



Nuevos avances en el desarrollo de vacunas frente a la peste porcina africana

Anna Lacasta Marin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal

Nuevos avances en el desarrollo de vacunas frente a la peste porcina africana

Memoria presentada por Anna Lacasta Marín
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado
Microbiología Ambiental y Biotecnología

VºBº del director,

VºBº del co-director,

VºBº de la tutora,

Dr. Fernando Rodríguez
González

Dr. Francesc Accensi i
Alemany

Dra. Rosa Mª Pintó
Solé

La doctoranda,

Anna Lacasta Marín

Barcelona, Diciembre 2012

Los estudios de doctorado de Anna Lacasta Marín han sido financiados por una beca de formación de profesorado universitario (FPU), concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia, referencia AP2007-00781.

Per l'Edu

AGRAÏMENTS

Tanqueu els ulls i penseu en la cançó d'Alanis Morissette "Thank you". Bé, no tanqueu els ulls que sinó no podeu seguir llegint, entorneu-los una miqueta. Que dir a aquestes alçades? Tres anys ben justets per fer una tesis... només amb això ja està tot dit. Sense tots vosaltres no ho hagués aconseguit, ja que "el camí es llarg i ple d'entrebancs", però heu fet que tot em fos més pla.

Per on començar? Això si que és fàcil, pels meus dos directors de tesis. Fernando, qué decir... o cómo decirlo... llegué al CReSA perdida y sin rumbo, con más dudas que respuestas y me diste no una oportunidad sino la oportunidad de partir de cero y cambiar todas las perspectivas e ideas preconcebidas que tenía. En estos tres años he aprendido más que en todos los años de formación anteriores, he aprendido a cuestionármelo todo, a espabilarme, a tomar decisiones, a equivocarme (sobretudo), a caerme y a levantarme... la lista sería interminable. Y lo más importante es que también me has ayudado a crecer como persona.

Francesc, quina paciència que tens amb mi! Gairebé més que me mare, la teva porta sempre ha estat oberta per qualsevol problema de feina, però el més important és que encara l'has tingut més oberta per parlar d'altres temes que em preocupaven i que poc tenien a veure amb protocols. Entre els dos m'heu il·luminat el camí fins aquí.

Per on continuar? Doncs pel grup! Som un grup petit de grans persones ("sóc petit, però valent"). Començant pel Jordi, et vaig agafar el relleu però sempre t'has preocupat perquè les coses ens sortissin bé, has estat la veu en off d'aquesta història. Seguim per la Merche (yo sigo pensando que eres del grupo), llegué al CReSA naïve naïve y me enseñaste las técnicas, a los técnicos y a jugar un poco al fútbol (imagínate como lo hacía antes). Sin ti podría existir una tesis pero estaría llena de páginas y páginas en blanco. Me lo he pasado muy bien trabajando muy duro y eso si que tiene mérito. I que en seria dels grups sense els becaris? Paula, era hija única y me llegó una hermanita de grupo, deseo

cumplido. La de horas que nos hemos pasado bajo presión (negativa, claro), trabajando y sin trabajar, dos años codo con codo, a las duras y a las maduras. Sin ti esta tesis sería aburridísima, al menos el recuerdo que yo me llevaría de ella.

Seguim, seguim que m'he animat! Els becaris, aquells éssers sensibles i sempre incompresos. He gaudit dels dos despatxos i això ha permès que us pogués conèixer més a tots, als que encara hi sou i als que ja heu marxat. No volia posar noms perquè sóc molt sapastre i segur que em deixo a algú, però faré un esforç. Menció especial a les nenes del despatx de l'esquerra: la Júlia, la Cris, la Juliana, l'Alexandra, la Paula M. I el Saulo (que ja és una més), m'heu escoltat les queixes i renecs, i m'heu animat in vivo o in Post-it. Sense comptar amb la cançó de les 18h, que aquesta ens animava a totes (yo tengo tu amor...). Als del despatx de la dreta, vau ser els primers en patir-me, però no els últims, gràcies a la Mar (que nena, ens fem uns ELISA o millor una citometria), el Mario, el Tarradas, la Tufaria, el Gerard, la Kate i la Noelia, sempre heu tingut un moment per mi quan passava preguntant "Que heu vist al meu jefe?". I un "moltes gracias!" a la resta de becaris que segur que en un moment o altre us he demanat un S.O.S. Ah, per cert, a tots els becaris que encara us quedeu pel CReSA, deixo dos plegatins al centre, un a l'NBS3 a cultiu cel·lular i un altre al despatx, rere la porta, feu-ne un bon ús.

Ara toca el torn dels tècnics. Tots i cadascun de vosaltres heu contribuït directa o indirectament en aquesta tesis. Menció especialíssima a la Marta M., que no es de PPA però ens aguanta. Muchas gracias por estar entre esos dos mundos, el de los becarios y el de los técnicos, somos el Peste Team. También muchas mercis por ayudarme a hacer trajes a medida y por arrancarme una sonrisa cuando ya tenia cara de Walking Dead. Me llevo los desayunos y los almuerzos entre timer y timer, y espero llevarme las copias y los originales de la multitud de fotos que tenéis mías. Evidentemente, también mención especial a Raquel M. ¡Nenita! Eres el alma del P3, lo sabes, ¿no? Sin ti el trabajo se nos haría a todos muy cuesta arriba, haces que todo funcione y siempre con una sonrisa en la

cara. Me llevo conmigo todas esas horas de citometría haciendo bailar a las células a ritmo de Máxima FM.

Un agraiement enorme a la resta de personal de l'NBS3 tant d'estabulari com de laboratoris: el Valentí, la Conchita, la Mari Ángeles, la Claudia, el Juan Carlos, l'Iván, el Xavi i la Mónica, feu una feina excel·lent i la feu amb ganes. M'enduc la bandera del virkon i el "mocho" per posar-la de fons de pantalla allà on vagi a parar.

Un gracias más que especial a las coleguitas del jefe: Vicky, Tuija y Lilly, siempre que he tenido dudas habéis estado ahí para echarme una (o dos) manos.

Gracias también a la Dra. Moreno y al Dr. Garrido por ofrecerme la posibilidad de aprender técnicas novedosas en un grupo más que bueno. Gracias a Carmen, Rodrigo, Miguel, Juber, Eloy, Erena, Ángeles, Nuria, Reyes, Gema y Gemo por hacer que mi estancia en Córdoba fuese todo un éxito dentro y fuera del laboratorio. Un abrazo muy fuerte y nos vemos en la feria de mayo.

Merci beaucoup Marie-Frédérique per l'oportunitat de fer un in vivo a les instal·lacions del ANSES amb uns porquets prou especials i per obrir-me les portes de casa teva, merci també a Evelyn per l'ajuda prestada i a la Celin et Maëna per la vostra ajuda fora del laboratori, tot un plaer compartir casa amb les dues. I gràcies a la Bretagne per ser com és i donar aquesta pau en moments de neguit.

Nenitas y nenitos del Departament de Microbiologia de la UB, laboratorio 7 y 11, pasando lista: Natalia, Silvia, Sandra, Rocío, Markus, Maite P., Mercè, Maite S., Judit, Raquel, Ivania y Fidel. Sois mi otro grupo, con vosotros empecé el camino y siempre os he llevado conmigo, bueno a vosotros y a las copias de la libreta de Maite P. que me han salvado la vida más de una vez. Us agraeixo també a vosaltres, Dr. Joan Tomás i Dra. Susana Merino tot el que em veu ensenyar el temps que vaig treballar amb vosaltres,

l'esforç que veu dedicar a fer-me veure el que volia a la vida i el camí a que havia de seguir, les lliçons apreses no les he oblidat.

I finalment, els agraïments als amics i a la família. Gràcies, gràcies i més gràcies a les nenes del bàsquet (i als nens de les nenes del bàsquet), els moments que passem juntes són en els que no penso en la tesis, si ho faig em dona la pilota a la cara, sabeu? M'heu fet desconnectar i veure que el món no s'acaba perquè pari un moment per jugar un partidillo o prendre unes cervesetes. Gracias también a mis otras nenitas Bea, Pili y Carol, hemos ido de la mano paso a paso desde que éramos unos mocos, ahora se supone que ya somos mayores y seguimos de la mano ¡No me soltéis!

La família, gràcies a la meva mare per fer-me com sóc: independent, forta, autosuficient... a part de guapa, encantadora, simpàtica... Gràcies al meu pare, que m'ha acompanyat en aquest camí dia a dia, els seus consells son presents a cada decisió. A la meva germana, Mire sempre està bé comptar amb l'afecte incondicional de la germana gran i la seva paciència. Gràcies per preguntar-me "Que tal va la tesis?" sense esperar que digues que bé. També agrair a la meva tia el seu suport en moments pitjor que difícils i per preocupar-se per mi més del que faig jo mateixa. I com no, agrair a l'Edu que sigui com és, tu has fet que ho pugui superar tot, poses el Sol als meus dies i la Lluna a les meves nits, i sé que el que vindrà encara serà millor, ja saps, molta pasta, fama, viatges...

L'agraïment per 3 anys d'esforç compartit no es pot posar en un paper, però ho he intentat. Moltes gràcies a tots i cada un de vosaltres, allà on vagi sempre vindreu amb mi.

SOU TOTS MOLT MACOS!

RESUMEN	V
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA ENFERMEDAD: PESTE PORCINA AFRICANA (PPA).....	3
1.1.1. Breve historia y estado actual de la enfermedad	3
1.1.2. Epidemiología de la PPA	6
1.1.3. Patogenia de la PPA	8
1.1.4. Diagnóstico de la PPA	11
1.2. EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA).....	13
1.2.1. Morfología del VPPA	13
1.2.2. Ciclo infectivo del VPPA	14
1.2.3. Genoma del VPPA.....	18
1.3. RESPUESTA INMUNITARIA Y EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR PARTE DEL VPPA	20
1.3.1. VPPA virulentos y genes implicados en la evasión del sistema inmunitario	21
1.3.2. Respuesta inmunitaria innata.....	22
1.3.3. Respuesta inmunitaria adaptativa	26
1.3.3.1. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos	27
1.3.3.2. Respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T.....	29
1.4. DESARROLLO DE VACUNAS EXPERIMENTALES FRENTE AL VPPA	32
1.4.1. Antecedentes del laboratorio.	35
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.....	51
3.1.1. Líneas celulares estables.....	51
3.1.2. Líneas celulares primarias.....	51
3.1.2.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	51
3.1.2.2. Macrófagos alveolares porcinos (PAM)	52
3.1.2.3. Fibroblastos de piel porcinos.....	52
3.2. PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS CTL <i>IN SILICO</i> BASADOS EN LA SECUENCIA DE LAS PROTEÍNAS VIRALES: P30, P54 Y SHA	53
3.2.1. Predicción teórica de epítomos CTL en la secuencia de sHAPQ	53
3.2.2. Análisis predictivo de la localización de los péptidos F3 y A6 en la estructura de la HA	53
3.3. OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS PARA INMUNIZACIÓN	54
3.3.1. Obtención de las construcciones pCMV-sHAPQ y pCMV-UbsHAPQ.....	54
3.3.2. Generación de librerías genómicas de expresión (ELI) basadas en el genoma de Ba71V fusionadas a sHA o a Ub	54
3.3.3. Preparación de las vacunas de DNA	59
3.4. CEPAS VIRALES UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS	59
3.4.1. Aislados del VPPA utilizados	59
3.4.2. Titulación del VPPA mediante la técnica de hemadsorción.....	60
3.4.3. Desarrollo de una nueva PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) y titulación del VPPA mediante la misma	60
3.4.3.1. Desarrollo de un estándar para la cuantificación del VPPA mediante RT-qPCR.....	60
3.4.3.2. Reacción de RT- qPCR para la cuantificación del VPPA	61

3.5. INFECCIONES <i>IN VIVO</i>	62
3.5.1. Ensayos de infección <i>in vivo</i>	62
3.5.2. Seguimiento clínico de la PPA	65
3.6. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	65
3.6.1. Medición de la respuesta humoral o de anticuerpos específicos	65
3.6.1.1. <i>ELISA para detectar anticuerpos específicos frente al VPPA</i>	65
3.6.1.2. <i>Ensayo de inhibición de la infección del VPPA in vitro</i>	66
3.6.2. Detección de la respuesta celular.....	66
3.6.2.1. <i>ELISPOT para la detección de células específicas secretoras de IFNγ porcino</i>	66
3.6.2.2. <i>ELISA para la medición de factores solubles en suero porcino</i>	68
3.6.2.3. <i>Caracterización por citometría de los fibroblastos de piel y de las poblaciones celulares presentes en PBMC de cerdo</i>	69
3.6.2.4. <i>Transcriptómica diferencial en tejido y sangre</i>	70
3.6.2.5. <i>Proteómica diferencial en linfonodo gastrohepático</i>	73
3.6.2.6. <i>Valoración microscópica de los tejidos mediante la tinción con hematoxilina-eosina y de marcajes inmunohistoquímicos</i>	76
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
4. RESULTADOS.....	81
4.1. IDENTIFICACIÓN Y CAPACIDAD PROTECTORA DE EPÍTOPOS CTL ESPECÍFICOS DE LA HA DEL VPPA.....	83
4.1.1. Identificación de dos epítomos inmunodominantes en la HA.....	84
4.1.2. F3 y A6 estimulan la secreción de IFN γ de una forma dependiente de SLA-I	85
4.1.3. Ensayo de protección utilizando los péptidos F3 y A6	88
4.2. ENSAYOS DE PROTECCIÓN MEDIADA POR LIBRERÍAS GENÓMICAS DE EXPRESIÓN	89
4.2.1. La protección conferida por las ELI depende del modo de presentación de los antígenos vacunales al sistema inmune	90
4.2.2. Caracterización de 7 nuevos antígenos del VPPA con potencial inmunoprotector	93
4.2.3. Ub-ELI _{completa} protege al 60% de los cerdos vacunados, a pesar de la ausencia en la misma de las secuencias que codifican las proteínas virales p30, p54 y sHA	95
4.3. INMUNIZACIÓN DE CERDOS SPF CON VACUNAS DNA	98
4.3.1. El aislado de VPPA atenuado E75CV1 resulta letal para los cerdos SPF.....	98
4.3.2. Confirmación de la capacidad protectora de nuestras vacunas DNA en cerdos SPF .	100
4.3.3. La protección conferida mediante Ub-ELI _{completa} correlacionó con la expansión en sangre de células T-CD8 ⁺ , inmediatamente tras la infección con E75CV1	105
4.3.4. La protección conferida mediante las vacunas DNA en cerdos SPF es independiente de la inducción de anticuerpos y correlaciona con la inducción de una respuesta T-específica	108
4.4. UTILIZACIÓN DE UN VIRUS ATENUADO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN PROTECCIÓN FRENTE A LA PPA	110
4.4.1. Establecimiento de la dosis óptima de E75CV1 para la inmunización de cerdos convencionales.....	110
4.4.2. El aislado atenuado E75CV1 protege frente a la infección con el virus homólogo virulento E75L, pero no frente al virus virulento Ba71L.....	114
4.4.3. Comparación de la respuesta inmunitaria desarrollada tras la infección con E75L en animales inmunizados y no inmunizados con el aislado E75CV1: de la patogenia a la protección	117
4.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOPATOGENIA PROVOCADA POR DOS CEPAS DEL VPPA HOMÓLOGAS: E75L VIRULENTE Y E75CV1 ATENUADA.....	122

4.5.1. Cinética diferencial de la presencia de virus en sangre e hisopos nasales tras la infección con E75L y E75CV1	122
4.5.2. Elección del linfonodo gastrohepático como órgano diana para los estudios de inmunopatogenia comparada	125
4.5.3. Análisis comparativo de la expresión diferencial de genes relacionados con el sistema inmunológico en linfonodo gastrohepático de cerdos infectados con E75L o con E75CV1 .	130
4.5.4. Análisis comparativo de la expresión génica y proteica diferencial de factores relacionados con el sistema inmunológico en sangre de cerdos infectados con E75L o con E75CV1.....	134
4.5.5. Análisis comparativo global de la expresión diferencial de genes y proteínas en linfonodo-gastrohepático tras la infección con E75L o E75CV1	140
5. DISCUSIÓN	147
6. CONCLUSIONES	171
7. ANEXOS	177
8. BIBLIOGRAFÍA.....	185

RESUMEN

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad hemorrágica altamente infecciosa que afecta tanto a suidos salvajes como domésticos y a las garrapatas del género *Ornithodoros*, causando verdaderos estragos en la producción porcina en los países afectados. El agente causal de la enfermedad, el virus de la peste porcina africana (VPPA), es extremadamente complejo. A día de hoy, no existe una vacuna eficaz contra el VPPA, por lo que su erradicación depende de un diagnóstico rápido de la enfermedad acompañado del sacrificio de los animales infectados y/o expuestos al virus. Asimismo, existe un gran desconocimiento tanto sobre los mecanismos de protección implicados frente al VPPA, como respecto a los antígenos del virus potencialmente protectores, lo que dificulta aún más el desarrollo de estrategias vacunales efectivas.

Así pues, dos fueron los principales objetivos de este trabajo. Primero, el desarrollo de nuevas estrategias vacunales frente a la PPA, caracterizando tanto el grado de protección alcanzado como los mecanismos y antígenos implicados en la misma. Segundo, la propuesta de un modelo de protección homóloga con virus atenuado que permitiera profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados tanto en protección como en inmunopatogenia.

Los principales logros alcanzados se pueden resumir en: i) la caracterización, por primera vez en el caso del VPPA, de dos epítomos T-CD8⁺ con capacidad protectora, ambos localizados en la HA del virus; ii) la demostración del enorme potencial de la estrategia ELI utilizada, diseñada expresamente para optimizar una respuesta T-CD8⁺ específica, revelando su utilidad tanto para obtener niveles de protección nunca antes alcanzados con vacunas DNA, como para caracterizar nuevos antígenos virales capaces de estimular una respuesta T-CD8⁺ protectora; y iii) la puesta a punto de un modelo de protección homóloga utilizando un virus atenuado que ha permitido ratificar la relevancia de la respuesta celular en protección, arrojando nueva luz sobre los mecanismos implicados tanto en protección como en la inmunopatogenia asociada a la infección con cepas altamente virulentas.

Estamos convencidos de que los avances obtenidos durante esta Tesis Doctoral facilitarán el diseño más racional de futuras vacunas frente a la PPA.

RESUM

La pesta porcina africana (PPA) es una malaltia hemorràgica altament infecciosa que afecta tant a suïds salvatges com domèstics i a les paparres del gènere *Ornithodoros*, causant importants pèrdues en la producció porcina dels països afectats. L'agent causal de la malaltia, el virus de la pesta porcina africana (VPPA), es extremadament complexe. A dia d'avui, no existeix una vacuna eficaç contra el VPPA, així doncs, la seva erradicació es basa en un diagnòstic ràpid de la malaltia seguit del sacrifici dels animals infectats i/o exposats al virus. De la mateixa manera, existeix un gran desconeixement tant sobre els mecanismes de protecció implicats enfront al VPPA, com respecte als antígens del virus potencialment protectors, el que dificulta encara més el desenvolupament d'estratègies vacunals efectives.

Així doncs, els principals objectius del present treball de Tesis van ser. Primer, el desenvolupament de noves estratègies vacunals front la PPA, caracteritzant tant el grau de protecció assolit com els mecanismes i antígens implicats en la mateixa. Segon, la proposta d'un model de protecció homòloga amb virus atenuat que permetés profunditzar en el coneixement dels mecanismes implicats tant en protecció com en immunopatogenia.

Els principals èxits assolits es poden reumir en: i) la caracterització, per primer cop en el cas del VPPA, de dos epítops T-CD8⁺ amb capacitat protectora, ambdós localitzats a la HA del virus; ii) la demostració de l'enorme potencial de l'estratègia ELI, dissenyada expressament per a optimitzar una resposta T-CD8⁺ específica, tot evidenciant la seva utilitat tant per obtenir nivells de protecció mai abans assolits amb vacunes DNA, com per caracteritzar nous antígens del virus amb capacitat d'estimular una resposta T-CD8⁺ protectora; i iii) la posta a punt d'un model de protecció homòloga utilitzant un virus atenuat que ha permès ratificar la rellevància de la resposta cel·lular en protecció, abocant nova llum sobre els mecanismes implicats tant en protecció com en immunopatogenia associada a la infecció amb soques altament virulentes.

Estem convençuts de que els avenços obtinguts al llarg de la present Tesis Doctoral facilitaran un disseny més racional de futures vacunes enfront de la PPA.

SUMMARY

African swine fever (ASF) is a fatal highly-infectious hemorrhagic disease which affects domestic and wild pigs and ticks from genus *Ornithodoros*. ASF has a devastating effect on porcine production and, in consequence, causes major economic impact on the affected countries. The causal agent of the disease, African swine fever virus (ASFV), is an extremely complex virus and, unfortunately, there is no effective vaccine available against it. Consequently, ASF-eradication relies on its rapid diagnostic and the culling of the infected or exposed pigs. Little is known about both the mechanisms of protection against ASFV and the potentially protective-viral antigens. Due to such facts, the development of effective vacunal strategies is even tougher.

Two were the main objectives of the present study: On one hand, to develop new vacunal strategies against ASF, characterizing both the degree of protection achieved and the mechanisms and antigens involved in such protection. And, on the other hand, the proposal of a homologue protection-model by means of the use of an attenuated viral strain, allowing us to go in depth in the mechanisms implicated in protection and immunopathogenesis.

The main findings can be summarized in: i) the characterization, for the first time in the case of ASFV, of two CD8⁺-protective epitopes, located in the viral HA; ii) the statement of the huge potential of a random ASFV-genome based ELI-strategy designed to optimize a CD8⁺-specific response, such strategy has allowed us to obtain the higher levels of protection achieved using DNA-vaccines and to characterize new viral antigenic determinants able to stimulate a CD8⁺-protective response; and iii) the optimization of a homologue protection-model via an attenuated viral strain, which has allowed us to ratify the relevance of the cell-response in the achieved protection, elucidating the mechanisms implicated in protection and immunopathogenesis associated with the infection with highly pathogenic strains.

We are convinced that the obtained findings presented in the present Ph.D. Thesis will facilitate the design of more rational vaccines against ASF.

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos

ABC: complejo avidina biotina (del inglés *Avidin Biotin Complex*)

Ac: anticuerpos

ADCC: citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (del inglés *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*)

ATCC: colección americana de cultivos tipo (del inglés *American Type Culture Collection*)

APC: aloficocianina (del inglés *allophycocyanin*)

bp: pares de bases (del inglés *base pairs*)

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés *Bovine Serum Albumina*)

CDAC: citotoxicidad mediada por anticuerpos dependiente del complemento (del inglés *Complement Dependent Antibody mediated Cytotoxicity*)

cDNA: ADN complementario (del inglés *complementary DNA*)

CID: Coagulación Intravascular Diseminada

CMV: citomegalovirus humano

CPA: Células Presentadoras de Antígeno

CS: Células Secretoras

CTL: linfocitos T citotóxicos (del inglés *Cytotoxic T Lymphocytes*)

CV1: fibroblastos de riñón de mono verde

DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés *deoxyribonucleic acid*)

DO: densidad óptica

dpi: días post-infección

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilendiaminotetracético (del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)

ELI: inmunización con librería de expresión (del inglés *Expression Library Immunization*)

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (del inglés *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

ELISPOT: ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzima (del inglés *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Spot assay*)

ER: retículo endoplasmático (del inglés *Endoplasmic Reticulum*)

FB: fibroblastos

FCS: suero fetal bovino (del inglés *Fetal Calf Serum*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*)

GEC: copias equivalentes del genoma (del inglés *Genome Equivalent Copies*)

HA: hemaglutinina

HN: hisopo nasal

HPRT: transferasa de hipoxantina-guanina fosforibosilada (del inglés *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IEF: isoelectroenfoque

IFA: test de anticuerpos de fluorescencia indirecta (del inglés *Indirect Fluorescent Antibody test*)

IFD: Inmunofluorescencia Directa

IFN: interferón

IL: interleuquina

LB: medio de cultivo de Luria Bertani

LN-GH: Linfonodo-Gastrohepático

MGF: familias multigénicas (del inglés *multigenic families*)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility Complex*)

mRNA: ARN mensajero (del inglés *messenger RNA*)

NCLDV: virus núcleo-citoplasmáticos de ADN grandes (del inglés *NucleoCytoplasmic Large DNA Virus*)

NK: células naturalmente asesinas (del inglés *Natural Killer*)

NfκB: factor nuclear kappa B (del inglés *Nuclear Factor kappa B*)

- NFAT: factor nuclear de células T-activadas (del inglés *Nuclear Factor of Activated T-cells*)
- OIE: organización mundial de sanidad animal (del francés *Office International des Epizooties*)
- ORF: fase de lectura abierta (del inglés *Open Reading Frame*)
- PAM: macrófagos alveolares porcinos (del inglés *Porcine Alveolar Macrophages*)
- PBMC: células mononucleares de sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PBS: tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- pCMV: vector comercial para expresar genes en sistemas eucariotas bajo el control del promotor del citomegalovirus
- PDE: Proteína Diferencialmente Expresada
- PE: R-Ficoeritrina (del inglés *R-Phycoerythrin*)
- PHA: fitohemaglutinina (del inglés *Phytohemagglutinin*)
- pi: post-infección
- piA: post infección con virus atenuado (solo en el caso de inmunización con virus atenuado y posterior infección con cepas virulentas del VPPA)
- piV: post-infección con virus virulento (solo en el caso de inmunización con virus atenuado y posterior infección con cepas virulentas del VPPA)
- PMSF: fenilmetilsulfonilfluorido (del inglés *phenylmethylsulfonylfluoride*)
- PPA: Peste Porcina Africana
- PPC: Peste Porcina Clásica
- PRR: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern Recognition Receptors*)
- RNA: ácido ribonucleico (del inglés *ribonucleic acid*)
- RPMI: medio de cultivo del *Roswell Park Memorial Institute*
- RRT-qPCR: PCR a tiempo real para la cuantificación relativa
- RT: retrotranscripción
- RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

sCD163: fracción soluble del receptor celular de monocitos/macrófagos CD163

SHA: dominio extracelular de la hemaglutinina

SLA: antígenos leucocitario porcino (del inglés *Swine Leukocyte Antigen*)

SPF: libre de patógenos específicos (del inglés *Specific Pathogen Free*)

SPK: proteína quinasa de la serina (del inglés *Serine Protein Kinase*)

TAP: transportador asociado al procesamiento antigénico (del inglés *Transporter associated with Antigen Processing*)

TGF: factor de crecimiento transformante (del inglés *Transforming Growth Factor*)

TIR: repeticiones terminales invertidas (del inglés *Terminal Inverted Repetitions*)

TLR: transportador tipo Toll (del inglés *Toll Like Receptor*)

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (del inglés *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*)

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor*)

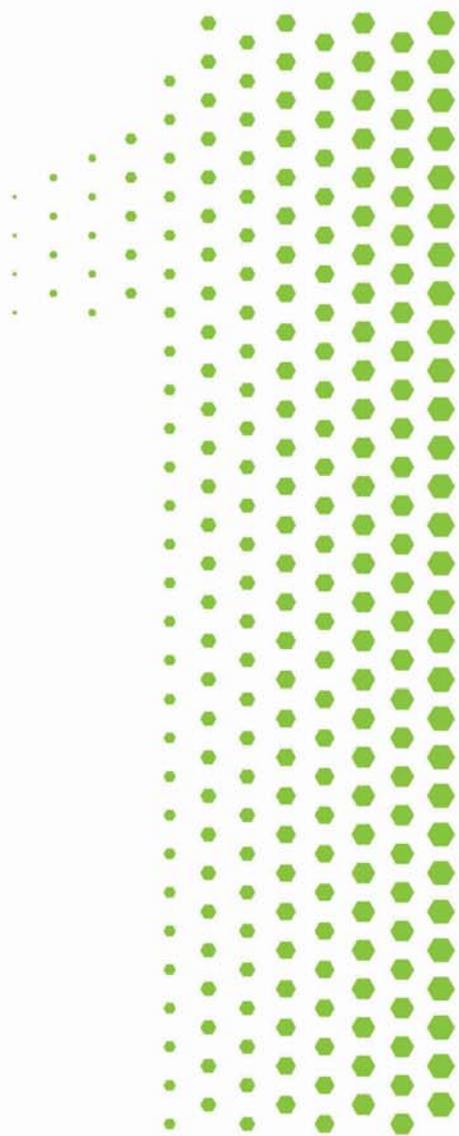
Ub: monómero de ubiquitina

UHA: unidades hemaglutinantes

Vero: células epiteliales de riñón de mono verde

VFA: Virus de la Fiebre Aftosa

VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana



INTRODUCCIÓN

"Quién nace lechón, muere cochino"

1.1. La enfermedad: Peste Porcina Africana (PPA)

1.1.1. Breve historia y estado actual de la enfermedad

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad hemorrágica altamente infecciosa que afecta tanto a suidos domésticos como salvajes. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la integra dentro del capítulo de enfermedades de declaración obligatoria debido al impacto devastador que tiene, tanto a nivel sanitario como socioeconómico, en los países a los que afecta (capítulo 1.1- Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos).

La PPA fue descrita por primera vez en Kenia (Montgomery, 1921) tras la aparición de brotes de una enfermedad hemorrágica, hasta ese momento desconocida, registrados en 1910 y 1915. Esta enfermedad, que afectaba a cerdos domésticos europeos recién introducidos en el continente africano causando una mortalidad cercana al 100%, inicialmente se consideró como una variante de la Peste Porcina Clásica (PPC) debido a la similitud en las lesiones generadas, recibiendo así el nombre de Peste Porcina del Este Africano. Sin embargo, pronto se demostró que cerdos recuperados de la PPC no quedaban protegidos frente al nuevo agente infeccioso. Adicionalmente, se pudo demostrar que los suidos salvajes africanos (*Phacochoerus aethiopicus* y *Potamochoerus porcus*), pese a no sufrir la enfermedad, podían actuar como reservorios (a diferencia de lo que ocurre con la PPC) y, muy probablemente, originaron los primeros brotes en cerdos domésticos (Montgomery, 1921).

En 1932 se aisló por primera vez el agente causal de la enfermedad a partir de cerdos salvajes infectados de forma natural y capturados en las proximidades de granjas de cerdos domésticos infectados por el virus de la PPA (VPPA) (Steyn, 1932). No obstante, la transmisión directa de la enfermedad entre cerdos salvajes y domésticos no se pudo demostrar hasta que se descubrió que las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* podían ser portadoras del virus (De Tray, 1957). Así, dichas garrapatas, se convirtieron en un elemento fundamental en el ciclo selvático de transmisión del virus entre cerdos salvajes y domésticos en África (Heuschele, 1965; Plowright, 1969; Sanchez Botija, 1963).

Inicialmente, la PPA estaba restringida al sud-este africano, hasta que en 1957 se produjo un brote en Portugal, demostrándose que la introducción del virus en Europa se produjo por la alimentación de cerdos domésticos con desechos de comida de aviones procedentes de Angola con destino al aeropuerto de Lisboa. Este primer brote de PPA fue eficientemente controlado y erradicado (Manso Ribeiro, 1958), pero en 1960 surgió un nuevo episodio de la enfermedad que se extendió por toda la Península Ibérica. Estudios recientes discriminan entre los aislados virales que provocaron estos dos brotes y sugieren dos introducciones distintas de la enfermedad desde África (Gallardo *et al.*, 2009). Una vez introducida en España, la PPA se convirtió en una enfermedad endémica y no se consiguió erradicar hasta 1995, suponiendo graves consecuencias económicas para la industria porcina. A diferencia de los brotes descritos en África, donde la enfermedad se presentaba de forma aguda, en la Península Ibérica evolucionó a formas subagudas y crónicas, indicando la tendencia del virus a adaptarse al nuevo huésped (Pan *et al.*, 1988; Sharman, 1971), dificultando su identificación y correcta erradicación (Kleiboeker, 2002).

Durante los años setenta y ochenta, la PPA se extendió desde la Península Ibérica a toda Europa, incluyendo Malta, Italia, Francia, Bélgica y Holanda; y también por el continente americano, comprendiendo Cuba, República Dominicana, Haití y Brasil, siendo erradicada en todos estos lugares, con la excepción de la isla de Cerdeña, donde permanece endémica desde su introducción en 1982. En todos estos casos, el programa de erradicación consistió en el sacrificio masivo de los animales infectados o potencialmente expuestos, política que implicaba grandes pérdidas económicas en los países afectados. Más recientemente, en el África subsahariana se registró un aumento de brotes de PPA entre los años 1990 y 2000, afectando no sólo al área sud-este, si no migrando además hacia países del oeste del continente, incluyendo Costa de Marfil, Nigeria, Togo, Ghana, Burkina Faso, Chad; e incluso llegando a las islas de Madagascar y Mauricio (OIE, 2011). En 2007 el virus reapareció en Europa a través de Georgia y desde ese momento ha estado en continua expansión por el Cáucaso. La cepa que provocó el primer brote de PPA en Georgia resultó ser muy cercana filogenéticamente a un aislado de VPPA

circulante en aquel momento en Mozambique, Madagascar y Zambia (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008; Rowlands *et al.*, 2008) y es muy probable que el origen del brote residiera en productos porcinos contaminados con el virus transportados en barco, que se utilizaron para la alimentación de cerdos en granjas cerca de Poti (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008). Diferentes factores adversos hacen que la erradicación de esta enfermedad en el Cáucaso sea difícil, como son que el virus sea capaz de infectar a cerdos salvajes, el régimen de alimentación de cerdos de granja (basado en restos cárnicos de cerdo infectados), la ausencia de controles veterinarios estrictos, el gran volumen de comercio porcino ilegal y la ausencia de infraestructuras para la producción cárnica adecuadas. Todos estos factores de riesgo, sumados a la falta de coordinación internacional y de un programa de control y erradicación adecuado, han facilitado que el virus se haya expandido hasta zonas limítrofes con la Unión Europea (OIE, 2011), lo que a su vez hace que el peligro de expansión del VPPA al resto de Europa sea considerado como alto (Wieland *et al.*, 2011).

La PPA tiene un gran impacto socioeconómico tanto en países donde es endémica como en los de nueva introducción debido a la ausencia de tratamiento o vacuna eficaces (figura 1).

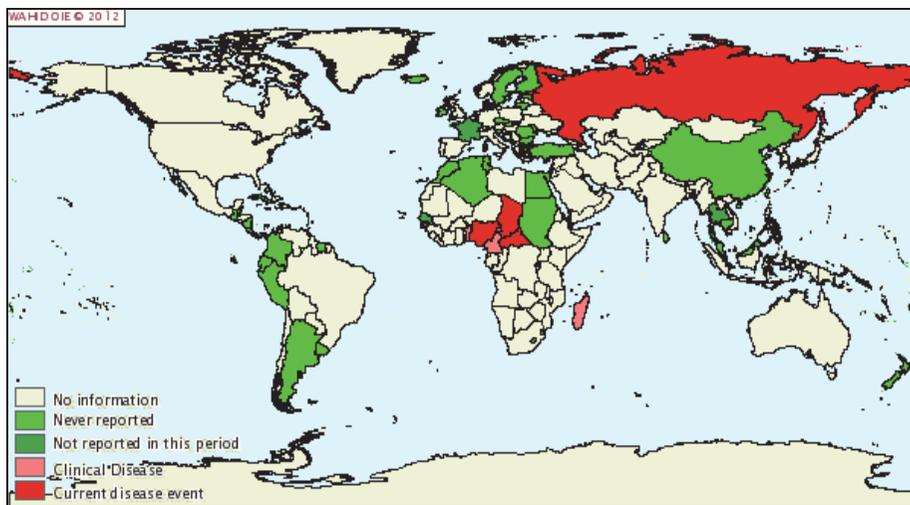


Figura 1. Mapa actual de la distribución mundial de la PPA.

(http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap)

En los países endémicos del África subsahariana el coste más alto de la PPA no se produce en las grandes industrias porcinas, sino en las pequeñas granjas de los campesinos debido a la falta de sistemas de compensación por parte de los gobiernos y a la escasez de controles efectivos (Edelsten and Chinombo, 1995). Así, gran parte de la población, sobretodo en áreas donde la producción bovina es complicada, pierde la fuente principal de proteínas de su dieta. Fuera de África, el mayor impacto provocado por la PPA reside en la pérdida del estatus de las marcas porcinas y en las medidas drásticas que se deben tomar para erradicar la enfermedad, incluyendo el sacrificio masivo de los animales.

1.1.2. Epidemiología de la PPA

El huésped natural del VPPA son los cerdos salvajes africanos (*Phacochoerus aethiopicus*, *Potamochoerus porcus*, *Potamochoerus larvatus* e *Hylochoerus meinertzageni*) y las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*, entre los que el virus circula de forma inaparente. Sin embargo, tanto los cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) como los jabalíes (*Sus scrofa ferus*) son altamente susceptibles a la enfermedad.

En el este y sur del continente africano la enfermedad es endémica en muchos países y el virus se mantiene en un ciclo selvático entre los cerdos salvajes arriba mencionados y las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*, a los que está perfectamente adaptado. Los suidos salvajes africanos pueden estar infectados por el virus de por vida sin mostrar signos de la enfermedad. Pese a ello, tanto la transmisión directa entre estos animales (vertical y horizontal), como la transmisión directa de cerdo salvaje a cerdo doméstico se consideran altamente infrecuentes (Anderson *et al.*, 1998; Heuschele and Coggins, 1969), considerando que son las garrapatas *O. moubata* y *O. sonrai* (Vial *et al.*, 2007) las que juegan un papel fundamental en el ciclo. En las madrigueras, la transmisión del virus se da continuamente entre las garrapatas y los cerdos salvajes neonatos, los cuales desarrollan altos niveles de viremia, suficientes para infectar a las garrapatas libres de virus que, a su vez, se alimentan de ellos (Thomson *et al.*, 1980). La relevancia epidemiológica de la garrapata viene avalada por la enorme capacidad de estos

artrópodos de amplificar el virus exponencialmente (Basto *et al.*, 2006; Kleiboeker *et al.*, 1998) y de transmitirse transtadial (entre los estadios de pupa-larva-adulto), transovarial y sexualmente dentro de la misma especie (Parker *et al.*, 1969; Plowright *et al.*, 1974; Rennie *et al.*, 2001), pudiéndose mantener el virus sin necesidad del suido. Dentro de este ciclo selvático, ocasionalmente el virus salta al cerdo doméstico donde provoca verdaderos estragos socioeconómicos.

En los países libres de la enfermedad, ésta ha irrumpido históricamente del mismo modo, a raíz de la alimentación de cerdos domésticos con restos de comida y productos cárnicos contaminados con virus infeccioso procedente de países con PPA (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008; Manso Ribeiro, 1958). A esto hay que añadir que el virus es muy resistente a la inactivación tanto por agentes físicos como químicos pudiendo persistir en alimentos congelados, mal cocinados o curados durante largos períodos de tiempo (Farez and Morley, 1997; McKercher *et al.*, 1978; Montgomery, 1921; Plowright and Parker, 1967). Una vez introducida la enfermedad en una región en la que no existe ciclo selvático entre los cerdos salvajes, garrapatas y cerdo doméstico, la principal vía de transmisión es el contacto directo entre cerdos domésticos infectados y no infectados (Costard *et al.*, 2009). De todos modos, la presencia en la región de cerdos salvajes altamente susceptibles a la enfermedad o de garrapatas del género *Ornithodoros*, en las que el virus puede persistir incluso años (incluso si las garrapatas no se alimentan), también son factores de riesgo a tener en cuenta (Oleaga-Perez *et al.*, 1990; Sanchez Botija, 1963). Este es uno de los factores que dificultó la erradicación de la enfermedad en la Península Ibérica y, muy probablemente, fue la causa del último brote registrado en Portugal en 1999 (Basto *et al.*, 2006; Boinas *et al.*, 2011).

En los territorios afectados de PPA, la enfermedad puede evolucionar hacia formas subagudas y crónicas. En estos casos, la presencia de animales persistentemente infectados que no muestran signos clínicos de la enfermedad, pero que excretan continuamente virus al medio ambiente, son de gran importancia en la propagación y diseminación de la enfermedad dificultando su erradicación. De hecho, este pareció ser

uno de los factores clave que dificultó la erradicación de la PPA en la Península Ibérica (Pan *et al.*, 1988; Sharman, 1971).

1.1.3. Patogenia de la PPA

Aún a riesgo de resultar redundante, los huéspedes naturales del VPPA son los cerdos salvajes africanos y las garrapatas del género *Ornithodoros* en los que causa infecciones persistentes pero en los que no se aprecian signos clínicos de la enfermedad (Heuschele and Coggins, 1969; Plowright, 1969). No obstante, se ha demostrado que las garrapatas infectadas con el VPPA tienen una tasa de mortalidad más elevada que las no infectadas (Hess *et al.*, 1989). En el caso de los cerdos salvajes africanos, resistentes a la enfermedad, solo se ha observado una ligera leucopenia en linfonodo, afectando más a los folículos que a la zona difusa, pero, en cualquier caso, no dando lugar a la patogenia que se observa en cerdos domésticos (Oura *et al.*, 1998a).

En el caso del cerdo doméstico o el jabalí la enfermedad se presenta en un amplio rango de formas clínicas, desde formas hiperagudas o agudas, en las que la mortalidad es cercana al 100%, hasta formas subclínicas (mortalidad del 30-60%) o inaparentes, dependiendo del aislado viral, la ruta de exposición, la dosis recibida y el estado del receptor (Kleiboeker, 2002). En todas sus formas, la morbilidad de la PPA es elevada, debido a la naturaleza altamente contagiosa del virus (Kleiboeker, 2002).

En las formas hiperagudas, causadas por aislados muy virulentos, se puede reducir el curso de la infección hasta tan solo 2-4 días, muriendo los animales sin haber presentado signos clínicos, excepto la presencia de un pico de fiebre (Konno *et al.*, 1972; Mebus and Dardiri, 1979). El periodo de incubación de las formas agudas y subagudas de la PPA varía entre 5-7 días, momento en el que aparecen los primeros signos clínicos, como anorexia, fiebre, hemorragias nasales, eritemas cutáneos, cianosis, diarrea y disnea (Kleiboeker, 2002). Este periodo de incubación se puede ver reducido según la vía de introducción del virus, por ejemplo la entrada de virus por la vía oro-nasal puede reducir en dos días la aparición de los primeros signos (Mebus, 1988). En la forma aguda de la enfermedad, la muerte del animal suele ocurrir entre 12-14 días tras la infección y las lesiones

macroscópicas más características son: edema pulmonar, esplenomegalia hemorrágica, hipertrofia y hemorragia en linfonodos y petequias en riñones (Carrasco *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 1996a; Mebus, 1988). En la forma subaguda, las lesiones son similares pero menos severas y la muerte suele ocurrir entre los 15-20 días tras la infección (Mebus, 1988).

