPHOCYTES, MEMORY, PORCINE.

Resumen

El rubulavirus porcino es responsable de la enfermedad del ojo azul de los cerdos, la cual se caracteriza por signos nerviosos, opacidad de la cornea y alta mortalidad en cerdos lactantes. Las alteraciones reproductivas en sementales incluyen epididimitis y atrofia testicular. Desde que se le identificó por primera vez, a principios de la década de los ochenta del siglo pasado, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de las características moleculares del virus y las propiedades patológicas, biológicas e inmunológicas de la enfermedad. Esta revisión presenta avances de la respuesta inmune humoral y celular al rubulavirus porcino, discute la importancia de los anticuerpos en el control de la infección y la inmunogenicidad de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN); además, describe el papel de los linfocitos CD4+CD8- en la respuesta aguda y la de los linfocitos CD4+CD8+ en la respuesta de memoria.

Palabras clave: RUBULAVIRUS PORCINO, ANTICUERPOS, LINFOCITOS CD4+CD8- Y CD4+CD8+, MEMORIA, CERDOS.

* Laboratorio de Inmunología, Departamento de Nutrición y Salud Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Km 0.6, Carretera a la Victoria, Hermosillo, Sonora, México, Apartado Postal 1735, CP 83000, Tel. (662) 289-2400 Ext. 294, Fax (662) 280-0094, Correo electrónico: jhdez@cascabel.ciad.mx

** Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, 74630, Metepec, Puebla, México.

*** Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

† Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma de Sonora, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

‡ Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

Blue eye disease in porcine is a viral infection that affects these animals regardless of their age and causes neurological, respiratory and reproductive problems as well as corneal opacity.¹⁻³ It appears with severe and fatal neurological problems in piglets. In adult pigs, neurological and respiratory damage is scarce, with reproductive failure being the main characteristic.⁴⁻⁵ Experimentally infected boars have low sperm concentration and motility, nodules in the head of the epididymis, spermatoc granulomas, vacuolar degeneration and mononuclear cell infiltration.⁶ In spite of the damage the animal's libido does not diminish and the plasmatic concentration of testosterone does not vary.⁷ The virus enters intranasally and through the olfactory nerve travels towards the central nervous system,⁸ it is possible to isolate the virus from the central nervous system of new born pigs^{2,8,9} as well as from the reproductive tract of adults.^{2,6} It has been thought that the virus has venereal transmission because dams have been observed to be infected after mounting or artificial insemination. Recent results show that the virus is excreted in semen, both in the seminal fluid as well as in sperm, situation that alters sugar expression in the acrosome of sperm and conditions their ability to fertilize.¹⁰

The responsible virus belongs to the Paramyxoviridae family, Paramyxovirinae subfamily, Rubulavirus genus, porcine rubulavirus species.¹¹ It has more than 40% homology in each gene with human parotiditis virus, parainfluenza 2 and 4 virus, and simian virus^{5,12-15} as well as much similarity to the tropism and pathogenicity of parotiditis virus.^{8,16} La Piedad Michoacan virus (LPMv) was the first isolate characterized and is considered prototype of the disease.³ Nevertheless, new isolates have been characterized based on their electrophoresis profile and clinical manifestations of the disease, suggesting the presence of virus capable of causing lesions in piglets, adults or both.¹⁷

The rubulavirus has three proteins in the nucleocapsid: a nucleoprotein (NP, 68Kd), a phosphoprotein (P, 52Kd) and the high molecular weight protein (L, 200Kd); a matrix protein (M, 42Kd) and two glycoproteins: Hemagglutinin-Neuraminidase (HN, 66Kd) and the fusion glycoprotein (F, 71Kd).¹⁸ The HN protein is in charge of recognizing the cellular receptor and the F protein is in charge of the fusion with the target cell. The HN protein recognizes a receptor in the target cell which is rich in sialic acid and contains sialila-2,3 lactose,^{19, 20} determinant for infection because when it is modified to sialila-2,6 lactose, the virus losses its ability to recognize and infect.²¹ There is a close relationship between tissue expression of sialila-2,3 lactose in healthy pigs²² and viral replication sites in naturally and experimentally infected pigs.^{6,8} It has been proposed that the pathological differences between pigs of different ages are due, in part, to the differential expression of glyco-

Introducción

La enfermedad de ojo azul en los cerdos es una infección viral que afecta a estos animales sin importar su edad, y provoca problemas neurológicos, respiratorios, reproductivos y opacidad de la cornea.¹⁻³ Se manifiesta con severos y fatales problemas neurológicos en lechones. En cerdos adultos el daño neurológico y respiratorio es escaso, siendo la falla reproductiva la principal característica.⁴⁻⁵ Seminales infectados experimentalmente presentan baja concentración y motilidad espermática, nódulos en la cabeza del epidídimo, granulomas espermáticos, degeneración vacuolar e infiltración de células mononucleares.⁶ A pesar del daño no disminuye la libido del animal y las concentraciones plasmáticas de testosterona no se alteran.⁷ El virus ingresa por vía intranasal y por el nervio olfatorio hacia el sistema nervioso central,⁸ es posible aislarlo del sistema nervioso central de neonatos^{2,8,9} y del aparato reproductor de adultos.^{2,6} Se ha supuesto que el virus se transmite por vía venérea ya que se ha observado que las cerdas se infectan durante la monta o la inseminación artificial. Resultados recientes demuestran que el virus se excreta por el semen, tanto en el líquido seminal como en los espermatozoides, situación que altera la expresión de azúcares en el acrosoma de los espermatozoides y condiciona su habilidad para fecundar.¹⁰

El virus responsable pertenece a la familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae, género Rubulavirus, especie rubulavirus porcino.¹¹ Tiene más de 40% de homología en cada gen con el virus de la parotiditis humana, virus parainfluenza 2 y 4 y virus símico^{5,12-15} y mucha similitud en el tropismo y patogenicidad con el virus de la parotiditis.^{8,16} El virus La Piedad Michoacán (LPMv) fue el primer aislamiento caracterizado y es considerado prototipo de la enfermedad.³ Sin embargo, nuevos aislamientos se han caracterizado con base en su perfil de electroforético y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, lo que ha sugerido presencia de virus capaces de causar lesiones principalmente en lechones, adultos o ambos.¹⁷

El rubulavirus presenta tres proteínas en la nucleocápside: La nucleoproteína (NP, 68Kd), la fosfoproteína (P, 52Kd) y la proteína de gran peso molecular (L, 200Kd); una proteína de matriz (M, 42Kd) y dos glicoproteínas: Hemagglutinina-Neuraminidasa (HN, 66Kd) y la de fusión (F, 71Kd).¹⁸ La proteína HN se encarga de reconocer el receptor celular y la proteína F se encarga de la fusión con la célula blanco. La proteína HN reconoce un receptor en la célula blanco rico en ácido siálico que contiene sialila-2,3 lactosa,^{19,20} determinante para la infección, ya que cuando se modifica por un sialila-2,6 lactosa, el virus pierde la habilidad para reconocer e infectar.²¹ Existe una estrecha relación entre la expresión tisular de sialila^{2,3} lactosa en cerdos sanos²² y los sitios de replicación viral en cerdos infectados

conjugates with sialil-2,3 lactose, which is found in greater proportion in the nervous system of new born pigs and in the reproductive tract of adults.^{21, 22}

Humoral response

Antibody response

The humoral response against rubulavirus is initiated with the presence of specific antibodies since the first post-infection (PI) week. During the first four PI week the titles fluctuate between 4 and 6 Log₂, from the fifth PI week the titles increase, reaching up to 8.5 Log₂.²³ In natural infections antibodies can be detected until 18 months after infection.⁴ As for the importance of antibodies in the control of the disease, it has been observed that pregnant dams, immunized with an inactivated vaccine, transfer the immunity to their piglets. The natural passive immunity of the piglets allow them to survive the challenge.²⁴ Similar results are observed in pigs in growth and reproduction when immunized. In this case disease signs in the affected farms, as well as mortality rates, decrease significantly ($P < 0.05$).²⁴ These results show the importance of antibodies in the control of the disease during the first weeks of life in pigs. *In vitro* essays show that specific antibodies against rubulavirus or against immunogenic peptides have a neutralizing effect.²⁵ The importance of antibodies in other infections due to paramyxovirus reveal a direct effect on the virus and on the infected cell.²⁶ Antibodies inhibit the union of the virus with its cellular receptor and penetration, they favor viral destruction through complement and carry out other neutralization mechanisms.²⁷ The union of antibodies to the surface of infected cells can alter multiplication at the interior of the cell, suppress the intracellular synthesis of viral proteins and viral RNA, contributing to the control of the disease.²⁸ Nevertheless, under certain circumstances antibodies contribute to the development of viral persistence.²⁹ It has been observed that if measles virus reaches the central nervous system (one in a million cases) the disease known as subacute sclerosing panencephalitis appears. In this case antibodies are inefficient at controlling the virus and favor the negative regulation of viral proteins rendering the virus invisible to the immune system.³⁰ Porcine rubulavirus is a virus with the capacity of developing *in vitro* and *in vivo* persistence.^{31, 32} It has been observed that it is possible to identify genetic material of the virus in permanently infected cell strains,³³ and in the nervous system of pigs after 50 days of infection.³² These results suppose that similar mechanisms to those of measles could develop during the infection with porcine rubulavirus.

Antibody specificity

Antibodies against rubulavirus are directed against

natural y experimentalmente.^{6,8} Se ha propuesto que las diferencias patológicas entre cerdos de diferentes edades se deben, en parte, a la expresión diferencial de glicoconjugados con sialila2,3 lactosa que se encuentran en mayor proporción en el sistema nervioso de neonatos y en el sistema reproductor de cerdos adultos.^{21,22}