La forma crónica de la enfermedad se produce por infección con aislados de baja virulencia, que no causan apenas mortalidad. De este modo, los animales pueden permanecer infectados siendo portadores del virus durante largos periodos de tiempo, excretando virus al medio ambiente de forma continua (Leitao *et al.*, 2001; Villeda *et al.*, 1993b; Wilkinson *et al.*, 1981). En este caso, los signos clínicos se limitan al sistema respiratorio, lo que dificulta el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad (Mebus, 1988). Las lesiones habituales son: pleuritis fibrinosa, adhesiones pleurales, neumonía e hiperplasia de los tejidos linforeticulares, aunque también es común encontrar pericarditis fibrinosa y necrosis en la piel (Leitao *et al.*, 2001; Moulton and Coggins, 1968; Moulton *et al.*, 1975).

La teoría más aceptada para explicar la patogenia hemorrágica de la PPA aguda reside en la interacción entre el virus y las células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos/macrófagos y células dendríticas), que son la diana principal de replicación del virus y el elemento clave para su diseminación por todo el organismo (Colgrove *et al.*, 1969; Fernandez *et al.*, 1992a; Gregg *et al.*, 1995; Mebus, 1988; Sanchez-Torres *et al.*, 2003). Una vez el aislado virulento infecta a monocitos y macrófagos se activa una cascada de señalización que culmina con la liberación de factores solubles (Carrasco *et al.*, 2002; Gomez-Villamandos *et al.*, 1998; Gomez del Moral *et al.*, 1999; Salguero *et al.*, 2002; Salguero *et al.*, 2005) que, a su vez, produce dos efectos devastadores: el daño irreparable en las células endoteliales vasculares y la apoptosis masiva de células infectadas y de linfocitos no infectados. El daño en las células endoteliales contribuye a aumentar la permeabilidad vascular y a provocar alteraciones de la hemostasia. En consecuencia, se produce una coagulación intravascular diseminada (CID) que conlleva al consumo de factores de coagulación y plaquetas y la activación de la fibrinólisis, dando

lugar a hemorragias generalizadas (Gomez-Villamandos *et al.*, 1996; Schiefer and Searcy, 1975; Villeda *et al.*, 1995; Villeda *et al.*, 1993a; Villeda *et al.*, 1993b). Por otro lado, la apoptosis masiva de células infectadas y de linfocitos no infectados causa la destrucción de los órganos linfoides (los más afectados son el bazo y los linfonodos renal y gastrohepático), lo que contribuye a la patología hemorrágica. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el área con apoptosis más extensa es el tejido linfoide difuso, donde se encuentra una gran densidad de macrófagos infiltrados (Carrasco *et al.*, 1996a; Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Oura *et al.*, 1998b; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996). Este tipo de apoptosis inducida de células no infectadas, llamada *by-stander*, no es exclusiva del VPPA. De igual modo, el virus de la inmunodeficiencia humana (Lu *et al.*, 1994), el virus de la anemia del pollo (Jeurissen *et al.*, 1992), el herpesvirus bovino tipo I (Griebel *et al.*, 1990) y el virus del herpes simplex tipo I (Ito *et al.*, 1997), entre otros, también provocan este efecto.

Otro efecto provocado por la infección con el VPPA, es la activación de la hematopoyesis, hecho que tiene connotaciones positivas y negativas. Positivas, evitando una profunda trombocitopenia al inicio de la infección al activar la proliferación de megacariocitos; y negativa, al estimular la proliferación de neutrófilos, sensibles a la infección y potenciales diseminadores del virus (Carrasco *et al.*, 1996b; Gomez-Villamandos *et al.*, 1997; Karalyan *et al.*, 2012a). Esta alteración de la hematopoyesis induce al aumento de formas celulares inmaduras y linfocitos atípicos en el torrente sanguíneo (Karalyan *et al.*, 2012a). En fases tardías de la infección, el virus también es capaz de infectar y replicar en otros tipos celulares, tales como células endoteliales (Edwards *et al.*, 1984; Fernandez *et al.*, 1992a; Sierra *et al.*, 1989; Vallee *et al.*, 2001), megacariocitos (Edwards *et al.*, 1984; Gomez-Villamandos *et al.*, 1998), plaquetas (Gomez-Villamandos *et al.*, 1996), neutrófilos (Carrasco *et al.*, 1996b), fibroblastos (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995) y hepatocitos (Sanchez-Cordon *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 1987).

En las infecciones con aislados menos virulentos, en las que se desarrolla PPA subaguda, no se observa daño endotelial ni CID, asociándose la presencia de hemorragias a una intensa vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular (Kleiboeker, 2002;

Mebus, 1988). Con aislados muy atenuados no se observa apoptosis en órganos linfoides sino cierta proliferación celular (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997), sobretodo de células B, pudiendo llegar a provocar una hipergammaglobulinemia (De Boer *et al.*, 1972; Leitao *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 1970). En estos casos, las lesiones típicamente encontradas obedecen a la formación de inmunocomplejos (Fernandez *et al.*, 1992b).

1.1.4. Diagnóstico de la PPA

Debido a la ausencia de una vacuna eficaz frente a la PPA, las campañas de erradicación han tenido que sostenerse en medidas sanitarias y de control estrictas y en un diagnóstico diferencial rápido de los brotes, seguido del sacrificio masivo de los animales infectados o potencialmente expuestos (Kleiboeker, 2002). Dichas medidas son del todo imposibles de aplicar en las zonas tradicionalmente endémicas, principalmente del África subsahariana, donde se vive en situación de extrema pobreza.

Cuando aparece la sospecha de un brote de PPA aguda, el primer procedimiento que se adopta es la realización de la necropsia de los animales afectados en busca de las lesiones típicas de la enfermedad en su forma aguda, tales como edema pulmonar, esplenomegalia hemorrágica, hipertrofia, hemorragia en linfonodos y petequias en riñones (Carrasco *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 1996a; Mebus, 1988). Estas lesiones son fácilmente confundibles con otras enfermedades hemorrágicas como la PPC o septicemias bacterianas (OIE, 2012). El diagnóstico de las formas crónicas de la PPA resulta más complicado al no poderse diagnosticar a través de lesiones macroscópicas en los tejidos, debiéndose recurrir al diagnóstico en el laboratorio (Kleiboeker, 2002).

En países libres de la enfermedad o en zonas enzoóticas con brotes esporádicos, el aislamiento del virus resulta esencial tanto para el diagnóstico como para caracterizar epidemiológicamente la cepa viral en circulación y así poder establecer las medidas de control pertinentes. El aislamiento del VPPA se consigue gracias a la capacidad del virus de replicar y provocar un efecto citopático claro en cultivos primarios de macrófagos porcinos que, además, puede ser confirmado mediante el test de hemadsorción (HAD), basado en la adherencia de eritrocitos a las células infectadas (Malmquist and Hay,

1960). No obstante, no todos los VPPA son hemadsorbentes, teniendo que recurrir a la detección de antígenos virales o del genoma del virus. En estos casos, se realiza un análisis por inmunofluorescencia directa (IFD) sobre los tejidos afectados para la detección de antígenos virales (Bool *et al.*, 1969) o bien el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto convencional como a tiempo real, para la detección de DNA viral (Aguero *et al.*, 2003; Aguero *et al.*, 2004; King *et al.*, 2003; Ronish *et al.*, 2011). Esta última técnica es muy sensible y permite detectar DNA viral en estadios muy tempranos de la infección y también en infecciones crónicas, donde la IFD pierde mucha sensibilidad debido a los inmunocomplejos que se forman en los tejidos en este tipo de infecciones (Sanchez-Vizcaino, 2006), además de permitir la secuenciación del material genético amplificado y su clasificación filogenética.

En los países donde la PPA es endémica entre los cerdos domésticos, con casos de enfermedad crónica o inaparente, el método más efectivo de diagnosis es el análisis serológico mediante ELISA (Escribano *et al.*, 1989; Gallardo *et al.*, 2006; Pastor *et al.*, 1990), *immunoblotting* (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1989) o IFA (Pan *et al.*, 1974), para la detección de anticuerpos específicos frente al virus. Estos análisis tienen el inconveniente de no ser útiles para detectar infecciones recientes, cuando el animal todavía no ha podido generar anticuerpos específicos, aunque han resultado esenciales en los casos históricamente más exitosos de erradicación de la enfermedad, como ocurrió a mediados de los años noventa en la Península Ibérica, donde prácticamente las formas predominantes de la enfermedad eran subagudas (Pastor *et al.*, 1992; Pastor *et al.*, 1990).

Existen muchas otras técnicas de diagnóstico de la PPA, pero nos hemos basado en las que han sido validadas por la OIE (Capítulo 2.8.1: *African swine fever*, de la última edición del OIE: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*).

1.2. El virus de la peste porcina africana (VPPA)

El VPPA es el único miembro de la familia *Asfarviridae*, del género *Asfavirus* (Dixon *et al.*, 2000; Salas, 1999). Es un virus grande, icosaédrico, con envuelta y con un genoma de doble cadena de DNA, siendo el único *Arbovirus* conocido con DNA como material genético. El VPPA comparte algunas características genéticas con otras familias de virus de DNA grandes, capaces de replicar, al menos parcialmente, en el citoplasma. Se ha propuesto que estas familias de virus posiblemente compartan un antecesor común, formando una superfamilia de virus de DNA grandes núcleo-citoplasmáticos (NCLDV), en la que se incluyeron también las familias *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* y *Mimiviridae* (Iyer *et al.*, 2006). Un análisis filogenético basado en la secuencia del gen que codifica la DNA polimerasa del VPPA encuadra a *Asfarviridae* como un clado separado entre *Poxviridae* e *Iridoviridae* (Raoult *et al.*, 2004). El VPPA se asemeja estructuralmente a *Iridoviridae* al tener, los viriones, morfología icosaédrica (Carrascosa *et al.*, 1984) y a *Poxviridae* en su organización genética, compartiendo incluso motivos tales como extremos terminales en forma de horquilla y la presencia de repeticiones terminales invertidas (Gonzalez *et al.*, 1986; Ortin *et al.*, 1979; Salas, 1999; Sogo *et al.*, 1984).

1.2.1. Morfología del VPPA

Mediante microscopía electrónica, las partículas virales se observan con una clara simetría icosaédrica compleja formada por múltiples capas concéntricas. En el centro de la partícula se aprecia un núcleo interno que contiene el genoma viral cubierto de una fina capa proteica (Breese and DeBoer, 1966; Carrascosa *et al.*, 1984). Esta estructura central núcleo-proteica mide entre 70 y 100 nm de diámetro y contiene, además del genoma, enzimas y otras proteínas que son empaquetadas en la partícula viral, utilizadas en etapas tempranas de la infección una vez el virus entra en la célula. Entre estas proteínas se ha descrito una RNA polimerasa dependiente de DNA, un enzima encargado del encapuchamiento del RNA mensajero (mRNA) y enzimas de poliadenilación, junto con otros factores requeridos para la transcripción temprana de los genes del VPPA. El centro núcleo-proteico viral se encuentra rodeado por una envuelta lipídica interna cuyo

origen sigue provocando una intensa discusión (Hawes *et al.*, 2008) y sobre la cual se dispone la cápside proteica (Andres *et al.*, 1997). La cápside, formada por entre 1.892 y 2.172 capsómeros, mide entre 170-190 nm de diámetro y posee simetría icosaédrica, asimismo está formada por distintas proteínas, siendo la p72 la mayoritaria (Andres *et al.*, 1997). Finalmente, los viriones extracelulares están rodeados por una envuelta externa que adquieren de la membrana plasmática al salir de la célula (Breese and DeBoer, 1966), alcanzando un diámetro de 175-215 nm (Almeida *et al.*, 1967; Carrascosa *et al.*, 1984; Schloer, 1985) (figura 2).

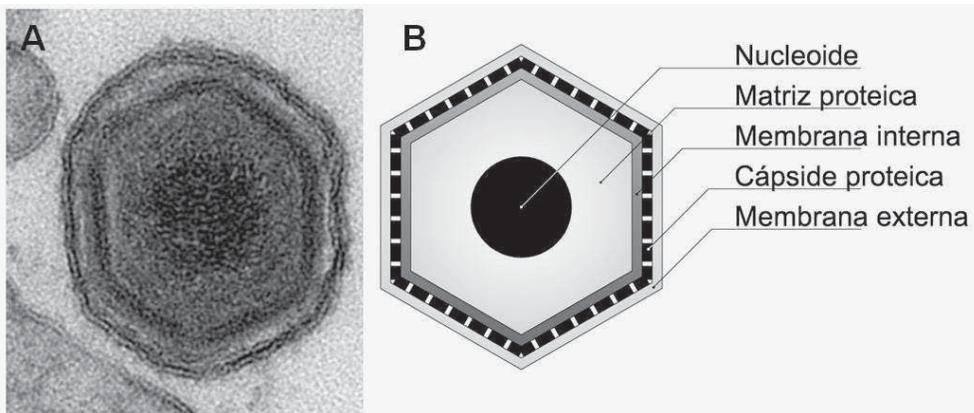


Figura 2. Imagen de un virión extracelular mediante microscopía electrónica (A) y representación esquemática de la estructura del VPPA (B).

1.2.2. Ciclo infeccioso del VPPA

Las principales dianas de replicación del VPPA son los macrófagos porcinos que expresan marcadores celulares característicos de etapas avanzadas de diferenciación. La teoría sobre el sistema de entrada del virus a la célula más aceptada (tanto en macrófagos como en células Vero) describe una introducción mediante uno o varios receptores proteicos, vía endocitosis mediada por receptor (Alcami *et al.*, 1989; Cuesta-Geijo *et al.*, 2012; Hernaez and Alonso, 2010). En cualquier caso, la entrada del VPPA en la célula no se libra de polémica, ya que algunos autores han sugerido una introducción alternativa por fagocitosis (Basta *et al.*, 2010) o, incluso, utilizando un proceso de macropinocitosis (Sanchez *et al.*, 2012b).

Pese a que los receptores de los macrófagos no han sido definitivamente caracterizados, se ha asociado la susceptibilidad de infección por el VPPA con la expresión de los marcadores celulares de superficie SWC9 y CD163, ambos asociados a la maduración de macrófagos (McCullough *et al.*, 1999; Sanchez-Torres *et al.*, 2003), habiéndose postulado este último (un receptor implicado en la endocitosis de complejos de hemoglobina) como un potencial receptor de entrada del virus. En lo que se refiere a las proteínas del virus implicadas en la entrada a la célula, estudios *in vitro* han demostrado que la proteína p12 (pO61R) participa en la entrada en células Vero (Angulo *et al.*, 1993), mientras que las proteínas p54 (pE183L), p72 (pB646L) y p30 (pCP204L) participan en la entrada del virus tanto en células Vero como en macrófagos. Estas proteínas están implicadas en diferentes etapas de entrada, así mientras p54 (pE183L) y p72 (pB646L) parecen implicadas en la unión del virus a la célula, p30 (pCP204L) parece intervenir en la internación del mismo (Angulo *et al.*, 1993; Borca *et al.*, 1994a; Gomez-Puertas *et al.*, 1998), apuntando hacia la existencia de un complejo mecanismo de entrada del virus al macrófago en que muy probablemente participen varias proteínas del virus así como más de un receptor celular.

Aunque a día de hoy no están totalmente esclarecidos los mecanismos infectivos tras la entrada del virus en la célula, comentaremos la teoría más aceptada. El VPPA se desencapsida en compartimentos endocíticos (endosomas tardíos y lisosomas), permitiéndose la liberación del genoma viral al citoplasma celular, probablemente gracias a la fusión de la membrana interna de la partícula viral con la de la vesícula endocítica, de una manera similar a lo descrito para el virus *Vaccinia*. Tras su salida al citoplasma, el genoma viral, acompañado con proteínas estructurales del virus, es transportado por la red de microtúbulos a los puntos de ensamblaje perinucleares, adyacentes al centro organizador de microtúbulos (Heath *et al.*, 2001).

La transcripción de genes virales sigue una regulación temporal similar a *Poxviridae* (Smith and Law, 2004), que empieza con la transcripción de los genes tempranos, inmediatamente tras la entrada del virus, utilizando la RNA polimerasa, el enzima encargado del encapuchamiento del mRNA, enzimas de poliadenilación y factores de

transcripción que se encuentran formando parte del núcleo proteico del virus (Salas, 1999). La expresión de los genes tempranos da lugar a enzimas involucrados con el metabolismo de nucleótidos y la replicación del DNA, así como otros factores necesarios para la expresión de los genes tardíos, que codifican, entre otras, las proteínas estructurales, enzimas y factores que, a su vez, serán empaquetados en el virión.

A pesar de que la teoría más extendida describe al VPPA como un virus exclusivamente citoplasmático, la realidad es que se ha demostrado claramente la existencia de una etapa temprana de replicación en el núcleo (García-Beato *et al.*, 1992; Rojo *et al.*, 1999). La implicación de esta etapa nuclear inicial no está caracterizada al detalle, de todos modos, se conoce que el virus afecta profundamente a la organización nuclear, provocando la reorganización de la lamina, la redistribución de varias proteínas nucleares, así como la defosforilación y la subsiguiente degradación de la RNA polimerasa II, ayudando a entender los mecanismos de *sut-off* celular descritos en infecciones con VPPA (Ballester *et al.*, 2011).

La morfogénesis del virus es un proceso complejo que tiene lugar en las factorías virales perinucleares, cerca del centro organizador de microtúbulos (Heath *et al.*, 2001). Las factorías virales son estructuras intracitoplasmáticas de membrana que el VPPA (y otros muchos virus) utiliza para ensamblar nuevas partículas (Heath *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 1998).

La formación *de novo* de viriones empieza con el reclutamiento de estructuras membranosas procedentes del retículo endoplasmático (ER), proceso en el cual es crucial la presencia de la proteína estructural p54 (pE183L) (Rodríguez *et al.*, 2004), así como probablemente la proteína pXP124L (miembro de la familia multigénica MGF110) (Netherton *et al.*, 2004). Estas membranas del ER modificadas son incorporadas como una envuelta interior en las partículas virales, sobre las que se ensambla la proteína p72 (pB646L), proteína mayoritaria de la cápside, formando la típica estructura icosaédrica del VPPA (Cobbold and Wileman, 1998; García-Escudero *et al.*, 1998). En este proceso de ensamblaje de la proteína p72 (pB646L), otra proteína viral parece jugar un papel fundamental, pB602L, que actuaría como un chaperona (Cobbold *et al.*, 2001), así como

la proteína viral pB438L, necesaria para la formación de los vértices de la estructura icosaédrica (Epifano *et al.*, 2006).

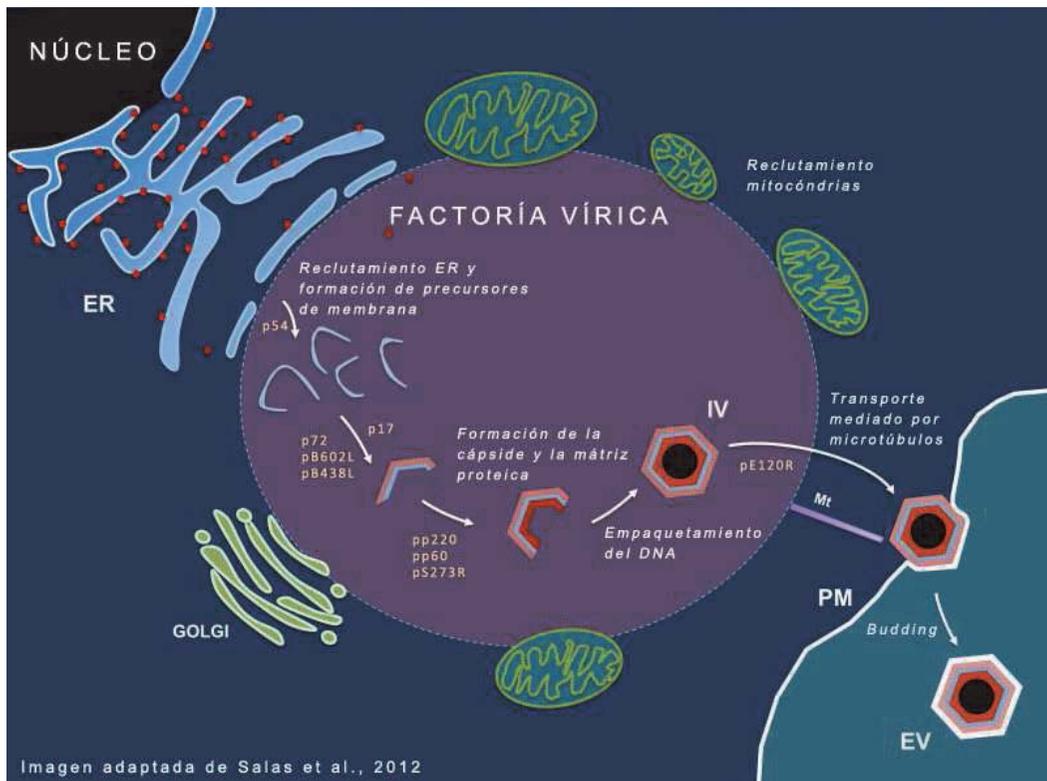


Figura 3. Representación esquemática de la morfogénesis de nuevos viriones de VPPA (Salas and Andres, 2012).

Los componentes mayoritarios del núcleo viral son 6 productos obtenidos del procesamiento de las poliproteínas pp220 (pCP2475L) y pp60 (pCP530R) por parte de la proteasa viral pS273R: p150, p37, p34 y p14 provenientes de pp220 (pCP2475L) y p35 y p15 que provienen de pp60 (pCP530R) (Alejo *et al.*, 2003; Andres *et al.*, 2002a; Andres *et al.*, 2001a; Andres *et al.*, 2002b; Andres *et al.*, 1997; Heath *et al.*, 2003). El último paso en la maduración del virión consiste en la incorporación del genoma a la partícula viral. Dos modelos han sido descritos: en uno de los modelos se propone que los complejos núcleo-proteicos (pronucleoides) se generan en las factorías víricas cerca de las partículas de virus vacías, para después ser encapsidadas en las partículas virales ya ensambladas (Brookes *et al.*, 1996; Brookes *et al.*, 1998); el otro mecanismo propone que el DNA

primero se encapsida, seguramente junto con las nucleoproteínas para, a continuación, condensarse dentro de la partícula viral ya totalmente formada. Dando fuerza a esta hipótesis, experimentos con virus recombinantes que no expresan la poliproteína pp220 (pCP2475L) (Andres *et al.*, 2002b) ni la pp60 (pCP530R) (Suarez *et al.*, 2010) muestran que la incorporación del genoma del virus y las nucleoproteínas p10 (pK78R) y pA104R en la partícula vírica depende del ensamblaje previo del núcleo nucleoproteico. Independientemente del mecanismo, el proceso no es muy eficiente, ya que se pueden observar partículas víricas vacías muy frecuentemente.

Finalmente, para que las partículas víricas salgan de la célula, los viriones deben ser transportados desde las factorías víricas a la membrana plasmática, excepto cuando la célula muere por necrosis o apoptosis, tras lo cual las partículas de virus son liberadas directamente. El movimiento de las partículas virales hasta la membrana plasmática es dependiente de la red de microtúbulos y de la quinasa tipo I (Hernaiz *et al.*, 2006; Jouvenet *et al.*, 2004). De nuevo, la proteína pE120R parece jugar un papel importante en el transporte de los viriones desde la factoría vírica hasta la membrana plasmática, aunque el mecanismo de acción no se conoce totalmente. Durante su salida, el VPPA adquiere una última envuelta lipídica que procede de la membrana externa celular y que no es imprescindible para la infección (Andres *et al.*, 2001b).

1.2.3. Genoma del VPPA

El genoma del VPPA está compuesto por una única molécula de doble cadena de DNA lineal, con los extremos unidos de forma covalente, recordando al genoma de *Poxviridae* (Gonzalez *et al.*, 1986). Cerca de ambos extremos se encuentra una zona rica en repeticiones terminales invertidas (TIR), zona altamente variable entre los diferentes aislados del VPPA (Yanez *et al.*, 1995).

Actualmente se han secuenciado 12 genomas completos del VPPA, procedentes de distintas zonas del globo, aislados en distintos momentos en el tiempo y con grados de virulencia diversos, en los que se han identificado entre 150 y 175 fases de lectura abiertas (ORF) (de Villiers *et al.*, 2010). El primer virus secuenciado fue el aislado Ba71V

(PRJNA15242), adaptado a células Vero y totalmente apatógeno, en el que se han identificado 151 ORF, que codifican unas 50 proteínas estructurales y multitud de enzimas relacionados con la replicación del DNA viral, la transcripción de genes y modificación post-traducciona de proteínas (Yanez *et al.*, 1995), todas ellas reguladas temporalmente a nivel transcripcional por cuatro tipos de promotores distintos que permiten dividir los genes del VPPA en inmediatamente tempranos, tempranos, intermedios y tardíos (Almazan *et al.*, 1992; Almazan *et al.*, 1993; Rodriguez and Salas, 2012; Rodriguez *et al.*, 1996).

A parte de Ba71V, se han secuenciado 11 cepas de VPPA aisladas de campo, 8 de ellas procedentes de África (aisladas de cerdos domésticos o salvajes africanos) y otras 3 europeas: la cepa portuguesa OUR/T88/3, la española E75 (de Villiers *et al.*, 2010) y la georgiana Georgia 2007/1 (Chapman *et al.*, 2011). Confirmando los datos obtenidos con Ba71V, las secuencias de los genomas varían entre 170 y 192 Kbp y están constituidas por una región central muy conservada y dos regiones variables situadas en los extremos. La variación en la longitud existente entre aislados del VPPA se debe principalmente a la pérdida o ganancia de secuencias en estas regiones variables. En dichas regiones se encuentran repeticiones en tándem de secuencias no codificantes y los miembros de las familias multigénicas (MGF), a los que se les atribuye una evolución mediante mecanismos de duplicación y divergencia de secuencias (Almendral *et al.*, 1990; Blasco *et al.*, 1989; Vydellingum *et al.*, 1993; Yozawa *et al.*, 1994), asociándose algunas de ellas con el grado de patogenicidad del VPPA (Afonso *et al.*, 2004; Chapman *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2012; Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 2001).

A pesar de no ser un virus altamente variable (comparado sobretodo con virus RNA), mapeos de restricción y la secuencia de fragmentos de DNA localizados en la región central del genoma (Wesley and Pan, 1982), incluida la secuencia del gen *B646L*, que codifica la proteína mayoritaria de la cápside p72 (pB646L), ha permitido identificar hasta el momento 22 genotipos distintos del VPPA, 21 de los cuales (del II al XXII) pertenecen al este y sur de África. El nivel de diversidad entre los aislados de estas regiones se atribuye a la larga historia evolutiva del virus en esta parte del continente africano, permitiendo la

evolución del virus en los huéspedes salvajes y sugiriendo la existencia de varias introducciones desde el ciclo selvático a la población de cerdos domésticos importados desde Europa (Bastos *et al.*, 2003; Sumption *et al.*, 1990; Wesley and Tuthill, 1984). En claro contraste, la gran homología de secuencia entre los aislados pertenecientes al genotipo I, localizados en el oeste y centro de África, Europa, Caribe y Brasil, obtenidos durante un periodo de 40 años desde 1957, sugieren un único origen (Bastos *et al.*, 2003; Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005).

1.3. Respuesta inmunitaria y evasión del sistema inmune por parte del VPPA

Como sucede con otras enfermedades víricas en las que las principales dianas de replicación del virus son las células del sistema mononuclear fagocítico, el sistema inmunológico del huésped queda directamente afectado tras la infección con el VPPA, viéndose alterada tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Mohamadzadeh *et al.*, 2007). Explotando esta característica, el VPPA dispone de varias proteínas con capacidad para modular la respuesta inmunológica del huésped tras la infección, permitiéndole evadir, en cierta medida, la respuesta inmunitaria. El nivel de alteración del sistema inmune depende en gran medida del grado de virulencia del aislado, observándose una correlación directa entre su patogenicidad y la afectación del mismo (Correia *et al.*, 2012; Dixon *et al.*, 2004).

Desgraciadamente, la dificultad y el desconocimiento existente respecto al sistema inmunitario de los reservorios naturales del virus: cerdos salvajes africanos y garrapatas del género *Ornithodoros*; hace que prácticamente todo el conocimiento obtenido respecto a este tipo de interacciones se deba bien a infecciones experimentales en cerdos domésticos o bien a estudios de infección *in vitro*, con las limitaciones que estos estudios implican.

Aún así y con estas premisas en mente, merece la pena dedicar un capítulo aparte de esta introducción a describir lo que hasta el momento se sabe de las fascinantes

relaciones entre el VPPA y el sistema inmunitario porcino, clave para entender la patogénesis viral y para el futuro diseño de vacunas eficientes frente al virus.

1.3.1. VPPA virulentos y genes implicados en la evasión del sistema inmunitario

Tomando como prototipo viral un virus altamente infeccioso capaz de provocar una forma aguda de PPA, se desarrollan dos fenómenos perfectamente caracterizados: i) el virus infecta monocitos/macrófagos maduros en los que es capaz de replicar provocando la salida de la célula de grandes cantidades de viriones y factores solubles inmunomoduladores al exterior y ii) provocar la apoptosis de células circundantes, principalmente linfocitos T y B no infectados (apoptosis *by-stander*) (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Salguero *et al.*, 2005). Así pues, el virus tiene la capacidad de modular al sistema inmunitario de dos maneras distintas pero complementarias al mismo tiempo, asegurando de este modo la replicación del virus a altísimos niveles sin que el sistema inmunitario pueda impedirlo.

Correspondiendo con esta capacidad dual, los VPPA virulentos han demostrado disponer de una serie de genes que actúan como factores de virulencia ayudando a evadir la respuesta inmunitaria (Dixon *et al.*, 2004). Por un lado, el virus es capaz de modificar la vida media del macrófago infectado mediante la activación de genes implicados en apoptosis, como *A238L*, con actividad pro y anti-apoptótica a diferentes tiempos durante la infección (Dixon *et al.*, 2004), *A179L* (codifica una proteína con gran homología al protooncogen Bcl2) y *A224L* (codifica una proteína con gran homología a la proteína IAP), ambos con demostrada actividad anti-apoptótica (Afonso *et al.*, 1996; Brun *et al.*, 1996; Chacon *et al.*, 1995; Nogal *et al.*, 2001; Revilla *et al.*, 1997) y los genes de las MGF 360 y 530 de los que no se conoce su función específica pero que están claramente implicados en la viabilidad celular (Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 2001). Del mismo modo el VPPA dispone de una batería de genes: *A276L* (MGF360), *A528L* (MGF530), *I329L* y *A238L*, capaces de expresar productos que inhiben la respuesta a IFN de tipo I (Afonso *et al.*, 2004; Correia *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 1996). Cabe recordar que el IFN tipo I es esencial para la defensa inmediata frente a infecciones virales. Otros genes

implicados en la evasión del sistema inmunitario son: *EP402R* (codifica una proteína con gran homología con el antígeno leucocitario CD2), responsable de la unión del virus a los eritrocitos facilitando así su diseminación por el organismo y que parece tener cierta capacidad de inhibir de la linfoproliferación (Borca *et al.*, 1998), *NL (DP71L)* y *UK (DP96R)* cuya delección no afecta a la replicación del virus en cultivos de macrófagos pero sí que reduce la virulencia de algunas cepas del VPPA *in vivo* (Zsak *et al.*, 1998; Zsak *et al.*, 1996) y, nuevamente, *A238L* capaz de modular la respuesta pro-inflamatoria del animal infectado al inhibir la actividad del factor nuclear kappa B (NFkB) y de la fosfatasa de la calcineurina, inhibiéndose en consecuencia, la ruta de señalización del factor nuclear de células T-activadas (NFAT) (Gil *et al.*, 2008; Miskin *et al.*, 2000; Salguero *et al.*, 2008). Como cabía esperar, la eliminación selectiva de ciertos genes implicados en virulencia, provoca la atenuación del virus (Afonso *et al.*, 2004; Borca *et al.*, 1998; Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 1998; Zsak *et al.*, 2001; Zsak *et al.*, 1996), muy probablemente facilitando su reconocimiento y control por parte del sistema inmunológico del animal infectado. En consonancia con estos resultados, se ha podido comprobar que aislados virales naturales, capaces de provocar infecciones subagudas, tenían afectados uno o más de estos genes (Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 1998; Zsak *et al.*, 2001; Zsak *et al.*, 1996). Este fenómeno podría explicar, al menos parcialmente, la patogenia de la infección con virus atenuados que, a pesar de infectar la misma diana que aislados más virulentos de VPPA (el monocito/macrófago porcino) ni provocan la leucopenia característica ni apenas signos clínicos típicos de la enfermedad, permitiendo la activación del sistema inmune, la resolución de la infección y la aparición de cerdos capaces de resistir infecciones recurrentes.

1.3.2. Respuesta inmunitaria innata

Los monocitos y los macrófagos son células básicas para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario tanto innato, estableciendo una primera barrera de contención de la infección, como adaptativo, actuando de mediador en la cascada de señalización. A su vez, como ya hemos comentado anteriormente, son la diana principal de replicación del

VPPA, siendo el grado de virulencia del mismo el que determinará el potencial de destrucción de las células del sistema mononuclear fagocítico (Carrillo *et al.*, 1994; Gregg *et al.*, 1995; Oura *et al.*, 1998a; Sanchez-Torres *et al.*, 2003).

Trabajos realizados *in vitro* con macrófagos porcinos han podido demostrar, sin lugar a dudas, que el VPPA es capaz de interferir en diversas cascadas de señalización intracelular, alterando la transcripción de genes inmunomoduladores y modificando así la respuesta inmunitaria del huésped (Gil *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006). Desgraciadamente, todavía a día de hoy existe una gran controversia sobre las rutas de señalización alteradas a causa de la infección; controversia alimentada por la imposibilidad de comparar los resultados obtenidos por los distintos autores, al utilizarse aislados virales de distinta virulencia y origen, cultivos primarios distintos y protocolos de estimulación e infección también dispares entre sí. A todo esto se debería añadir la enorme heterogeneidad existente entre los datos obtenidos *in vitro*, con un único tipo celular mantenido en cultivo, y los disponibles mediante la infección *in vivo*, a partir de complejos tejidos en los que se detectarían no solo las modificaciones que el virus provoca en la célula diana (monocitos/macrófagos), sino además las alteraciones producidas en el resto de subpoblaciones celulares, tanto directa como indirectamente (*by-stander*). A pesar de los diferentes e incluso contradictorios resultados obtenidos, merece la pena destacar una serie de estudios realizados al respecto.

Trabajos realizados *in vitro* demuestran que una vez el VPPA infecta a los monocitos/macrófagos, preferentemente los más maduros (Sanchez-Torres *et al.*, 2003), se establece una expresión diferencial de genes que, en el caso de la infección *in vitro* de macrófagos alveolares porcinos con la cepa de alta virulencia Malawi LIL20/1, se traduce en el aumento de la expresión de genes tales como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, receptores celulares de superficie, moléculas de adhesión, moléculas de señalización intracelular, entre otras. De todos modos, el aumento de expresión de estos genes parece ser transitorio y en etapas tardías de la infección vuelven a su nivel basal (Zhang *et al.*, 2006), probablemente debido a la capacidad de determinadas proteínas tardías del virus de provocar la parada de la transcripción de genes del huésped (*shut-off*

celular) (Dixon *et al.*, 2004), que finalmente desemboca en su muerte por apoptosis (Gomez-Villamandos *et al.*, 1998; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996) y/o necrosis (Gomez-Villamandos *et al.*, 1997; Sanchez-Cordon *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 1989). Diversos autores corroboran *in vivo* estos datos, describiendo la habilidad de los macrófagos infectados con diferentes cepas virulentas: E70, E75 y Malawi LIL20/1, de liberar al medio extracelular determinados factores solubles como TNF α , IL1 e IL6 (Gomez-Villamandos *et al.*, 1997; Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Gomez del Moral *et al.*, 1999; Salguero *et al.*, 2005; Sanchez-Cordon *et al.*, 2008). Dichos factores solubles colaborarían en la inducción de apoptosis de células circundantes no infectadas (apoptosis *by-stander*), en su mayoría linfocitos (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Gomez del Moral *et al.*, 1999; Salguero *et al.*, 2005), facilitando así la evasión del sistema inmune del huésped por parte del virus y su expansión por todo el organismo (Oura *et al.*, 1998b). La activación de un fenotipo proinflamatorio y procoagulante conjuntamente con la apoptosis de las células endoteliales, ayudado por la replicación del virus a tiempos tardíos en estas células (Vallee *et al.*, 2001), facilita la activación de la hematopoyesis en la médula ósea (Gomez-Villamandos *et al.*, 1997), así como la secreción de proteínas de fase aguda por parte del hígado (Carpintero *et al.*, 2007; Sanchez-Cordon *et al.*, 2008).

En contraposición a lo hasta ahora comentado, encontramos otros estudios que afirman que el VPPA inhibe muy eficientemente la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1 y TNF α en macrófagos alveolares porcinos infectados *in vitro* con cepas virulentas (Malawi LIL20/1 y OUR/T88/1), coincidiendo con la detección de altos niveles del inmunosupresor TGF β , postulándose que estas acciones pudieran venir mediadas por factores inmunosupresores codificados en el genoma del virus (Powell *et al.*, 1996; Whittall and Parkhouse, 1997). Las diferencias obtenidas entre estos estudios nos indican la cautela con que se deben tratar dichos estudios *in vitro*.

Independientemente de estos trabajos, se ha descrito que tras la infección con el VPPA se evidencia una disminución de la capacidad fagocítica y quimiotáctica de los macrófagos, sin depender del grado de virulencia de la cepa utilizada (Martins *et al.*, 1987; Powell *et al.*, 1996) y, de igual modo, la disminución en la expresión de antígenos

leucocitarios porcinos (SLA) de clase I y clase II en las células presentadoras de antígeno (CPA) infectadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Gonzalez Juarrero *et al.*, 1992; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997; Vallee *et al.*, 2001); indicando que la interacción del virus con el sistema inmunológico no depende únicamente de su grado de patogenicidad, tratándose de un fenómeno mucho más complejo.

Los datos arriba mencionados ganan validez cuando se realizan en paralelo estudios comparativos de expresión de citoquinas inducidas tras la infección *in vitro* de macrófagos porcinos con aislados de VPPA de distinta virulencia. Mediante PCR a tiempo real se pudo confirmar que los virus atenuados inducían niveles más altos de expresión de las citoquinas IL6, TNF α , IL12 e IL15 que los aislados altamente virulentos tras la infección *in vitro* de macrófagos porcinos derivados de sangre (Gil *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2003). Estos últimos datos parecen encajar con el hecho de que *in vivo* los aislados atenuados son capaces de provocar una respuesta innata del huésped que contribuiría a controlar la primera oleada de infección dando tiempo al desarrollo de la respuesta adaptativa (humoral y celular) protectora (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997).

Evidentemente, los monocitos/macrófagos no son la única subpoblación celular relacionada con la respuesta innata afectada por la infección con el VPPA. En general las células NK (*Natural Killer*) juegan un papel muy importante en la lucha contra las infecciones virales, eliminando las células infectadas y produciendo citoquinas (como el IFN γ) y quimioquinas (Zeromski *et al.*, 2011), pero su papel en la infección con el VPPA no está del todo esclarecido. En un estudio reciente, Leitao *et al.* (2001) nos demuestra la implicación que las células NK parecen tener en protección frente al VPPA tras la infección/inmunización *in vivo* con el aislado atenuado ASFV:NH:P68. En este estudio, los animales que permanecían asintomáticos tras la infección veían acrecentada la actividad de las células NK, resistiendo además al desafío posterior con la cepa virulenta L60 (Leitao *et al.*, 2001). Curiosamente, en este mismo trabajo se correlacionaba la aparición de viremia, signos y lesiones crónicas de PPA con la ausencia de actividad NK y la presencia simultánea de altos títulos de anticuerpos específicos; contrariamente a la

mayoría de argumentos esgrimidos respecto al papel protector de los mismos (ver apartado 1.3.3.1.). En consonancia con estos resultados, ya en los primeros estudios realizados en este campo se describía la activación diferencial de NK dependiendo de la virulencia del aislado. Así, el aislado atenuado ASFV:NH:P68 era capaz de estimular la actividad NK y, en cambio, la cepa virulenta L60 la deprimía (Martins and Leitao, 1994).

Curiosamente, tras la infección de cerdos con la cepa de moderada virulencia Malta 78 se detectó un decaimiento en la actividad NK coincidiendo con el pico de pirexia, encajando con el hecho de que las células NK extraídas de estos animales cultivadas a 40°C perdieran toda actividad NK (Norley and Wardley, 1983).

Teniendo en cuenta los datos de todos estos estudios, resulta claro que existe una imperativa necesidad de esclarecer las modificaciones que ocurren en el sistema inmunitario innato tras la infección con aislados de VPPA de distinta virulencia. En cualquier caso, la influencia del VPPA no se reduce a estas dos subpoblaciones celulares (monocitos/macrófagos y células NK), teniendo también efecto sobre el sistema inmunitario adaptativo, como veremos en el apartado siguiente.

1.3.3. Respuesta inmunitaria adaptativa

Como ya se ha comentado anteriormente, la infección de cerdos con cepas virulentas de VPPA provoca una enfermedad aguda con una mortalidad cercana al 100% en menos de dos semanas tras la infección (Kleiboeker, 2002). Este tipo de infección provoca la destrucción de monocitos y macrófagos directamente infectados (Fernandez *et al.*, 1992a; Sanchez-Torres *et al.*, 2003), así como una apoptosis *by-stander* masiva en tejidos linfoides, lo que conlleva a una elevada leucopenia (Carrasco *et al.*, 1996a; Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Oura *et al.*, 1998b; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996). Como resulta lógico, la celeridad con la que la infección progresa y la temprana muerte de los animales, impide observar la formación de una potente respuesta inmunitaria específica (Murphy *et al.*, 2008).

Así pues, la mayor parte de estudios sobre la respuesta inmune adaptativa se han realizado infectando/inmunizando cerdos con virus atenuados naturalmente o con virus

recombinantes delecionados que no provocan mortalidad y sí respuesta inmunitaria en los animales infectados (Gomez-Puertas and Escribano, 1997; Gomez-Puertas *et al.*, 1997; Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Neilan *et al.*, 2004; Onisk *et al.*, 1994; Oura *et al.*, 2005; Wardley *et al.*, 1985; Zsak *et al.*, 1993). Está bien descrito que los animales que superan una infección con aislados atenuados de VPPA generan una respuesta adaptativa que les permite sobrevivir a la re-infección con una dosis letal de la cepa homóloga virulenta, ofreciendo tan solo una protección marginal frente a cepas heterólogas (King *et al.*, 2011; Neilan *et al.*, 2004; Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1983). En lo que se refiere a los mecanismos implicados en protección, e independientemente del debate abierto que hay en estos momentos, existen indudables evidencias de que tanto los anticuerpos como las células T-específicas, pueden jugar un papel relevante en protección.

1.3.3.1. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos

La inducción de anticuerpos tras la infección con el VPPA no se ha estudiado únicamente con objetivos meramente diagnósticos (más detalles en el apartado 1.1.4.), sino también con el propósito de desvelar el papel que los mismos juegan en la protección frente al VPPA (Onisk *et al.*, 1994) y en la patogenia viral, reflejado por ejemplo en la formación de inmunocomplejos (Fernandez *et al.*, 1992b) e incluso quizás en el establecimiento de cronicidad de la infección (Leitao *et al.*, 2001).