Respuesta humoral

Respuesta de anticuerpos

La respuesta humoral contra el rubulavirus se inicia con la presencia de anticuerpos específicos a partir de la primera semana posinfección (PI). Durante las primeras cuatro semanas PI los títulos fluctúan entre 4 y 6 log₂, a partir de la quinta semana PI los títulos se incrementan, llegando hasta 8.5 log₂.²³ En infecciones naturales, los anticuerpos se pueden detectar hasta después de 18 meses de infección.⁴ En cuanto a la importancia de los anticuerpos en el control de la enfermedad, se ha observado que cerdas gestantes inmunizadas con una vacuna inactivada transfieren protección a los lechones. La inmunidad natural pasiva de los lechones les permite sobrevivir al desaffo.²⁴ Resultados similares se observan con cerdos en crecimiento y reproductores cuando son inmunizados. En este caso los signos de la enfermedad en las granjas afectadas, así como los porcentajes de mortalidad disminuyen significativamente ($P < 0.05$).²⁴ Estos resultados muestran la importancia de los anticuerpos en el control de la enfermedad durante las primeras semanas de vida de los cerdos. Ensayos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos contra el rubulavirus o contra péptidos inmunogénicos tienen actividad neutralizante.²⁵ La importancia de los anticuerpos en otras infecciones por paramixovirus revela un efecto directo sobre el virus y sobre la célula infectada.²⁶

Los anticuerpos inhiben la unión del virus a su receptor celular y la penetración, favorecen la destrucción viral por complemento y llevan a cabo otro mecanismo de neutralización.²⁷ La unión de los anticuerpos a la superficie de las células infectadas puede alterar la multiplicación al interior de la célula, suprimir la síntesis intracelular de proteínas virales y ARN viral contribuyendo al control de la enfermedad.²⁸ Sin embargo, bajo ciertas circunstancias los anticuerpos contribuyen al desarrollo de la persistencia viral.²⁹ Se ha observado que si el virus del sarampión alcanza el sistema nervioso central (uno en un millón de casos), se presenta la enfermedad conocida como panencefalitis esclerosante subaguda. En este caso los anticuerpos son inefficientes en el control del virus y favorecen la regulación negativa de las proteínas virales dejando invisible al virus frente al sistema inmune.³⁰ El rubulavirus porcino es un virus con capacidad para desarrollar persistencia *in vitro* e *in vivo*.^{31,32} Se ha observado que es posible identificar material genético del virus en líneas celulares permanentemente infectadas,³³ y en el sistema nervioso

NP, NH and M viral proteins.²³ HN protein is the most immunogenic protein because Hernandez²³ using western blot essays observed that in the second PI week, 85% of the serums of experimentally infected pigs (n = 7) recognize this protein, and after the third PI week 100% does the same thing. This behavior is similar to the one observed in children infected with parainfluenza virus, where antibody specificity is mainly against HN protein, which increases with the number of reinfections.³⁴ Up to this moment no antibodies against rubulavirus F protein have been demonstrated, one of the explanations is the low immunogenic response against the protein as it happens with parainfluenza virus.²³ In children infected with the parainfluenza virus it's possible to determine antibodies against F protein only after multiple reinfections.²⁶ Another protein that is recognized by antibodies is M protein although the response is lesser in comparison to that of the HN protein. In this case we observe that in the fourth PI week, 28% of the serums and in the fifth week PI 43% are specific to this protein. The response to NP protein is greater than that for M protein but lesser than the one observed for HN. The proposal that the HN protein is one of the most immunogenic part of rubulavirus has taken to the development of methods for purifying HN protein,³⁵ as well as the development of immunogenic peptides through computer algorithms.³⁶ The immunization of mice with these peptides induces the formation of neutralizing antibodies,²⁵ and opens an important possibility of using them in pigs.

Cellular response

CD4+CD8- and CD4+CD8+ lymphocytes participation

An important characteristic of the immune system of pigs is that besides expressing CD4+ and CD8+ T lymphocytes, there is a population that expresses both the CD4 and CD8 markers and is called CD4+CD8+ double positives.³⁷ This *sui generis* population is observed in humans in percentages smaller than 5% while in pigs or macaques they can reach more than 50% of the total T lymphocytes.³⁸ These cells are found normally in peripheral blood, in lymphatic nodules, and increase in number as pigs age. Since their identification the question has been: What is their biological function? The first observations showed that they are previously activated cells which transform into small lymphocytes after expressing the CD8 molecule.³⁹ They proliferate after *in vitro* stimulation of mononuclear cells in presence of virus, bacteria or parasites, as long as the animal had been previously in contact with said antigen.⁴⁰ These results suggested that they were memory cells and further studies propose that they act with restriction by MHC-II; in other words the functional molecule is CD4. Nevertheless, taking into account the role of CD8, it has

de cerdos hasta después de 50 días de infección.³² Estos resultados suponen que mecanismos similares al virus del sarampión podrían desarrollarse durante la infección con el rubulavirus porcino.

Especificidad de anticuerpos

Los anticuerpos contra el rubulavirus están dirigidos contra las proteínas virales NP, HN y M.²³ La HN constituye la proteína más inmunogénica, ya que Hernández²³ utilizando ensayos de inmunoelectrotransferencia observó que en la segunda semana PI, 85% de los sueros de los cerdos infectados experimentalmente (n = 7) reconocen esta proteína, a partir de la tercera semana PI el 100%. Este comportamiento es similar al que se observa en niños infectados con el virus parainfluenza, donde la especificidad de anticuerpos es principalmente contra la proteína HN, y ésta aumenta con el número de reinfecciones.³⁴ Hasta la fecha no se han demostrado anticuerpos contra la proteína F del rubulavirus, una de las explicaciones es la baja inmunogenicidad de la proteína como sucede con el virus parainfluenza.²³ En niños infectados con el virus parainfluenza es posible determinar anticuerpos contra la proteína F sólo después de múltiples reinfecciones.²⁶ Otra proteína reconocida por los anticuerpos es la proteína M; sin embargo, la respuesta es menor en comparación con la proteína HN. En este caso se observa que en la cuarta semana PI, 28% de los sueros, y en la quinta 43% son específicos para esta proteína. La respuesta a la proteína NP es mayor que a la M, pero menor que la observada a la HN. La propuesta de la proteína HN como una de las más inmunogénicas del rubulavirus, ha llevado al desarrollo de métodos para purificar la proteína HN,³⁵ así como al desarrollo de péptidos inmunogénicos por medio de algoritmos computacionales.³⁶ La inmunización de ratones con estos péptidos induce la formación de anticuerpos neutralizantes,²⁵ y abre una importante posibilidad de utilizarlos en cerdos.