La evidencia más sólida de la importancia de los anticuerpos específicos en protección frente al VPPA procede de estudios de transferencia pasiva de anticuerpos específicos mediante calostro, suero de cerdos inmunes o inmunoglobulinas purificadas, en los que se vio aumentada la tasa de supervivientes, retrasada la aparición de signos de PPA y reducidos los niveles de viremia en infecciones letales con VPPA virulentos (Onisk *et al.*, 1994; Schlafer *et al.*, 1984).

A pesar de los experimentos de transferencia pasiva, algunos autores insisten en que el virus *per se* es incapaz de inducir anticuerpos neutralizantes (De Boer *et al.*, 1969; Leitao *et al.*, 2001; Oura *et al.*, 2005; Salguero *et al.*, 2008), teoría apoyada por el hecho de que

el virus pueda coexistir en circulación en presencia de altos títulos de anticuerpos (Leitao *et al.*, 2001), como ocurre para otros virus como el de Marburg o el Ébola (Dimmock, 1993).

Otros autores, sin embargo, defienden su existencia (Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1986a; Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1986b; Zsak *et al.*, 1993). Un estudio pionero *in vitro* permitió la caracterización inicial de un epítipo conformacional y neutralizante en la proteína mayoritaria de la cápside p72 (pB646L) (Zsak *et al.*, 1993). A continuación, un estudio más detallado permitió caracterizar varias proteínas del virus reconocidas por los anticuerpos específicos implicados en protección tales como las proteínas estructurales p30 (pCD204L), p54 (pE183L) y, nuevamente, p72 (pB646L), describiéndose dos mecanismos distintos de neutralización. Mientras los anticuerpos que reconocen a p54 (pE183L) y p72 (pB646L) evitan la unión del virus a la célula, los que reconocen a p30 (pCD204L) evitan su internalización (Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Gomez-Puertas *et al.*, 1996), siendo ambos mecanismos complementarios y necesarios para obtener efecto protector (Gomez-Puertas *et al.*, 1996). De nuevo, cabe remarcar que existe cierta controversia respecto a la capacidad protectora de los anticuerpos inducidos frente a ciertas proteínas, llegando incluso a correlacionarse su presencia con la aparición de lesiones crónicas de PPA (Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2007).

Durante la infección con aislados atenuados del VPPA, éste es capaz de inducir anticuerpos específicos frente a otras muchas proteínas virales, aunque no se ha descrito su capacidad neutralizante ni protectora, incluyendo: proteínas no estructurales (reductasa de ribonucleótidos (pF334L), quinasa de timidina (pK196R) y ligasa de DNA (pNP419L)), otras proteínas estructurales (proteína similar a histona (pA104R) y proteína de unión al DNA (pK78R)) y proteínas de las que no se conoce actualmente su función (pC44L, pCP312R, pE184L, pB602L, pK145R, pK205R) (Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Kollnberger *et al.*, 2002; Neilan *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2007; Zsak *et al.*, 1993).

Cabe destacar que en todos los trabajos que defienden la existencia de anticuerpos neutralizantes, siempre hay un consenso en cuanto a la incapacidad de neutralizar *in*

vitro el 100% del virus, quedando siempre una fracción de virus no neutralizable (alrededor de un 10%), seguramente debido a la inducción de anticuerpos capaces de bloquear la neutralización (Gomez-Puertas and Escribano, 1997). Esta podría ser la explicación de la incapacidad de los anticuerpos de proteger totalmente frente al virus o la persistente presencia de virus en cerdos afectados por PPA crónica, incluso en presencia de altos niveles de anticuerpos (Leitao *et al.*, 2001).

Dejando de lado el papel que pueda tener la actividad neutralizante, también se han contemplado otras vías de acción de los anticuerpos, tales como la citotoxicidad mediada por anticuerpos dependiente del complemento (CDAC) o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), que podrían jugar un papel protector en PPA (Wardley *et al.*, 1985).

Independientemente de su mecanismo de acción, tanto los autores que confían en la capacidad neutralizante como los que apuestan por otras vías de acción, consideran que es esencial la existencia de anticuerpos específicos en el torrente circulatorio si se quieren controlar las primeras rondas de replicación del virus inmediatamente tras la infección *in vivo*, pudiéndose así controlar la infección y superar la enfermedad (Onisk *et al.*, 1994; Wardley *et al.*, 1985). De acuerdo con lo mencionado, a nuestro entender, resultaría ideal que una vacuna del futuro fuera capaz de inducir, entre otras respuestas, anticuerpos capaces de inhibir las primeras rondas de replicación viral, sirviendo como primera barrera de defensa frente a la infección; que sea o no fácil la inducción de este tipo de respuesta protectora tras la vacunación es otra cuestión que se abordará durante la presente Tesis.

1.3.3.2. Respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T

Al igual que ocurre con la respuesta innata y con la respuesta humoral, poco se conoce sobre la respuesta de los linfocitos T inducida tras la infección con el VPPA y, menos aún, sobre su potencial papel protector. De igual modo, hay un gran desconocimiento sobre la modulación que el VPPA ejerce sobre esta subpoblación celular, en muchos casos

indirectamente. Así, como se verá a continuación, existe de nuevo controversia entre los diversos trabajos.

La mayoría de autores coinciden en que las cepas más virulentas del VPPA provocan una apoptosis masiva de linfocitos T indirectamente (*by-stander*), a lo que se puede añadir la capacidad del virus de inhibir la proliferación de los linfocitos en respuesta a mitógenos (Childerstone *et al.*, 1998; Leitao *et al.*, 2001). No sucede lo mismo en infecciones con cepas atenuadas (Leitao *et al.*, 2001), en las que incluso se ha descrito el efecto inverso (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997).

Se han realizado multitud de trabajos encaminados a identificar tanto la posible implicación de las células T en protección frente a la infección con el VPPA como para identificar los antígenos virales que son reconocidos por estas mismas células. Para este tipo de estudios, al igual que en los trabajos de respuesta humoral, ha resultado esencial contar con modelos de protección basados en virus atenuados (Alonso *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1992; Jenson *et al.*, 2000; Oura *et al.*, 2005). De este modo y utilizando células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMC), obtenidas a partir de animales supervivientes a la infección con un virus atenuado, se han podido realizar ensayos de linfoproliferación *in vitro* utilizando como estímulos tanto virus vivo como virus inactivado con luz ultravioleta (no infeccioso). En todos los casos se pudo demostrar que, aunque todos los estímulos promovían la linfoproliferación celular, el mayor poder linfoproliferativo se obtenía siempre tras la estimulación con VPPA virulento homólogo no inactivado, manteniendo los virus virulentos heterólogos cierta capacidad linfoproliferativa. (Canals *et al.*, 1992; Jenson *et al.*, 2000). A pesar de que estos resultados no son definitivos a la hora de demostrar la implicación de estas células en protección, permitieron postular la teoría de que las células T-CD4⁺ podían jugar un papel preponderante en protección, muy probablemente facilitando la correcta actividad de las células T-CD8⁺ (Canals *et al.*, 1992; Leitao *et al.*, 2000; Takamatsu *et al.*, 2012) y de las células B secretoras de IgG específicas, mayoritariamente presentes en los animales recuperados de la infección con cepas atenuadas del VPPA (Reis *et al.*, 2007).

Seguendo este camino, existen evidencias irrefutables que demuestran la capacidad protectora de otra subpoblación de células T, en este caso los linfocitos T-CD8⁺. Al igual que en el caso de protección mediada por anticuerpos en los que los experimentos de transferencia pasiva fueron claves (Onisk *et al.*, 1994), la capacidad protectora de las células T-CD8⁺ quedó irrefutablemente demostrada mediante experimentos de depleción específica de esta subpoblación celular (Oura *et al.*, 2005). De forma análoga a lo que ocurre para los anticuerpos, las células T-CD8⁺ no parecen poseer la capacidad de proteger totalmente frente a la infección, ratificando la más que probable necesidad de inducir ambos tipos de respuesta concomitantemente si se quiere obtener una protección total. Esta evidencia concuerda con el hecho de que los linfocitos T-CD8⁺ citotóxicos (CTL) de animales supervivientes a la infección con VPPA fueran capaces de reconocer epítomos concretos expresados en la superficie de monocitos/macrófagos infectados con cepas homólogas o próximas, reconocimiento mediado por SLA-I (Alonso *et al.*, 1997; Jenson *et al.*, 2000; Leitao *et al.*, 2000; Leitao *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1993).

Hasta el momento pocos son los antígenos virales que específicamente se han identificado como dianas de las células T-CD8⁺, incluyendo las proteínas p72 (pB646L) (Canals *et al.*, 1992; Leitao *et al.*, 1998), pG1340L (Leitao *et al.*, 2000), p30 (pCD204L) (Alonso *et al.*, 1997), p12 (pO61R) (Canals *et al.*, 1992) y p1329L (Jenson *et al.*, 2000). Adicionalmente, se han descrito una serie de epítomos reconocidos por las células T-CD8⁺, descritos mediante una librería genómica aleatoria del virus, que no se han podido asociar a ninguna ORF identificada (Jenson *et al.*, 2000), pudiendo quizás corresponder a fases de lectura no descritas como tales.

Todos los datos recién descritos parecen encajar con resultados más recientes que demuestran una correlación muy directa entre protección y el número de células T circulantes que específicamente secretan IFN γ tras la estimulación *in vitro* con el VPPA (King *et al.*, 2011). Un estudio más detallado del mismo parece confirmar el papel preponderante en esta inducción de células T dobles positivas CD8⁺ y CD4⁺, típicamente

presentes en el cerdo doméstico (Alonso *et al.*, 1997; Argilaguët, 2009; Canals *et al.*, 1992).

Con todos estos resultados en conjunto, parece claro llegar a la conclusión de que una vacuna ideal debería intentar inducir ambos tipos de respuesta inmunológica: humoral y celular, si esto fuera posible. Nuestros resultados preliminares con DNA no parecen ser muy halagüeños respecto a lo primero (Argilaguët *et al.*, 2011; Argilaguët *et al.*, 2012b) (tema ampliamente desarrollado en el apartado 1.4.1.), aunque sí permiten que centremos esta Tesis en el segundo de los objetivos: inducir una respuesta celular protectora lo más completa y eficaz posible.

1.4. Desarrollo de vacunas experimentales frente al VPPA

Hoy en día no existe una vacuna frente al VPPA, siendo el diagnóstico temprano de la enfermedad y el sacrificio masivo de los animales las principales medidas adoptadas cuando se detecta un brote, como ya hemos comentado extensamente en el apartado 1.1.4. Diagnóstico de la PPA. Con esta premisa en mente, es evidente que la generación de una vacuna eficaz es uno de los principales retos en el campo de la investigación de la PPA.

Las primeras vacunas desarrolladas frente a la PPA se centraron en la obtención de virus inactivados, ya fuese física (calor) o químicamente, fracasando todos los ensayos a la hora de inducir una respuesta protectora en los animales inmunizados (Forman *et al.*, 1982; Mebus, 1988; Montgomery, 1921; Stone and Hess, 1967). Por otro lado, el uso de virus atenuados, bien naturalmente o bien tras su adaptación en cultivo celular, resultó muy prometedor en condiciones experimentales, confiriendo altos niveles de protección (Gomez-Puertas *et al.*, 1996; King *et al.*, 2011; Malmquist, 1962; Neilan *et al.*, 2004; Onisk *et al.*, 1994; Oura *et al.*, 2005; Zsak *et al.*, 1993). Desafortunadamente, su utilización resultó no ser factible en campo, debido al alto riesgo que comportaba su posible reversión hacia formas virulentas y al hecho de que los animales pudieran acabar convirtiéndose en portadores. Un ejemplo muy ilustrativo de lo recién comentado resultó del programa de vacunación llevado a cabo en Portugal utilizando una cepa

atenuada del VPPA, en que se incluyeron más de 500.000 cerdos y en el que murieron más del 20% de ellos, mostrando signos y lesiones compatibles con PPA, de las que se pudo aislar gran cantidad de virus (Manso Ribeiro, 1962).

En las últimas décadas, otras aproximaciones vacunales se han tenido en cuenta como, por ejemplo la generación de virus atenuados genéticamente mediante la delección de genes específicos relacionados con la virulencia (Borca *et al.*, 1998; Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 1998), abriendo la posibilidad de obtener una vacuna viva atenuada segura a la vez que eficaz (Lewis *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1998; Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 1996). Desafortunadamente esta vía no parece haber rendido los resultados esperados hasta el momento actual.

A mediados de los años noventa se obtuvieron resultados prometedores de protección, utilizando extractos crudos de proteínas del VPPA expresadas en el sistema de baculovirus (Barderas *et al.*, 2001; Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996). Ensayos de inmunización utilizando concomitantemente las proteínas recombinantes p30 (pCP204L) y p54 (pE183L) del VPPA expresadas en baculovirus mostraron una correlación directa entre la inducción de una respuesta humoral específica y su capacidad para proteger al 50% de los animales frente al desafío letal, aunque todos los animales desarrollaron signos clínicos de PPA (Gomez-Puertas *et al.*, 1998). Los anticuerpos neutralizantes inducidos frente a la proteína p54 (pE183L) fueron capaces de inhibir la unión del VPPA a los macrófagos, mientras que los específicos frente a la proteína p30 (pCP204L) inhibían su internalización dentro de la célula (Gomez-Puertas *et al.*, 1996); siendo necesarios ambos mecanismos de neutralización para que la protección resultara eficaz (Gomez-Puertas *et al.*, 1998). A pesar de que estos resultados se vieron confirmados tras la inmunización con la proteína quimérica PQ, formada por la fusión de p30 (pCP204L) y p54 (pE183L) (Barderas *et al.*, 2001), un estudio paralelo inmunizando con las mismas proteínas (p30 y p54) más las proteínas p72 (pB646L) y p22 (pKP177R) no fue capaz de reproducir estos mismos resultados, observándose únicamente un ligero retraso en la aparición de la enfermedad, sin obtener supervivientes al final del ensayo (Neilan *et al.*, 2004). Independientemente de que estos

resultados contradictorios pudieran deberse a la utilización de cepas virales y dosis de desafío distintas, de todos modos, la realidad es que el proceso de producción y purificación de las proteínas hacía inviable el escalado de su utilización en condiciones de campo.

Otro antígeno del VPPA utilizado con relativo éxito en protocolos de protección frente a la PPA fue la proteína CD2v (pEP402R, también llamada hemaglutinina (HA)), antígeno responsable de la hemadsorción y que comparte gran homología con el antígeno leucocitario CD2. La inmunización con células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante que codifica a *EP402R* fue capaz de proteger frente al desafío letal con el virus homólogo de forma dosis dependiente (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996). En este mismo ensayo no se detectaron anticuerpos neutralizantes, a pesar de que todos los animales desarrollaron anticuerpos específicos frente a HA. De todos modos, cabe destacar que en el caso del único animal totalmente protegido (avirémico), dichos anticuerpos si que fueron capaces de inhibir la infección *in vitro*. El hecho de que se inmunizara con células completas infectadas con baculovirus permite predecir que las inmunizaciones con HA (pE402R) debían provocar también una potente respuesta celular Th1, tal y como ha sido descrita para otros antígenos utilizando este tipo de protocolo de vacunación (Bachmann *et al.*, 1994). La ausencia de metodología en su momento impidió poder comprobar el grado de respuesta celular inducida y/o su implicación en la protección conferida.

Ampliando el rango de antígenos a utilizar, un estudio reciente centró sus esfuerzos en el uso de péptidos sintéticos en base a la secuencia de varias proteínas del VPPA para la inmunización de cerdos y, aunque tan solo consiguieron un retraso en la muerte de los animales y un control relativo de la viremia; alcanzaron a identificar *in vitro* nuevos epítomos con posible potencial protector (Ivanov *et al.*, 2011).

A continuación, se dedica un apartado independiente a describir los avances obtenidos en nuestro laboratorio en lo que se refiere al desarrollo experimental de vacunas frente a la PPA.

1.4.1. Antecedentes del laboratorio.

Desde la apertura de los laboratorios de alta seguridad (NBS-3) del CRESA los esfuerzos realizados por nuestro grupo de investigación se han concentrado, justamente, en el campo del desarrollo de nuevas estrategias vacunales frente a la PPA, centrándonos esencialmente en vacunas DNA, en las que nuestro laboratorio tiene una amplia experiencia (Leifert *et al.*, 2004; Rodriguez and Whitton, 2000). Las vacunas que hemos desarrollado hasta el momento se han basado en la utilización de tres de las proteínas estructurales del VPPA: p30 (pCP204L), p54 (pE193L) y HA (pE402R), descritas en trabajos iniciales usando sistemas de expresión en baculovirus como inmunogénicas y potencialmente protectoras (Barderas *et al.*, 2001; Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Neilan *et al.*, 2004; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996). Una de las ventajas de la utilización de vacunas DNA reside, aparte de en su sencillez y flexibilidad, en su idoneidad a la hora de profundizar en el estudio de los mecanismos implicados en protección frente a una enfermedad sin interferencias de otros antígenos, bien sean del patógeno o del vector vacunal (*Baculovirus*, *Adenovirus* o *Vaccinia* son virus muy complejos con multitud de proteínas inmunogénicas y/o inmunomoduladoras). Así, independientemente de los resultados que se obtuvieron en cuanto a la protección conferida, se pudieron obtener una serie de lecciones que han permitido entender un poco mejor la patogenia del VPPA y realizar un diseño más racional de nuestras vacunas experimentales. Los datos que a continuación se resumen, forman parte de la Tesis Doctoral del Dr. Jordi Marqués i Argilaguet (Argilaguet, 2009) y han servido de punto de partida para la presente Tesis.

Por orden cronológico, la primera tentativa de inmunización con DNA se llevó a cabo con la construcción plasmídica pCMV-PQ, plásmido que codifica una proteína quimérica (PQ), resultado de la fusión de las proteínas p30 (pCP204L) y p54 (pE183L) del VPPA, bajo el control del promotor eucariótico del citomegalovirus humano (CMV). La vacunación con el plásmido generado provocó una eficiente respuesta humoral en ratón, mientras que, sorprendentemente, resultó totalmente ineficaz en cerdo, el huésped natural del VPPA. En consonancia con esta falta de respuesta humoral y celular, los animales inmunizados

no sobrevivieron al desafío con una dosis letal de VPPA (10^4 UHA₅₀ de E75L), sucumbiendo a la vez que los animales del grupo control inmunizados con suero salino. El hecho de que esta construcción quimérica (PQ) resultara muy inmunogénica cuando se inoculaba en forma de extractos proteicos tras la expresión en baculovirus (Barderas *et al.*, 2001) permitía descartar que la ausencia de una respuesta fuera debida a algún problema estructural de la misma, poniendo en evidencia la baja respuesta inmune de nuestra vacuna DNA y corroborando lo descrito para otras vacunas DNA en grandes animales (Babiuk *et al.*, 2003).

Aprovechando nuestra experiencia en el desarrollo de nuevas estrategias capaces de mejorar la respuesta inmune tras la vacunación con DNA, decidimos explorar varias alternativas.

Inicialmente se exploró la capacidad adyuvante de la molécula APCH1, potencialmente capaz de dirigir los antígenos vacunales a las CPA. APCH1 consiste en el fragmento variable de un anticuerpo obtenido a partir del hibridoma 1F12 (Gil Dones, 2003), específico para la cadena β de la molécula SLA-DR, perteneciente a la familia de SLA-II (Bullido *et al.*, 1997). La idea consistió en fusionar APCH1 a nuestro antígeno de interés (PQ), con el objetivo de dirigirlo a la superficie de las células CPA, donde el SLA-DR se expresa preferentemente (Lunney, 1994; Lunney and Pescovitz, 1987; Saalmuller *et al.*, 1991). En claro contraste a lo descrito para pCMV-PQ, la fusión de PQ a APCH1 permitió potenciar la respuesta humoral y celular T-CD4⁺ (restringida por MHC-II) inducida tras la inmunización con DNA (utilizando el plásmido pCMV-APCH1PQ) en el cerdo. Desafortunadamente, el fortalecimiento de la respuesta inmunitaria frente a p30 (pCP204L) y p54 (pE183L) no se vio reflejado en una mejora de la protección frente a la infección letal con el VPPA (10^4 UHA₅₀ de E75L), incluso pudiéndose observar una exacerbación de la viremia, muy probablemente debida a la inducción de anticuerpos específicos frente a p30 (pCP204L) y p54 (pE183L), incapaces de reconocer al VPPA en su forma nativa e ineficaces a la hora de neutralizarlo *in vitro* (Argilaguet *et al.*, 2011).

Independientemente de que la vacunación con pCMV-APCH1PQ no confiriera protección, la capacidad adyuvante de APCH1 quedó fuera de duda, si bien permite reflexionar sobre

la ineficacia de esta respuesta en protección frente al VPPA. Ratificando esta teoría, en nuestro laboratorio pudimos también demostrar que la fusión de APCH1 a una serie de epítomos B y T del virus de fiebre aftosa (VFA), mejoró no sólo la respuesta inmune inducida en cerdos tras la vacunación con DNA (pCMV-BTT), sino que, además, mejoraba la protección conferida frente a la infección con el virus (Borrego *et al.*, 2011). En este caso, y a diferencia de lo que ocurrió frente al VPPA, la presencia de una potente respuesta de células T-CD4⁺ previa al desafío y la aceleración de una respuesta de anticuerpos neutralizantes inmediatamente tras la infección, resultó suficiente para conferir una protección total frente al VFA.

A pesar de lo descorazonador de los resultados iniciales con el VPPA, éstos nos han permitido tomar conciencia definitiva de lo importante que resulta el conocer los mecanismos implicados tanto en protección como en inmunopatogenia, a la hora de diseñar vacunas racionales de futuro.

Con el objetivo de mejorar el potencial protector de nuestras vacunas DNA, decidimos generar el plásmido pCMV-sHAPQ, codificando PQ fusionado al fragmento extracelular de la HA, antígeno responsable de la aglutinación del virus (Ruiz-Gonzalvo and Coll, 1993). Esta estrategia fue diseñada obedeciendo a varios criterios: i) incluir la HA por su potencial inmunoprotector, antígeno que ya había sido utilizado con éxito en estudios previos de inmunización tras su expresión en baculovirus (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996); ii) eliminar su dominio intracelular, descrito como inmunosupresor (Borca *et al.*, 1998; Kay-Jackson *et al.*, 2004) y iii) incluir solamente la fracción soluble de la HA (sHA), aprovechando su alto grado de homología con la molécula linfocitaria CD2 (Borca *et al.*, 1994b) y su potencial capacidad para transportar antígenos a las células que expresan su receptor en superficie (CD2R⁺), principalmente CPA (Crosby *et al.*, 2004). Ratificando la hipótesis, la inmunización con pCMV-sHAPQ mejoró exponencialmente la respuesta obtenida con pCMV-PQ, demostrándose así el potencial adyuvante de la sHA. Desafortunadamente, al igual que ocurrió para pCMV-APCH1PQ, la respuesta humoral y celular inducida resultó totalmente ineficaz frente a la infección letal con el virus,

correlacionándose de nuevo con la incapacidad de los anticuerpos inducidos de neutralizar al VPPA *in vitro* (Leitao *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta que los anticuerpos generados tras la vacunación con DNA no parecían resultar de utilidad, incluso pudiendo resultar potencialmente perjudiciales, se decidió generar una nueva construcción plasmídica (pCMV-UbsHAPQ) en la que los antígenos del VPPA utilizados hasta el momento; sHA (parte extracelular de pE402L), p30 (pCD204L) y p54 (pE183L) fueran expresados como una fusión con el polipéptido celular ubiquitina (Ub). Esta estrategia, utilizada entre otros en nuestro laboratorio frente a multitud de antígenos, ha demostrado ser de enorme utilidad para diseñar vacunas a la carta en la que se pretende potenciar la respuesta T-CD8⁺, evitando, a su vez, la inducción de anticuerpos (Rodríguez *et al.*, 1997).

Por primera vez desde que se comenzó la línea de investigación de vacunas frente al VPPA en el CReSA, tras la vacunación con pCMV-UbsHAPQ se pudo demostrar un cierto grado de protección frente a la infección letal con el VPPA. Curiosamente, el grado óptimo de protección, medido tanto en el retraso en la muerte como en el grado de protección (33%), se obtuvo tras la administración de dos únicas dosis de vacuna (Argilaguet *et al.*, 2012b), quizás debido a la aparición de bajos (e indetectables) niveles de anticuerpos específicos y deletéreos tras la inmunización recurrente con 4 dosis. Cabe destacar que el estado general de los animales a día 15 pi permitía aventurar la definitiva recuperación de los cerdos supervivientes, algo nunca conseguido antes con vacunas DNA utilizando una dosis tan agresiva del VPPA.

Resulta de gran importancia remarcar que el grado de supervivencia correlacionaba con la ausencia de virus en sangre a día 3 pi y con la presencia concomitante de un número anormalmente alto de células T-CD8⁺ en sangre, permitiendo aventurar un papel de estas células en protección. El primer capítulo de la presente Tesis está dedicado precisamente a la caracterización de epítomos T-CD8⁺ responsables de dicha protección.

De lo visto hasta el momento, podemos definir que la eficacia de una estrategia vacunal parece depender, en gran medida, del antígeno utilizado, de los mecanismos inmunogénicos implicados en protección frente al patógeno en particular, así como de la

capacidad de la estrategia vacunal de presentar el antígeno correctamente al sistema inmunológico. Pero la situación se complica aún más cuando se demuestra que esta presentación no sólo depende del antígeno *per se* (forma ubiquitinada y no ubiquitinada por ejemplo), sino que además podría también verse influenciada por el vehículo o vector vacunal utilizado. Así, mientras que pCMV-sHAPQ indujo una potente respuesta de anticuerpos y celular, la vacunación de cerdos con BacMam-sHAPQ (baculovirus recombinante que expresa sHAPQ bajo el control del promotor eucariótico CMV) indujo únicamente una potente respuesta celular en ausencia de anticuerpos, capaz de proteger a los cerdos frente a un desafío subletal con VPPA (Argilagué *et al.*, 2012a). Confirmando la hipótesis de que la inducción de anticuerpos no-neutralizantes podría ser la responsable del fallo de protección observado con pCMV-sHAPQ.

Los resultados arriba descritos, además de formar parte de la Tesis Doctoral de Jordi Marquès i Argilagué (Argilagué, 2009), han dado lugar a una serie de publicaciones en las que he participado activamente: una patente, tres artículos publicados y un artículo de revisión recién aceptado en Virus Research.

Publicaciones:

Argilagué, J.M., Perez-Martin, E., Gallardo, C., Salguero, F.J., Borrego, B., Lacasta, A., Accensi, F., Diaz, I., Nofrarias, M., Pujols, J., Blanco, E., Perez-Filgueira, M., Escribano, J.M., Rodriguez, F., 2011. *Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. Vaccine 29, 5379-5385.*

Argilagué, J.M., Perez-Martin, E., Nofrarias, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., Lopez-Soria, S., Escribano, J.M., Reche, P.A., Rodriguez, F., 2012. *DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies. PloS one 7, e40942.*

Argilagué, J.M., Pérez-Martin, E., López-Soria, S., Escribano, J.M., Giesow, K., Keil, G., Fernando, R., 2012. *BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African Swine Fever Virus.* Antiviral research In press.

Takamatsu, H., Denyer, M., Lacasta, A., Stirling, C., Argilagué, J., Netherton, C., Oura, C., Martins, C., Rodríguez, F., 2012. *Cellular immunity in ASFV responses.* Virus research S0168-1702.

Patentes:

Inventores: **Fernando Rodríguez, Jordi Marquès i Argilagué, Eva Pérez Martín, María Ballester Devis, Anna Lacasta, Francesc Accensi, Paula López Monteagudo.** Nº de patente y propiedad intelectual: P26002ES00-CReSA. Título: *Utilización de una construcción génica y/o peptídica para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus de la peste porcina africana (VPPA).* Fecha: 04-10-2011.



OBJETIVOS

"Al cerdo más ruin, la mejor bellota"

A día de hoy no sólo no existe una vacuna eficaz frente a la PPA, sino que, además, existe un enorme desconocimiento tanto sobre los mecanismos implicados en protección frente a la misma como respecto de los antígenos del virus potencialmente protectores. Dos son los objetivos generales que se pretenden abordar en la presente Tesis: i) desarrollar nuevas estrategias vacunales frente a la PPA, caracterizando tanto el grado de protección alcanzado como los mecanismos y antígenos implicados en la misma y ii) poner a punto un modelo de protección homóloga con virus atenuado que permita profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en protección así como en los implicados en la respuesta inmunitaria asociada a la infección (inmunopatogenia).

Avanzar en ambos objetivos facilitará un diseño más racional de futuras vacunas frente a la PPA. Con este propósito general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la presencia de potenciales epítomos T-CD8⁺ en las secuencias de las proteínas p30, p54 y/o en el dominio extracelular de la hemaglutinina; codificadas todas ellas en el plásmido pCMV-UbsHAPQ, capaz de proteger a un 33% de los animales vacunados frente al desafío letal con VPPA y en ausencia de anticuerpos. En caso de éxito, caracterizar la capacidad protectora de los epítomos identificados.
2. Generación de librerías de expresión basadas en la secuencia genómica del VPPA. Caracterización de su capacidad protectora frente a la infección letal con el VPPA y, en la medida de lo posible, identificación de antígenos individuales del VPPA con potencial protector.
3. Puesta a punto de un modelo de protección homóloga basado en la infección con el aislado atenuado del VPPA E75CV1 y caracterización de la respuesta inmunológica inducida. Evaluación de la capacidad protectora de E75CV1 frente a la infección con un aislado virulento diferente aunque de origen próximo: Ba71L.

4. Estudio comparativo de la cinética de la respuesta inmune y de la patogenia provocada por la infección con los virus homólogos E75L virulento y E75CV1 atenuado. Aplicación de técnicas virológicas, histopatológicas, inmunológicas, moleculares y de genómica y proteómica al estudio.



MATERIALES Y MÉTODOS

"Del cerdo se aprovechan hasta los andares"

3.1. Líneas celulares utilizadas

3.1.1. Líneas celulares estables

Las dos líneas celulares estables utilizadas a lo largo del trabajo experimental de la presente Tesis fueron adquiridas directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y son: fibroblastos de riñón de mono verde africano (CV1) y células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero).

Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, utilizando el medio de cultivo del *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI, Sigma) para CV1 o el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) para Vero. Ambos medios se suplementaron con penicilina a 100 UI/ml (Invitrogen), estreptomycin a 100 µg/ml (Invitrogen), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor (Invitrogen), para convertirse en medios completos. Al tratarse de líneas celulares adherentes, para realizar pases sucesivos las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, Lonza) y desprendidas del fondo de la botella de crecimiento utilizando tripsina/EDTA (0,25% y 0,025% p/v, respectivamente, Sigma). Finalmente, las células se conservaron a largo plazo a -150°C en medio de congelación (90% FCS, 10% dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma)).

3.1.2. Líneas celulares primarias

3.1.2.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC porcinas se purificaron a partir de sangre recogida directamente en presencia del anticoagulante heparina de litio mediante un gradiente de densidad sobre Histopaque 1077 (Sigma). Un volumen de 20 ml de sangre diluida 1:1 en PBS (10 ml de sangre con 10 ml de PBS) se depositó suavemente sobre un colchón de 7 ml de Histopaque 1077 y, tras su centrifugación durante 30 minutos a 400 xg sin freno ni aceleración, se recogió la interfase entre el plasma y el Histopaque 1077, conteniendo las PBMC. Después de centrifugar las células 10 minutos a 400 xg se lisaron los eritrocitos con 3,5 ml de agua destilada estéril a 4°C durante 30 segundos, transcurridos los cuales se suplementaron con 9 ml de cloruro de sodio (NaCl, Merk) al 3,5% para recuperar el

equilibrio osmótico. A continuación, se lavaron dos veces las PBMC con medio RPMI 1640 completo y, finalmente, fueron contadas en una cámara de Neubauer tras la exclusión con azul tripano (Sigma) y resuspendidas en medio RPMI 1640 completo a una concentración de 10^6 células/ml.

3.1.2.2. *Macrófagos alveolares porcinos (PAM)*

Inmediatamente después del sacrificio de los cerdos, se extrajeron los pulmones completos de los cerdos en condiciones de máxima esterilidad, para a continuación obtener los PAM tras realizar tres lavados consecutivos con 250 ml de PBS suplementado con gentamicina a $1 \mu\text{g/ml}$ (Sigma). El recuento de los PAM se realizó en una cámara de Neubauer tras la exclusión con azul tripano y se conservaron a largo plazo a -150°C a una concentración de 50×10^6 células/ml en medio de congelación.

3.1.2.3. *Fibroblastos de piel porcinos*

Los fibroblastos se obtuvieron de la piel de los cerdos supervivientes a la infección con VPPA siguiendo protocolos previamente descritos (Takashima, 2001), con ligeras modificaciones. Después de afeitar y desinfectar la piel del cerdo se cortaron dos segmentos de 2 cm^2 que, inmediatamente, se incluyeron en tripsina diluida al 0,5% en PBS y se incubaron 16 horas a 4°C . A continuación, en condiciones de esterilidad, se separó la dermis de la epidermis, y la dermis se cortó en trozos de 4 mm^2 . Dichos fragmentos se cultivaron en placas de Petri (Delta Lab) con medio RPMI 1640 completo a 37°C en atmósfera de humedad con el 5% de CO_2 . Las placas se controlaron diariamente, hasta la observación de monocapas de fibroblastos en el microscopio óptico invertido. En ese momento se descartó el fragmento de piel y la monocapa de células se lavó con PBS para, a continuación, ser desprendida del fondo utilizando tripsina/EDTA (0,25% y 0,025% p/v, respectivamente). Finalmente, los fibroblastos se emplazaron en una botella de cultivo celular (Biolite) a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO_2 , realizando pases cuando la confluencia lo indicaba (90%) y congelando las células en cada pase.

Actualmente, el pase más alto que se ha realizado es el número 54, sin que las células hayan perdido viabilidad.

3.2. Predicción de epítomos CTL *in silico* basados en la secuencia de las proteínas virales: p30, p54 y sHA

3.2.1. Predicción teórica de epítomos CTL en la secuencia de sHAPQ

La predicción *in silico* de los epítomos CTL incluidos en la secuencia de sHAPQ se basó en su afinidad para unirse al transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP), usando un modelo de regresión de máquina de soporte vectorial (Diez-Rivero *et al.*, 2010). Este modelo se basa en la idea de que los epítomos que sean capaces de unirse a TAP podrán ser transportados más eficientemente desde el citosol hasta el ER para ser presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Hammer *et al.*, 2006), lo que a su vez influirá en su capacidad para inducir una respuesta T-CD8⁺ específica. Este modelo se desarrolló para predicciones en humanos, pero estudios computacionales sugieren que se puede aplicar en los mamíferos en general.

Así pues, siguiendo este modelo se diseñaron 53 péptidos de 9 aminoácidos (AA) cada uno partiendo de las secuencias aminoacídicas completas de los antígenos p30 (18), p54 (7) y sHA (28) (tabla V). Los péptidos sintéticos de 9 AA se encargaron a Sigma Aldrich, siendo sintetizados con el sistema PEPscreenTM y entregados liofilizados en un rango de 1 a 6 mg. Dichos péptidos fueron resuspendidos en PBS con el 10% de DMSO dejándolos a una concentración final de 10 mg/ml.

3.2.2. Análisis predictivo de la localización de los péptidos F3 y A6 en la estructura de la HA

El análisis predictivo se realizó mediante el programa Jalview, basado en el alineamiento múltiple de secuencias desarrollado por el grupo de Geoff Barton de la Universidad de Dundee.

3.3. Obtención de construcciones plasmídicas para inmunización

3.3.1. Obtención de las construcciones pCMV-sHAPQ y pCMV-UbsHAPQ

Los plásmidos pCMV-sHAPQ y pCMV-UbsHAPQ estaban disponibles en el laboratorio en el momento de comenzar este trabajo (Argilaguet, 2009).

Brevemente, la secuencia amplificada por PCR de dos antígenos inmunodominantes del VPPA: p30 y p54 (obtenidas del aislado E75L, PRJEA41377) se clonaron en pauta de lectura con la fracción extracelular de la HA (sHA, posiciones 61 a 612 de la secuencia aminoacídica de la HA) en el plásmido de expresión pCMV (Clontech). De este modo se formó la construcción pCMV-sHAPQ (figura 4 A). A continuación, la secuencia de sHAPQ se clonó en pauta de lectura con la secuencia de la poliproteína Ub (NC_000071.6), con el objetivo de mejorar la presentación antigénica en el contexto de las moléculas de SLA-I y potenciar la respuesta T-CD8⁺ inducida tras la vacunación (Rodriguez and Whitton, 2000), formándose así el plásmido pCMV-UbsHAPQ (figura 4 B).

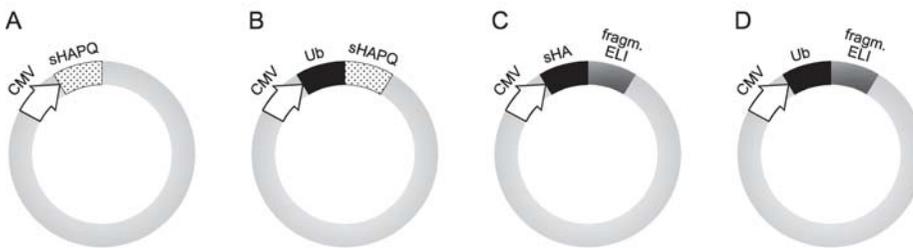


Figura 4. Representación esquemática de las construcciones plasmídicas generadas en el laboratorio: pCMV-sHAPQ (A), pCMV-UbsHAPQ (B), sHA-ELI (C) y Ub-ELI (D).

3.3.2. Generación de librerías genómicas de expresión (ELI) basadas en el genoma de Ba71V fusionadas a sHA o a Ub

Los fragmentos para la generación de las ELI provenían de la colección de plásmidos pBR325 y pBR322 que contienen los fragmentos generados tras la digestión del genoma completo de Ba71V (aislado de VPPA adaptado a crecer en células Vero y apatógeno *in vivo*) con los enzimas de restricción *EcoRI* y/o *Sall* (Ley *et al.*, 1984). Los fragmentos utilizados y su localización en el genoma completo de Ba71V están resumidos en la tabla I. En total se contó con nueve plásmidos que cubrían el 76,5% del genoma de Ba71V: un

fragmento de restricción *EcoRI/SalI* (RA/SC), cuatro fragmentos de restricción *SalI* (SD, SB, SE y SH) y cuatro fragmentos de restricción *EcoRI* (RC, RC', RD' y RB) de longitudes variables (figura 5).

Tabla I. Fragmentos de restricción generados tras la digestión del genoma de Ba71V con los enzimas de restricción *EcoRI* y/o *SalI*, y utilizados como punto de partida para la construcción de las ELI.

Nombre	Enzima de restricción	Longitud (bp)	Región del genoma de Ba71V cubierta (bp)	Número de colonias seleccionadas para formar parte de las ELI
RA/SC	<i>EcoRI/SalI</i>	13.190	16.978-30.168	160
SB	<i>SalI</i>	23.990	35.267-59.257	190
RC	<i>EcoRI</i>	11.445	63.173-74.744	112
RB	<i>EcoRI</i>	14.828	77.738-92.566	190
RC'	<i>EcoRI</i>	11.730	99.861-111.591	144
SD	<i>SalI</i>	18.492	107.235-125.940	190
SE	<i>SalI</i>	16.187	133.347-149.534	190
SH	<i>SalI</i>	8894	149.534-158.428	72
RD'	<i>EcoRI</i>	10.788	159.313-170.101	95

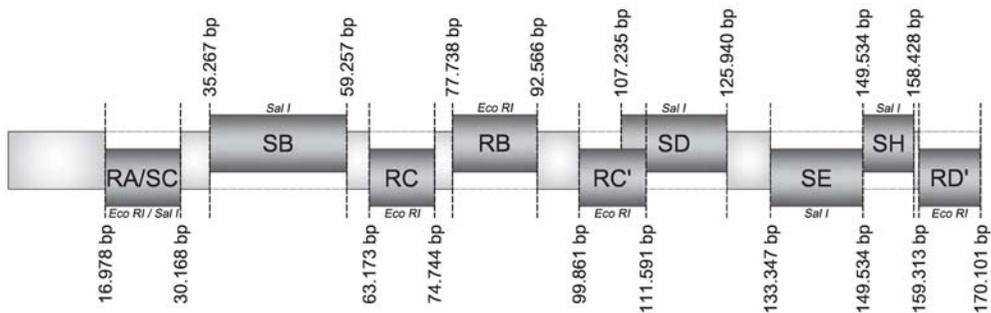


Figura 5. Representación esquemática de los fragmentos del genoma del Ba71V generados tras la digestión con los enzimas de restricción *EcoRI* y/o *SalI*, utilizados como punto de partida para la construcción de las ELI.

Los fragmentos de DNA viral, después de ser escindidos del plásmido de origen (figura 6 A), fueron digeridos totalmente con el enzima de restricción *Sau3AI*, que reconoce la secuencia nucleotídica $5'GATC3'$ y tiene una media de corte cada 300-500 bp (figura 6 B y C). Los fragmentos de restricción generados se purificaron con el kit Minielute Cleanup (Qiagen).

Como prueba de concepto inicial, los fragmentos obtenidos a partir de SD y SB se clonaron aleatoriamente con la ligasa Quick ligase (BioLabs) en los plásmidos pCMV-Ub_{F1} y pCMV-sHA_{F1} (una sola pauta de lectura), previamente digeridos con *Bgl*III, generando las ELI: sHA-ELI_{SD/SB} y Ub-ELI_{SD/SB} (figura 6 C y D), respectivamente, compuestas por 380 clones cada una y que cubren aproximadamente el 8% de las ORF contenidas en el genoma de Ba71V (figura 6 D y E).

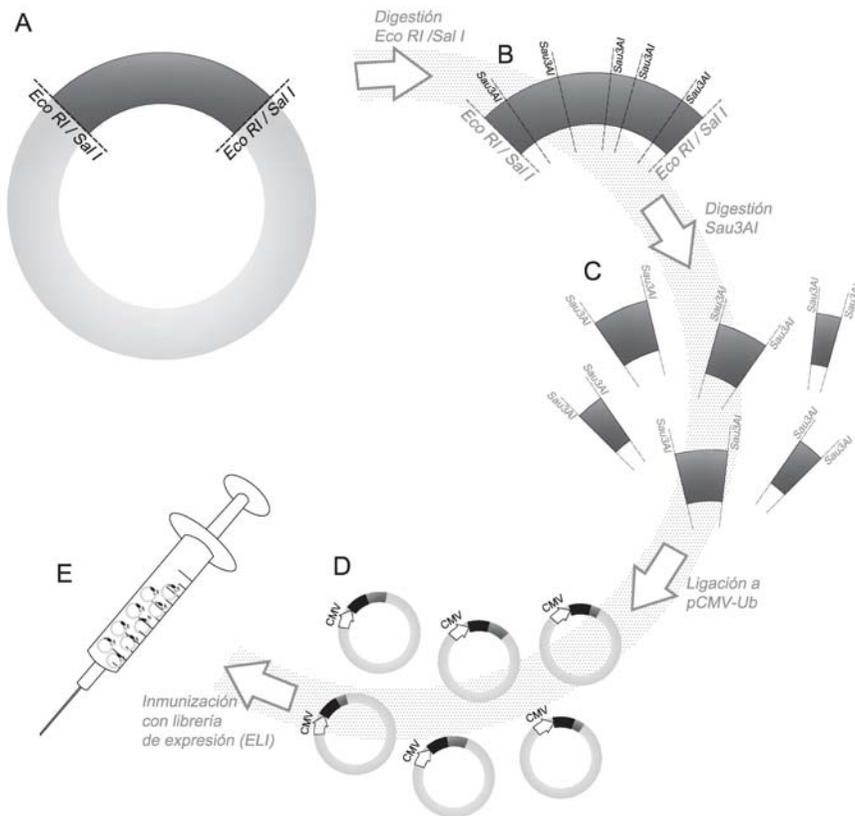


Figura 6. Representación esquemática de los pasos seguidos para la generación de las ELI.

Los fragmentos generados a partir de los 9 plásmidos originales que cubrían el 76,5% del genoma de Ba71V se clonaron aleatoriamente en las tres pautas de lectura posibles en los plásmidos pCMV-Ub_{F1/F2} y pCMV-Ub_{F3} que contenían sitios de reconocimiento compatibles con *BclI* y *Bgl*III inmediatamente después de la Ub, de este modo los fragmentos podían ser leídos en las pautas de lectura 1, 2 y 3 (Rodríguez *et al.*, 2001). La

ELI finalmente generada (Ub-ELI_{completa}) consistía en una colección de 4.029 clones individuales.

A continuación, se procedió a la electrotransformación de los productos de la ligación en *Escherichia coli* electrocompetentes (ElectroMax™ DH10B, Invitrogen) en las condiciones de voltaje de 2.000 V, capacitancia de 25 µF y resistencia de 200 Ω, en cubetas de 1 mm (Bio-Rad) utilizando el Gene Pulser XCell (Bio-Rad). Para cada fragmento de restricción y pauta de lectura, se seleccionaron el número de colonias suficiente para asegurar la representatividad de cada una de las ORF existentes. El número de colonias requeridas en cada caso (tabla I) se calculó teniendo en cuenta la longitud del fragmento original y el número de fragmentos generados tras la digestión completa con *Sau3AI* (figura 7).

$$N = 2 * (\ln(1-P) / \ln(1-f))$$
$$f = m / L$$

Donde:

N: número de colonias a picar

P: probabilidad (= 0,9)

m: longitud media de los fragmentos generados tras la digestión con *Sau3AI*

L: longitud total del fragmento tras la digestión del plásmido con *EcoRI* y/o *Sall*

Figura 7. Fórmula seguida para el cálculo del número de colonias necesarias para asegurar la representatividad de cada uno de los fragmentos generados tras la digestión con *Sau3AI* en la ELI generada.

Los plásmidos de todos los clones de las ELI: Ub-ELI_{SD/SB}, SHA-ELI_{SD/SB} y Ub-ELI_{completa}, se purificaron con el kit Nucleospin 96 plasmid core (Macherey Nagel) y se secuenciaron, mediante el método Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977), con el cebador Ub-F (tabla II) para comprobar la secuencia nucleotídica del genoma de Ba71V insertada. Para tal fin se utilizó el servicio de secuenciación de la Universitat Autònoma de Barcelona. La secuenciación individual de cada clon facilitó la posterior selección de aquellos clones que codificaban secuencias del genoma de Ba71V en la misma pauta de lectura que la ubiquitina y la eliminación de todos los clones que contenían las secuencias de p30, p54 y HA, evitando así su posible inmunodominancia *in vivo*.

Tabla II. Relación de cebadores utilizados para las técnicas de PCR, RT-qPCR y RRT-qPCR.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Long. (bp)	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Long. (bp)	nº acceso
pCMV						
Ub-F	GGCAAAGATCCAGGACAAGG	20				NC_000071.6
VPPA (RT-qPCR)						
SPK-F	ATGTCCAGGCCGGAACAAC	19	SPK-R	CTACTCTAGTTCGAAATAGGC	23	R298L
SPK-F2	GTCCAGGCCGGAACAACA	18	SPK-R2	CCTTCCACCTTTGCTGAGGA	22	R298L
<i>Sus scrofa</i> (RRT-qPCR)						
18S-F	GACTCAACACGGGAAACCTCAC	22	18S-R	GCTTATGACCCGCACCTACTGG	22	AY265350
βactina-F	CAGGTCATCACCATCGGAACG	22	βactina-R	GACAGCACCGTGTGGCGTAGAGGT	25	U07786
Ciclofilina-F	CCTGAACATACGGTCTCTG	19	Ciclofilina-R	AACGGGAACCGTTTGTGTG	21	AY266299
HPRT-F	TCATTATGCCGAGGATTTGGA	21	HPRT-R	CTCTTATCACATCTCGAGCAA	23	NW_003540069.1
TLR3-F	AGTAAATGAATCACCCCTGCCTAGCA	25	TLR3-R	GCCGTTGACAAAACACATAAAGGACT	25	DQ266435
TNFα-F	CCCTTCTCCTTCCCTCTG	19	TNFα-R	CCTCGGCTTTGACATTGG	18	X57321
IL1β-F	GGCCGCCAAGATAAATCTGA	20	IL1β-F	GGACCTCTGGGTATGGCTTTC	21	NM_214055
IL4-F	TTGCTGCCCCAGAGAAC	17	IL4-R	TGTCAAGTCCGCTCAGG	17	AY294020
IL5-F	TGGTGGCAGAGACCTTGACA	20	IL5-R	CCATCGCTATCAGCAGAGTT	21	NM_214205.1
IL6-F	TGGTACTGCCCTCCCTACC	20	IL6-R	CAGAGATTTTGCAGGAGGATG	20	NM_214399
IL8-F	TTCGATGCCAGTGCATAAATA	21	IL8-R	CTGTACAACCTTCTGCACCCA	21	AB057440
IL10-F	CAGATGGGCGACTTGTG	18	IL10-R	ACAGGGCAGAAATTGATGAC	20	L20001
IL12p40-F	GGAGTATAAGAAGTACAGAGTGG	23	IL12p40-R	GATGTCCCTGATGAAGAAGC	20	U08317
IL13-F	AAGTGGCCAGTTCGTAAAAGA	22	IL13-R	ACCCGTGGCGAAAAATCA	18	NM_213803.1
IL18-F	AGGACATCAAGCCGTGTTT	20	IL18-R	CGGTCTGAGGTGCATTATCTGA	22	EU118362.1
IL21-F	CTGCTGATGGTCACTTCTCA	22	IL21-R	AGGGATCTTGTCTCTGGAA	20	NM_214415
IL23-F	GCTTGCANAAGGATCCACCAA	20	IL23-R	GGCTCCCCTGTGAAAATGTC	20	NM_001130236.1
IFNγ-F	CAAAAGCCATCAGTGAACCTATCA	23	IFNγ-R	TCTCTGGCCTTGGAAACATAGTCT	23	X53085
TGFβR1-F	TCAGGCTTACCATTGCTGTTCCAG	24	TGFβR1-R	CTGCGCAAACCTCTCCAAATCG	22	NM_001038639
TGFβR2-F	TCC AAC ATC CTG GTC AAA GG	20	TGFβR2-R	CAG GGA GAG GCC GAA GTC	18	EF396957
Defensinaβ1-F	ACCGCTCCTCTTGATTC	20	Defensinaβ1-R	GGTCCGATCTGTTTCATCT	20	NM_213838
Defensinaβ2-F	CTGTCTGCCTCCTCTCTCC	20	Defensinaβ2-R	CAGGTCCCTTCAATCTGTT	20	NM_214442
Caspasa1-F	CTCTCCACAGGTTCACAATC	20	Caspasa1-R	GAAGACGAGGCTTAACTGG	20	NM_214162
NFKB-F	CTCGCACAAAGGAGACATGAA	20	NFKB-R	ACTCAGCGGGAAGGCATTAT	20	DQ834921
CD163-F	GCCTGTCTCATCGCACTCT	20	CD163-R	GGATTAGCATATCCGTTTCATCTG	25	NM_213976.1

Todos los clones se conservaron en medio de congelación para bacterias (85% Luria Bertani (LB, Sigma) y 15% de glicerol (Sigma) a -80°C .

Las técnicas moleculares utilizadas a lo largo de este trabajo están basadas en protocolos descritos por Maniatis y colaboradores (Maniatis *et al.*, 1982).

3.3.3. Preparación de las vacunas de DNA

Los clones conservados a -80°C se descongelaron y sembraron en 5 ml de LB hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5 a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}). Estos precultivos se utilizaron para inocular 1 litro de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En el caso de plásmidos individuales se inocularon 2 ml del precultivo directamente en medio LB, mientras que en el caso de las librerías se mezclaron 5 μl (Ub-ELI_{SD/SB} y SHA-ELI_{SD/SB}) o 0,5 μl (Ub-ELI_{completa}) de cada clon a incluir, para finalmente inocular la mezcla en 1 litro de LB. Tras la incubación del cultivo a 37°C durante 12 horas con agitación se realizó la extracción de los plásmidos utilizando el kit EndoFree Plasmid Mega (Qiagen) para conseguir una preparación de DNA libre de endotoxinas lista para ser usada *in vivo*. La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría (NanoDrop) y el DNA fue diluido en suero fisiológico (Grifols) a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, previo a su inoculación *in vivo*.

3.4. Cepas virales utilizadas en los estudios

3.4.1. Aislados del VPPA utilizados

Para las infecciones experimentales *in vivo* se utilizaron los aislados E75L, E75CV1 y Ba71L. Las cepas Ba71L y E75L (virulentas) fueron aisladas en los brotes ocurridos en España en 1971 y 1975, respectivamente, y amplificadas en leucocitos porcinos. La cepa Ba71L, por su parte, fue cedida por la Dra. Maria Luisa Salas (CBM).

El aislado atenuado E75CV1 se obtuvo tras 4 pases consecutivos de la cepa virulenta E75L en cultivo de células CV1 (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1983).

3.4.2. Titulación del VPPA mediante la técnica de hemadsorción

La determinación del título viral se basó en la utilización de la técnica de la hemadsorción. Se cultivaron PAM un mínimo de 3 horas antes del ensayo, en placas de 96 pocillos (Biolite), a una concentración de 4×10^5 células/pocillo. Para la titulación se dispensó cada muestra directamente sobre los PAM para, a continuación, realizar diluciones seriadas en base 10 (6 réplicas por muestra), 18 horas tras la infección se dispensaron 20 μ l de sangre de cerdo diluida 1:100 en PBS como fuente de eritrocitos (Argilaguet *et al.*, 2011). Cada 24 horas se observó la evolución de la aparición de las típicas “rosetas” de eritrocitos en cada pocillo, imagen típica del fenómeno de hemadsorción (figura 8) (Malmquist and Hay, 1960). El título viral se calculó teniendo en cuenta la última dilución en la que se observaba el efecto hemadsorbente en el 50% de los pocillos, viniendo así definido en forma de unidades hemadsorbentes por mililitro de muestra (UHA_{50}/ml) (Reed and Muench, 1938).

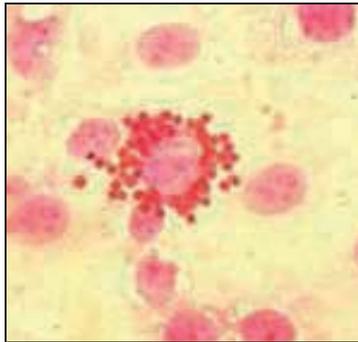


Figura 8. Imagen típica de hemadsorción en la que se observa la adhesión de eritrocitos a la superficie de los PAM infectados con el VPPA.

3.4.3. Desarrollo de una nueva PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) y titulación del VPPA mediante la misma

3.4.3.1. Desarrollo de un estándar para la cuantificación del VPPA mediante RT-qPCR

Con el objetivo de poder cuantificar el virus presente en tejidos y en hisopos nasales (HN) obtenidos a partir de cerdos infectados con el VPPA, se diseñó una nueva RT-qPCR, basada en el gen que codifica la proteína quinasa de la serina (*SPK*, *R298L*) del VPPA (Ballester *et al.*, 2011), gen muy conservado entre VPPA filogenéticamente distantes.

Amplificamos la ORF de la *SPK* utilizando como molde DNA purificado de una muestra de sangre positiva mediante hemadsorción para VPPA (aislado E75L). Para la amplificación se utilizó FlexiGoTaq (Promega) y los cebadores SPK-F y SPK-R (tabla II) siguiendo siguientes condiciones de PCR: i) un ciclo de 3 minutos a 95°C para la desnaturalización del molde de partida (DNA bicatenario), ii) 35 ciclos de amplificación que comprende cada uno un periodo de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, seguido de un periodo de 30 segundos a 58°C que facilita el anillamiento (o hibridación) de los cebadores con el molde y, finalmente, un periodo de 1 minuto a 72°C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de DNA y iii) un periodo adicional de 10 minutos a 72°C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos.

Los productos de la amplificación (891 bp) se corrieron en un gel de agarosa y se extrajeron con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) para ser cuantificados por espectrofotometría (NanoDrop). El estándar se preparó partiendo de una concentración de DNA de 10^9 moléculas de *SPK*/μl, para a continuación ir disminuyendo logarítmicamente hasta 1 molécula de *SPK*/μl.

3.4.3.2. Reacción de RT- qPCR para la cuantificación del VPPA

Se utilizó la RT-qPCR para titular virus en dos tipos de muestras obtenidas de cerdos infectados con VPPA: hisopos nasales en PBS y tejidos. La extracción de DNA de 200 μl de suspensión de PBS preincubado a temperatura ambiente con el hisopo nasal se realizó mediante el kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) y la extracción de DNA de tejido se realizó a partir de 30 mg del mismo con el kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), siguiendo en cada caso las especificaciones del proveedor.

Los cebadores SPK-F2 y SPK-R2 (tabla II) para la RT-qPCR se diseñaron con el programa Primer Express™ (Applied Biosystems), resultando la reacción de amplificación en un fragmento de 85 bp del gen que codifica la *SPK* (*R298L*). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en un volumen final de 20 μl, conteniendo: 2 μl de muestra, 900 nM de cada cebador y 10 μl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), usando el ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) y

siguiendo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizó una curva de disociación para corroborar la no formación de dímeros de cebadores. Las placas utilizadas fueron las MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems).

El límite de detección de la técnica usando el estándar anteriormente descrito resultó de 2 copias de DNA viral. Los resultados se expresan en \log_{10} de las copias equivalentes del genoma (GEC) por mililitro de hisopo nasal o bien \log_{10} de las GEC por cada gramo de tejido.

3.5. Infecciones *in vivo*

3.5.1. Ensayos de infección *in vivo*

Los cerdos empleados para todos los experimentos pertenecían a las razas Landrace x Large White (cerdos convencionales) o bien Large White libres de patógenos específicos (SPF) de 6-8 semanas de edad. Los cerdos SPF son el estándar mínimo exigido por las autoridades reguladoras competentes para las pruebas de evaluación de productos destinados para uso humano y veterinario (CCAC, 1993; ILAR, 1996; OMS, 1998). Una ventaja adicional que ofrece la utilización de los cerdos SPF es la garantía de realizar los experimentos en animales con un sistema inmunológico naíf, facilitando la lectura de los ensayos inmunológicos a realizar.

Para las inmunizaciones con DNA se utilizaron 600 μg de DNA diluido en suero fisiológico por animal y por dosis de inmunización (Argilaguet *et al.*, 2012b) y para las inmunizaciones con péptidos se utilizaron 100 μg de péptidos (1:1) en adyuvante de Freund completo para la primera inmunización e incompleto para la segunda en proporción 1:1 con la mezcla de péptidos (Barderas *et al.*, 2001; Gomez-Puertas *et al.*, 1998). En ambos casos, se administraron 2 dosis vacunales y cada dosis estaba separada de la otra por un intervalo de 15 días. Cada vacuna fue suministrada en un volumen final de 1,5 ml, dividiendo la misma en tres partes iguales entre el cuádriceps femoral izquierdo, la tabla muscular izquierda del cuello y subcutáneamente en la oreja izquierda,

siguiendo protocolos optimizados en el laboratorio (Argilaguet *et al.*, 2011). La protección conferida por cada prototipo vacunal fue evaluado dos semanas tras la administración de la última dosis vacunal, mediante la infección con VPPA, bien utilizando la cepa virulenta E75L o el aislado atenuado E75CV1 (1ml de inóculo conteniendo 10^4 UHA₅₀ en PBS); inoculado intramuscularmente en las tablas derechas del cuello (figura 9 A).

Para establecer la dosis óptima de infección/inmunización utilizando el aislado E75CV1 se infectaron grupos de 4 cerdos con distintas dosis del virus: 10^2 UHA₅₀, 10^4 UHA₅₀ y 10^5 UHA₅₀ (figura 9 B). Adicionalmente, 4 animales se conservaron sin infectar como controles del experimento. Por último los animales pre-infectados con la dosis de 10^4 UHA₅₀ y los controles fueron re-infectados, a 28 días post-infección, con una dosis letal (10^4 UHA₅₀) de la cepa virulenta E75L. El mismo procedimiento de caracterización de la protección se llevó a cabo re-infectando 6 cerdos control y 6 cerdos pre-infectados con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1 con la cepa virulenta Ba71L (figura 9 C).

Esta misma dosis viral fue la seleccionada para realizar los experimentos de patogenia viral en los que se comparó el curso de la enfermedad tras la infección con E75L o con E75CV1. Para su realización se partió de 54 animales separados en 3 grupos de tratamiento: i) 18 cerdos infectados con la cepa virulenta E75L sacrificados en grupos de 6 los días 1, 3 y 7 pi; ii) 24 animales infectados con el aislado atenuado E75CV1 sacrificados en grupos de 6 los días 1, 3, 7 y 31 pi; y iii) 12 cerdos no infectados utilizados como control del experimento sacrificados en grupos de 3 los días 1, 3, 7 y 31 pi (figura 9 D).

Con la excepción de este último experimento, en el que se realizaron sacrificios seriados para la toma de muestras, los animales se sangraban los días de interés por punción en la vena cava obteniendo, bien sangre anticoagulada (recogida en tubos que contenían heparina de litio) para el aislamiento de PBMC y la extracción de RNA, o bien sangre para la obtención de suero (reogida en tubos si aditivos). Tras la infección con el VPPA

también se recogieron hisopos nasales los días de interés para estudiar la excreción viral. En todos los casos, las muestras de tejido se recogían únicamente el día de la necropsia.

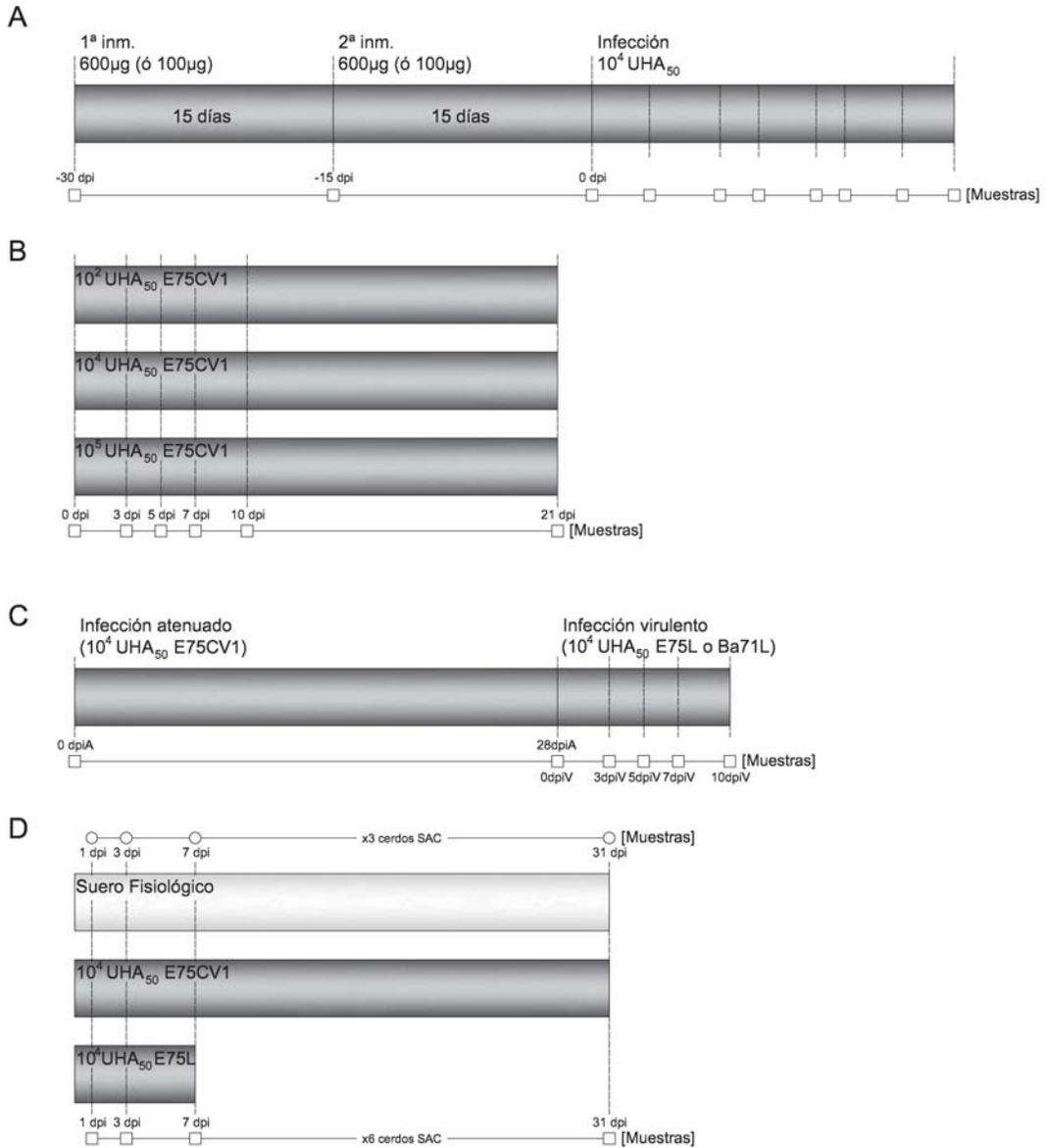


Figura 9. Esquema de la planificación de los experimentos *in vivo*: ensayos de inmunización con DNA (o péptidos) y posterior infección con el virus virulento E75L (A); ensayo para la determinación de la dosis óptima de infección/inmunización con el aislado E75CV1 (B); ensayo de inmunización con E75CV1 e infección posterior con cepas virulentas del VPPA (C) y ensayo de patogenicidad comparada con E75L y E75CV1 (D).

Todos los procedimientos con cerdos Landrace x Large White (cerdos convencionales) fueron realizados en granjas experimentales y/o en las instalaciones de bioseguridad nivel 3 (NBS3) del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CRESA), siguiendo las guías de Buenas Prácticas Experimentales bajo la supervisión del comité de ética y bienestar animal de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Los experimentos con cerdos Large White (SPF) realizados en las instalaciones del ANSES en Ploufragan (Francia) bajo la supervisión de la *Direction des Services Vétérinaires des Côtes d'Armor* (AFSSA número de registro B-22-745-1).

3.5.2. Seguimiento clínico de la PPA

Tras la infección, los animales fueron observados diariamente para determinar la aparición de los signos clínicos característicos de la PPA aguda. La valoración cuantitativa del desarrollo de la enfermedad se basó en la aparición de los siguientes signos clínicos (escala del 0 al 4): temperatura rectal, cianosis, diarrea, hemorragias, postración y pérdida de apetito. Los animales fueron sacrificados por razones éticas en el mismo momento en el que la progresión de la enfermedad imposibilitaba la vida sin sufrimiento, para inmediatamente realizar la necropsia completa, incluyendo la valoración de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los distintos órganos extraídos según Galindo-Cardiel y colaboradores (Galindo-Cardiel *et al.*, 2012).

3.6. Valoración de la respuesta inmunológica

3.6.1. Medición de la respuesta humoral o de anticuerpos específicos

3.6.1.1. ELISA para detectar anticuerpos específicos frente al VPPA

La determinación de la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA en el suero de cerdos vacunados y/o infectados se realizó mediante un ELISA de tipo indirecto, utilizando antígeno soluble obtenido a partir de células infectadas con VPPA (OIE, 2012). De una manera resumida, cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (Nunc) se tapizó durante 12 horas a 4°C con 100 µl de la proteína correspondiente diluida en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (5 µg/ml, Merk). Tras lavar 3 veces la placa con

PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v, Sigma), éstas se bloquearon durante 1 hora a 37°C con 200 µl de PBS suplementado con 1% albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) (p/v). Los sueros porcinos diluidos 1:200 se incubaron durante 1 hora a 37°C y, tras los lavados correspondientes, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (α -IgG de cerdo diluido 1:20.000, Sigma) (tabla III), incubando la reacción durante 1 hora a 37°C. Tras los últimos lavados, las reacciones se revelaron utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina soluble (TMB, Sigma) como sustrato, parando la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Merk). Los resultados obtenidos para cada punto fueron representados como la absorbancia obtenida para cada pocillo a una longitud de onda (λ) de 405 nm.

3.6.1.2. Ensayo de inhibición de la infección del VPPA *in vitro*

Para analizar la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero de los cerdos infectados de inhibir la infección del VPPA *in vitro*, se inactivó el complemento de los sueros durante 30 minutos a 56°C para, a continuación, incubar 50 µl de cada una de las diluciones de suero (1:10 ó 1:20) con 50 µl de VPPA (4×10^5 UHA₅₀ de E75L) durante 1 hora a 37°C. Una vez facilitada la unión de los anticuerpos al virus añadido, la mezcla fue utilizada para infectar monocapas de PAM previamente cultivados en placas de 96 pocillos. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada dilución y cada suero. 72 horas tras la infección, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para ser titulados mediante la técnica de hemadsorción previamente descrita (apartado 3.4.2.).

3.6.2. Detección de la respuesta celular

3.6.2.1. ELISPOT para la detección de células específicas secretoras de IFN γ porcino

Una vez obtenidas las PBMC porcinas, se determinó la frecuencia de células específicas secretoras de IFN γ , presentes en sangre mediante un ensayo de ELISPOT (Diaz and Mateu, 2005), tras la vacunación y/o la infección. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos Costar 3590 (Corning) con 50 µl/pocillo del anticuerpo α -IFN γ porcino (clon P2G10, BD Pharmingen) a una dilución 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6)

durante 18 horas a 4°C. Tras lavar 3 veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y bloquear las placas con medio RPMI 1640 completo durante 1 hora a 37°C, se añadieron 5×10^5 PBMC en cada pocillo, bien en ausencia o bien en presencia de los estímulos correspondientes y en un volumen final de 200 μ l/pozo.

Los estímulos se prepararon de la siguiente manera: la cepa virulenta E75L se utilizó sin inactivar (viva) a 10^5 UHA₅₀ cada 10^5 PBMC, las proteínas p30, p54 y sHA expresadas en baculovirus (Gomez-Puertas *et al.*, 1998; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996) se utilizaron a una concentración de 6 μ g/ml y los péptidos de 9 AA diseñados a partir de la secuencia de p30, p54 y sHA se utilizaron individualmente y también como una mezcla a una concentración de 4 μ g/ml cada uno. Como control positivo se utilizó fitohemaglutinina (PHA, Sigma) a 5 μ g/ml y como control negativo se utilizó medio RPMI 1640 y/o una proteína irrelevante de baculovirus (Bac) obtenida de la misma forma y utilizada a la misma concentración (6 μ g/ml) que las específicas del VPPA.

Para las estimulaciones utilizando fibroblastos y PBMC autólogos se procedió como sigue: los fibroblastos SLA-I⁺ de piel de cerdo se preincubaron durante 1 hora con los péptidos apropiados a una concentración de 4 μ g/ml cada uno por separado y a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂. Dichos fibroblastos se utilizaron, tras varios lavados, como CPA en ensayos de estimulación de PBMC autólogas (ratio de 1:10). Como controles negativos y positivos del ensayo se utilizaron fibroblastos preincubados con medio RPMI 1540 (sin péptido) y PHA, respectivamente. En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado.

Tras 20 horas de estimulación a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂, las células se retiraron y, tras de los subsiguientes lavados con Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS, se procedió a realizar una inmunotinción. Con este objetivo se utilizaron 50 μ l/pocillo de un anticuerpo anti-IFN γ porcino biotilado (clon P2C11, BD Pharmingen) diluido 1:1000 en PBS, y tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Biosource) diluida a 0,5 μ g/ml, siendo incubada 45 minutos a 37°C. Finalmente, la reacción fue revelada utilizando TMB insoluble (Calbiochem).

Los resultados, una vez sustraídos los valores obtenidos de los pocillos del control negativo (medio solo, proteína irrelevante o fibroblastos, dependiendo del experimento), se representan como la frecuencia de células específicas secretoras de IFN γ por cada millón de PBMC (CS-IFN γ /millón PBMC).

3.6.2.2. ELISA para la medición de factores solubles en suero porcino

Se realizaron ELISA para medir en suero los siguientes 6 factores solubles: la fracción soluble del receptor CD163 (CISA-INIA, Madrid), IFN α (R&D), IFN γ (BD Pharmingen), IL10 (Biosource), IL12 (R&D) y TNF α (R&D).

Todos los ELISA realizados consisten en ensayos de captura con protocolos similares, especificados bien por el proveedor o bien por los creadores del método. A continuación, se especifica la metodología del único ELISA sin protocolo comercial, el de detección de la fracción soluble del receptor de monocitos/macrófagos CD163 (sCD163).

En un primer paso se realizó el tapizado de las placas Costar 3590 durante 18 horas a temperatura ambiente con 100 μ l del anticuerpo de captura 2H12/BM (α -CD163) a una concentración de 10 μ g/ml en PBS. Tras lavar las placas 3 veces con solución de lavado (Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS), se saturaron las mismas con 0,5% BSA en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, y después de lavar las placas 3 veces con solución de lavado, se añadieron 100 μ l de los sueros porcinos sin diluir y del estándar que actúa a su vez como control positivo de la técnica. Cada ensayo se realizó por triplicado, incubando las reacciones durante 18 horas a 4°C. Tras lavar las placas 5 veces con tampón de lavado se dispusieron 100 μ l/pozo del anticuerpo de detección 2A10 biotinilado (α -CD163-biotinilado) a una dilución 1/1000. Después de incubar 1 hora a 37°C, las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 100 μ l/pozo de estreptavidina-HRP (Invitrogen), diluida 1/2000 en PBS para, a continuación, incubarla durante 1 hora a 37°C. Finalmente, y después de lavar las placas 3 veces con solución de lavado, se procedió al revelado con 50 μ l de TMB soluble durante 10 minutos a temperatura ambiente, para después añadir 50 μ l de solución de parada (1 N de H $_2$ SO $_4$). La lectura de las placas se realizó con el Power Wave XS (Bio-Tek) y los resultados obtenidos para cada

reacción fueron representados como los picogramos de sCD163 por mililitro de suero porcino.

3.6.2.3. Caracterización por citometría de los fibroblastos de piel y de las poblaciones celulares presentes en PBMC de cerdo

Las poblaciones celulares más relevantes presentes en PBMC obtenidas de sangre de cerdo y extraídas los días de interés, fueron analizadas por citometría de flujo. Del mismo modo, se analizaron los fibroblastos aislados de piel. Todos los marcajes con anticuerpos específicos se realizaron en frío y sin permeabilizar, con el objetivo de marcar antígenos de la superficie celular, utilizando los siguientes sobrenadantes de hibridomas sin diluir: α -CD163 (clon 2A10/B11), α -SWC3 (clon Ba1C11), α -p30 (clon 1D9), α -SLA-I (clon 4B7/8) y α -SLA-II (clon B14H2). Como control de isotipo IgG1 se utilizó el clon 6D12 y para el control de isotipo IgG2a se utilizó el clon 1D9 en aquellas muestras de células de cerdos no infectados con el VPPA. Con la idea de realizar marcajes múltiples se utilizaron anticuerpos secundarios específicos de isotipo conjugados con fluorocromos distintos (diluidos 1:200): α -IgG-FITC (Sigma), α -IgG1-APC y α -IgG2a-Cy2, (ambos de Vitro). En paralelo, se realizaron marcajes directos con anticuerpos monoclonales específicos comerciales ya conjugados (diluidos 1:100): α -CD4a-PerCPCy5.5, α -CD8a-AlexaFluorTM647 y α -CD21-PE (todos de BD Pharmingen) (tabla III).

Los fenotipos de los linfocitos fueron caracterizados mediante citometría de flujo (BD FACSAria I) utilizando diferentes combinaciones dobles o triples de los anticuerpos mencionados. Los protocolos de marcaje derivan del anteriormente descrito por Denyer y colaboradores (Denyer *et al.*, 2006). Brevemente, se sembraron 10^6 células/pozo en una placa de 96 pocillos con fondo en V (Corning) para, a continuación, proceder al marcaje específico incubándolas con los anticuerpos primarios durante 1 hora a 4°C. Tras dos lavados (centrifugación 3 min a 400 *xg*, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células con PBS 1% FCS), las PBMC se incubaron con los anticuerpos secundarios (en aquellos casos en que fuera necesario) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se volvieron a lavar las células dos veces y se fijaron con formalina (Sigma)

al 2% diluida en PBS para, finalmente, ser analizadas, previo filtrado (tubos BD Falcon), en el citómetro. El análisis de los resultados se realizó con el programa FACSDiva 6.1.

Tabla III. Anticuerpos utilizados en protocolos de marcaje celular para análisis por citometría de flujo e inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Clon	Antígeno reconocido	Isotipo	Procedencia
α-p30	1D9	Antígeno p30 del VPPA	IgG2a	J. Dominguez (INIA)
α-CD163	2A10/B11	CD163 de macrófagos porcinos	IgG1	J. Dominguez (INIA)
α-SWC3	Ba1C11	SWC3 de macrófagos porcinos	IgG1	J. Dominguez (INIA)
α-SLA-I	4B7/8	SLA-I de CPA porcinas	IgG2a	J. Dominguez (INIA)
α-SLA-II	BL4H2	SLA-II de CPA porcinas	IgG2a	J. Dominguez (INIA)
α-IPNV	6D12	irrelevante	IgG1	J. Dominguez (INIA)
α-CD4a-PerCPCy5.5	74-12-4	CD4a de linfocitos T porcinos	IgG2b	BD Pharmingen
α-CD8a-AlexaFluor™647	76-2-11	CD8a de linfocitos T porcinos	-----	BD Pharmingen
α-CD21-PE	B-ly4	CD21 de linfocitos B humanos	IgG1	BD Pharmingen
α-IgG1-APC	-----	Ac. de ratón isotipo IgG1 conjugado a APC	-----	Vitro
α-IgG2a-Cy2	-----	Ac de ratón isotipo IgG2a conjugado a Cy2	-----	Vitro
α-IgG-FITC	-----	Ac. de ratón IgG conjugado a FITC	-----	Sigma
α-mouse IgG-peroxidasa	-----	Ac. de ratón IgG conjugado a peroxidasa	-----	Sigma
α-pig IgG-peroxidasa	-----	Ac. de cerdo IgG conjugado a peroxidasa	-----	Sigma
α-rabbitIgG-peroxidasa	-----	Ac. de conejo IgG conjugado a peroxidasa	-----	Dako
α-Caspasa-3	9661	Caspasa-3	-----	Cell Signaling
α-MAC397	MAC387	Ag L1 (células mieloides)	IgG1	Dako

3.6.2.4. Transcriptómica diferencial en tejido y sangre

3.6.2.4.1. Extracción del RNA

Para la extracción del RNA de sangre anticoagulada con heparina se utilizó Trizol-Reagent (Invitrogen) según las especificaciones del proveedor. Brevemente, 200 µl de sangre de cerdo se mezclaron con 500 µl de Trizol-Reagent y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incorporaron 100 µl de cloroformo (Sigma) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos para, posteriormente, incubarse 3 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 15 minutos se recogió la fase acuosa (la que contenía el RNA), a la que se le añadieron 250 µl de isopropanol (Sigma) mezclando por inversión e incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó y lavó dos veces el RNA con etanol al 70% (Merk) para, finalmente, secarlo al aire.

Para la extracción del RNA de tejido sólido (linfonodo gastrohepático) se utilizó el kit RNeasy Mini (Qiagen) según las especificaciones del proveedor, partiendo siempre de 30

mg de tejido, previamente congelado en N₂ líquido inmediatamente tras la necropsia y tratado con RNAlater ice (Ambion) previo a la manipulación, según especificaciones del proveedor.

Todas las muestras de RNA se conservaron a -80°C y se manipularon siempre manteniendo la cadena de frío (hielo).

3.6.2.4.2. Tratamientos enzimáticos

Las muestras de RNA fueron sometidas a un tratamiento de DNAsa (Qiagen) para eliminar las trazas de DNA que podrían haber quedado de la extracción. Adicionalmente, las muestras de RNA que provenían de sangre fueron sometidas a un tratamiento con heparinasa I (Sigma) para eliminar la heparina de las muestras, ya que es un conocido inhibidor de las polimerasas (Glaum *et al.*, 2001; Izraeli *et al.*, 1991). Después de cada tratamiento el RNA se lavó para la eliminación de impurezas mediante el kit RNeasy Minielute (Qiagen).

3.6.2.4.3. Retrotranscripción

Tras realizar ambos tratamientos, 1 µg de RNA se usó como molde para la retrotranscripción (RT) a cDNA utilizando el kit iScript cDNA synthesis (BioRad), en un volumen final de 20 µl. Cada cDNA fue diluido con 180 µl de agua DEPC (Sigma) para conservarlo a una concentración de 5 ng/µl a -20°C, listo para su utilización. Se escogió el RNA de 3 animales de cada grupo y punto temporal para ser retrotranscritos, en base a la calidad y cantidad del mismo tras los tratamientos enzimáticos.

La eficiencia de la RT se comprobó mediante PCR convencional utilizando los cebadores 18S-F y 18S-R (tabla II), siguiendo el mismo ciclo que el especificado en el apartado 3.4.3.1.

3.6.2.4.4. PCR a tiempo real para cuantificación relativa (RRT-qPCR) de factores implicados en la respuesta inmunitaria

Una vez comprobada la RT se procedió a medir la expresión de los factores implicados en la respuesta inmunitaria mediante PCR a tiempo real para su cuantificación relativa (RRT-qPCR). La reacción de la RRT-qPCR se realizó en un volumen final de 20 μ l que contenían 2 μ l de cDNA como molde, 10 μ l de Power SYBR Green PCR Master Mix y los dos cebadores a una concentración final de 500 nM, usando el ABI 7500 Fast Real Time PCR System bajo las mismas condiciones que las descritas en el apartado 3.4.3.2. Todas las reacciones se realizaron por triplicado en la misma placa y cada placa (MicroAmpTM Fast Optical 96-well Reaction Plate) se repitió en dos ocasiones. Los cebadores se diseñaron usando Beacon DesignerTM (Biosoft International).

Para estar seguros de la sensibilidad y fidelidad de los resultados obtenidos con la RRT-qPCR, se llevó a cabo una normalización interna de los genes analizados, utilizando tres genes de referencia: *β -actina*, *ciclofilina* y *transferasa de hipoxantina-guanina fosforibosilada (HPRT)*. Mediante este sistema se analizó la expresión diferencial de los genes descritos en la tabla II.

3.6.2.4.5. Análisis de los datos de la RRT-qPCR

La expresión relativa de los genes se evaluó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001), en el que los valores de $\Delta\Delta Ct$ corresponden a la fórmula representada en la figura 10. Los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ menores de 1 significan inhibición de la expresión, en este caso el ratio de cambio (en inglés *fold change*) se calculó como $1/\text{ratio}$ y con el símbolo menos (-) delante. Siguiendo este modelo, los valores de 1 y -1 indican que no hay cambios en la expresión, mientras que valores superiores a 1 indican sobre-expresión y valores menores a -1 indican inhibición de la expresión.

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{GP} - Ct_{GR})_{\text{grupo X}} - (Ct_{GP} - Ct_{GR})_{\text{grupo control}}]$$

Donde:

Ct_{GP} : ciclo de cuantificación del gen problema

Ct_{GR} : media geométrica del ciclo de cuantificación del gen de referencia

X: tratamiento

Figura 10. Fórmula para el cálculo de $\Delta\Delta Ct$ para cada gen y muestra a medir, para la comparación de la expresión génica entre diferentes grupos experimentales.

3.6.2.5. Proteómica diferencial en linfonodo gastrohepático

3.6.2.5.1. Extracción de proteínas del linfonodo gastrohepático

Las muestras de linfonodo se homogenizaron mecánicamente en solución de lisis (urea 7 M (Appllichem), CHAPS 4% (p/v, Sigma), tiourea 2M (Merk), DTT 1% (Sigma), anfolitos 0,8% (Sigma), azul de bromofenol ~1 mg (Faga-Lab), DNAsa, cóctel inhibidor de proteasas (Sigma) y PMSF 0,2 M (Sigma)), usando tubos cónicos y émbolos de cristal esmerilado. La cantidad de tejido de partida fue de 100-300 mg lisados con 1,5 ml de solución de lisis. Los homogenizados se incubaron 30 minutos a 4°C con agitación constante para, posteriormente, ser centrifugados a 14.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se extrajo el sobrenadante muy cuidadosamente para no arrastrar restos de tejido.

3.6.2.5.2. Cuantificación de los extractos proteicos

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-rad), midiendo la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 595 nm. Como patrón de referencia se empleó una dilución seriada de seroalbúmina (Sigma) empezando por la concentración de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ante la imposibilidad de realizar los ensayos con todas las muestras individualmente, los ensayos se realizan sobre mezclas de muestras según el tratamiento recibido y el tiempo seleccionado; reduciendo así el número final de muestras a analizar. Las muestras obtenidas se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

3.6.2.5.3. Separación de las proteínas por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque, primera dimensión)

Se realizaron 5 réplicas analíticas por tratamiento (controles, infectados con E75L e infectados con E75CV1). Para cada réplica se utilizaron 600 µg de proteína a la que se añadió solución de rehidratación (urea 7 M, CHAPS 4% (p/v), tiourea 2 M, anfolitos 1%, DTT 20 mM, PMSF 2 mM, cóctel inhibidor de proteasas y azul de bromofenol ~1 mg) hasta un volumen final de 300 µl. El isoelectroenfoque (IEF) se realizó con el Protean IEF cell (Bio-Rad), utilizando tiras de gel de poliacrilamida ReadyStrips IPG de 17 cm, con gradiente lineal de pH inmovilizado de 5 a 8 (Bio-Rad). Cada tira se depositó en un carril de la cámara de IEF y se cubrió con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra. A continuación, se siguieron las condiciones especificadas en la tabla IV a 20°C. Una vez acabado el IEF, las tiras se dispusieron durante 15 minutos en solución de equilibrado (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (v/v), DTT 2% (p/v), yodocetamida 2,5% (p/v, Merk) y H₂O. El DTT y la yodocetamida se añadieron para reducir los grupos Cys libres.