Respuesta celular

Participación de los linfocitos CD4+CD8- y CD4+CD8+

Una característica importante del sistema inmune de los cerdos es que además de expresar linfocitos T CD4+ y CD8+, existe una población que expresan los marcadores CD4 y CD8, llamada dobles positivos CD4+CD8+³⁷ Esta población *sui generis*, se observa en humanos en porcentajes menores a 5, mientras que en cerdos o macacos pueden alcanzar más del 50% del total de los linfocitos T.³⁸ Estas células se encuentran normalmente en sangre periférica, en los nódulos linfáticos y aumentan en número conforme con la edad del cerdo. Desde su identificación la pregunta ha sido: ¿cuál es su función biológica? Las primeras observaciones mostraron que son célu-

been suggested that this molecule could participate as an adhesion molecule which increases the affinity of TCR to the MHC.⁴¹

The infection with porcine rubulavirus is associated with a significant decrease ($P < 0.05$) of the proliferation capacity of mononuclear cells (MNC) stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (Con A) in the first PI week, which suggests an immunosuppressed state in the first weeks of infection.²³ This phenomenon is common in other paramyxovirus and is a consequence of a deficient production of interleukin-2 (IL-2). The administering of IL-2 to a culture of said cells manages to restore their proliferation capacity.⁴² The immunosuppression processes after a viral infection, as it occurs in porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), can predispose to some viral or bacterial infections *in vivo*.⁴³ In the case of porcine rubulavirus, field observations reveal that it is frequent to find the virus associated with other bacterial infections such as *Actinobacillus pleuroneumoniae*,⁴ nevertheless there is no information of experimental essays.

In vitro response of MNC stimulated with the virus appears from the second PI week with a maximum peak in the fourth week PI. In the following weeks the proliferation decreases but it is still possible to detect it at least until ten weeks PI with stimulation indexes >8 .²³ The phenotype of the MNC that proliferate after antigenic stimulation shows a predominance of CD4+CD8+ and CD4+CD8- cells, the first being more numerous, in contrast to CMN kept in culture without stimulation. On the contrary, MNC stimulated with PHA have the CD4+CD8- phenotype. Phenotype CD4-CD8+ is not modified in cells with or without stimulation. This characteristic is also observed in MNC stimulated with other viral or parasite antigens.^{41, 45}

As for the participation of some subpopulations of T lymphocytes, there is evidence which indicates that CD4+CD8- lymphocytes are in charge of the acute response to porcine rubulavirus and CD4+CD8+ cells of the memory response.⁴⁶ Hernandez *et al.*⁴⁶ have observed that CD4+CD8- lymphocytes proliferate in presence of rubulavirus in the third PI week and not in the tenth PI week. On the other hand, CD4+CD8+ lymphocytes respond to antigenic stimulation at tenth PI week and not in the third week PI. This difference is not due to the proliferation capacity of the cells because both populations respond when they are stimulated with mitogens such as PHA. In other models such as Aujeszky's disease, Summerfield *et al.*⁴⁷ report that CD4+CD8+ lymphocytes are responsible of immunological memory of the virus, while Zuckermann and Husmann⁴¹ describe that the memory response is carried out by CD4+CD8- and CD4+CD8+ lymphocytes.

Cell populations

As it happens with many viral infections,⁴⁸ the first

las previamente activadas, que se convierten en linfocitos pequeños después de expresar la molécula CD8.³⁹ Proliferan después de estimular células mononucleares *in vitro* en presencia de virus, bacterias o parásitos, siempre y cuando el animal haya estado previamente en contacto con dicho antígeno.⁴⁰ Estos resultados sugirieron que se trataba de células de memoria y estudios posteriores suponen que actúan con restricción por el MHC-II; es decir, que la molécula funcional es el CD4. Sin embargo, tomando en cuenta el papel de CD8 se ha sugerido que esta molécula podría participar como molécula de adhesión incrementando la afinidad del TCR por el MHC.⁴¹

La infección con el rubulavirus porcino se asocia con una disminución ($P < 0.05$) en la capacidad proliferativa de las células mononucleares (CMN) estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (Con A) en la primera semana PI, lo que sugiere un estado de inmunosupresión en las primeras semanas de infección.²³ Este fenómeno es común en otros paramixovirus y es consecuencia de una deficiente producción de IL-2. La administración de interleucina-2 (IL-2) al cultivo de dichas células logra restablecer la capacidad proliferativa de las células.⁴² Los procesos de inmunosupresión después de alguna infección viral, como ocurre con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS, por sus siglas en inglés), *in vivo* pueden predisponer a algunas enfermedades virales o bacterianas.⁴³ En el caso del rubulavirus porcino, observaciones de campo revelan que es frecuente encontrar al virus asociado a otras infecciones bacterianas, como el *Actinobacillus pleuroneumoniae*;⁴ sin embargo, no existe información de ensayos experimentales.