Tabla IV. Condiciones para la realización del IEF de las proteínas del linfonodo-gastrohepático.

Pasos	Voltaje (V)	Tiempo (h:min)	Voltios /hora (Vh)
Rehidratación activa	50	12:00	-
1	250 (+)	00:15	-
2	8.000 (+)	02:30	-
3	8.000 (++)	-	80.000
4	500 (++)	Mantenimiento	-

(+): aplicación del V en pendiente lineal; (++): pendiente rápida

3.6.2.5.4. Separación de las proteínas por tamaño en geles de poliacrilamida (segunda dimensión)

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en el Protean Plus DodedaCell (Bio-Rad). Las tiras ReadyStrips IPG se ubicaron sobre geles de poliacrilamida al 12% junto con una tira adyacente de papel Whatman impregnada con los marcadores de peso molecular (Sigma), sellándolo todo con agarosa (Sigma) al 1% (p/v) con azul de bromofenol para visualizar el frente de la electroforesis en el gel. La electroforesis de

desarrolló a temperatura ambiente (20°C) en la solución: TrisBase (Sigma) 25 mM, Glicina 192 mM (Sigma), SDS 0,1% (p/v) y H₂O, aplicando 35 V durante 1 hora y 100 V durante 14 horas o hasta que el frente alcanzó el final del gel.

3.6.2.5.5. Tinción de los geles de acrilamida

Los geles 2D se lavaron con H₂O ultra pura durante 1 minuto y, seguidamente, se trataron con la solución de tinción de Coomassie durante 18 horas. Esta solución se preparó en tres etapas: i) 80 g de H₂SO₄ se diluyeron en 22,5 ml de H₃PO₄ (Merk) 85% completando con H₂O hasta alcanzar los 700 ml; ii) 1 g de Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad) se diluyó en 20 ml de H₂O a la que se añadieron 200 ml de metanol (Panreac); y iii) ambas diluciones se mezclaron, enrasando el volumen final a 1 litro con H₂O ultrapura. Tras la tinción de los geles, éstos se lavaron de 1 a 3 minutos con una solución de 0,1 M Tris-H₃PO₄ en agua ajustando el pH de la solución a 6,5. A continuación, se aclararon con metanol al 25% en agua menos de 1 minuto para, posteriormente, lavar con H₂SO₄ al 20% durante 24 horas. Finalmente, los geles se mantuvieron en H₂O ultra pura. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente (20°C) con agitación orbital suave.

3.6.2.5.6. Análisis de imagen

Las imágenes de los geles se obtuvieron con un densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y se analizaron con el programa PD-Quest™ versión 7.3 (Bio-Rad). El criterio mínimo para determinar la presencia o ausencia de los puntos (*spots*) proteicos fue de 10 unidades por encima del valor de fondo y la normalización entre geles se basó en la cantidad total de proteína por gel. Este tipo de normalización es el más adecuado cuando se comparan muestras parecidas con pocas proteínas que varíen de unos geles a otros. Los criterios de selección cuantitativos para determinar diferencias entre las réplicas control y las de los animales tratados fueron de $2 < V < 0,5$ siendo V el volumen normalizado de la mancha en unidades de ppm CNT (unidades de cuantificación).

3.6.2.5.7. Identificación de las proteínas

El proceso de identificación de las proteínas se realizó en los Servicios de Proteómica de la Universidad de Córdoba mediante MALDI-TOF/TOF y en el Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Pamplona mediante trampa iónica, ambos centros pertenecen a la ProteoRed. La utilización de dos técnicas permite identificar un mayor número de proteínas:

- MALDI-TOF/TOF: la extracción de proteínas se llevó a cabo empleando la estación automática de homogenizado de geles ProPic (Genomic Solutions), tras lo cual se digirieron con tripsina y los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) en modo automático. Las proteínas fueron identificadas por huella peptídica y confirmadas por MS/MS analizando al menos dos péptidos por muestra. MASCOT (Matrixscience) fue el motor de búsqueda utilizado para la identificación de proteínas sobre la base de datos NCBI. Las identificaciones de proteínas con valoraciones mayores de 70 fueron positivamente asignadas, después de considerar los valores de masa molecular y el punto isoeléctrico.
- Trampa iónica: Los péptidos trípticos fueron analizados en una trampa iónica Q-TRAP 5500 (AB Sciex). La adquisición de datos de MS/MS se realizó con el Analyst 1.5.2. (AB Sciex) y se sometieron a análisis con el programa Phenyx™ (GeneBio) utilizando la base de datos UniprotKB/Swis-Prot para la identificación de las proteínas. Aquellas proteínas con una valoración superior a 10 y con, al menos, dos péptidos asignados fueron consideradas positivas.

3.6.2.6. Valoración microscópica de los tejidos mediante la tinción con hematoxilina-eosina y de marcajes inmunohistoquímicos

Durante la necropsia de los animales infectados con VPPA se recogió el linfonodo gastrohepático, entre otros tejidos. El linfonodo gastrohepático se fijó por inmersión en una solución del 10% de formol (Sigma) para, posteriormente, incluirse en bloques de parafina. A continuación, se obtuvieron secciones seriadas de 4 µm de grosor que fueron

utilizadas bien para el estudio histopatológico (tinción con hematoxilina-eosina), o bien para la detección de virus, apoptosis (caspasa-3) o de infiltrados de macrófagos por inmunohistoquímica.

3.6.2.6.1. Tinción del tejido con hematoxilina-eosina

Previo a su tinción las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. La primera tinción que se llevó a cabo fue la de la hematoxilina de Harris (Merk) durante 10 minutos, cubriendo la totalidad de la sección de tejido. A continuación se lavaron los tejidos con agua destilada durante 2 minutos para, seguidamente, realizar una diferenciación en alcohol clorhídrico (Merk) al 0,5% en agua destilada durante 30 segundos, tras lo cual se volvieron a lavar las secciones de tejido con agua corriente. El siguiente paso fue el viraje en agua amoniacal (QuimiNet) al 0,5%, con el consiguiente lavado posterior con agua corriente. Finalmente, se procedió a la coloración con eosina (Merk) durante 20 segundos, tras la cual se lavaron las secciones del tejido, se deshidrataron y montaron, listas para ser visualizadas en el microscopio óptico.

3.6.2.6.2. Detección del VPPA en linfonodo-gastrohepático

Previo a su tinción con anticuerpos α -p30 (clon 1D9, tabla III), las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron para, a continuación, realizar un tratamiento con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno (Merk) en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el objetivo de inhibir la peroxidasa endógena. Posteriormente, las muestras se trataron con EDTA (Sigma) diluido en agua destilada con el 0,5% de Tween-20 (pH 8; 0,37 g/ml) a 98°C durante 15 minutos para desenmascarar los diferentes epítomos. Tras dejarlo enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS (10% Tris (Sigma), 0,9% NaCl) y se bloquearon las muestras con TBS-2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se incubaron a 4°C durante 18 horas con el anticuerpo monoclonal α -p30 (clon 1D9, tabla III) diluido a 1:100 en TBS-2% BSA. Tras la incubación y

posterior lavado, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario α -IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Dako) diluido 1:200 en TBS-2% BSA. El sustrato empleado para el revelado de los cortes fue 3,3'-diaminobencidina (Sigma), previo tratamiento con la solución del complejo avidina biotina (ABC, Thermo Scientific).

3.6.2.6.3. Valoración de la apoptosis en linfonodo-gastrohepático

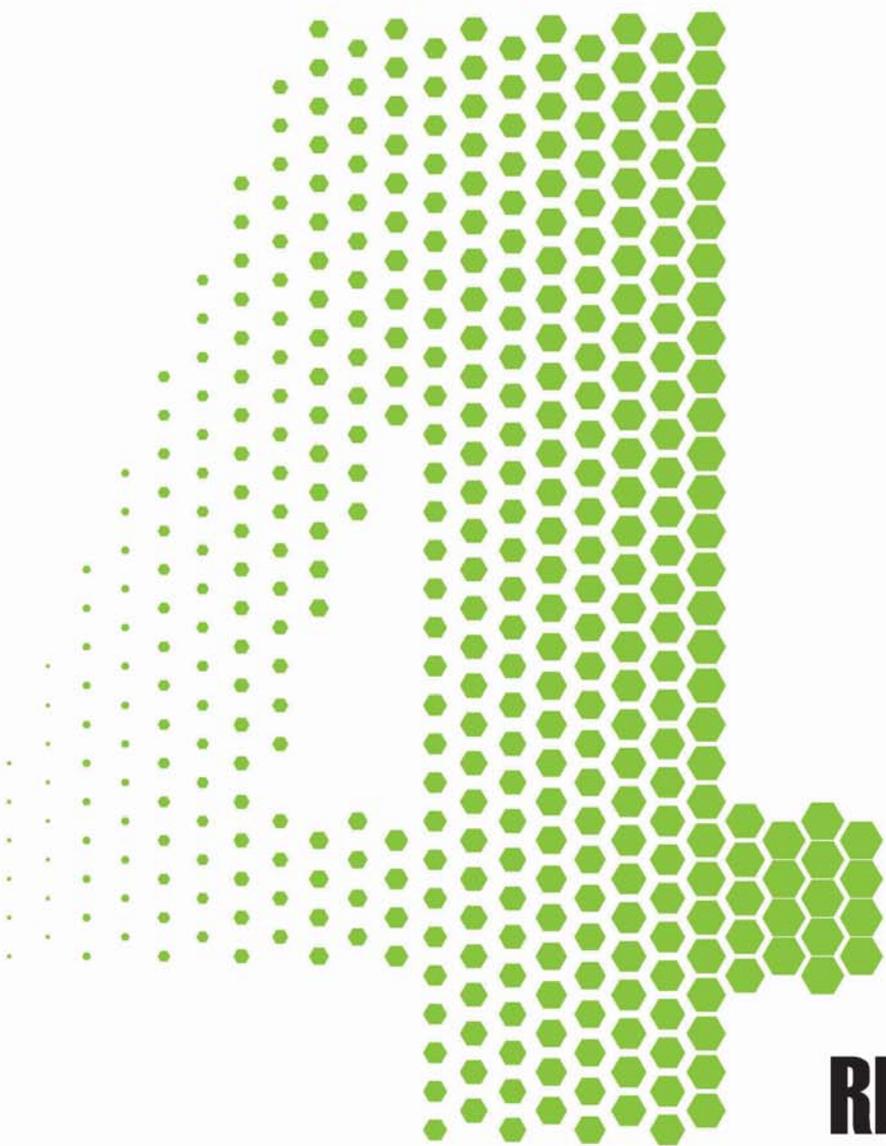
Para la valoración de la apoptosis en los tejidos se siguió el protocolo previamente descrito (3.6.2.6.2.), con ligeras modificaciones: como anticuerpo primario se utilizó un policlonal de conejo α -caspasa-3 (Cell Signaling) diluido 1:100 y como anticuerpo secundario se utilizó un α -IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Dako) diluido a 1:100 (tabla III).

3.6.2.6.4. Valoración de infiltrados celulares en tejidos de cerdos infectados con el VPPA

Para la detección de macrófagos en los tejidos se siguió el protocolo previamente descrito (3.6.2.6.2.), con ligeras modificaciones: el tratamiento previo al bloqueo se realizó mediante un tratamiento con proteasa (Sigma) a 37°C durante 8 minutos, como anticuerpo primario se utilizó un policlonal de conejo α -MAC387 (Dako) diluido 1:40 y como anticuerpo secundario se utilizó un α -IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido a 1:100 (tabla III).

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico para la determinación de diferencias significativas entre grupos de animales que recibieron diferentes tratamientos o entre aquellos que respondieron de manera diferencial en los parámetros evaluados se realizó mediante una T-Student previa determinación de la distribución normal, la varianza y la homogeneidad de los datos con el programa SigmaPlot 10.0.



RESULTADOS

"A cada cerdo le llega su San Martín"

4.1. Identificación y capacidad protectora de epítomos CTL específicos de la HA del VPPA

Como ya se ha comentado en la introducción (apartado 1.4.1.), tras la vacunación con el plásmido parcialmente protector pCMV-UbsHAPQ, el número de células T-secretoras de IFN γ específicas detectadas, tanto frente al virus como frente a proteínas específicas, resultó sorprendentemente más bajo que las detectadas tras la vacunación con el plásmido no protector pCMV-sHAPQ (Argilaguet, 2009). Con la aspiración de ver ampliada la señal específica obtenida tras la vacunación, se utilizaron PBMC de cerdos vacunados con pCMV-UbsHAPQ supervivientes a la infección letal con E75L, sacrificados 15 días tras la infección. Sorprendentemente, los datos obtenidos ratificaron los anteriores, no observándose apenas diferencias en el número de células T-secretoras de IFN γ en los animales supervivientes antes y después de la infección, al menos tras la estimulación con virus vivo (E75L) o con las proteínas p30, p54 y sHA del VPPA (figura 11).

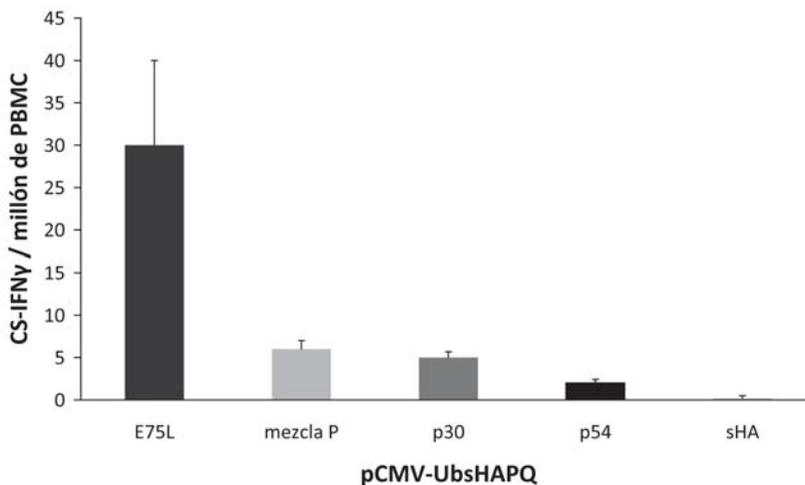


Figura 11. Detección de células T-específicas mediante ELISPOT de IFN γ en PBMC extraídas de cerdos vacunados con pCMV-UbsHAPQ y supervivientes a la infección con una dosis letal de E75L. Los resultados muestran tanto la media como la desviación estándar observada dentro del grupo de supervivientes y para cada uno de los estímulos utilizados: E75L, una mezcla de las proteínas p30, p54 y sHA (mezcla P) o cada una de las proteínas por separado.

El hecho de que pCMV-UbsHAPQ hubiera sido capaz de conferir protección en ausencia de anticuerpos, junto con la marcada proliferación de células T-CD8⁺ observada en la sangre de los animales protegidos, indicaba que debía existir una mayor respuesta celular de la que se detectaba mediante ELISPOT tras la estimulación con virus vivo o las proteínas p30, p54 y sHA.

4.1.1. Identificación de dos epítomos inmunodominantes en la HA

Con el objetivo de caracterizar la identidad de los epítomos CTL potencialmente protectores dentro de la construcción sHAPQ, se diseñaron *in silico* una batería de péptidos de 9 AA partiendo de las secuencias proteicas de p30 (18), p54 (7) y sHA (28) del VPPA (tabla V). Esta predicción se realizó teniendo en cuenta su teórico potencial de unión a las moléculas transportadoras TAP, esenciales para su presentación al sistema inmunológico como epítomos CTL (detalles en M&M).

Tras su síntesis, los péptidos fueron utilizados individualmente como estimuladores *in vitro* en ensayos de ELISPOT, utilizando las PBMC de los animales supervivientes recién descritos. De los 53 péptidos seleccionados, tan solo 2, pertenecientes a la secuencia de sHA, fueron capaces de estimular específicamente las células T-secretoras de IFN γ : el péptido F3 (SVDSPTITY, posiciones 116 a 124 de HA) y el péptido A6 (TNGDILNYY: posiciones 155 a 163 de HA). Curiosamente, dos de los cerdos supervivientes respondieron principalmente al péptido F3 y en menor medida al A6, mientras que un tercer cerdo tuvo una respuesta inversa, siendo la respuesta más inmunodominante frente al péptido A6 que frente al F3 (figura 12).

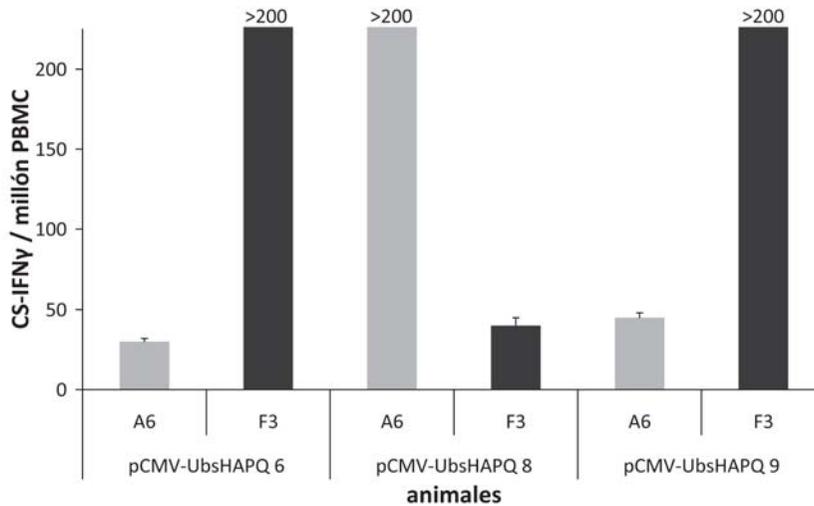


Figura 12. Detección de células T-específicas mediante ELISPOT de IFN γ en PBMC extraídas de cerdos vacunados con pCMV-UbsHAPQ y supervivientes a la infección con una dosis letal de E75L. Los resultados muestran, tanto la media como la desviación estándar obtenida en tres ensayos independientes para cada animal tras la estimulación con los péptidos A6 o F3.

4.1.2. F3 y A6 estimulan la secreción de IFN γ de una forma dependiente de SLA-I

Con el objetivo de confirmar la capacidad estimuladora de F3 y A6, se derivaron fibroblastos autólogos a partir de la piel de los mismos animales supervivientes (de los que se extrajeron PBMC), con la finalidad de ser utilizados como CPA tras la incubación con los péptidos específicos.

Previo a la realización de estos ensayos, se procedió a la caracterización de los fibroblastos obtenidos. Las células que se aislaron de piel de cerdo presentaban escaso citoplasma y tenían forma de huso con grandes prolongaciones citoplasmáticas muy extendidas, lo que coincidía con la típica morfología de los fibroblastos en cultivo celular (Wheater *et al.*, 1987) (figura 13 A). Más relevante para los experimentos a realizar, los fibroblastos expresaban SLA-I en superficie e indetectables niveles de SLA-II (figura 13 B-D), lo que encajaba perfectamente con nuestro propósito de usarlas como CPA capaces de estimular células T-CD8⁺ *in vitro*.

Tabla V. Péptidos de 9 AA basados en la secuencia de las proteínas virales: p30, p54 y sHA que potencialmente podrían unirse a TAP en estudios *in silico*.

Nombre	Secuencia	Posición	Nombre	Secuencia	Posición
Péptidos basados en la secuencia de p30			Péptidos basados en la secuencia de sHA		
A1	DIVKSAHIY	61-69	B1	TYCGIAGNY	57-65
H1	NKVIRAHNF	158-166	C1	VYLDKKINY	101-109
A2	FILNISMKM	3-11	D1	FNRTYELVY	94-102
B2	AHIYAGQGY	66-74	E1	KYQNYLSTR	197-205
D2	KTVQHIEQY	143-151	C2	CKNNGTNV	133-141
G2	LRSSQVVF	19-27	E2	YYDNRSNF	48-56
H2	WNMTLHVLF	83-91	F2	YGGLFWNTY	40-48
A4	VVRLMVIKL	182-190	A3	NCTNPILKY	190-198
C4	RAHNFQTI	162-170	B3	VFLNNIFTI	28-36
E4	HAGSLYNWF	28-36	C3	NIFTINDTY	32-40
F4	KTLLSTVKY	52-60	D3	WSTLNQTVF	21-29
H4	LLSHLHLMF	196-204	E3	YYWNGNNNF	162-170
G5	LYNWFVSVEI	32-40	F3	SVDSPTITY	116-124
H5	NKLLSHLHL	194-202	G3	MINNTISSL	175-183
C6	ISMKMEVIF	7-15	H3	NTEIFNRTY	90-98
B7	LMVIKLLKK	185-193	A5	NGTNVNIY	136-144
C7	AQEEWNMTL	79-87	C5	IFPNTEIF	86-94
E7	IVTTAIKTL	46-54	E5	EIFNRTYEL	92-100
Péptidos basados en la secuencia de p54			F5	GGLFWNTYY	41-49
F1	PSFFSTHMY	24-32	A6	TNGDILNYY	155-162
G1	ASAHPTPEY	144-152	B6	YCGIAGNYC	58-66
B4	SAIENLRQR	166-174	D6	SCCGHNISL	67-75
D4	TRSMDEEFF	-3-6	E6	NPILKYQNY	193-201
G4	AIEEEDIQF	62-70	F6	NRTYELVYL	95-103
B5	IIIVLIYLF	44-52	G6	TNNCSLIIF	79-87
D5	FQPVYPRHY	6-14	H6	KKINYTVKL	105-113
			A7	QTVFLNNIF	26-34
			D7	RSNFTYCGI	53-61

Una vez caracterizados, los fibroblastos fueron preincubados con y sin los péptidos F3 y A6 por separado para ser utilizados en protocolos de estimulación *in vitro*, utilizando PBMC autólogas. Como se esperaba, los fibroblastos utilizados como CPA ratificaron los resultados obtenidos con los péptidos solubles, resultando como mínimo tan eficientes como estos (figura 14).

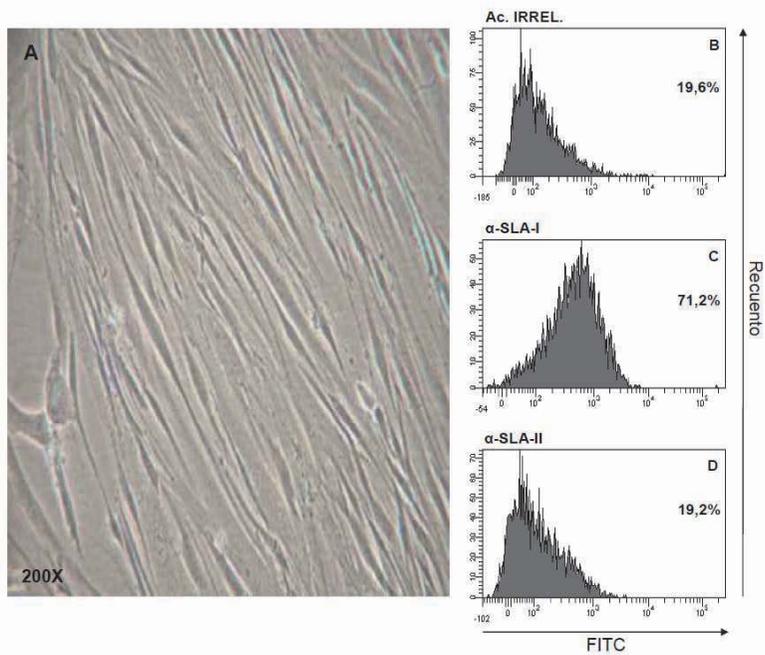


Figura 13. Caracterización de fibroblastos primarios derivados de piel: fibroblastos en imagen de microscopio óptico invertido x200 (A); y caracterización por citometría de flujo del porcentaje de fibroblastos marcados con un anticuerpo irrelevante (B), marcados con α -SLA-I (C) o con α -SLA-II (D). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón polivalente conjugado con FITC.

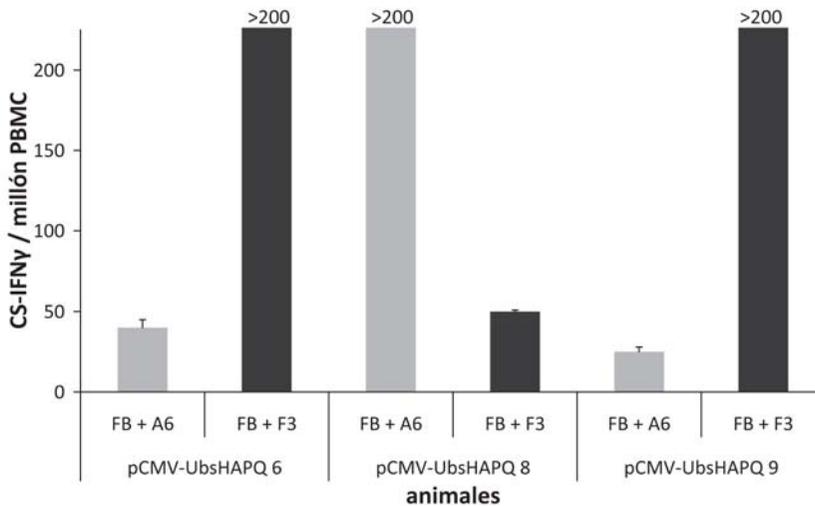


Figura 14. Detección de células T-específicas mediante ELISPOT de IFN γ en PBMC extraídas de cerdos vacunados con pCMV-UbsHAPQ y supervivientes a la infección con una dosis letal de E75L. Los resultados muestran tanto la media como la desviación estándar observada en tres ensayos independientes para cada animal tras la estimulación con fibroblastos autólogos pre-incubados con los péptidos A6 o F3.

4.1.3. Ensayo de protección utilizando los péptidos F3 y A6

Después de comprobar la capacidad de los péptidos F3 y A6 de ser reconocidos por células T-CD8⁺ a través de SLA-I y su capacidad inmunoestimuladora *in vitro* (figuras 12 y 14) se decidió ensayar su capacidad protectora *in vivo*.

Con este objetivo 5 cerdos Landrace x Large White fueron inmunizados con los péptidos sintéticos F3 y A6 y 4 cerdos fueron inmunizados con adyuvante de Freund solamente (controles). Finalmente, 15 días tras la última inmunización los animales fueron infectados con 10^4 UHA₅₀ de E75L.

Como cabía esperar para esta dosis de virus los animales control murieron todos entre los días 7 y 10 pi. En claro contraste, uno de los animales inmunizado con los péptidos fue capaz de sobrevivir a la infección del VPPA, detectándose además un retraso en la aparición de las primeras bajas en este grupo, ya que la primera muerte se produjo a día 10 pi, 3 días más tarde que los controles (figura 15).

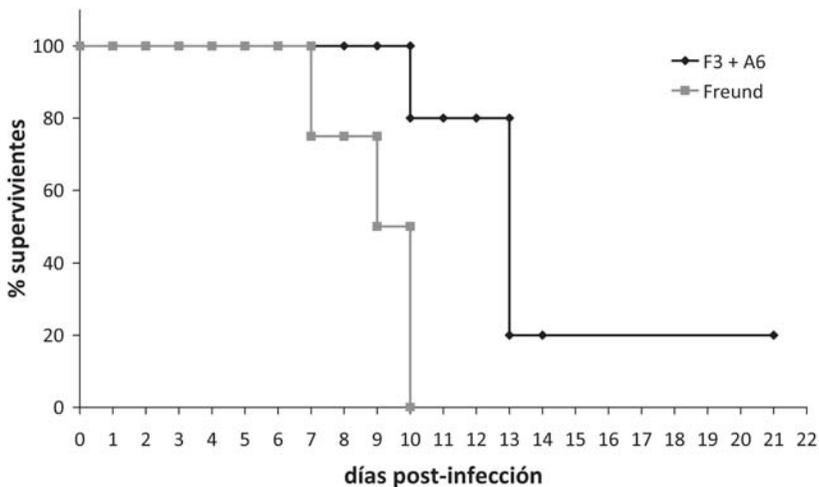


Figura 15. Porcentaje de supervivencia de cerdos inmunizados con los péptidos F3 y A6 (línea negra) y de los controles sin vacunar (línea gris) tras la infección con una dosis letal de E75L.

Sin embargo, y a pesar de la protección parcial conferida por los péptidos frente al desafío letal con el VPPA, los animales inmunizados padecieron signos de PPA aguda como fiebre (temperaturas superiores a los 40,5°C), pérdida de apetito e inactividad. Estos resultados parecen correlacionar con el hecho de que se alcanzaran títulos virales

en sangre comparables a los del grupo control. De todos modos, es muy significativo que el animal superviviente viera retrasada la viremia (a día 3 pi no detectamos virus en sangre) y que mantuviera durante todo el desarrollo del experimento títulos virales menores que los animales control, siendo indetectables a partir de día 10 pi (figura 16). La menor viremia y el hecho de que esta fuera transitoria tiene un paralelismo claro con la ausencia de lesiones típicas de PPA en la necropsia.

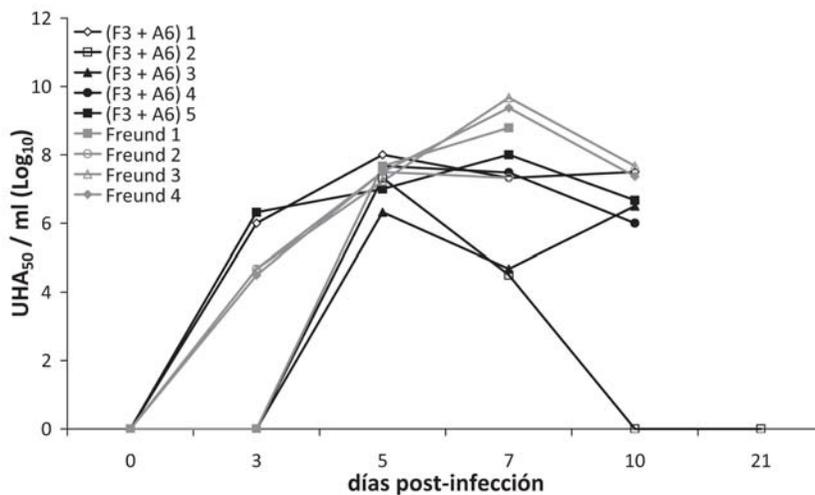


Figura 16. Cinética de detección de virus en suero de cerdos inmunizados con los péptidos F3 y A6 (línea negra) y en los controles sin vacunar (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

4.2. Ensayos de protección mediada por librerías genómicas de expresión

Teniendo en cuenta la protección parcial conferida frente al VPPA tras la inmunización con pCMV-UbsHAPQ, conteniendo las secuencias de las proteínas virales: p30, p54 y sHA; tres proteínas de las más de 150 codificadas en el genoma del VPPA; se decidió intentar identificar la presencia de nuevos antígenos potencialmente protectores en el resto del genoma del virus. Con este objetivo, se resolvió generar librerías aleatorias de expresión a partir del genoma del aislado Ba71V, con el propósito de utilizarlas en protocolos de vacunación con DNA; lo que se conoce como estrategia de inmunización con librerías de expresión (ELI).

4.2.1. La protección conferida por las ELI depende del modo de presentación de los antígenos vacunales al sistema inmune

Con el objetivo de realizar una primera prueba de concepto que permitiera validar la estrategia ELI, se decidió comenzar por el diseño de dos librerías a partir de dos fragmentos de restricción *Sall* únicos del genoma de Ba71V: SD y SB (tabla I). Las dos librerías así obtenidas: sHA-ELI_{SD/SB} y Ub-ELI_{SD/SB}, se componían de 380 clones individuales cada una de ellas en una sola pauta de lectura (F1), para ser expresados como un producto de fusión: i) con sHA, con la intención de orientar la respuesta inmunitaria hacia la generación de anticuerpos específicos y potenciar la respuesta T-CD4⁺ (Argilaguet, 2009); y ii) con ubiquitina, con el objetivo de potenciar una respuesta específica de células T-CD8⁺, evitando a su vez la producción de anticuerpos (Argilaguet, 2009; Rodríguez *et al.*, 1997). Los clones que específicamente contenían las secuencias correspondientes a p30 y HA (presentes en pCMV-sHAPQ o en pCMV-UbsHAPQ), fueron eliminados de ambas librerías tras la secuenciación individual de todos sus clones.

Con el objetivo final de mejorar la respuesta protectora obtenida hasta el presente (33%), cada una de las librerías resultantes: sHA-ELI_{SD/SB} y Ub-ELI_{SD/SB} fue ensayada *in vivo* en combinación con el plásmido pCMV-sHAPQ o pCMV-UbsHAPQ respectivamente.

Grupos de 4 cerdos fueron inmunizados: a) con la librería sHA-ELI_{SD/SB} más la parte proporcional del plásmido pCMV-sHAPQ (1,6 µg/plásmido, sHA-ELI_{SD/SB-sHAPQ}); b) con la librería Ub-ELI_{SD/SB} más la parte proporcional del plásmido pCMV-UbsHAPQ (1,6 µg/plásmido, Ub-ELI_{SD/SB-sHAPQ}); y c) como controles del experimento 3 animales fueron inmunizados con el plásmido pCMV y 3 más con pCMV-Ub. Dos semanas tras la última inmunización los 14 animales fueron infectados con 10⁴ UHA₅₀ de E75L.

Como se puede observar en la figura 17, la curva de supervivencia obtenida para el grupo inmunizado con sHA-ELI_{SD/SB-sHAPQ} es comparable a la del grupo control (pCMV) y, a pesar de que un animal sobreviviera hasta día 12 pi, no se observaron diferencias ni en la cinética de aparición de la enfermedad ni en la intensidad de las lesiones macro y microscópicas encontradas tras la necropsia. La ausencia de protección fue corroborada por los datos de viremia, ya que tanto la cinética de aparición del virus en sangre como

los títulos virales alcanzados en cada tiempo tras la infección resultaron similares para ambos grupos de inmunización (figura 18 A).

En claro contraste, el grupo inmunizado con Ub-ELI_{SD/SB-SHAPQ}, aunque no vio retrasadas las primeras bajas respecto a los controles, alcanzó una supervivencia del 50% (2/4 animales), un 20% más que el grupo de animales vacunados con el plásmido pCMV-UbsHAPQ, anteriormente descrito (apartado 1.4.1.), siendo éste el máximo nivel de protección alcanzado hasta ahora por ninguna de las vacunas probadas (figura 17).

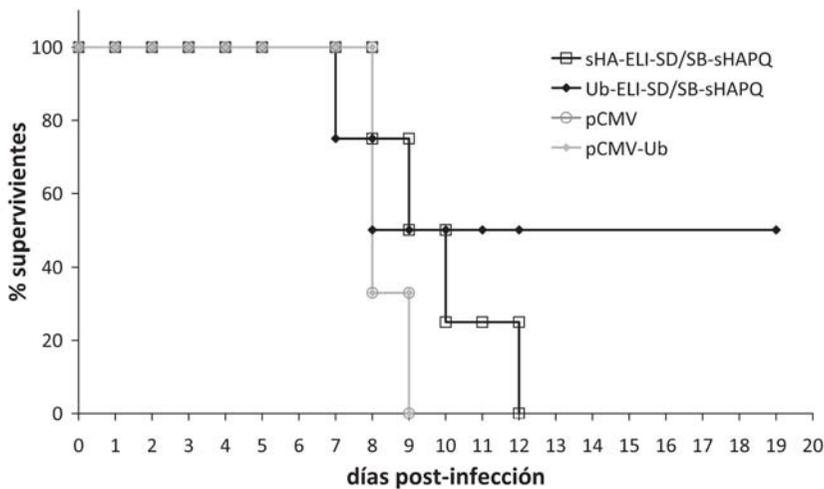


Figura 17. Porcentaje de supervivencia de los cerdos inmunizados con sHA-ELI_{SD/SB-SHAPQ} o con Ub-ELI_{SD/SB-SHAPQ} (ambos en negro) y de los animales de los grupos control inmunizados con el plásmido pCMV o pCMV-Ub (ambos en gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

La protección se vio ratificada al observarse que los animales inmunizados con Ub-ELI_{SD/SB-SHAPQ} mantuvieron durante todo el experimento títulos virales menores en sangre que los animales control (pCMV-Ub), siendo máxima esta diferencia a día 7 pi (hasta 4 logaritmos, $p < 0,01$) entre los animales supervivientes inmunizados con Ub-ELI_{SD/SB-SHAPQ} y los controles. Asimismo, la viremia tuvo un carácter transitorio en los animales protegidos, no detectándose virus a día 3 pi y aclarándolo totalmente a partir de día 19 pi (figura 18 B), hecho que concuerda con la ausencia de lesiones macro y microscópicas típicas de PPA y con una sintomatología de la enfermedad aguda mucho más leve en aquellos animales que superaron la infección.

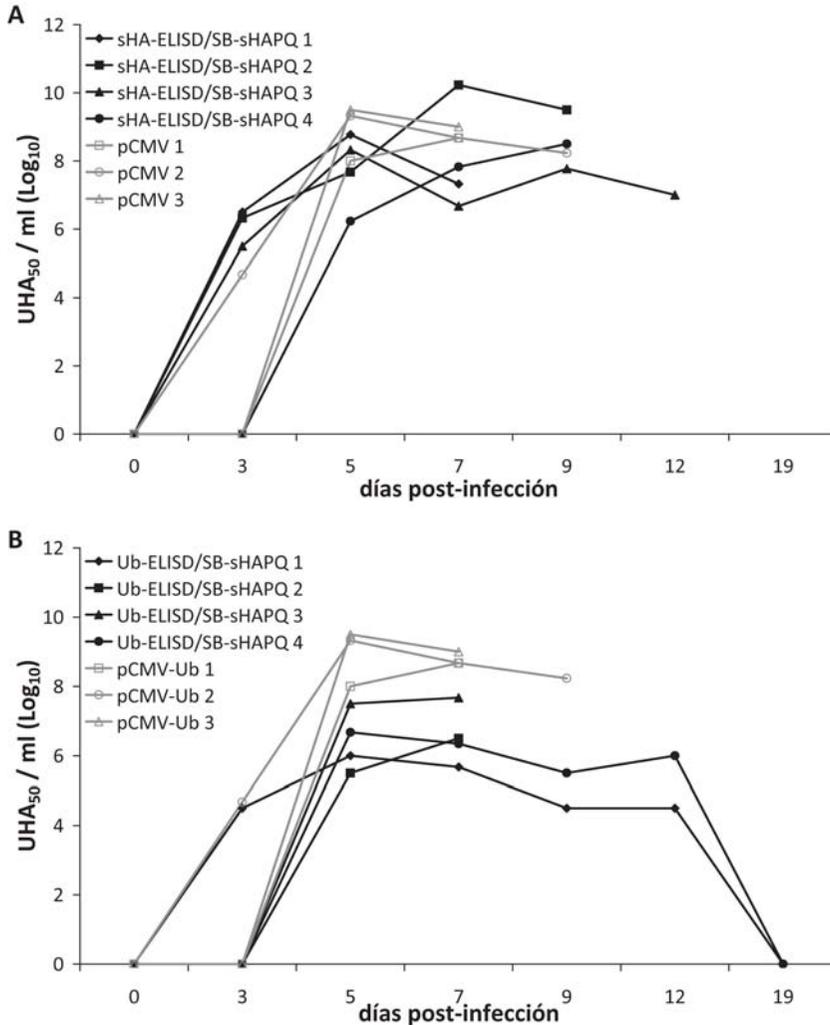


Figura 18. Cinética de detección de virus en suero de cerdos inmunizados con sHA-ELI_{SD/SB-sHAPQ} (línea negra) o con pCMV (línea gris) (A) y de los animales inmunizados con Ub-ELI_{SD/SB-sHAPQ} (línea negra) o con pCMV-Ub (línea gris) (B), tras la infección con una dosis letal de E75L.

Como cabía esperar, la vacunación con Ub-ELI_{SD/SB-sHAPQ} no estimuló la generación de anticuerpos específicos, al no observarse siquiera ningún tipo de aceleración tras la infección con el VPPA, siendo los títulos de anticuerpos específicos indistinguibles de los detectados en los animales control (figura 19 B). En claro contraste con lo observado anteriormente tras la inmunización con pCMV-sHAPQ (Argilaguet, 2009), la inmunización

con sHA-ELI_{SD/SB-sHAPQ}, no fue capaz de estimular una respuesta humoral, al menos detectable mediante nuestra metodología (figura 19 A).

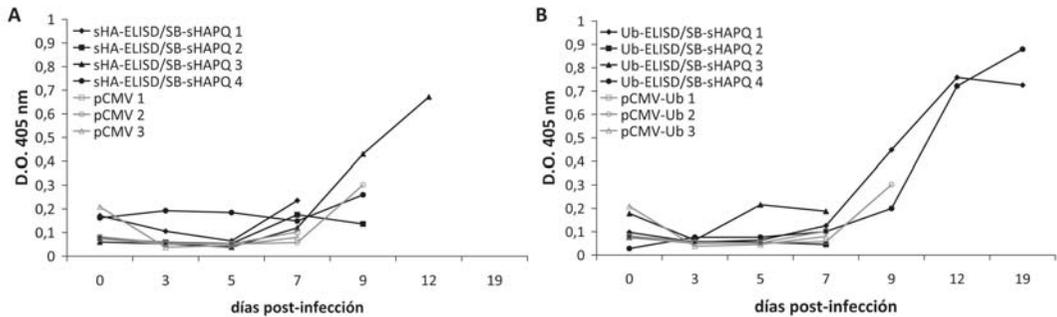


Figura 19. Cinética de detección de anticuerpos específicos frente al VPPA mediante ELISA tras la infección con una dosis letal de E75L, tanto en los sueros de los cerdos inmunizados con sHA-ELI_{SD/SB-sHAPQ} (línea negra) o con pCMV (línea gris) (A); como de los animales inmunizados con Ub-ELI_{SD/SB-sHAPQ} (línea negra) o con pCMV-Ub (línea gris) (B).

4.2.2. Caracterización de 7 nuevos antígenos del VPPA con potencial inmunoprotector

Tras la secuenciación de los clones de la librería Ub-ELI_{SD/SB} y su comparación con la secuencia del aislado Ba71V (PRJNA15242), únicamente 7 clones, de los 376 seleccionados de esta librería, contenían secuencias que mantenían la pauta de lectura con la ubiquitina y que correspondían con ORF previamente descritas en el genoma de Ba71V. Los fragmentos de restricción *Sau3AI* en pauta de lectura con la ubiquitina codificaban fragmentos de las proteínas: p10, pp220 y pp60 (proteínas estructurales), proteínas para las que aún no se ha identificado una función concreta (pCP312R y pD339L), helicasa y una proteína relacionada con la virulencia y el control de la apoptosis en el huésped (proteína similar a Bcl2) (tabla VI).

Un vez identificados los 7 clones, éstos fueron utilizados en protocolos de inmunización en los que 5 cerdos recibieron una mezcla con los 7 plásmidos (85,7 ng/plásmido, Ub-ELI_{7-clones}) y 3 cerdos se utilizaron como controles del ensayo tras ser inmunizados con el plásmido pCMV-Ub. Todos los animales se infectaron con una dosis letal de E75L dos semanas tras la última inmunización.

Tabla VI. Descripción de los 7 clones identificados a partir de Ub-ELI_{SD/5B} que mantienen la pauta de lectura con la ubiquitina.

Nombre	Gen	Posición (bp)	Proteína
Clon 1	<i>CP312R</i>	762 a 927	pCP312R
Clon 2	<i>CP2475L</i>	18 a 78	Poliproteína de 220 KDa (pp220)
Clon 3	<i>CP530R</i>	57 a 162	Poliproteína de 60 KDa (pp60)
Clon 4	<i>D339L</i>	822-927	pD339L
Clon 5	<i>K78R</i>	156-189	Proteína estructural p10
Clon 6	<i>A179L</i>	501-540	Proteína similar a Bcl2
Clon 7	<i>A859L</i>	105-378	Helicasa

Tal y como se ha descrito para esta dosis de virus, todos los animales control murieron entre los días 7 y 10 pi. En cambio, los animales vacunados con Ub-ELI_{7-clones} vieron retrasadas las primeras bajas 3 días respecto a los animales control y lo que es más importante, uno de los cerdos sobrevivió al desafío letal con VPPA (1/5) (figura 20).

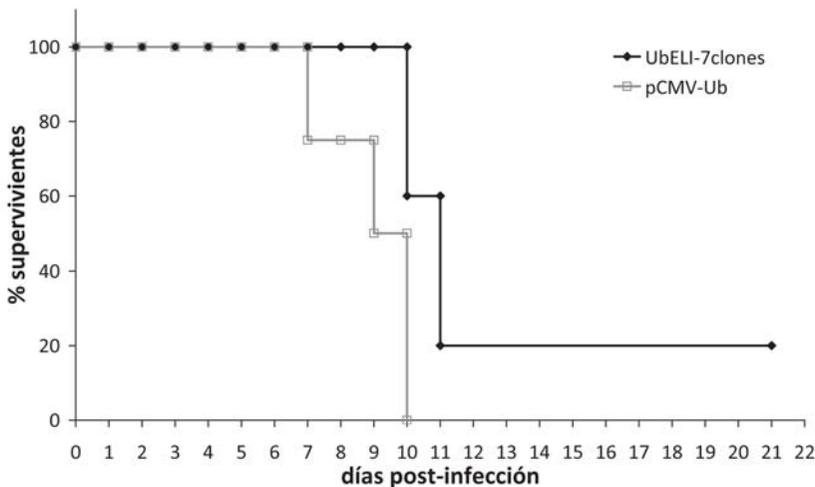


Figura 20. Porcentaje de supervivencia de los animales inmunizados con Ub-ELI_{7-clones} (línea negra) o con pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

En consonancia con estos resultados, el animal superviviente mantuvo títulos virales menores a lo largo de todo el ensayo, con ausencia de virus a día 3 pi y aclarándolo a partir de día 10 pi, ratificando el carácter transitorio de la viremia (figura 21).

Adicionalmente, la signos clínicos de PPA fueron menos intensos en este animal, no observándose lesiones ni micro ni macroscópicas compatibles con PPA tras la necropsia.

Los animales no supervivientes, en cambio, sufrieron cinéticas de aparición de virus, títulos virales y sintomatología de la enfermedad indistinguibles, independientemente del grupo de inmunización o del día en el que murieron (figura 21).

Los resultados obtenidos claramente demuestran la capacidad protectora de una vacuna DNA compuesta por 7 clones discriminados de la librería Ub-ELI_{SD/SB}.

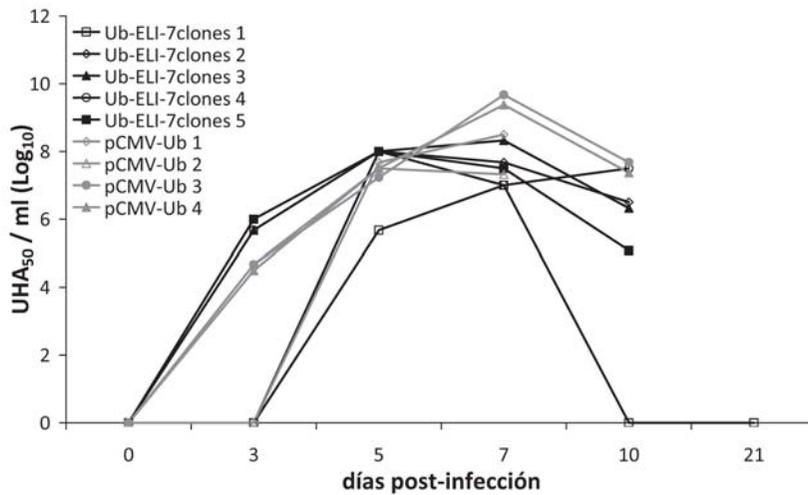


Figura 21. Cinética de detección de virus en suero de cerdos inmunizados con Ub-ELI_{7-clones} (línea negra) o de los animales control inmunizados con pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

4.2.3. Ub-ELI_{completa} protege al 60% de los cerdos vacunados, a pesar de la ausencia en la misma de las secuencias que codifican las proteínas virales p30, p54 y sHA

Los resultados hasta ahora expuestos, sirvieron como prueba de concepto para demostrar el potencial vacunal de la estrategia ELI, siempre y cuando los antígenos clonados se expresaran como fusión al polipéptido ubiquitina. Partiendo de esta información, se procedió a la generación de una ELI con 4.029 clones a partir del 76,5% del genoma de Ba71V, expresando al azar cada uno de los fragmentos de restricción *Sau3AI* en las tres pautas de lectura posibles y fusionadas a la ubiquitina: Ub-ELI_{completa}.

Con el fin de evaluar la capacidad protectora de Ub-ELI_{completa}, se inmunizaron 5 cerdos con la mezcla de los 4.029 clones comprendidos en la misma (0,15 µg/plásmido) y 5 cerdos más fueron utilizados como controles del ensayo, inmunizados con pCMV-Ub. Dos

semanas tras la última inmunización, a todos los cerdos se les inoculó una dosis letal de E75L.

Como cabía esperar para la dosis de virus utilizada, el grupo de animales control sufrió las primeras bajas a día 7 pi, no contando con ningún superviviente tras el día 10 pi. En contraposición, 3 de los 5 animales (60%) vacunados con Ub-ELI_{completa} sobrevivieron a la infección letal, teniendo lugar las primeras bajas a partir del día 10 pi, con un retraso de 3 días respecto los animales control (pCMV-Ub). El porcentaje de supervivientes obtenido fue el mayor alcanzado hasta el momento tras la vacunación con DNA codificando antígenos del VPPA (figura 22).

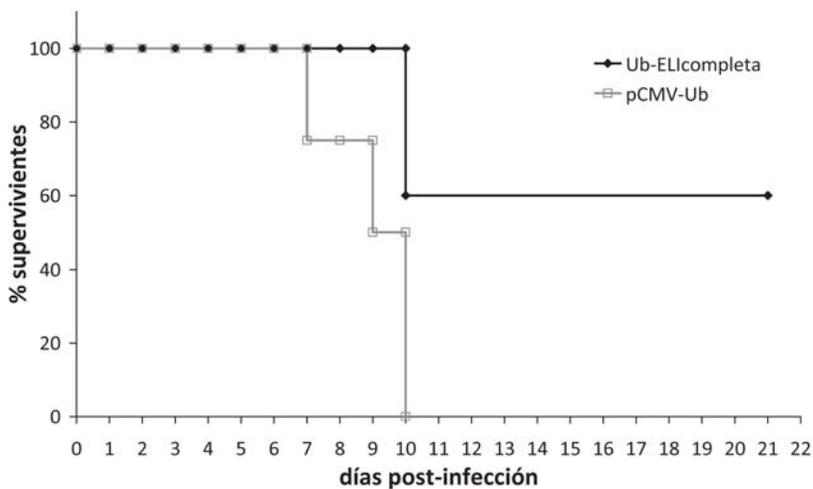


Figura 22. Porcentaje de supervivencia de los cerdos inmunizados con Ub-ELI_{completa} (línea negra) y del grupo control inmunizado con pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

Corroborando los datos de supervivencia, los títulos virales en suero y la cantidad de virus excretado (hisopo nasal) alcanzados, fueron generalmente menores en aquellos animales inmunizados con Ub-ELI_{completa} que en los animales control (figura 23 y 24). Cabe destacar que en los animales que superaron la infección no se pudo detectar virus a partir del día 21 pi, ni en suero ni en hisopo nasal, datos que se tradujeron en una ausencia total de lesiones macroscópicas y microscópicas en la necropsia.

Independientemente del porcentaje de supervivencia y del relativo control de la viremia y de la excreción viral, todos los animales sufrieron signos severos de PPA aguda, mejorando su estado general únicamente aquellos animales que superaron la infección.

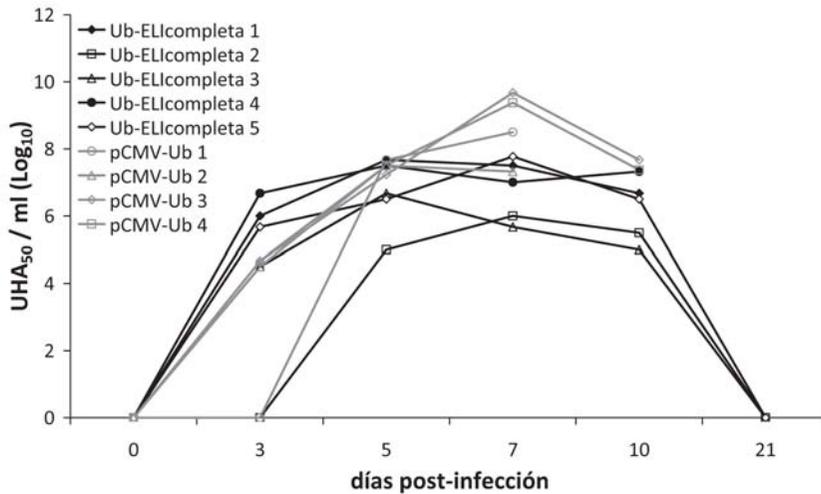


Figura 23. Cinética de detección de virus en suero de cerdos inmunizados con Ub-ELI_{completa} (línea negra) o de los animales control inmunizados con pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

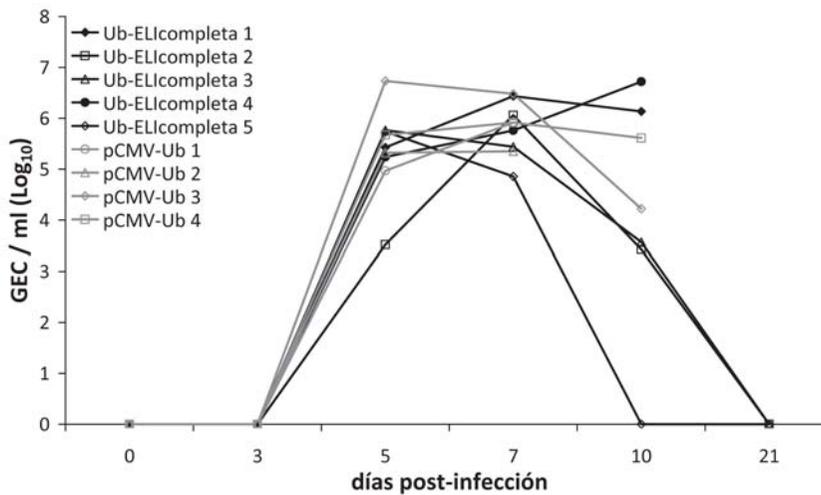


Figura 24. Cinética de la excreción viral detectable a partir de hisopos nasales obtenidos a partir de los animales vacunados con Ub-ELI_{completa} (línea negra) o de los animales control inmunizados con el plásmido pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L.

Así pues, con una librería genómica de expresión con 4.029 clones (Ub-ELI_{completa}) y en ausencia de anticuerpos específicos y de los tres antígenos parcialmente protectores en los que se basó el anterior trabajo del laboratorio (Argilaguet, 2009), se consiguió la máxima protección alcanzada con vacunación con DNA frente al VPPA, siendo la supervivencia de un 60%.

4.3. Inmunización de cerdos SPF con vacunas DNA

Con el propósito de confirmar la capacidad protectora de nuestras vacunas DNA y, a su vez, identificar los mecanismos implicados en la protección conferida, se decidió utilizar cerdos libres de patógenos específicos (SPF). Como ya hemos comentado en el apartado de materiales y métodos, los cerdos SPF son el estándar mínimo exigido por las autoridades reguladoras competentes para las pruebas de evaluación de productos destinados para el uso humano y veterinario. Otra ventaja adicional es la de tener la garantía de realizar los experimentos en animales con un sistema inmunológico naif, lo que facilitó enormemente la lectura de los ensayos inmunológicos.

4.3.1. El aislado de VPPA atenuado E75CV1 resulta letal para los cerdos SPF

Para llevar a cabo nuevos experimentos de inmunización e infección utilizando las Ub-ELI se escogieron cerdos Large White SPF y el aislado atenuado E75CV1, derivado de la cepa virulenta E75L. En claro contraste con el virus virulento (E75L), capaz de matar en 7 días, la inoculación de cerdos convencionales con la misma dosis de E75CV1 (10^4 UHA₅₀), provocaba una viremia transitoria sin apenas provocar signos clínicos aparentes (apartado 4.4.1.). Con estos datos en mente y con el objetivo de otorgar a los animales vacunados más oportunidades de superar la infección, se decidió utilizar el aislado E75CV1 en cerdos SPF. El primer resultado inesperado provino del hecho de que los cerdos SPF infectados con E75CV1 murieran con una cinética muy parecida a la de los cerdos convencionales infectados con la cepa virulenta E75L, observándose tan solo un retaso en la misma (figura 25). Del mismo modo, los títulos virales alcanzados en sangre

fueron equivalentes a los de los cerdos convencionales infectados con la cepa virulenta E75L (figura 26).

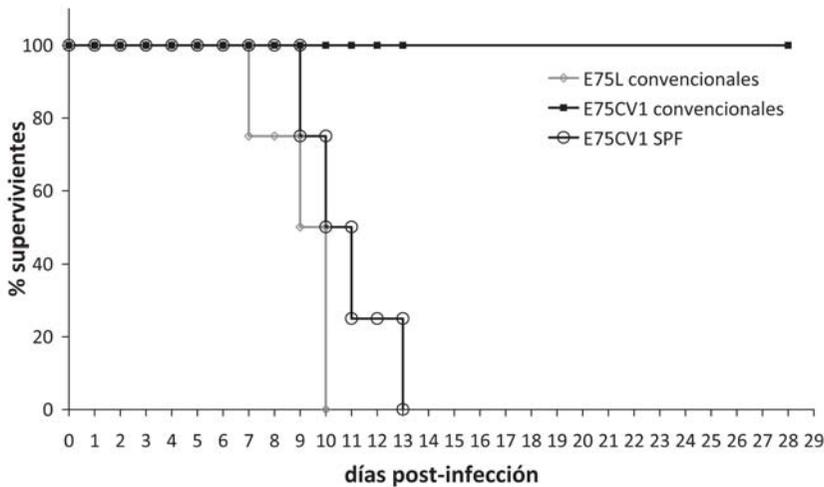


Figura 25. Porcentaje de supervivencia de cerdos convencionales infectados con E75L (rombo gris) o con E75CV1 (cuadrado negro) y comparativa de la infección de cerdos SPF con este mismo virus atenuado (círculo negro). Para ambos virus se utilizó una dosis de 10^4 UHA₅₀.

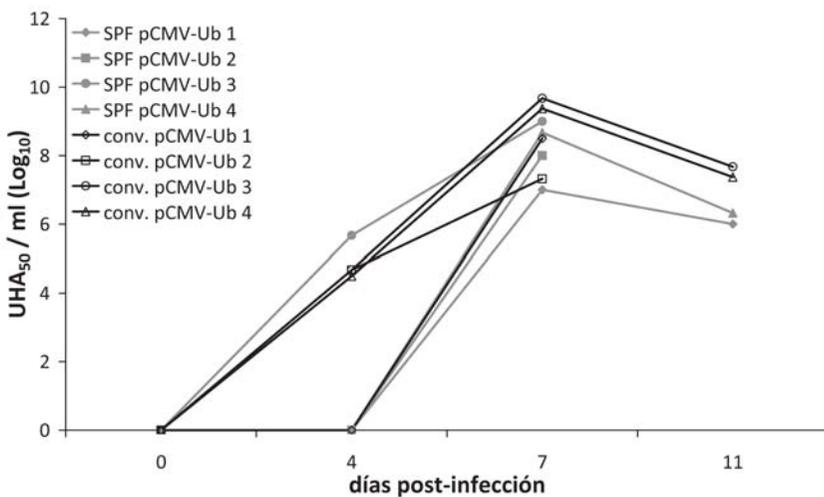


Figura 26. Comparativa de la cinética de detección de virus en suero tras la infección de cerdos SPF con E75CV1 (línea gris) o de cerdos convencionales infectados con E75L (línea negra). Para ambos virus se utilizó una dosis de 10^4 UHA₅₀.

Pese a este contratiempo, se procedió con los protocolos de inmunización e infección programados, con el fin de poder definir la respuesta inmunitaria y protectora asociada a la vacunación con DNA en un modelo libre de “interferencias inmunológicas” tan valioso como es el de los cerdos SPF.

4.3.2. Confirmación de la capacidad protectora de nuestras vacunas DNA en cerdos SPF

Con el fin de corroborar los datos de protección de las vacunas pCMV-UbsHAPQ, Ub-ELI_{7clones} y Ub-ELI_{completa} se utilizaron 20 cerdos divididos en 3 grupos: un grupo de 8 cerdos se inmunizó con la mezcla de plásmidos Ub-ELI_{7clones} más la parte proporcional de pCMV-UbsHAPQ (75 µg/plásmido, Ub-ELI_{7clones}-sHAPQ), otro grupo de 8 cerdos se vacunó con Ub-ELI_{completa} (0,15 µg/plásmido) y 4 cerdos más se inmunizaron con pCMV-Ub para ser usados como controles del experimento. Dos semanas tras la última inmunización, los 20 animales se infectaron con 10⁴ UHA₅₀ de E75CV1.

Mientras que los animales control murieron todos entre los días 9 y 13 pi, tanto en el grupo de animales vacunados con Ub-ELI_{7clones}-sHAPQ, como en el grupo de inmunizados con Ub-ELI_{completa}, sobrevivió el 50% (4/8) de los cerdos (figura 27).

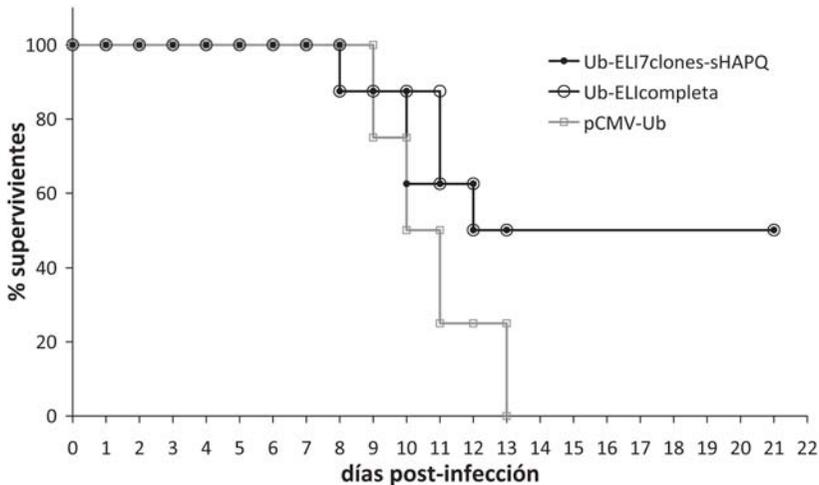


Figura 27. Porcentaje de supervivencia de los cerdos SPF inmunizados con Ub-ELI_{7clones}-sHAPQ, con Ub-ELI_{completa} (ambos en negro) o bien con el plásmido pCMV-Ub (línea gris), tras la infección con 10⁴ UHA₅₀ de E75CV1.

Asimismo, los datos de viremia y de excreción viral correlacionaban con los de protección manteniendo, los animales supervivientes, niveles de virus menores que los cerdos control tanto en sangre como excretados, siendo especialmente significativa la diferencia a día 7 pi ($p < 0,01$ en Ub-ELI_{completa} y $p < 0,05$ en Ub-ELI_{7-clones-sHAPQ}); momento en que se alcanzaron los máximos títulos virales en todos los grupos (figuras 28 y 29).

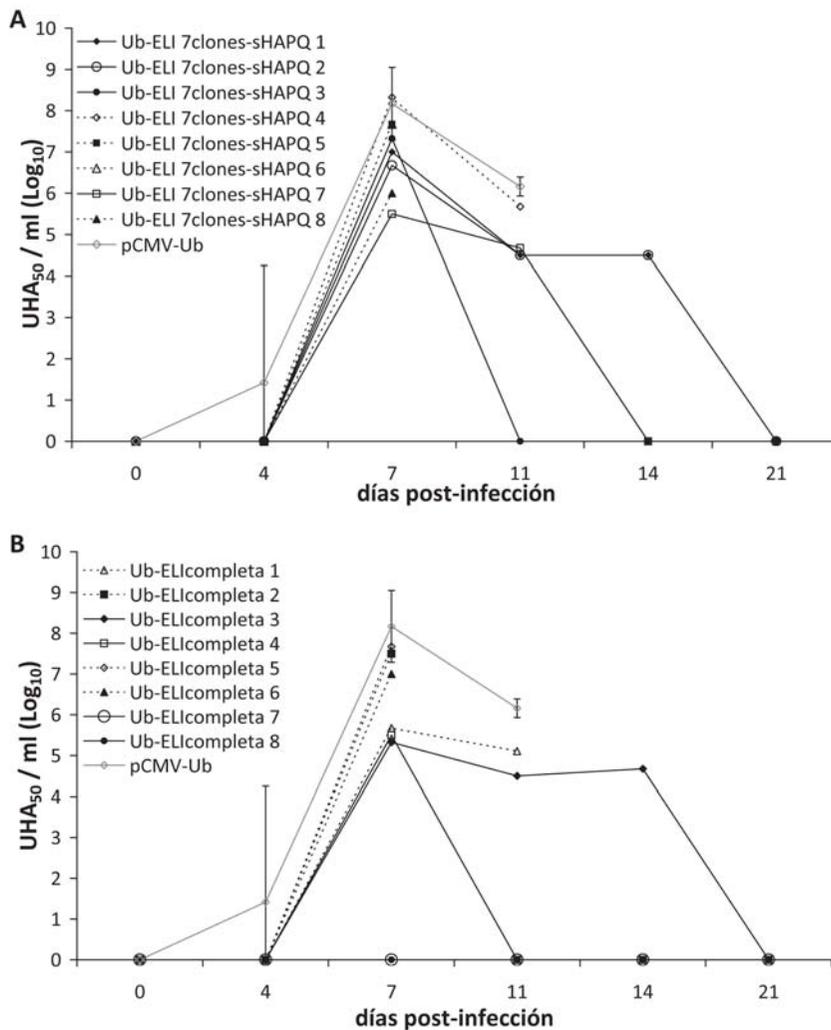


Figura 28. Cinética de detección de virus en suero observada en los cerdos SPF inmunizados bien con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} (A) o con Ub-ELI_{completa} (B), tras la infección con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1. En ambos gráficos se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los valores individuales correspondientes a los animales vacunados con las ELI supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos).

Cabe remarcar que, por primera vez desde que se iniciaron los estudios de vacunación con DNA, en 2 de los 4 cerdos supervivientes vacunados con Ub-ELI_{completa} no se detectó virus en sangre ni en excreciones a ningún tiempo tras la infección (figuras 28 B y 29 B), siendo también destacable la transitoriedad de la viremia en el resto de animales supervivientes, no detectándose virus los días 4 y 21 pi.

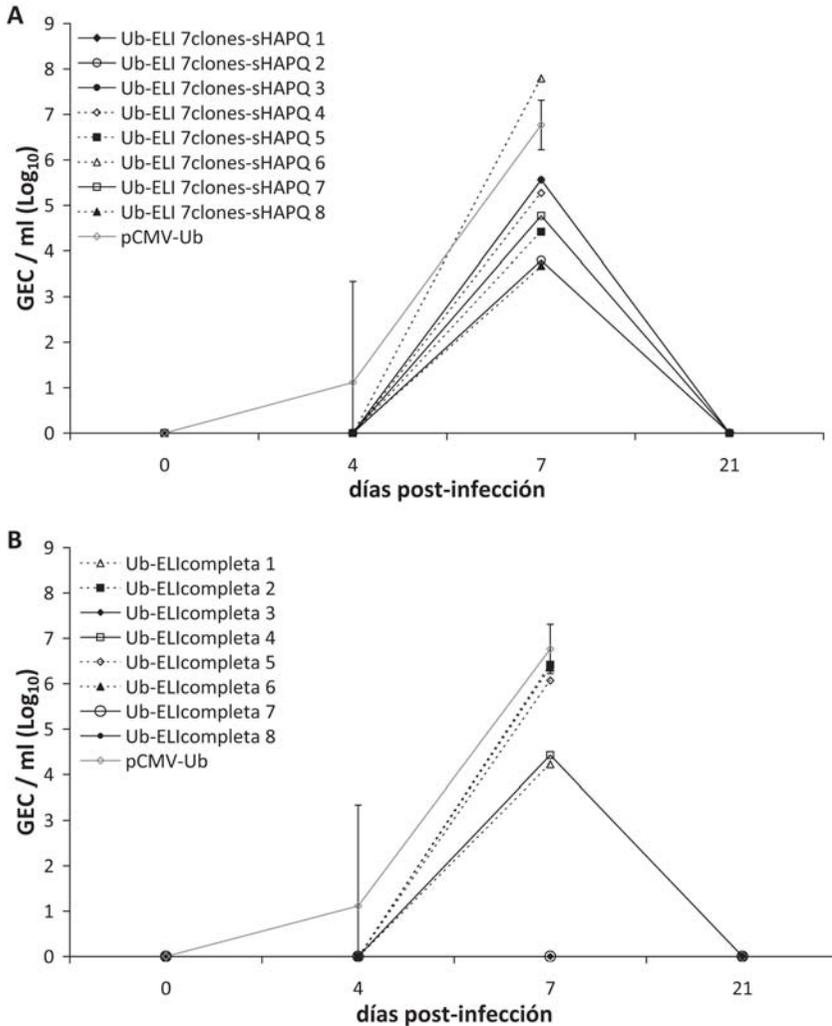


Figura 29. Cinética de la excreción viral detectable a partir de hisopos nasales obtenidos a partir de los cerdos inmunizados con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} (A), con Ub-ELI_{completa} (B), tras la infección con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1. En ambos gráficos se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los valores individuales correspondientes a los animales vacunados con la ELI supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos).

El control de la viremia y el aclarado del virus al final del ensayo se tradujeron en ausencia de lesiones tanto macroscópicas como microscópicas en la necropsia de los animales supervivientes, tanto tras la vacunación con Ub-ELI_{completa} como con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ}.

Independientemente de la cantidad de virus detectada en suero o en excreciones, uno de los parámetros más fiables para determinar el grado de infección de un animal (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996) así como el nivel de protección conferido por nuestras vacunas (Argilaguuet *et al.*, 2011), es el de determinar el número de monocitos/macrófagos en sangre infectados tras la inoculación del virus. Como cabía esperar para los animales que sucumbieron a la infección, tanto vacunados como controles, el máximo número de macrófagos infectados (SWC3⁺p30⁺), se alcanzó a día 7 pi, coincidiendo con las etapas terminales de la PPA. En claro contraste, el pico de células infectadas detectable en los animales supervivientes nunca alcanzó los máximos del resto de animales, para resultar prácticamente indetectable a día 7 pi (figura 30).

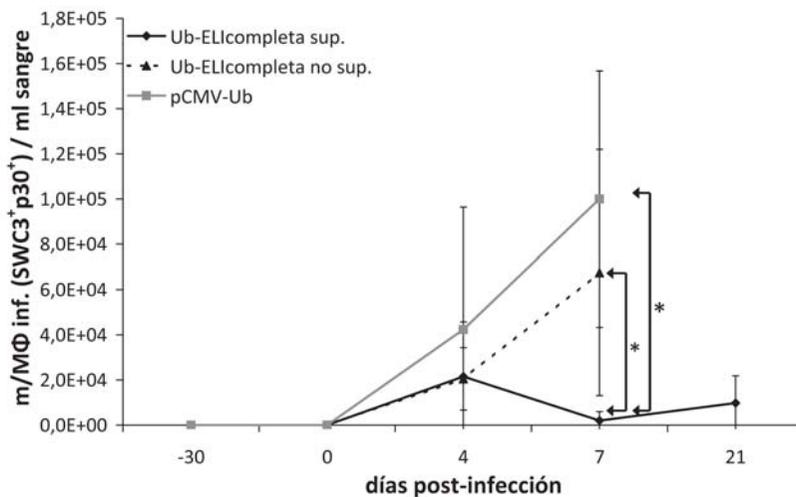


Figura 30. Número total de monocitos/macrófagos infectados con E75CV1 (SWC3⁺p30⁺) por mililitro de sangre total, detectados por citometría de flujo, a partir de muestras de cerdos SPF inmunizados con Ub-ELI_{completa} o con pCMV-Ub, tras la infección con 10⁴ UHA₅₀ de E75CV1. En el gráfico se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los correspondientes a los animales vacunados con Ub-ELI_{completa} supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos) (* p<0,05).

Confirmando la sólida protección conferida por Ub-ELI_{completa}, la concentración de IFN α resultó significativamente menor en los animales supervivientes que en los no supervivientes, alcanzando su máximo en todos los casos a día 7 pi (figura 31 A).

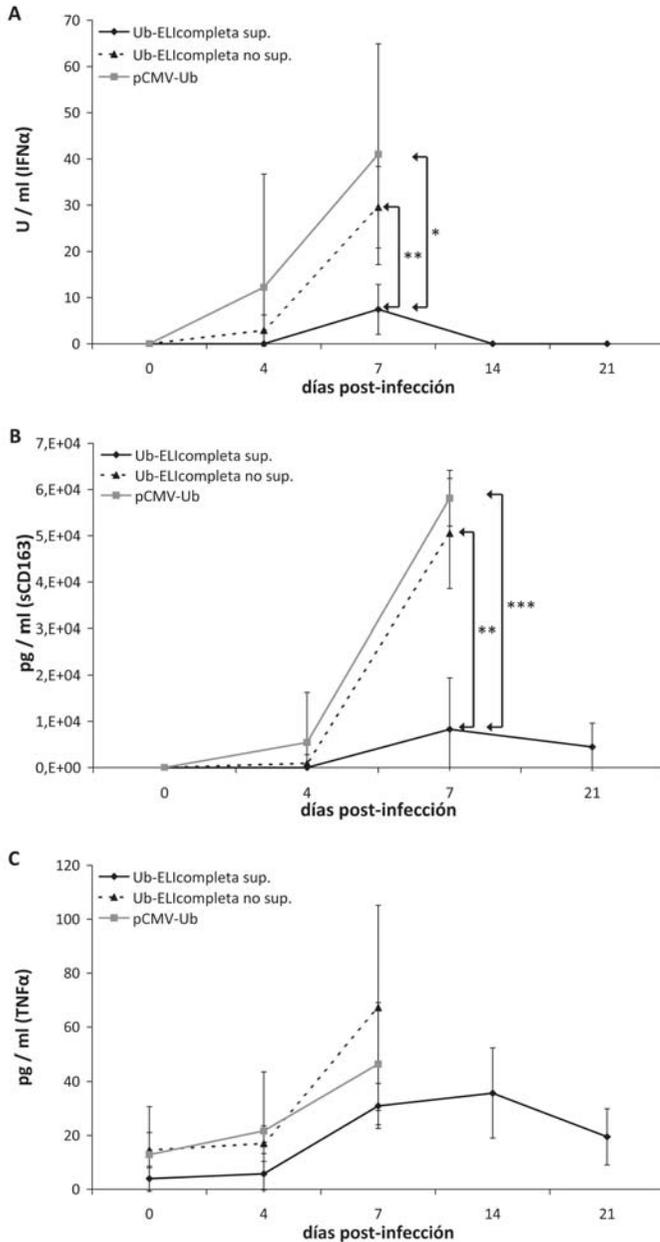


Figura 31. Cinética de detección de factores solubles en suero de cerdos SPF inmunizados con Ub-ELI_{completa} o con pCMV-Ub, tras la infección con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1: IFN α (A), sCD163 (B) y TNF α (C). En todos los paneles se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los correspondientes a los animales vacunados con Ub-ELI_{completa} supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Una mención especial merece el caso de sCD163, descrito por primera vez en el presente trabajo de Tesis como un buen marcador de virulencia y que, al igual que el IFN α , permitió ratificar la sólida protección conferida por la vacuna en el caso de los animales supervivientes (figura 31 B). Del mismo modo, y a pesar de encontrar diferencias significativas entre los grupos, también se observaron concentraciones de TNF α en suero que tendían a ser menores en los animales supervivientes respecto a los no supervivientes (figura 31 C).

4.3.3. La protección conferida mediante Ub-ELI_{completa} correlacionó con la expansión en sangre de células T-CD8⁺, inmediatamente tras la infección con E75CV1

La capacidad protectora de Ub-ELI_{completa} no se vio reflejada en cambios aparentes en el número de PBMC presentes en sangre a lo largo de la infección, respecto a los descritos para los cerdos control. En ambos casos se observó un aumento inicial en el número de PBMC tras la infección con E75CV1 (día 4 pi) seguido de una brusca caída en los mismos, alcanzando su mínimo a día 7 pi (figura 32 A). Cabe destacar que, a pesar de que el recuento total de PBMC fuera parecido a día 7 pi, los animales control murieron sin recuperar los valores iniciales de PBMC, mientras que los animales supervivientes recobraron los valores de partida para su recuperación total (figura 32 A).

Caracterizando más en profundidad la cinética de las poblaciones celulares más significativas de PBMC a lo largo del ensayo, se pudo observar que tanto los linfocitos T-CD4⁺, como los linfocitos B (CD21⁺) y los macrófagos (SWC3⁺) (figura 32 B, C y D) siguieron una cinética muy parecida a la de las PBMC totales (figura 32 A), independientemente del grupo de inmunización.

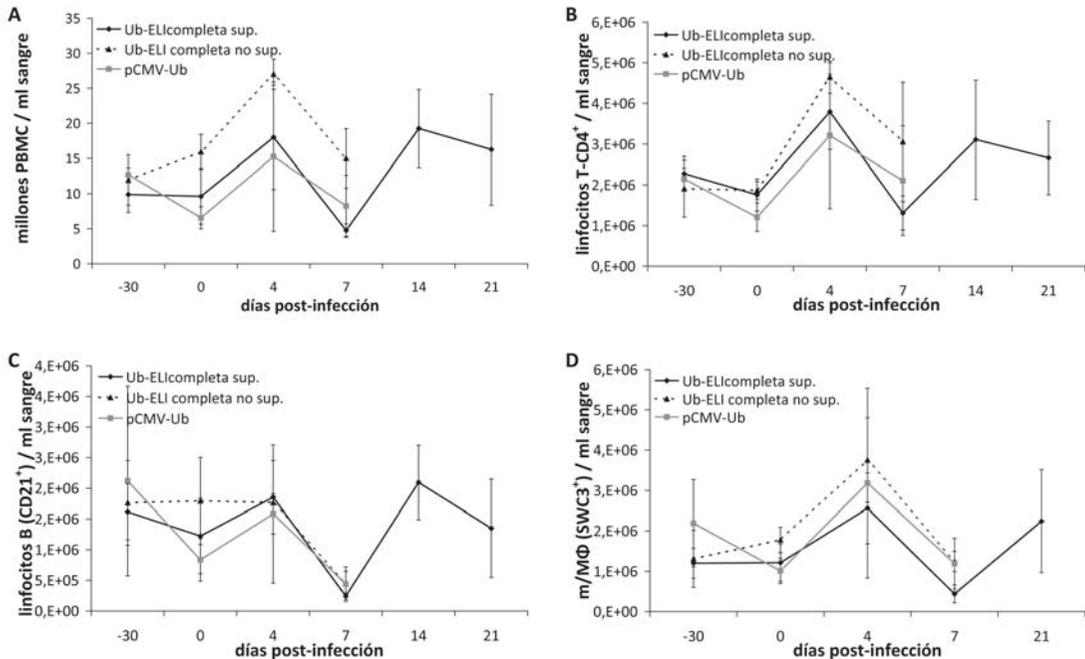


Figura 32. Evolución de los recuentos leucocitarios (A), linfocitos T-CD4⁺ (B), linfocitos B (CD21⁺) (C) y los monocitos/macrófagos (SWC3⁺) (D) a lo largo del estudio, antes y después de la infección con 10⁴ UHA₅₀ de E75CV1. En todos los paneles se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los correspondientes a los animales vacunados con Ub-ELI_{completa} supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos).

En claro contraste, la población de linfocitos T-CD8⁺ siguió una cinética totalmente distinta, observándose una clara caída en su número iniciada en etapas muy tempranas de la infección (día 4 pi), en los animales que sucumbían a la infección. Sin embargo, y en consonancia con resultados obtenidos previamente con animales convencionales, únicamente en los cerdos SPF vacunados con Ub-ELI_{completa} supervivientes, se detectó un claro aumento en el número total de células T-CD8⁺ a día 4 pi y, pese a padecer la misma caída en el número de esta subpoblación celular a día 7 pi, terminaron no sólo recuperando los valores iniciales, sino que al final del ensayo (día 21 pi) su número se vio aumentado significativamente en 3 veces respecto al día 0 pi (figura 33 A). Del mismo modo, la población de células doble positivas T-CD4⁺CD8⁺ de los animales supervivientes

siguió exactamente la misma evolución, aumentando esta subpoblación en 2,5 veces entre el día de infección y el último día del ensayo (día 21 pi) (figura 33 B).

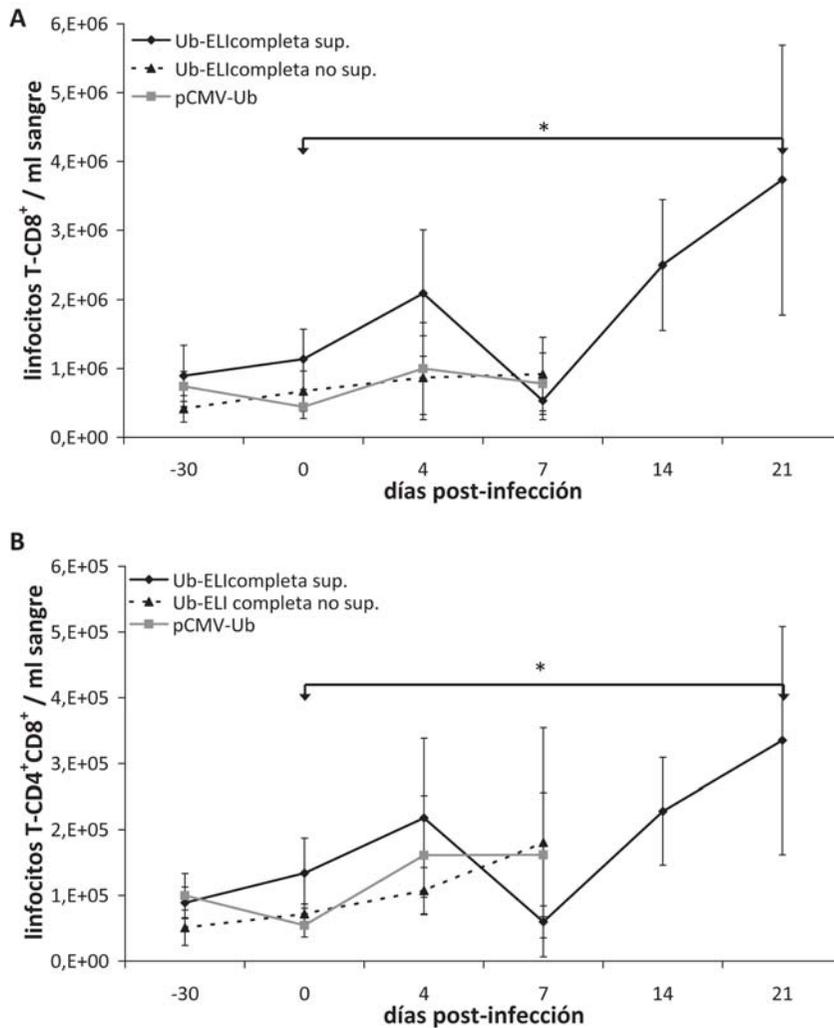


Figura 33. Evolución de los recuentos de linfocitos T-CD8⁺ (A) y T-CD4⁺CD8⁺ (B) a lo largo del estudio, antes y después de la infección con 10⁴ UHA₅₀ de E75CV1. En todos los paneles se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes al grupo control (línea gris), así como los correspondientes a los animales vacunados con Ub-ELI_{completa} supervivientes (línea negra sólida) y no supervivientes (línea negra de puntos) (* P<0,05).

4.3.4. La protección conferida mediante las vacunas DNA en cerdos SPF es independiente de la inducción de anticuerpos y correlaciona con la inducción de una respuesta T-específica

En concordancia con los resultados obtenidos hasta el momento con las Ub-ELI y con pCMV-UbsHAPQ (Argilaguet, 2009) en animales convencionales, tras la vacunación de cerdos SPF con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} y Ub-ELI_{completa} tampoco se indujeron anticuerpos específicos frente al VPPA. La cinética de generación de anticuerpos resultó indistinguible de la de los cerdos control, ratificando que la protección conferida era independiente de la respuesta humoral inducida por la infección. En cualquier caso, y como cabía esperar, el título de anticuerpos específicos frente al VPPA alcanzó su máximo nivel en los animales supervivientes los últimos días del ensayo (figura 34).

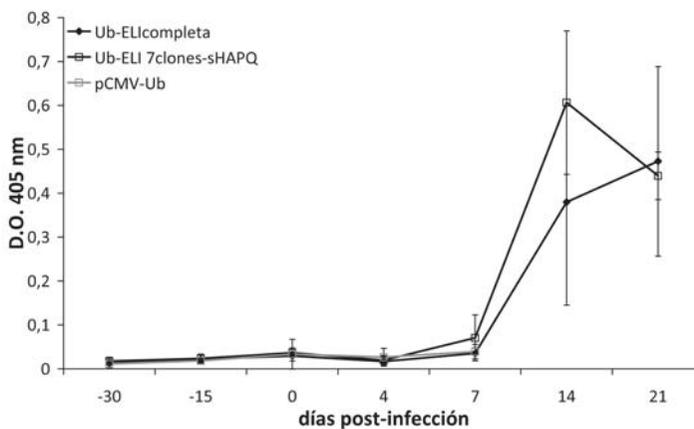


Figura 34. Cinética de la generación de anticuerpos específicos frente al VPPA detectables en el suero de los cerdos SPF inmunizados con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} (cuadrado vacío), con Ub-ELI_{completa} (rombo negro) o con pCMV-Ub (cuadrado gris), antes y después de la infección con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1.