La respuesta *in vitro* de CMN estimuladas con el virus se presenta a partir de la segunda semana PI, con un pico máximo en la cuarta semana PI. En las siguientes semanas la proliferación disminuye, pero es posible detectarla al menos hasta durante diez semanas PI con índices de estimulación >8 .²³ El fenotipo de las CMN que proliferan después del estímulo antigénico muestra un predominio de células CD4+CD8+ y CD4+CD8-, predominando los primeros, a diferencia de CMN que se mantienen en cultivo sin estímulo. Por el contrario, las CMN estimuladas con PHA presentan el fenotipo CD4+CD8-. El fenotipo CD4-CD8+ no se modifica en las células con o sin estímulo. Esta característica también se observa en CMN estimuladas con otros antígenos virales o parasitarios.^{41, 45}

En cuanto a la participación de algunas subpoblaciones de linfocitos T, existen evidencias que indican que los linfocitos CD4+CD8- se encargan de la respuesta aguda al rubulavirus porcino, y las células CD4+CD8+ de la respuesta de memoria.⁴⁶ Hernández *et al.*⁴⁶ han observado que los linfocitos CD4+CD8- proliferan en presencia del rubulavirus en la tercera semana PI y no en la décima semana PI. Por el contrario, los linfocitos CD4+CD8+ responden al estímulo

changes observed after infection with porcine rubulavirus are an increase in cytotoxic T lymphocytes (CD3+ and CD8+) in the first PI week.^{23,49} In other models, the increase of these cells is associated with a strong cytotoxic response that helps to control the infection.⁵⁰ To date the cytotoxic activity of CD4-CD8+ lymphocytes has not been evaluated, but their importance in the response against rubulavirus is not discarded. In the third PI week, CD4+CD8- lymphocytes decrease, possibly due to recruiting in target organs as it occurs in other viral infections.⁵¹ Another possibility is a change of phenotype from CD4+CD8- to CD4+CD8+, which appears *in vitro* and is supposed to occur *in vivo*.⁴¹ In fact this explains the increase of CD4+CD8+ lymphocytes *in vivo*.⁴¹

There are a great number of specific antibodies against some superficial molecules such as CD45RA, CD29^{high} or CD25, which differentiate virgin, memory or activated cells⁵² respectively. The majority is commercially available; nevertheless, the analysis of o-glycosilated structures with peanut (PNA) or amaranth (ALL) lectin, differentiates memory⁵³ and virgin⁵⁴ cells respectively. After ten weeks of infection, pigs infected with porcine rubulavirus have high percentages of PNA+ cells that express CD29^{high} phenotype (PNA+ CD29^{high}).⁵⁵ On the contrary, the percentage of ALL+ cells is not altered, they only change the expression of CD29^{low} to CD29^{middle} marker.⁵⁵ These results suppose that memory cells in these animals, CD4+CD8+ lymphocytes, express O-glycosilated structures recognized by PNA lectin. The expression of this type of structures in CD4+CD8+ lymphocytes shows an increase in week ten compared to week three. The results indicate that the lymphocytes in charge of the memory response in pigs,^{46,55,56} express o-glycosilated structures that are determined with PNA lectin.

As for B lymphocytes (IgM+) it is observed that the infection favors the decrease of these cells in the fourth PI week, this can be a reflection of antigenic activation of B lymphocytes and the consequent change of superficial Ig: IgG for IgM.⁵⁷ The monocyte percentages decrease around week four PI. In other infections due to paramyxovirus, monocytes are the preferred target for them, what makes suspect that the rubulavirus follows a similar pathway. Experiments focused on determining the susceptibility of different cell populations to recognition and infection reveal that monocytes are one of the most susceptible populations⁵⁸ that can be infected *in vivo*.⁸ These results in some way explain the decrease of this cell population due to the infection by rubulavirus.

Cytokines

The production of cytokines during the development of a viral response is fundamental because on them depends the elimination or not of the virus.⁵⁹ There are virus which affect pigs, such as PRRS virus, that are capable of modulating the cytokine response and in this manner avoid the immune response.⁶⁰ In gen-

antigénico en la décima semana PI y no en la tercera semana PI. Esta diferencia no se debe a la capacidad proliferativa de las células, ya que ambas poblaciones responden cuando se estimulan con mitógenos como la PHA. En otros modelos como la enfermedad de Aujeszky, Summerfield *et al.*⁴⁷ informan que los linfocitos CD4+CD8+ son responsables de la memoria inmunológica al virus, mientras que Zuckermann y Husmann⁴¹ describen que la respuesta de memoria la llevan a cabo los linfocitos CD4+CD8- y los CD4+CD8+.