Teniendo en cuenta la clara expansión de células T-CD8⁺ observada en los animales supervivientes y en un intento de profundizar un poco más en los mecanismos implicados en protección, las PBMC de dichos animales fueron utilizadas en un ensayo de ELISPOT. Dicho ensayo permitió cuantificar el número de células T secretoras de IFN γ en respuesta a diversos estímulos. Como cabía esperar, tras los resultados obtenidos con cerdos convencionales vacunados con pCMV-UbsHAPQ y supervivientes a la infección

con E75L, las PBMC de cerdos SPF vacunados con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} supervivientes a la infección con E75CV1, prácticamente no fueron capaces de reconocer al virus vivo, mientras que dos de ellos (50% de los supervivientes) reconocieron muy eficientemente a los péptidos F3 y A6 (figura 35). Así, mientras que uno de los supervivientes reconocía muy eficientemente al péptido F3, otro reconocía mayoritariamente al péptido A6 (en ambos casos detectándose más de 200 células T-específicas por cada millón de PBMC). Independientemente de la observación adicional que parecía indicar la existencia de una estimulación menor, aunque claramente específica, frente al péptido F3 en todos los animales supervivientes, no se puede descartar que no se indujera una respuesta inmunodominante frente a cualquiera de los 7 clones incluidos en la vacuna (Ub-ELI_{7clones-sHAPQ}). En contraposición con los resultados obtenidos tras la vacunación con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ}, las PBMC obtenidas de todos los cerdos SPF vacunados con Ub-ELI_{completa} y supervivientes a la infección, respondieron *in vitro* a la estimulación con el virus E75L vivo, no respondiendo, como cabía esperar, a la estimulación con los péptidos F3 o A6 (la ORF correspondiente a HA no estaba incluida en la vacuna) (figura 35).

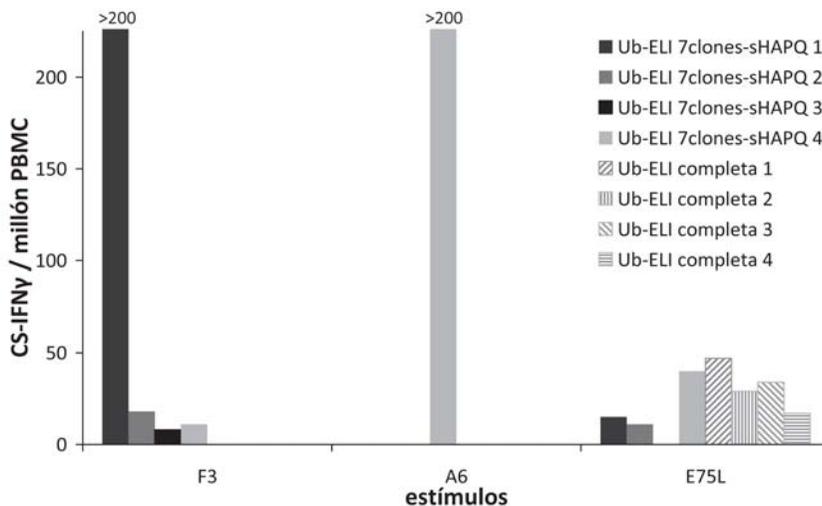


Figura 35. Detección de células T-específicas en PBMC de cerdos SPF inmunizados con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} o Ub-ELI_{completa} y supervivientes a la infección con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1, detectables mediante ELISPOT a día 21 pi.

4.4. Utilización de un virus atenuado como modelo para estudiar los mecanismos inmunológicos implicados en protección frente a la PPA

Independientemente de la innegable utilidad de las estrategias de inmunización con DNA y de su potencial de futuro, éstas no resultan idóneas a la hora de caracterizar en profundidad los mecanismos implicados en protección frente a la PPA; entre otros motivos, por no poder predecir con antelación cual de los animales inmunizados iba a resultar protegido frente a la infección con el virus. Así pues, en paralelo a los estudios de inmunización con DNA, se decidió poner a punto un modelo de protección basado en la inmunización con virus atenuado que, aunque lejos de poder ser utilizado en campo, confiere la protección más sólida y predecible descrita hasta el momento. Los estudios se basaron en la puesta a punto de un modelo de protección homóloga, descrito por primera vez por el Dr. Ruiz Gonzalvo (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1983) utilizando *in vivo* un virus previamente atenuado tras la adaptación y pase en cultivo seriado del virus virulento E75L a la línea celular CV1 (E75CV1).

4.4.1. Establecimiento de la dosis óptima de E75CV1 para la inmunización de cerdos convencionales

La experiencia del laboratorio con el VPPA y otros muchos virus, aconsejaba la inicial puesta a punto de la dosis óptima de infección/inmunización con el aislado atenuado E75CV1. Partiendo de los datos descritos en la literatura, se infectaron 3 grupos de 4 cerdos con diferentes dosis del aislado atenuado E75CV1: 10^2 UHA₅₀, 10^4 UHA₅₀ y 10^5 UHA₅₀. Un grupo adicional de 4 cerdos recibió el mismo volumen (1 ml) de suero fisiológico, para ser utilizados como controles del ensayo.

Dejando patente la importancia que la dosis infectiva tiene en el fino equilibrio existente entre el desarrollo de protección o de patogenicidad, se observaron dramáticas diferencias para cada uno de los grupos de infección. De las tres dosis evaluadas, únicamente la de 10^4 UHA₅₀, se comportó como cabía esperar para un virus atenuado, sin provocar ninguna baja (figura 36), ni signos clínicos aparentes de PPA, con la excepción de un pequeño pico de fiebre en alguno de los animales del grupo (figura 37 B).

Correlacionando con la cinética de la hipertermia observada, fue posible detectar la presencia transitoria de bajos títulos de VPPA en sangre en 3 de los 4 animales infectados con 10^4 UHA₅₀ entre los días 5 y 18 piA para, a continuación, aclararse la infección totalmente antes del día 28 piA (figura 37 E). Estos datos coincidían con la detección de DNA viral en hisopo nasal, ratificando la ausencia de virus en excreciones a día final del ensayo (día 28 piA).

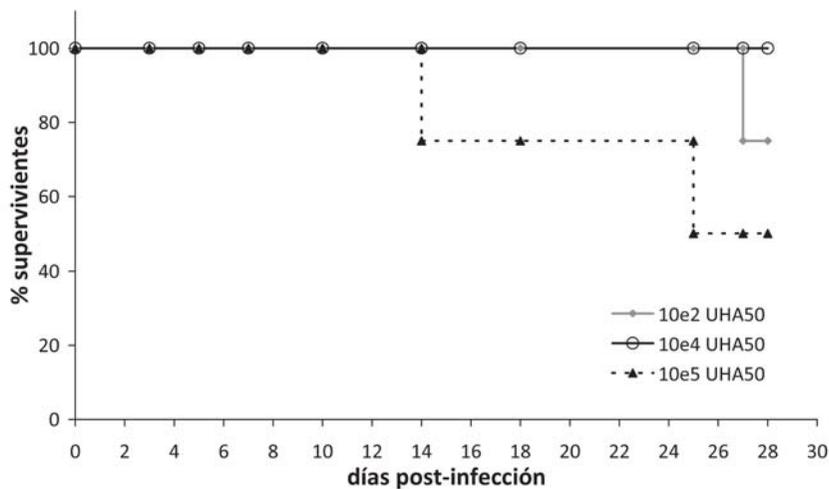


Figura 36. Porcentaje de supervivencia de cerdos infectados con el aislado E75CV1 a distintas dosis: 10^2 UHA₅₀ (línea gris), 10^4 UHA₅₀ (línea sólida negra) y 10^5 UHA₅₀ (línea puntos negra).

En claro contraste con la homogeneidad mostrada por el grupo de animales infectados con 10^4 UHA₅₀, los otros dos grupos de infección se comportaron de una manera mucho más heterogénea. El incremento de un logaritmo de E75CV1 en el inóculo (10^5 UHA₅₀) provocó que 2 de los 4 cerdos del grupo (50%) sufrieran signos de infección más acordes con una PPA aguda, sufriendo hipertermia más severa y títulos virales más elevados, sucumbiendo finalmente a la infección (Figura 37 C y F).

Los resultados obtenidos con la dosis menor de virus (10^2 UHA₅₀), resultaron aún más inesperados, puesto que tras un aparente periodo de silenciamiento viral de más de 18 días en el que no se observó signo alguno de PPA (incluyendo ausencia total de fiebre), en dos de los animales se pudo observar un repunte de infección iniciado a día 18 piA

que provocó la muerte de uno de ellos y la aparición de lesiones post-mortem típicas de PPA (figuras 37 A y D).

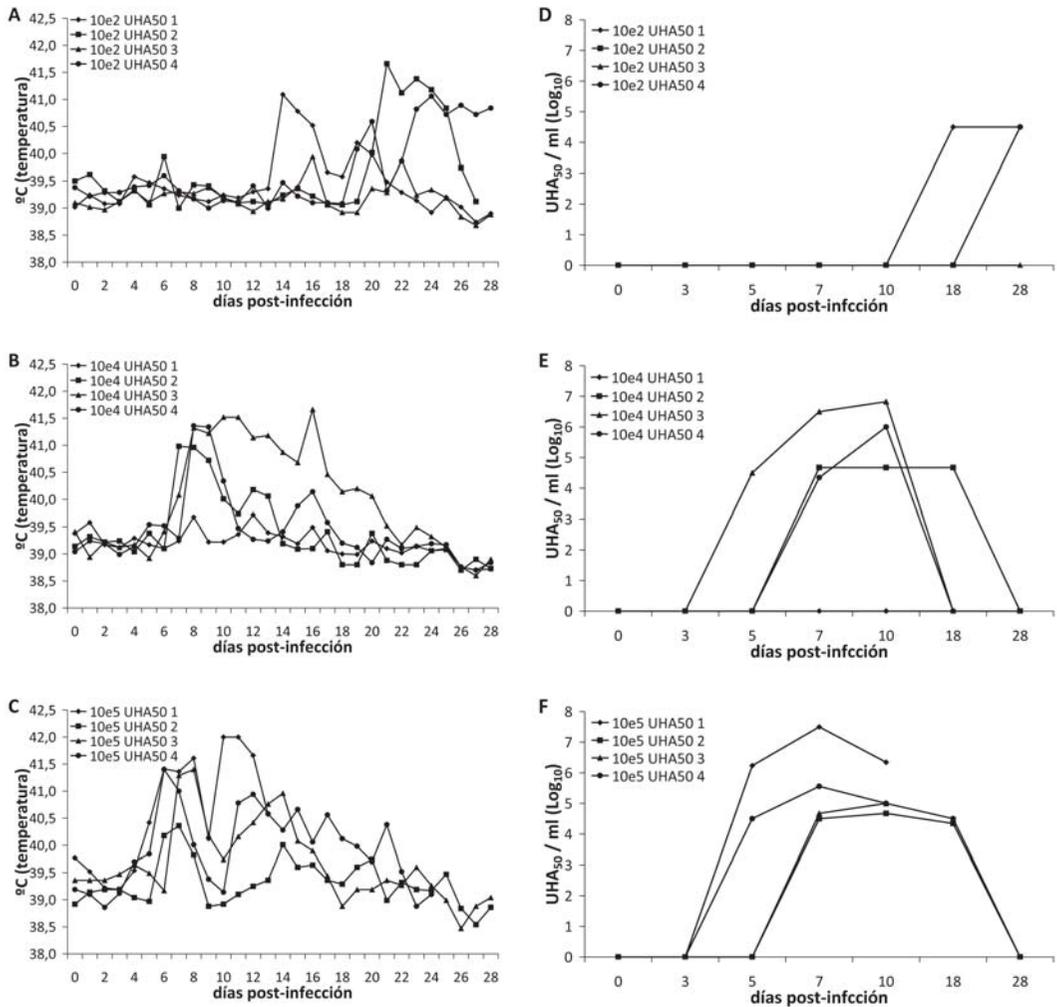


Figura 37. Cinética de la temperatura (A-C) y de la viremia (D-F) observadas tras la infección con distintas dosis de E75CV1: 10^2 UHA₅₀ (A y D), 10^4 UHA₅₀ (B y E) y 10^5 UHA₅₀ (C y F).

Ratificando la seguridad y utilidad de la dosis de 10^4 UHA₅₀ del aislado atenuado E75CV1, los cuatro cerdos desarrollaron una potente respuesta inmune específica frente al virus, tanto humoral como celular. Por un lado, se pudo observar que las PBMC secretaban IFN γ muy eficientemente frente a la estimulación *in vitro* con el virus vivo homólogo

virulento E75L (a día 28piA), más de 200 células T-secretoras de IFN γ por cada millón de PBMC (figura 38).

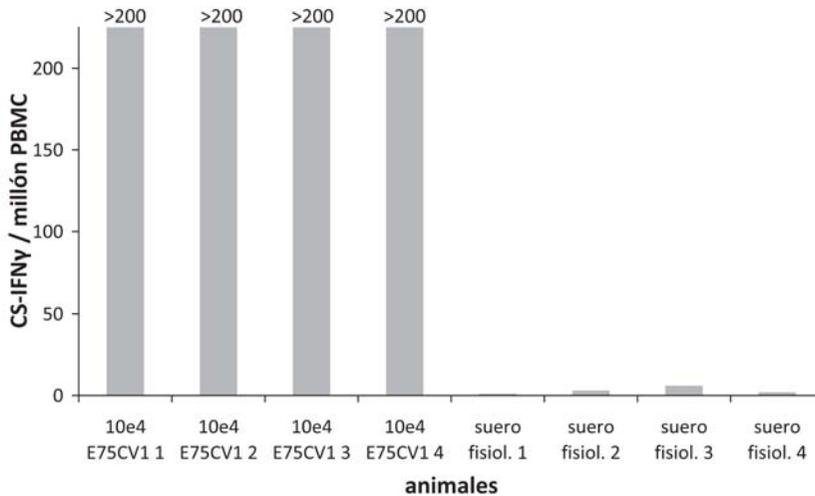


Figura 38. Detección de células T-específicas para VPPA detectables en PBMC de cerdos infectados con 10^4 UHA $_{50}$ de E75CV1 o de los animales no infectados. Los resultados muestran, tanto la media como la desviación estándar obtenida en tres ensayos independientes para cada animal tras la estimulación.

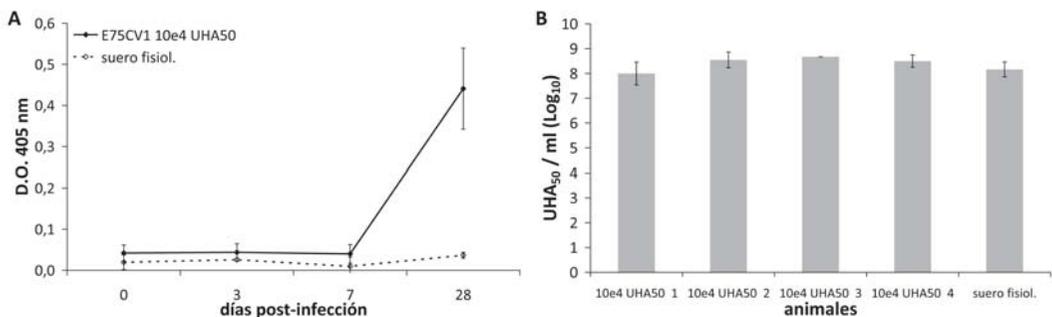


Figura 39. Cinética de la generación de anticuerpos específicos frente al VPPA tras la infección con E75CV1, se representan los valores medios y la desviación estándar correspondientes a los animales infectados con 10^4 UHA $_{50}$ de E75CV1 (línea sólida) y los animales control no infectados (línea puntos) (A); y análisis de la capacidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos a día 28 piA (B).

Adicionalmente, todos los cerdos fueron capaces de generar una respuesta humoral específica frente al virus, detectable a partir del día 18 piA (figura 39 A). Independientemente del elevado título de anticuerpos alcanzado, no se pudo demostrar

su capacidad neutralizante en un ensayo de inhibición de la infección *in vitro* (figura 39 B).

4.4.2. El aislado atenuado E75CV1 protege frente a la infección con el virus homólogo virulento E75L, pero no frente al virus virulento Ba71L

Una vez establecida la dosis óptima de infección con el aislado E75CV1 (10^4 UHA₅₀), se procedió a caracterizar su capacidad protectora frente a la infección con el virus homólogo virulento E75L. Con este objetivo, los cuatro cerdos infectados con la dosis óptima del aislado atenuado E75CV1 y los 4 cerdos controles inoculados con solución salina fueron infectados con dosis letal de la cepa homóloga virulenta E75L a los 28 días tras la primera infección.

Como cabía esperar, los 4 cerdos del grupo control murieron entre los días 7 y 9 piV (figura 40 A), sufriendo la sintomatología típica de PPA aguda, incluyendo una elevada hipertermia (figura 40 B), acompañada de la presencia de altos títulos de virus en sangre (figura 40 C) y en secreciones nasales (figura 40 D).

En claro contraste, la totalidad de los animales inmunizados con E75CV1 sobrevivieron a la infección con el homólogo virulento E75L (figura 40 A), sin sufrir signo alguno de PPA (figura 40 B). De todos modos, lo más sorprendente no fue el porcentaje de supervivientes alcanzado sino el bloqueo total de la infección, ya que no se detectó virus ni en suero ni en excreciones nasales en ningún animal, independientemente del tiempo tras la infección con E75L (figuras 40 C y D). El excelente control de la viremia se tradujo en ausencia de lesiones de PPA en la necropsia, ratificando la enorme eficacia protectora de la inmunización utilizando virus atenuado.

La reciente colaboración con el grupo de la Dra. María Luisa Salas permitió disponer del aislado virulento Ba71L y poder, de este modo, realizar un experimento de protección cruzada, ya que una de las dudas planteadas a lo largo del trabajo con vacunas DNA procedía del hecho de estar diseñadas a partir del genoma del aislado Ba71V, mientras que las infecciones virales se realizaron siempre con el virus E75L. Estas dos cepas, a

pesar de su origen próximo (España 1971 y 1975), bien podrían ser heterólogas, subestimando en este caso la protección conferida.

Con el objetivo de comprobar si el aislado atenuado E75CV1 era capaz de conferir protección frente a la infección con el virus virulento Ba71L, se infectaron 6 cerdos con 10^4 UHA₅₀ E75CV1 y 6 se conservaron sin infectar. 28 días después, los 12 cerdos se desafiaron con 10^4 UHA₅₀ de Ba71L y se mantuvieron en condiciones de bioseguridad durante 7 días más.

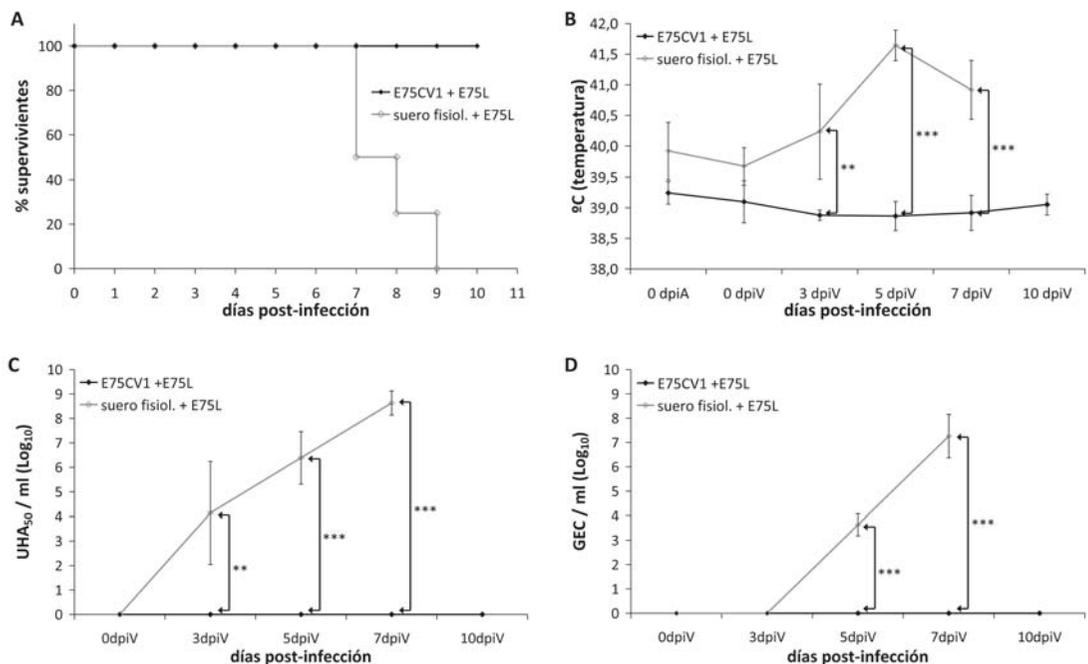


Figura 40. Porcentaje de supervivencia (A), cinética de la temperatura (B), de la viremia (C) y de la excreción viral (D). En todos los paneles se representan los valores medios y la desviación estándar de los animales control sin inmunizar (línea gris) o de los cerdos inmunizados con el aislado E75CV1 (línea negra), tras la infección con dosis letal de E75L (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

En claro contraste con la protección conferida frente a la infección homóloga con E75L, la inmunización con E75CV1 sólo pudo conferir una protección parcial frente a Ba71L. Dos de los 6 animales se comportaron prácticamente igual que los cerdos control, con títulos virales en sangre (figura 41 B) e hisopos nasales (figura 41 C) muy elevados, mientras que los otros 4 animales vieron retrasada la infección (a día 3 piV no se detectó virus) y los

títulos virales fueron significativamente más bajos. Independientemente del grado de protección, todos los cerdos padecieron signos típicos de PPA aguda, incluyendo hipertermia alcanzando temperaturas de riesgo (más de 41°C) a partir de día 5 piV (figura 41 A) y la aparición de las lesiones típicas de PPA en la necropsia, no pudiendo diferenciar estos animales de los controles.

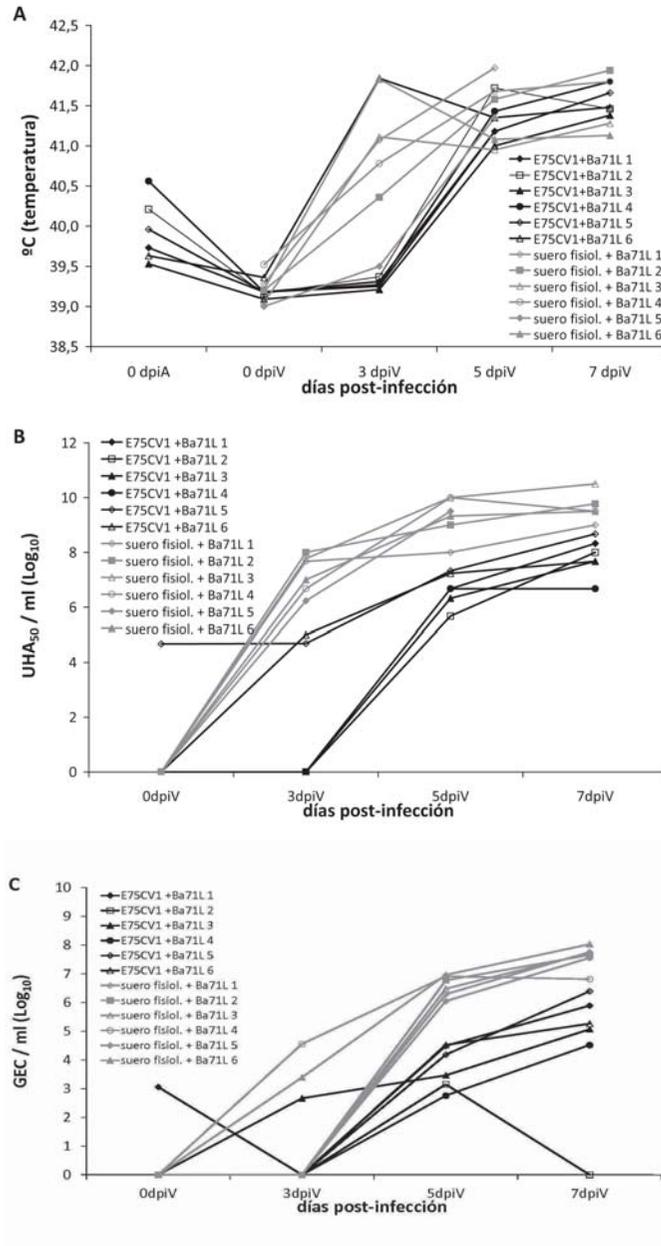


Figura 41. Cinética de la temperatura (A), de la viremia (B) y de la excreción viral (C) observada en cerdos no inmunizados (gris) o inmunizados con el aislado E75CV1 (negro), tras la infección con una dosis letal de Ba71L.

4.4.3. Comparación de la respuesta inmunitaria desarrollada tras la infección con E75L en animales inmunizados y no inmunizados con el aislado E75CV1: de la patogenia a la protección

A pesar de que la protección conferida por el virus atenuado E75CV1 correlacionaba con la presencia de una respuesta de anticuerpos específicos previa al desafío con el virus virulento E75L (figura 39 A), no se detectó un gran incremento en los títulos como consecuencia de la segunda infección viral, manteniéndose prácticamente constantes a lo largo de la infección y conservando además su incapacidad de neutralizar al virus *in vitro* (figura 42 A). Por otro lado, la protección también correlacionaba con una potente respuesta T-específica previa a la infección con el virus virulento (figura 38), aunque en este caso no se pudo cuantificar finamente la respuesta como para demostrar una potenciación en la respuesta, tras la infección con E75L (figura 42 B). Como cabía esperar, los cerdos control sucumbieron a la infección antes de haber podido desarrollar una respuesta específica de anticuerpos o de células T-específicas.

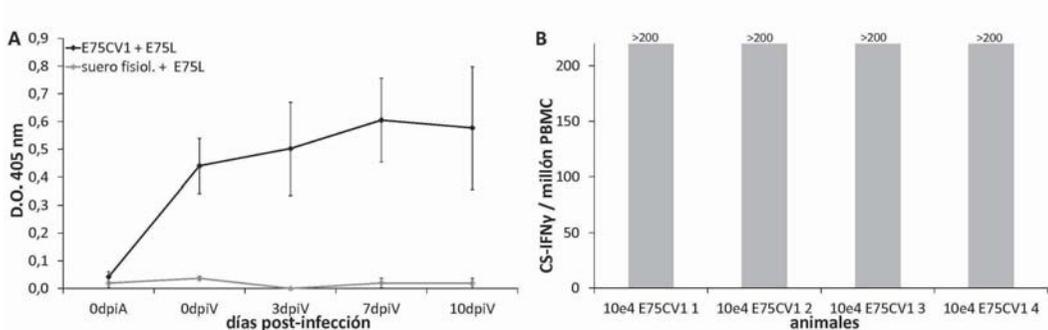


Figura 42. Cinética de generación de anticuerpos específicos frente al VPPA medidos mediante ELISA a partir del suero de los cerdos vacunados con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1 (línea negra) o de los controles no inmunizados (línea gris), antes y después de la infección con una dosis letal de E75L (A); y detección de células T-específicas frente al VPPA detectables en los cerdos inmunizados con E75CV1 10 días tras la infección con E75L (B).

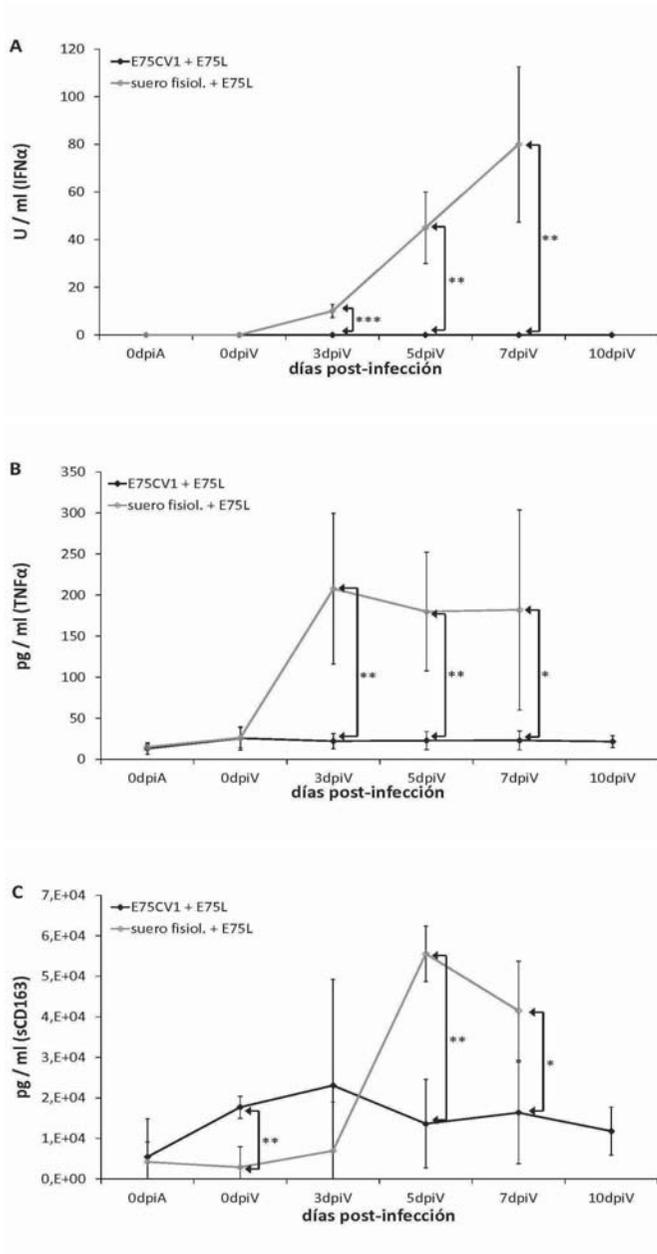


Figura 43. Cinética de la secreción de factores solubles en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los animales control no inmunizados (línea gris) o inmunizados con E75CV1 (línea negra) antes y después de la infección con una dosis letal de E75L: IFN α (A), TNF α (B) y sCD163 (C) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

El control eficiente de la infección con E75L por parte de los animales inmunizados con el aislado atenuado E75CV1, encajaba con el hecho de que todos ellos fueran capaces de evitar la secreción masiva de mediadores inmunológicos relacionados con la respuesta innata, tan importantes como IFN α y TNF α (figura 43 A y B). Las diferencias observadas para el caso de sCD163 no resultaron, en cambio, tan claras, esencialmente debido a los

altos niveles de partida (día 0 piV) existentes en el suero de los animales pre-infectados con E75CV1 (figura 43 C). En cualquier caso, a medida que avanzó la infección con E75L, los niveles de sCD163 presentes en el suero de los cerdos control, fueron muy superiores a los de los animales pre-inmunizados con E75CV1.

A pesar de los niveles de protección tan elevados obtenidos con el aislado atenuado E75CV1, todos y cada uno de los animales de este grupo sufrieron variaciones en el número total de PBMC, fruto de la infección con E75L. En ambos grupos, se pudo observar un aumento en el recuento total de PBMC a día 3 piV, seguido de una caída constante del número total de células hasta el día 7 piV, que en caso de los animales control supuso la pérdida del 75% de las células totales, coincidiendo con la aparición de bajas en el grupo. En claro contraste, la caída en el recuento de PBMC en los animales inmunizados con E75CV1 nunca supuso una pérdida significativa respecto a los números iniciales (día 0 piV), volviendo a mostrar una tendencia hacia la recuperación a partir del día 7 piV. Por último, cabe destacar que el número de partida de PBMC de los animales inmunizados con E75CV1 era significativamente mayor que el de los cerdos control (figura 44 A).

Un análisis detallado de las principales subpoblaciones celulares presentes en las PBMC: linfocitos B (CD21⁺), T-CD4⁺, T-CD8⁺, T-CD4⁺CD8⁺ y monocitos/macrófagos (SWC3⁺), a lo largo de la infección con la cepa virulenta E75L permitió comprobar que en el grupo control las poblaciones más afectadas por el virus fueron los monocitos/macrófagos y las células B; que prácticamente desapareciendo de la circulación a día 7 piV (figura 44 B y C). Curiosamente, en los animales protegidos por la vacunación con E75CV1, se pudo observar, a partir de día 7 piV, un incremento exponencial del número de linfocitos T: tanto T-CD4⁺, como T-CD8⁺ y T-CD4⁺CD8⁺ (figura 45), manteniéndose constante el número de macrófagos y de células B (figura 44 B y C); si bien es cierto que los linfocitos T-CD4⁺ ya partían de una situación privilegiada desde el inicio de la infección con E75L (día 0 piV), probablemente a causa de la inmunización con E75CV1.

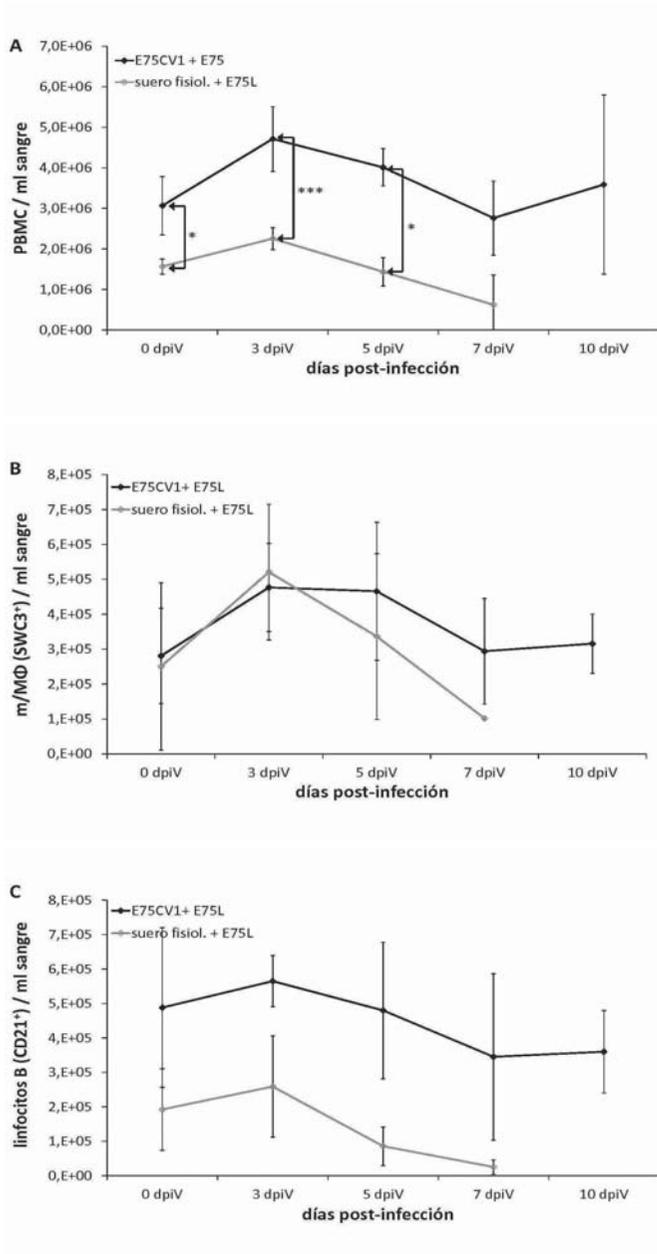


Figura 44. Evolución de los recuentos de PBMC (A), monocitos/macrófagos (SWC3⁺) (B) y linfocitos B (CD21⁺) (C), se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos inmunizados con E75CV1 (línea negra) o no inmunizados (línea gris), tras la infección con una dosis letal de E75L. (*p<0,05 y ***p<0,001).

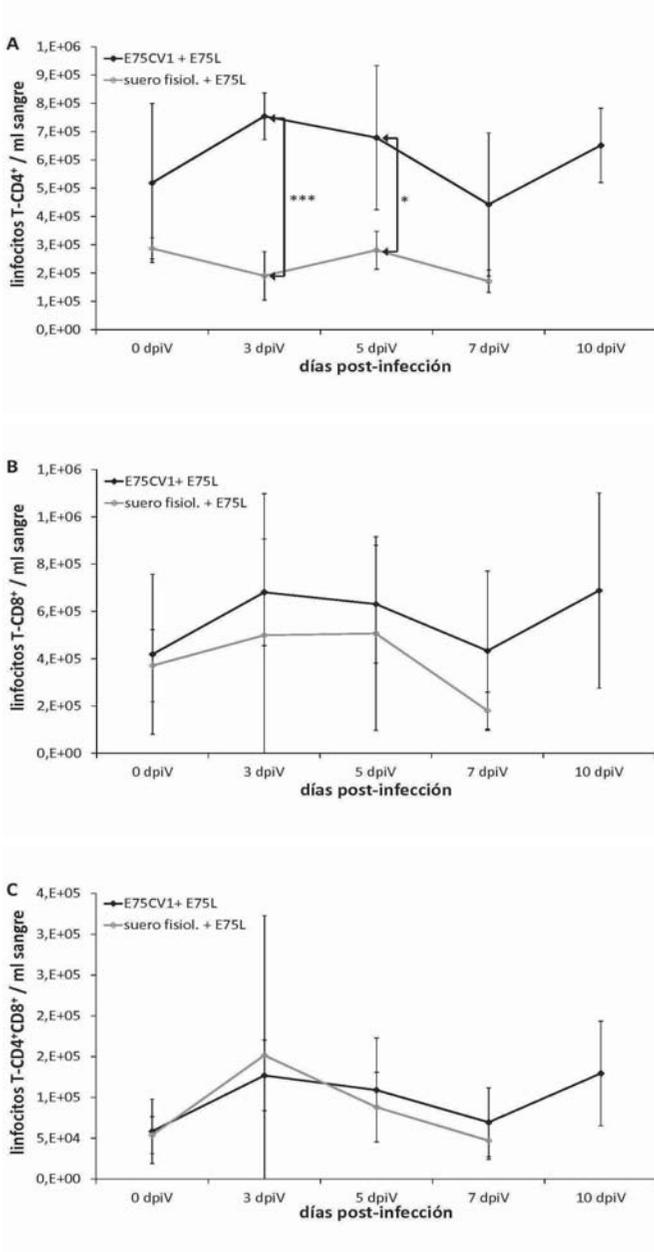


Figura 45. Evolución de los recuentos de linfocitos T-CD4⁺ (A), linfocitos T-CD8⁺ (B) y linfocitos T-CD4⁺CD8⁺ (C), se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos inmunizados con E75CV1 (línea negra) o no inmunizados (línea gris) tras la infección con una dosis letal de E75L (* p<0,05 y *** p<0,001).

4.5. Estudio comparativo de la inmunopatogenia provocada por dos cepas del VPPA homólogas: E75L virulenta y E75CV1 atenuada

La puesta a punto del modelo de infección con el aislado atenuado E75CV1, permitió plantear un estudio comparativo de la patogenia provocada por dos cepas homólogas del VPPA que difieren en su grado de virulencia: la virulenta E75L y la atenuada E75CV1. La aplicación de técnicas clásicas de virología e inmunología junto con técnicas más modernas de transcriptómica y proteómica deberían permitir esclarecer muchos puntos tanto de la patogenia viral como de los mecanismos implicados en protección. Así pues, en el presente capítulo se presentan los datos obtenidos de un completo experimento comparativo de infección con E75L y E75CV1. En dicho estudio se realizan sacrificios seriados de los animales a distintos días tras la infección, permitiendo la optimización en la toma de muestras y un estudio más detallado de la inmunopatogenia viral.

4.5.1. Cinética diferencial de la presencia de virus en sangre e hisopos nasales tras la infección con E75L y E75CV1

Los animales objeto de estudio (54 cerdos) fueron sacrificados secuencialmente, una vez divididos en 3 grupos: cerdos infectados con 10^4 UHA₅₀ de E75L (virulento), cerdos infectados con 10^4 UHA₅₀ de E75CV1 (atenuado) y cerdos que permanecieron sin infectar, utilizados como control del estudio. Los animales fueron sacrificados los días 1, 3, 7 y 31 pi, para estudiar la cinética comparada de la evolución de la enfermedad y la presencia viral, así como de la inducción de respuesta inmune innata y/o adaptativa en respuesta a la infección con cada uno de los virus.

Como cabía esperar, los animales inoculados con la cepa virulenta E75L padecieron signos severos de PPA aguda a partir de día 5 pi, incluyendo hipertermia (más de 40,5°C), disnea, depresión e inmovilidad. En claro contraste, los animales infectados con el aislado atenuado E75CV1 sufrieron una leve hipertermia totalmente transitoria, coincidiendo con la práctica ausencia de signos típicos de PPA (figura 46).

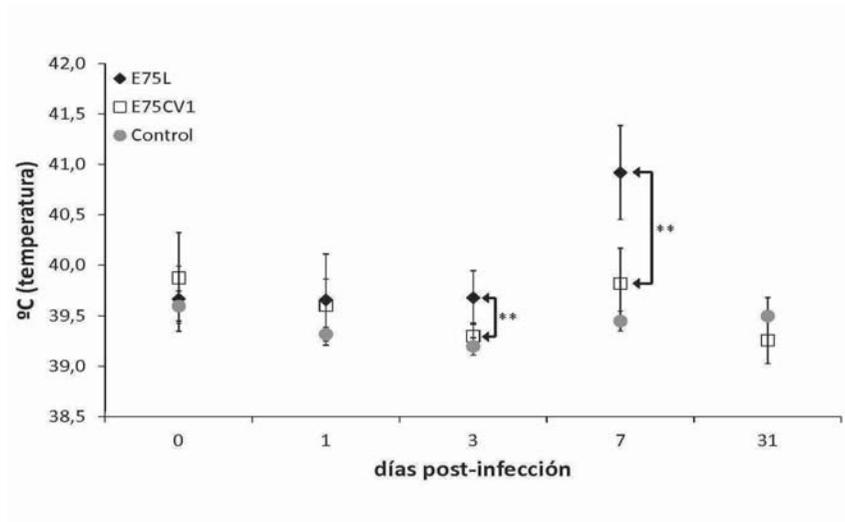


Figura 46. Evolución de la temperatura a lo largo del estudio, se representan los valores medios y la desviación estándar de los animales infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris) (** $p < 0,01$).

La diferente evolución de la enfermedad entre ambos grupos de infección concordaba con un retraso en la cinética de aparición, tanto de la viremia (figura 47 A) como de la excreción viral (figura 47 B) en los animales infectados con E75CV1. De este modo, en el grupo de cerdos infectados con la cepa virulenta E75L se empezó a detectar virus en suero a partir del día 3 pi, alcanzándose títulos realmente altos a día 7 pi (prácticamente de 10^9 UHA₅₀), momento en el que la excreción viral también fue máxima. Por otro lado, los animales infectados con el atenuado E75CV1 tan solo padecieron una ligera viremia transitoria, detectable a día 7 pi, corroborada con los datos obtenidos de excreción viral. Coincidiendo con la máxima carga viral detectada en suero a día 7 pi en cerdos infectados con E75L, en las PBMC de estos mismos animales se pudo detectar, por citometría de flujo, la presencia de monocitos/macrófagos infectados (SWC3⁺p30⁺) (figura 47 C).