Poblaciones celulares

Como sucede con muchas infecciones virales,⁴⁸ los primeros cambios que se observan después de la infección con el rubulavirus porcino son aumento de linfocitos T citotóxicos (CD3+ y CD8+) en la primera semana PI.^{23,49} En otros modelos, el incremento de estas células se asocia con una fuerte respuesta citotóxica que ayuda al control de la infección.⁵⁰ A la fecha no se ha evaluado la actividad citotóxica de los linfocitos CD4-CD8+, pero no se descarta su importancia en la respuesta al rubulavirus. En la tercera semana PI disminuyen los linfocitos CD4+CD8-, quizá debido al reclutamiento en los órganos blanco como sucede en otras infecciones virales.⁵¹ Otra posibilidad es el cambio en el fenotipo, de CD4+CD8- a CD4+CD8+, que se presenta *in vitro* y se supone que ocurre *in vivo*. De hecho esto explica el incremento de los linfocitos CD4+CD8+ *in vivo*.⁴¹

Existe gran número de anticuerpos específicos contra algunas moléculas de superficie como el CD45RA, CD29^{high} o el CD25, que diferencian células virgen, de memoria o activadas,⁵² respectivamente. La mayoría están disponibles comercialmente; sin embargo, el análisis de estructuras o-glicosiladas con lectina de cacahuete (PNA) o amaranto (ALL), diferencian células de memoria⁵³ y vírgenes,⁵⁴ respectivamente. Después de diez semanas de infección, los cerdos infectados con el rubulavirus porcino presentan altos porcentajes de células PNA+, que expresan el fenotipo CD29^{high} (PNA+ CD29^{high}).⁵⁵ Por el contrario, los porcentajes de células ALL+ no se alteran, sólo cambian la expresión del marcador CD29^{low} a CD29^{middle}.⁵⁵ Estos resultados suponen que las células de memoria en esos animales, los linfocitos CD4+CD8+, expresan estructuras o-glicosiladas reconocidas por la lectina PNA. La expresión de este tipo de estructuras en los linfocitos CD4+CD8+ muestra incremento en la semana diez respecto de la semana tres. Los resultados indican que los linfocitos encargados de la respuesta de memoria en el cerdo,^{46,55,56} expresan estructuras o-glicosiladas que se determinan con la lectina PNA.

En cuanto a los linfocitos B (IgM+) se observa que la infección favorece la disminución de estas células en la cuarta semana PI, ello puede ser reflejo de la activación antigénica de los linfocitos B y el consecuente cambio de Ig de superficie: IgG por IgM.⁵⁷ Los

eral terms it can be mentioned that the production of cytokines is classified in Th1 and Th2. The first one is characterized by the production of INF- and IL-2, while the second one by IL-4, IL-6 and IL-10.⁶¹ Nevertheless, cytokines such as IL-10 can be important in the regulation of cytotoxic cells.⁶² In the control of viral infections the Th1 type response has a better prognosis than Th2 type response.⁶³ Experiments done in laboratory reveal that during the first PI week, the infection induces transcripts for INF- and IL-4 in MNC of infected pigs, when compared to non-infected control pigs. During the memory response, CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes express different cytokine patterns: CD4+CD8- produce mainly IL-2, while CD4+CD8+ lymphocytes, IL-10. These results suggest that during the immune memory response CD4+CD8+ lymphocytes are in charge of regulating the immune response with the production of at least IL-10. Similar results are observed during the memory response to Aujeszky's disease virus in which CD4+C8+ lymphocytes produce great quantities of INF-⁴¹ or cooperate with B lymphocytes in the production of antibodies.⁵⁶ The production of antibodies has been described, especially the production of IgG class antibodies, as subject to the cooperation of CD4 lymphocytes. Through the expression of the CD40 ligand (CD40L) and the production of cytokines such as IL-2 and of INF-stimulate B lymphocytes to change the isotype of the heavy chain of the immunoglobulin (from IgM to IgG).⁶⁴ Up to date these mechanisms have not been identified as the ones responsible for the cooperation between CD4+CD8+ and B lymphocytes in pigs, but given the similarities between the human immune system and that of the pig, it is possible that similar mechanisms occur in pigs.

The advances in this revision show an important progress in the knowledge of the immune response of pigs infected with porcine rubulavirus. The immunogenic properties of the HN protein place it as an indisputable candidate for the elaboration of vaccines or diagnostic tools for the disease. Further studies will determine the low immunogenicity of F protein and how this has an effect on the control of the disease, because with HN protein, F is fundamental in the infection process.

As for the cellular response, the participation of CD4-CD8+ lymphocytes and INF-g are a pending matter for further research. It will be necessary to determine if CD4-CD8+ lymphocytes participate in the control of the disease and, in concordance, the vaccines that are elaborated shall have to consider adequately stimulating this cell sub-population. CD4+CD8- lymphocytes are presented as the basis for the development of a solid and possibly protecting response, according to the results obtained up to this date. The challenge shall be to understand the mechanisms involved in the activation and generation of these memory cells, which would be an important part in the control of the disease.

porcentajes de monocitos disminuyen alrededor de la semana cuarta PI. En otras infecciones por paramixovirus, los monocitos son blanco preferido de estos virus, lo que hace sospechar que el rubulavirus siga un camino similar. Experimentos enfocados a determinar la susceptibilidad de diferentes poblaciones celulares por el reconocimiento e infección, revelan que los monocitos son una de las poblaciones más susceptibles⁵⁸ que pueden llegar a estar infectados *in vivo*.⁸ Estos resultados de alguna manera explican la disminución de esta población celular debido a la infección por el rubulavirus.

Citocinas

La producción de citocinas durante el desarrollo de una respuesta viral es fundamental, ya que de ella depende la eliminación o no del virus en cuestión.⁵⁹ Existen virus que afectan a los cerdos, como el virus del PRRS, el cual es capaz de modular la respuesta de citocinas y de esta manera evadir la respuesta inmune.⁶⁰ En términos generales se puede mencionar que la producción de citocinas se clasifica en Th1 y Th2. La primera se caracteriza por la producción de INF- e IL-2, mientras que la segunda por IL-4, IL-6 e IL-10.⁶¹ Sin embargo, citocinas como la IL-10 pueden ser importantes en la regulación de las células citotóxicas.⁶² En el control de las infecciones virales la respuesta tipo Th1 tiene mejor pronóstico que la respuesta Th2.⁶³ Experimentos realizados en el laboratorio revelan que durante la primera semana PI, la infección induce transcritos para INF- e IL-4 en CMN de cerdos infectados, en comparación con los cerdos testigo no infectados. Durante la respuesta de memoria, los linfocitos CD4+CD8+ y CD4+CD8- expresan diferentes patrones de citocinas: los linfocitos CD4+CD4- producen principalmente IL-2, mientras que los linfocitos CD4+CD8+ IL-10. Estos resultados sugieren que durante la respuesta inmune de memoria, los linfocitos CD4+CD8+ se encargan de regular la respuesta inmune con la producción, al menos de IL-10. Resultados similares se observan durante la respuesta de memoria al virus de la enfermedad de Aujeszky, en la cual los linfocitos CD4+CD8+ producen grandes cantidades de INF-41 o cooperan con los linfocitos B para la producción de anticuerpos.⁵⁶ Se ha descrito que la producción de anticuerpos de la clase IgG, está sujeta a la cooperación de los linfocitos CD4. A través de la expresión del ligando del CD40 (CD40L) y la producción de citocinas como la IL-2 y el de INF- estimular en los linfocitos B el cambio de isotipo de la cadena pesada de la inmunoglobulina; es decir, de IgM a IgG.⁶⁴ Hasta la fecha no se han identificado que estos mecanismos sean los responsables de la cooperación entre los linfocitos CD4+CD8+ y los linfocitos B porcinos, pero dadas la similitudes entre el sistema inmune del humano y el cerdo es probable que mecanismos similares ocurran en el cerdo.

Referencias

1. Stephano HA, Ramírez TC, Gay GM, Maqueda JJ. Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias del XVII Congreso de la Asociación de Médico Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1981, Puerto Vallarta, México. 1981:43.
2. Stephano A, Gay G, Ramirez T. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associate with a paramixovirus infection. *Vet Rec* 1988;122: 6-10.
3. Moreno-Lopez J, Correa-Giron P, Martinez A, Ericsson A. Characterization of a paramixovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch Virol* 1986;91:221-231.
4. Stephano A. Blue eye diseases. In: Leman AD, Straw BF, Mengeling WL, Allaire AD, Taylor DJ, editors. *Porcine Diseases*. Ames, Ia: Iowa State University Press, 1994:237-241.
5. Hernández J, Ramírez H, Zenteno R, Monrroy J, Reyes-Leyva J, Zenteno E. Neumonitis inducida por el rubulavirus porcino. *Rev Inst Nac Enferm Resp* 1997;10:250-255.
6. Ramirez-Mendoza H, Hernandez-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimental infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol* 1997;117:237-252.
7. Ramírez-Mendoza H. Fisiopatología del paramixovirus del Ojo Azul a nivel testicular (tesis de doctorado). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
8. Allan GM, MacNeilly F, Walker Y, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, *et al.* A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest* 1996;8:405-413.
9. MacNeilly F, Walker I, Allan G, Foster C, Linne T, Merza M, *et al.* A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1997; 9: 3-9.
10. Espinosa S. Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del Ojo Azul (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
11. Rima B, Alexander BJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, *et al.* Family Paramyxoviridae, In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Matelli GP, *et al.*, editors. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. New York: Springer-Verlag, 1995:265-274.
12. Sundqvist A, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. The hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol* 1991;122:331-378.
13. Berg M, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J Gen Virol* 1991;72:1045-1050.
14. Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez J, Linne T. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V, and C; the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol* 1992;73:1195-1200.
15. Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxoviruses F proteins. *Virus Genes* 1997;14:55-61.
16. Wolinsky JS. Mumps. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields in Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1243-1266.
17. Hernandez J, Ramirez H, Carreon R, Mercado C, Lascrain R, Hernández-Jauregui P, *et al.* Several isolates of the Porcine Paramyxovirus can be sorted into two groups with different behavior. Memorias del III Congreso Internacional de Virología Veterinaria. Interlaken, Suiza. 1994:P1-6
18. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linne T, and Moreno-Lopez J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol* 1990;71:609-613.
19. Reyes-Leyva J, Hernández-Jauregui P, Montaña L, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPMV specifically recognize sialil (2-3) lactose-containing structures. *Arch Virol* 1993;133:195-200.
20. Espinosa B, Reyes J, Hernandez-Jauregui P, Zenteno R, Ramirez H, Hernandez J, *et al.* Carbohydrate

- specificity and porcine rubulavirus infectivity. In: Morilla A, Zimmerman J, Ion K, editors. Trends in Viral Emerging Diseases of Porcine. Ames, Ia: Iowa State University Press, 2002:81-85.
21. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jaúregui P, *et al.* E. NeuAca-2,3Gal-glycoconjugate expression determinates cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Com Biochem Physiol* 1997;118B:237-332.
 22. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 2000;126:415-424.
 23. Hernandez J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramirez H, Hernández-Jaúregui P, and Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult porcine. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;64:367-381.
 24. Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz A, Reyes-Leyva J, Hernández E, Moreno-López J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet Mex* 1992;23:217-222.
 25. Zenteno R. Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria en la hemaglutinina-neuraminidasa del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
 26. Ray R, Compans RW. Paramyxoviruses. In: Van Regenmortel MHB, Neurath AR editors. Immunology of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines. New York: Elsevier, 1990: 217-236.
 27. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4 ed. Philadelphia Pennsylvania, W.B. Saunders, 2000.
 28. Griffith D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of measles virus infection: a hypothesis for altered immune response. *J Infect Dis* 1994;170:S24-31.
 29. Griffith D, Bellini W. Measles Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields in Virology. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1267-1312.
 30. Fujinami RS, and Oldstone MBA. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody induced antigenic modulation. *J Immunol* 1980;125:78-85.
 31. Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch Virol* 1998;143:425-439.
 32. Wiman AC, Hjertner B, Linne T, Herron B, Allan G, McNeilly F, *et al.* Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J Neurovirol* 1998;4:545-552.
 33. Hjertner B, Linne T, Moreno-Lopez J. Establishment and characterization of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta Vet Scand* 1997;38:213-224.
 34. Kasel JA, Frank AL, Keitel WA, Taber LH, Glezen WP. Acquisition of serum antibodies to specific viral glycoproteins of parainfluenza virus 3 in children. *J Virol* 1984;52:828-832.
 35. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernandez J, Vallejo V, *et al.* Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J* 1999;16:517-522.
 36. Zenteno R, Hernandez J, Espinosa B, Hernandez-Jauregui P, Reyes J, Zenteno E. Secondary structure prediction of the hemagglutinin neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch Virol* 1998;143:333-352.
 37. Pescovitz M.D, Lunney J K, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 1984;133:368-373.
 38. Yang H, Parkhouse RM. Phenotypic classification of porcine lymphocytes sub-populations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996;89:76-83.
 39. Saalmueller A, Redheads M J, Buhning H J, Jonjic S, Koszinowski UH. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987;17:1297-1302.
 40. Pescovitz MD, Sakapoulos AG, Gaddy JA, Husman RJ, Zuckermann FA. Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:53-62.
 41. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double-positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72:55-66.
 42. Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jauregui E, Griffin DE. Cytokine production *in vitro* and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:236-248.
 43. Drew T. A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Rec* 2000;31:27-39.
 44. Zuckermann F, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of the peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996;87:500-512.
 45. Ivanoska D, Cuperlovic K, Lunney JK. Peripheral blood mononuclear cells subsets during *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Res Vet Sci* 1990;49:92-97.
 46. Hernandez J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montaña L, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;79:249-259.
 47. Summerfield A, Rhiza H, Saalmueller A. Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes. *Cell Immunol* 1996;168:291-296.
 48. Murail-Krishna K, Altman JD, Sures M, Sourdive DJD, Zajac AJ, Miller JD, *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a re-evaluation of bystander

- activation during viral infection. *Immunity* 1998;8:177-187.
49. Rodriguez-Ropon A, Hernandez-Jauregui P, Sanchez-Torres L, Favila-Castillo L, Estrada-Parra S, Moreno-Lopez J, *et al.* Apoptosis in lymph nodes and changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of pigs infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol* 2003;128:1-8.
 50. Tripp RA, Hou S, McMickle A, Houston J, Doherty PC. Recruitment and proliferation of CD8+ T cells in respiratory virus infections. *J Immunol* 1995;154:6013-6021.
 51. Page G, Wang F, Hahn E. Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1992;52:441-448.
 52. Bradley RW, Swain LM. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998;16:201-223.
 53. Galvan M, Murali-Krishna K, Lua L, Baum L, Ahmed R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector-memory CD8+ T cells from naive cells. *J Immunol* 1998;161:641-648.
 54. Lascurain R, Porras F, Baez R, Chavez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, *et al.* *Amaranthus leucocarpus* recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol Invest* 1997;26:579-587.
 55. Hernandez J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chavez R, Lascurain R, Zenteno E. Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 84 2002;84:71-82.
 56. Ober BT, Summerfield A, Mattlimger C, Weismuller KH, Jung G, Pfaff E, *et al.* Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in porcine. *J Virol* 1998;72:4866-4873.
 57. Zinkernagel RM, Bachmann F, Kundis TE, Ochen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333-368.
 58. Hernández J. Estudio de la respuesta inmune celular y humoral en cerdos infectados experimentalmente con el rubulavirus porcino (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
 59. Biron CA. Cytokines in the generation of the immune response to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994;6:530-538.
 60. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17:551-65.
 61. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322.
 62. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991;147:528-536.
 63. Springs MK. One step ahead of the game: viral