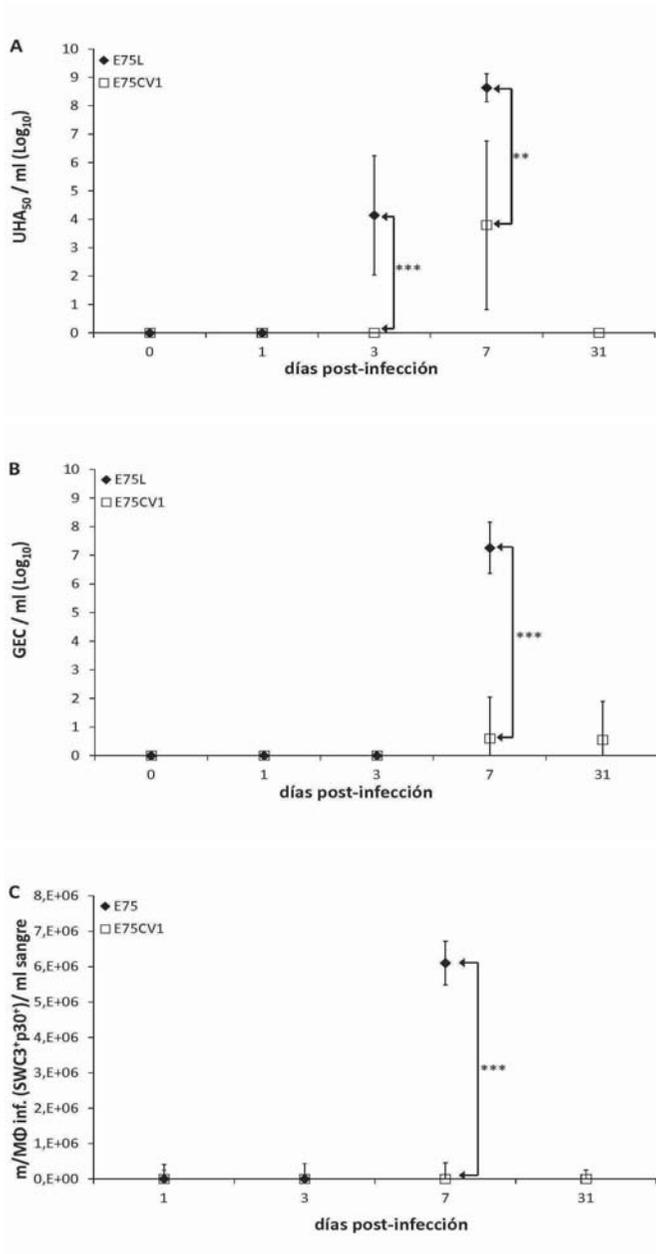


Figura 47. Cinética de la detección de virus en suero (A), de la excreción viral detectable en hisopos nasales (B) y del recuento de monocitos/macrófagos infectados con VPPA (C) observada, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro) o inmunizados con el aislado E75CV1 (cuadrado vacío) a lo largo del ensayo (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Finalmente y como cabía esperar de los estudios realizados en el apartado anterior, sólo se pudo detectar una respuesta inmunológica específica tanto humoral como celular, en los animales que superaron la infección con E75CV1, alcanzando su máximo a día 31 pi.

4.5.2. Elección del linfonodo gastrohepático como órgano diana para los estudios de inmunopatogenia comparada

Los animales infectados con el aislado atenuado E75CV1 no mostraron a ningún tiempo post-infección las lesiones macroscópicas típicas de PPA aguda, independientemente del órgano evaluado: hígado, riñón, bazo o linfonodo gastrohepático. En claro contraste, todos los órganos evaluados de los animales infectados con E75L presentaron lesiones de PPA aguda a día 7 pi (tabla VII).

Tabla VII. Valoración mínima y máxima de las lesiones macroscópicas observadas tras la necropsia de los animales infectados con E75L o con E75CV1 para cada tiempo seleccionado.

		Hígado		Riñón		Bazo		L. gastrohepático	
		Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
E75L	1 dpi	0	0	0	0	0	1	0	1
	3 dpi	0	0	0	0	0	1	0	1
	7 dpi	0	4	1	7	0	1	4	9
E75CV1	1 dpi	0	0	0	0	0	0	0	1
	3 dpi	0	0	0	0	0	1	0	1
	7 dpi	0	0	0	0	0	0	0	0
	31 dpi	0	1	0	1	0	0	0	0
		Valoración (0-12)		Valoración (0-15)		Valoración (0-9)		Valoración (0-9)	

El hígado, en la mayoría de los casos, presentó áreas multifocales enrojecidas de forma puntiforme en el parénquima. Asimismo, se observó un evidente edema y dilatación de la vesícula biliar, con una hemorragia masiva intraluminal (figura 48 A). Los riñones, por su parte, presentaban en general hemorragias corticales y medulares multifocales (petequias) con diferentes grados de severidad y una marcada dilatación pélvica (figura 48 B). El bazo, a pesar de ser uno de los órganos con una valoración de las lesiones más baja, mostró zonas infartadas multifocalmente de forma leve en algunos de los animales y cierta esplenomegalia (figura 48 C), corroborada con el peso relativo del órgano en estos animales, ya que fue muy superior al de los cerdos control y al de los cerdos infectados con el atenuado E75CV1 a día 7 pi (figura 49 A).

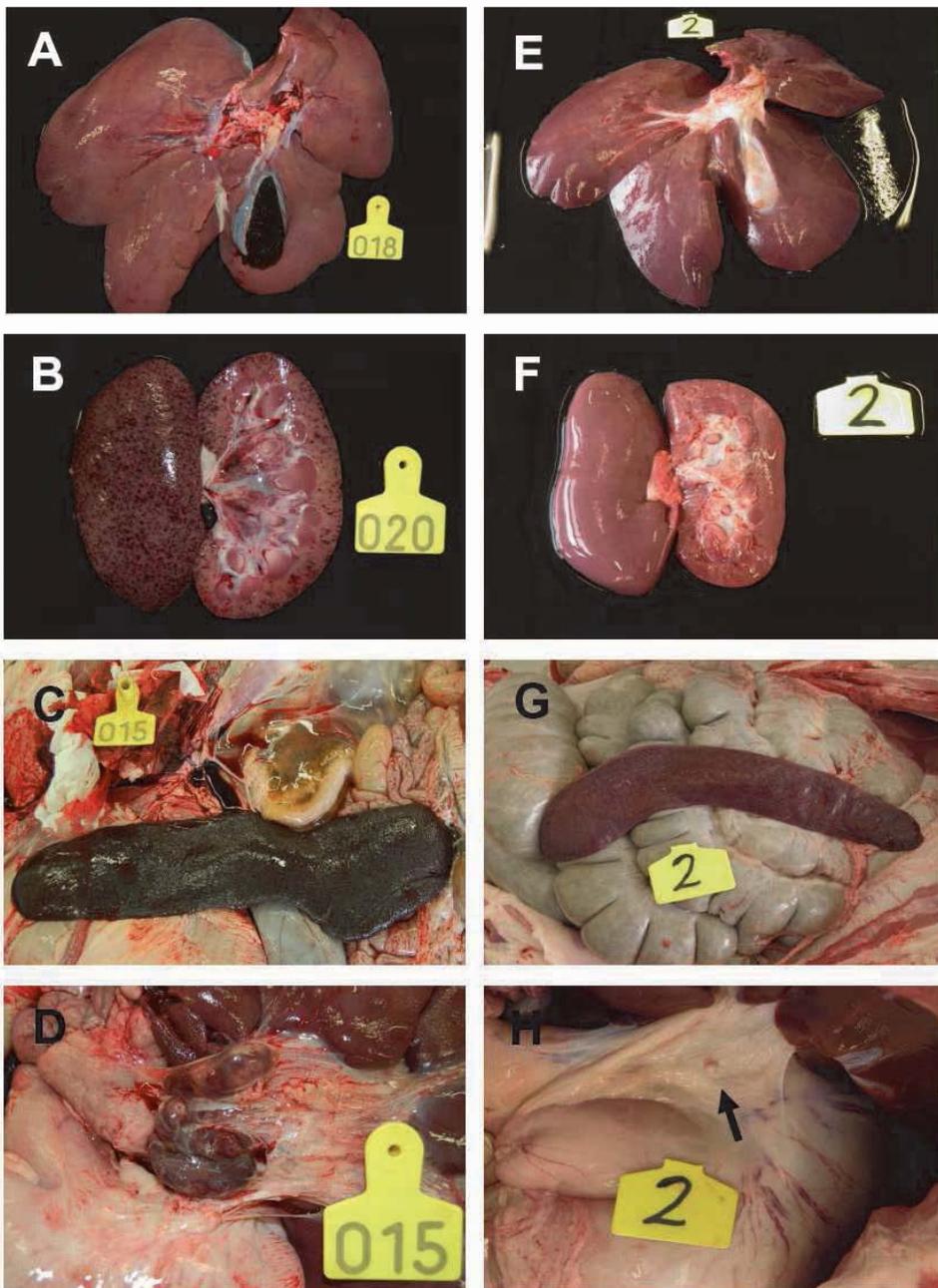


Figura 48. Fotografía ilustrativa de las lesiones macroscópicas más evidentes encontradas en diversos órganos a día 7 pi tras la infección con una dosis letal de E75L (A-D) y comparativa con órganos sanos procedentes de un cerdo control (E-H): hígado (A y E), riñón (B y F), bazo (C y G) y linfonodo gastrohepático (D y H).

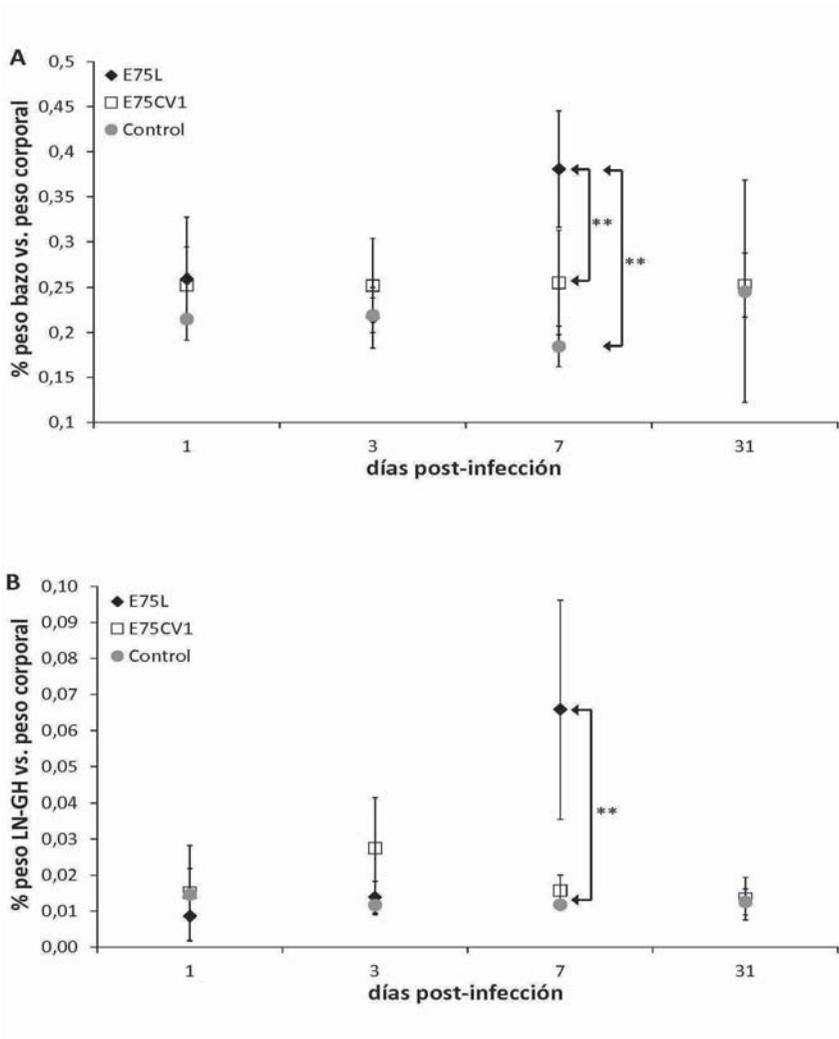


Figura 49. Evolución del porcentaje medio del peso del bazo (A) y del linfonodo-gastrohepático (B) respecto al peso corporal del cerdo en el momento de la necropsia, se representan los valores medios y la desviación estándar de los animales infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris) (** $p < 0,01$).

El análisis comparativo de los tejidos permitió definir, sin lugar a dudas, al linfonodo gastrohepático como el órgano más afectado por la infección con la cepa virulenta E75L en todos los animales. Así, la valoración cuantitativa de las lesiones resultó muy elevada a día 7 pi (de 4 a 9 puntos, tabla VII), caracterizada principalmente por una hiperplasia muy marcada, hemorragia generalizada (figura 48 D) y por un incremento del peso

relativo muy acentuado (de tres veces) (figura 49 B), en comparación tanto con los controles como con los cerdos del grupo infectado con E75CV1, que no mostraron alteración macroscópica alguna. A pesar de su intenso grado de afectación, la estructura linfonodular de los linfonodos gastrohepáticos de los cerdos infectados con E75L se mantuvo incluso a día 7 pi, si bien, el linfonodo se encontraba totalmente congestionado y con hemorragia masiva, apreciándose focos de necrosis de severidad variable (figura 50 B).

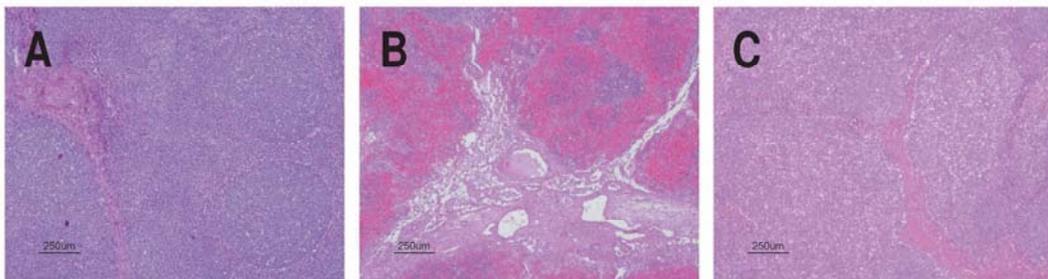


Figura 50. Valoración de la integridad estructural del linfonodo gastrohepático mediante tinción de hematoxilina-eosina de un cerdo representativo de cada grupo incluido en el ensayo: no infectados (A), infectados con E75L a día 7 pi (B) e infectados con E75CV1 a día 7 pi (C).

En claro contraste, los días 1 y 3 tras la infección con E75L nos se observaron hallazgos reseñables y en lo que se refiere a la infección con el virus atenuado E75CV1, apenas se pudo apreciar una ligera depleción linfocitaria detectable únicamente a día 7 pi, recuperada totalmente al fin del experimento (día 31 pi) (figura 50 C).

Confirmando los hallazgos patológicos macro y microscópicos, la cepa E75L fue mucho más agresiva en la colonización del linfonodo-gastrohepático que el aislado atenuado E75CV1. La tinción inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos frente al VPPA, detectó focos de antígeno viral muy tempranamente en el linfonodo-gastrohepático en ambas infecciones, mucho antes incluso de que se pudiera detectar viremia o lesiones microscópicas, observándose en cualquier caso dramáticas diferencias entre ambos virus (tabla VIII).

En el caso de la cepa E75L la invasión del tejido fue progresiva para finalmente encontrarse repartido en toda la extensión tisular (figura 51 C y D), alcanzando, además,

títulos virales en tejido muy elevados (figura 51 E). Por otro lado, la invasión del tejido con el virus atenuado E75CV1 resultó mucho más moderada, limitándose siempre a focos de infección muy bien definidos (figura 51 B), y en concordancia los títulos de viremia y excreción viral, la cantidad de virus en tejido no resultó tan elevada como en el caso de la infección con E75L (figura 51 E).

Tabla VIII. Valoración del grado de invasión del linfonodo gastrohepático por parte del VPPA en los dos grupos de infección: E75L (virulento) y E75CV1 (atenuado) a lo largo de la infección: (-) no hay marcaje, (+) invasión leve, (++) invasión moderada y (+++) invasión grave.

Grupos	Animal	1 dpi	3 dpi	7 dpi	31 dpi
E75L	1	+	++	+++	
	2	-	+	++	
	3	-	++	+++	
E75CV1	1	+	-	+	+
	2	-	-	+	+
	3	+	+	-	++

Cabe reseñar que, a pesar de la ausencia de virus detectable en sangre y excreciones virales en animales infectados con E75CV1 a día 31 pi, se pudo detectar la presencia residual de DNA y antígeno viral en linfonodo gastrohepático, detectado mediante RT-qPCR e inmunohistoquímica, respectivamente, en este último caso reducidos a un único foco de marcaje en la mayor parte de los casos (tabla VIII y figura 51 E).

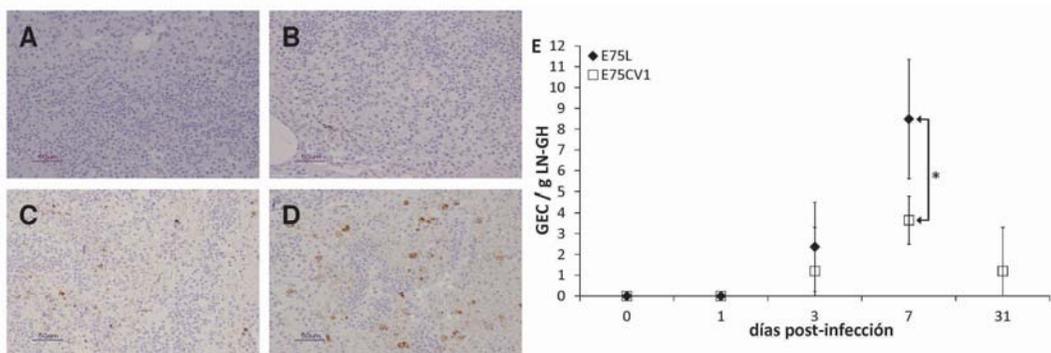


Figura 51. Ejemplo de marcaje del antígeno p30 de VPPA en el linfonodo gastrohepático para la valoración de la invasión del tejido por el virus (E75L o E75CV1): marcaje negativo (A), colonización leve (B) colonización moderada (C) y colonización severa (D). Cinética de detección de DNA viral en linfonodo gastrohepático de cerdos infectados con E75L (rombo negro) o E75CV1 (cuadrado vacío) a lo largo del ensayo (* p<0,05).

Finalmente, y como hallazgos microscópicos más significativos de las diferencias observadas entre ambas infecciones virales, cabría destacar una ligera infiltración de macrófagos (MAC387⁺), detectable tan pronto como a día 1 pi en los animales infectados con E75CV1, que resultó masiva a día 7 pi en los animales infectados con E75L (tabla IX); en este último caso, coincidiendo la presencia de macrófagos infectados (tabla VIII) con la de células apoptóticas (caspasa-3 positivas, tabla X).

Tabla IX. Valoración de la cantidad de macrófagos (MAC387⁺) infiltrados en el linfonodo-gastrohepático.

Grupos	Animal	1dpi	3dpi	7dpi	31dpi
E75L	1	+	+	+++	
	2	+	+	+++	
	3	+	+	++	
E75CV1	1	+	+	+	+
	2	++	++	++	+
	3	++	+	++	+
Control	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+

Tabla X. Valoración de la cantidad de células en apoptosis (caspasa-3⁺) en el linfonodo-gastrohepático.

Grupos	Animal	1dpi	3dpi	7dpi	31dpi
E75L	1	+	+	+++	
	2	+	+	++	
	3	+	+	++	
E75CV1	1	+	+	+	+
	2	+	++	+	+
	3	+	+	+	+
Control	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+

4.5.3. Análisis comparativo de la expresión diferencial de genes relacionados con el sistema inmunológico en linfonodo gastrohepático de cerdos infectados con E75L o con E75CV1

Con el objetivo de profundizar en las bases moleculares que gobiernan la respuesta inmunitaria asociada a la infección con la cepa E75L o con el aislado E75CV1, se realizó un estudio de expresión génica diferencial, partiendo del RNA extraído a partir del linfonodo gastrohepático (figura 52).

Como estudio piloto y complementario a análisis transcriptómicos y proteómicos mucho más sofisticados y que requieren un mayor tiempo de realización, se analizaron 21 genes relacionados con el sistema inmunológico que, en su conjunto, abarcan mediadores clave tanto para la respuesta inmune innata como adaptativa, incluyendo genes típicos de una respuesta Th1, Th2 y T-reguladora.

Tanto la infección con E75L como con E75CV1 provocaron evidentes diferencias en los niveles de expresión de los genes seleccionados. Con el objetivo de poder realizar una descripción lo más comprensible posible de los resultados obtenidos, éstos serán presentados dependiendo del día tras la infección en los que se ve alterada su expresión, señalando los cambios más significativos observados entre sí y siempre teniendo en cuenta que todos los valores están referidos respecto a los animales control sin infectar.

Ambos virus, E75 y E75CV1, demostraron ser capaces de regular diferencialmente el sistema inmunológico del cerdo tan pronto como a día 1 pi, mucho antes de que el virus fuera detectable de forma masiva en el tejido analizado, en ocasiones regulando al sistema inmunitario en direcciones totalmente contrarias. Este fue el caso de la regulación observada para la expresión de dos inmunomoduladores clave: CD163 e *IFN γ* , que a día 1 pi vieron aumentada su expresión en el caso de las infecciones con el virus atenuado y sub-expresados con el virus virulento. Adicionalmente, E75CV1 provocó la inmediata sobre-expresión de citoquinas tales como *IL5*, *IL6* e *IL10* y la supresión de *caspasa-1*; genes que permanecieron inalterables tras la infección con el virulento. Del mismo modo, E75L provocó la sobre-expresión de *IL21* e inhibió la expresión de *IL4*. Finalmente, se encontraron una batería de genes sobre-expresados en diferente grado en ambas infecciones, incluyendo *IL1 β* , *IL8*, *IL12p40*, *TGF β R1* y *TNF α* , así como sub-expresado el gen que codifica la *defensina- β 2*.

Como cabía esperar, el efecto de ambas infecciones sobre el sistema inmunológico del cerdo resultaba mucho más evidente a día 3 pi, en ambos casos destacando la sub-expresión de *IL1 β* , *IL5*, *IL6*, *IL13*, *IL18*, *IL23* y *TGF β R2*, casi siempre siendo más dramática en el caso del virulento. Curiosamente, únicamente dos genes se sobre-expresaban a

este tiempo en ambas infecciones: *IL8* e *IL21*, mientras que otros dos: *IFN γ* y *NFkB* sufrían una regulación opuesta para cada infección, viéndose sobre-expresada en el caso del atenuado e inhibida en el del virulento. La infección con E75L provocó, además, la sobre-expresión de *IL12p40* y *TNF α* y la sub-expresión muy acusada de *CD163*, *defensina- β 2* e *IL4*. Finalmente, la infección con el atenuado provocó la sobre-expresión de *defensina- β 1* y la sub-expresión de *caspasa-1*.

Al contrario de lo que se había mostrado a tiempos anteriores, a día 7 pi, una gran batería de genes vieron aumentada su expresión exclusivamente para el caso del virus virulento, incluyendo: *CD163*, *defensina- β 2*, *IL1 β* , *IL6*, *IL10* y *TLR3*, además de las comunmente activadas por E75CV1: *IFN γ* , *IL5*, *IL8*, *IL21*, *IL23* y *TNF α* . Únicamente *caspasa-1*, *IL4* e *IL18* se mantuvieron sube-expresadas a día 7 pi en ambas infecciones. En claro contraste, la infección con el atenuado mostró su capacidad de inhibir la expresión de 5 genes más: *CD163*, *defensina- β 2*, *IL1 β* , *defensina- β 1* e *IL13*, los tres primeros sobre-expresados en la infección con E75L. Finalmente, destacar que los genes *IL12p40* y *TGF β R1* fueron los únicos activados diferencialmente tras la infección con E75CV1 a este tiempo post-infección.

A día 31 pi, las comparaciones sólo se pudieron hacer entre las muestras control sin infectar y los supervivientes a la infección con el virus atenuado E75CV1; mostrando el siguiente perfil de expresión: sobre-expresión de *IFN γ* , *NFkB*, *IL8*, *TGF β R1* e *IL23*; y sobre todo de *CD163*; e inhibición de la expresión de *defensina- β 2*, *IL13*, *TNF α* y sobretodo de *defensina β 1*, *IL1 β* e *IL4*.

Todos estos resultados permiten validar tanto la calidad del RNA que será paralelamente utilizado para realizar estudios de *microarray* como la de los genes seleccionados, que permiten profundizar en los mecanismos que contribuyen a explicar el fino equilibrio que mantiene las diferencias entre patogenia y protección.

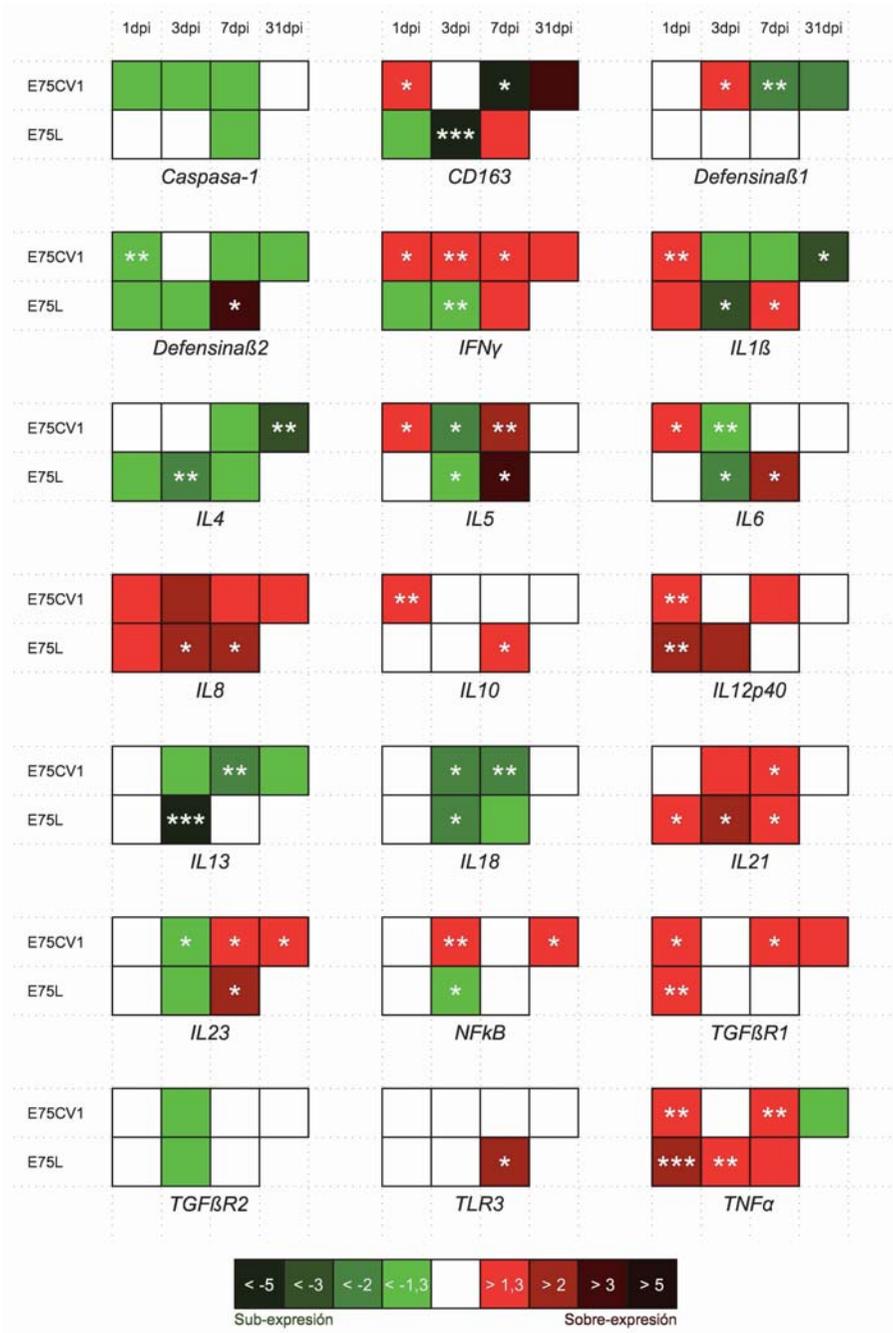


Figura 52. Análisis de la expresión diferencial de genes reguladores del sistema inmunológico porcino en linfonodo gastrohepático de animales infectados con la cepa virulenta E75L o bien con el aislado atenuado E75CV1. El grado de significación en cada caso se estableció comparando los valores de cada grupo con los valores de los controles en cada punto temporal (* p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,001).

4.5.4. Análisis comparativo de la expresión génica y proteica diferencial de factores relacionados con el sistema inmunológico en sangre de cerdos infectados con E75L o con E75CV1

Al igual que se observó en linfonodo-gastrohepático, ya a día 1 pi y en ausencia de virus detectable, se pudo observar una clara regulación del sistema inmune en sangre como consecuencia de la infección con el VPPA (figura 53). Se sobre-expresaban *IFN γ* , *IL1 β* , *IL10* y *NF κ B* muy temprano tras la infección con ambos aislados, mientras que únicamente *CD163* vió reducida su expresión. En paralelo, se pudo demostrar una sobre-expresión selectiva de *TGF β R1* tras la infección con E75CV1 y la inhibición del gen codificante de *defensina β 2* tras la infección con E75L virulento.



Figura 53. Análisis de la expresión diferencial de genes reguladores del sistema inmunológico porcino en sangre de animales infectados con la cepa virulenta E75L o bien con el aislado atenuado E75CV1. El grado de significación en cada caso se estableció comparando los valores de cada grupo con los valores de los controles en cada punto temporal (* p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001).

Sorprendentemente, el RNA aislado a partir de la sangre de cerdos infectados con ambos aislados virales a día 3 pi prácticamente mostró el mismo perfil de sobre-expresión de genes que el de día 1 pi. En ambos casos se observó la sobre-expresión de *IFN γ* , *IL10*, al que se añadió *TGF β R1*. Sin embargo, la expresión de *IL23* se vio fuertemente reprimida en ambas infecciones, mientras que *CD163* pasó a verse sobre-expresado únicamente tras la infección con E75L virulento. Del mismo modo, tanto *defensina- β 2* como *NF κ B* sufrieron una inhibición de su expresión. Curiosamente, *IL1 β* disminuyó su expresión en ambas infecciones, perdiendo la expresión diferencial en el caso de la infección con el atenuado y manteniendo una ligera sobre-expresión en el caso de E75L.

En claro contraste, el perfil de expresión génica varió dramáticamente a día 7 pi, siendo la infección con el aislado E75CV1 la que mostró mayores oscilaciones en su perfil. De este modo, E75CV1 provocó tanto la sobre-expresión selectiva de genes tan importantes como *IFN γ* e *IL23* como la inhibición de *CD163*, *IL10* y *TGF β R1*; siendo el primero el único selectivamente sobre-expresado por el virus virulento. Finalmente destacar que tras la infección con ambos virus se vieron sub-expresados los genes codificantes de *defensina- β 2*, *IL1 β* y *NF κ B*.

Finalmente, la situación a día 31 pi sufrió un nuevo cambio al verse sobre-expresado únicamente el gen del *TGF β R1*, mientras que el resto de los genes evaluados vieron inhibida su expresión, incluyendo: *CD163*, *defensina- β 2*, *IFN γ* , *IL1 β* , *IL10*, *IL23* y *NF κ B*.

Independiente de la validez de estos resultados, sorprende la poca coincidencia entre los resultados obtenidos del linfonodo gastrohepático y de la sangre. Así, únicamente enfocando nuestra atención en los resultados que muestra una coincidencia absoluta, cabe destacar: i) la sobreexpresión de *IL1 β* a día 1 pi y la reducción de la expresión de *IL23* a día 3 pi e independientemente de la infección (E75L o E75CV1); ii) la regulación opuesta que se observa en lo que se refiere a la expresión de *CD163* a día 7 pi, sobre-expresado en el caso del virulento e inhibido en el atenuado, iii) la sobre-expresión de *TGF β R1* a día 31 pi y iv) la sub-expresión de los genes *IL1 β* y *defensina- β 2* a día 31 pi.

El análisis génico diferencial es una herramienta muy potente para identificar los cambios en la expresión génica después de un tratamiento determinado, en nuestro caso, para la comparación de dos infecciones con virus homólogos de distinta virulencia. Sin embargo, en última instancia es necesario medir los niveles de proteína específica generada codificadas en los genes evaluados, ya que la regulación post-transcripcional podría variar el patrón de expresión de la proteína final. Con este objetivo se midieron los niveles de 5 factores solubles en suero relacionados con la respuesta a patógenos. Curiosamente, los valores de TNF α en suero coincidieron con los resultados de RRT-qPCR obtenidos de linfonodo gastrohepático. Los animales infectados con el virus virulento E75L vieron aumentados sus niveles de TNF α en suero a partir del día 3 pi y, aunque las diferencias no pudieran ser consideradas como estadísticamente significativas, sus valores se mantuvieron más elevados que los de los controles y los animales infectados con el atenuado E75CV1 hasta el final del ensayo. Cabe destacar que los niveles de TNF α de los animales infectados con E75CV1 fueron llamativamente indetectables al final del ensayo (día 31 pi) (figura 54).

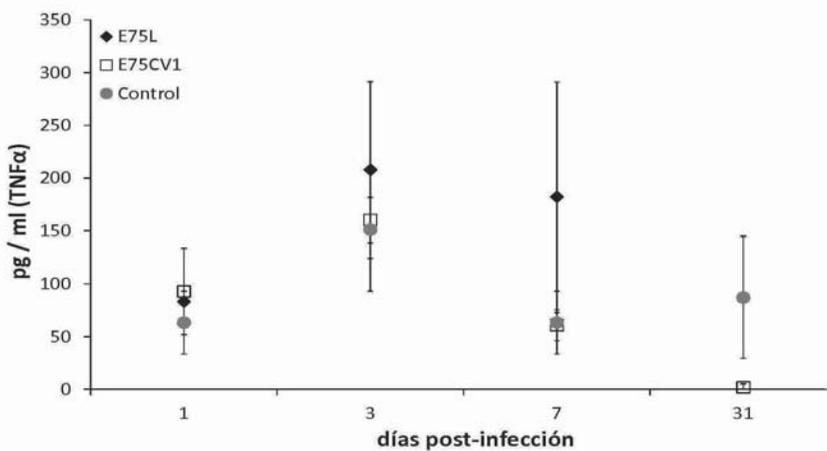


Figura 54. Cinética de detección de TNF α soluble mediante ELISA en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris).

Los niveles de IL1 β detectados en suero a partir de los tres grupos de infección no presentaron diferencias significativas entre ellos, con excepción del último día de ensayo (día 31 pi) en que los niveles de la citoquina fueron indetectables en los animales infectados con E75CV1. Pese a ello, se observó una tendencia a día 3 pi de tener niveles de IL1 β más elevados tras ambas infecciones (E75L o E75CV1) que en los controles, siendo mayores en el caso de los animales infectados con la cepa virulenta (figura 55).

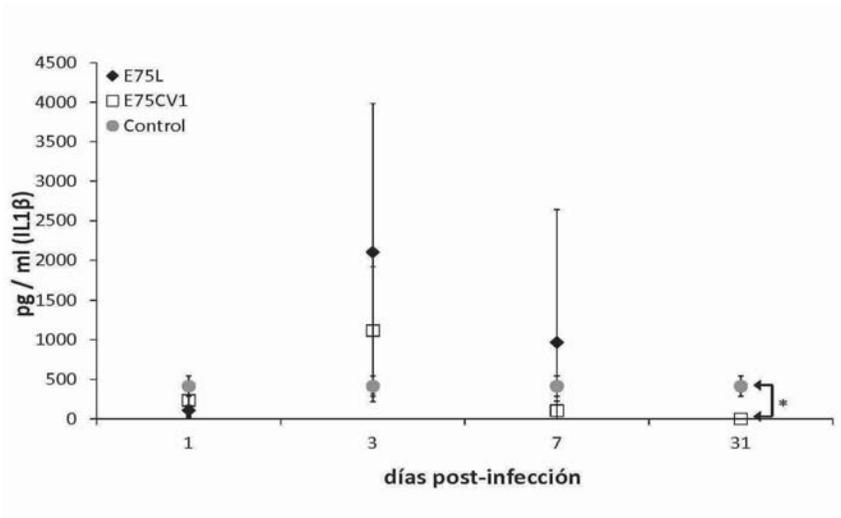


Figura 55. Cinética de detección de IL1 β soluble mediante ELISA en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris) (* $p < 0,05$).

De todos los factores solubles evaluados, el sCD163 fue el que permitió observar mayores diferencias entre ambos tipos de infección, aumentando más de 10 veces su nivel a día 7 pi en el grupo de infección con E75L cuando se comparaba con los obtenidos a partir de animales control o infectados con el aislado E75CV1 (figura 56). Finalmente, se analizó el nivel en suero de una de las citoquinas clave en respuesta inmune innata IFN α , para la que no se pudo realizar una RRT-qPCR. Al igual que ocurría para sCD163, los niveles de IFN α encontrados en suero aumentaban muy significativamente a día 7 pi solo en aquellos animales infectados con la cepa virulenta E75L (figura 57). Esta misma

evolución siguió la citoquina IL12, aunque las diferencias observadas no mostraron tanta significación estadística (figura 58).

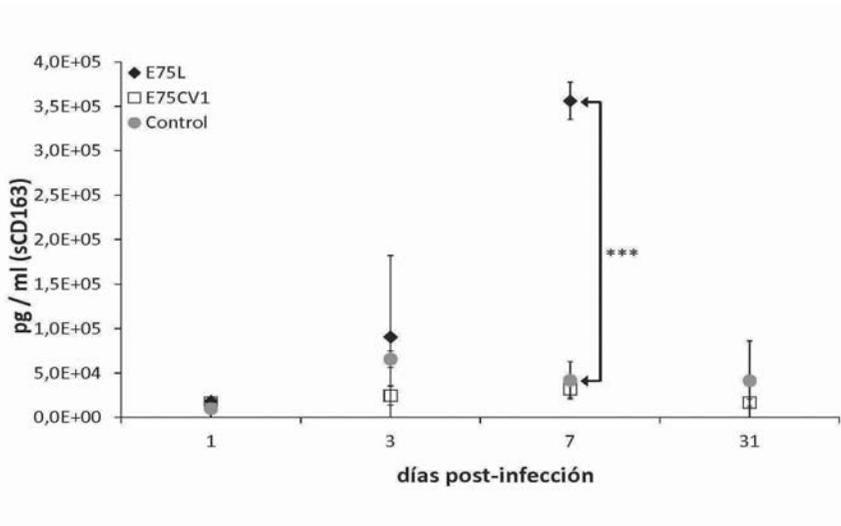


Figura 56. Cinética de detección de sCD163 mediante ELISA en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris) (***) $p < 0,001$.

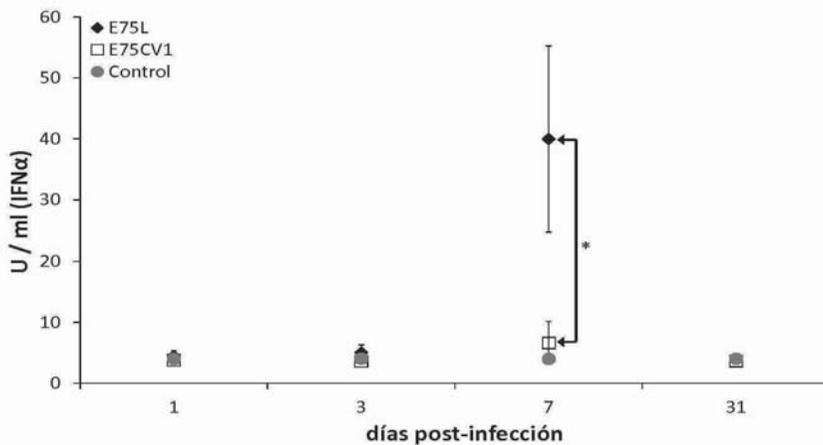


Figura 57. Cinética de detección de IFN α soluble mediante ELISA en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris) (*) $p < 0,05$.

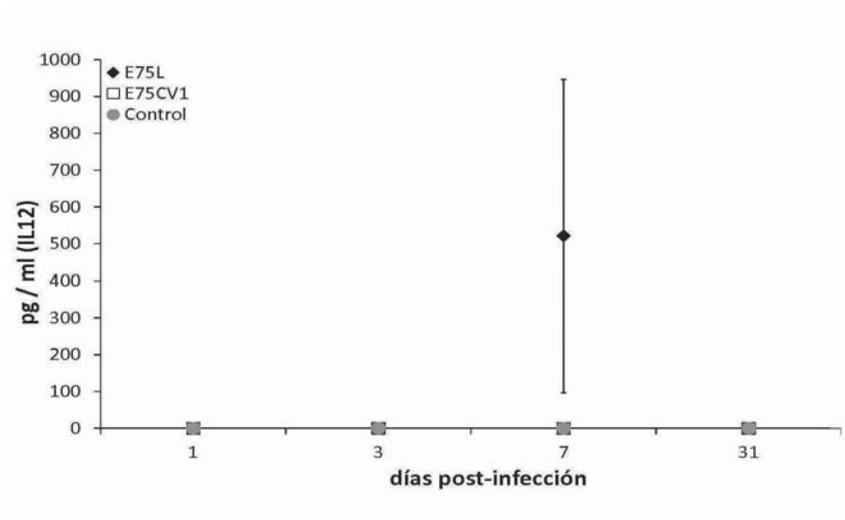


Figura 58. Cinética de detección de IL12 soluble mediante ELISA en suero, se representan los valores medios y la desviación estándar de los cerdos infectados con E75L (rombo negro), E75CV1 (cuadrado vacío) o no infectados (punto gris).

Al problema que supone la limitación de mRNA a la hora de analizar un número ingente de mediadores inmunológicos a partir de sangre, bien sea por RRT-qPCR o mediante un *microarray*, hay que añadir la imposibilidad de realizar ensayos de proteómica utilizando sangre, así como la ausencia de reactivos inmunológicos que permitan analizar un número elevado de proteínas solubles en suero.

Con este problema en mente, decidimos centrarnos en las muestras de linfonodo gastrohepático, que permiten analizar el máximo posible de proteínas (mediante proteómica) como de mRNA (mediante transcriptómica) diferencialmente expresados tras la infección con cada uno de los aislados de VPPA. En los siguientes apartados se pretende simplemente mostrar un ejemplo que demuestre la utilidad de las muestras seleccionadas, abriendo la oportunidad de realizar un análisis más exhaustivo con todas ellas en el futuro, siempre en colaboración con los expertos en esta materia, los Dres. Ángela Moreno y Juan José Garrido de la Universidad de Córdoba.

4.5.5. Análisis comparativo global de la expresión diferencial de genes y proteínas en linfonodo-gastrohepático tras la infección con E75L o E75CV1

Siguiendo el razonamiento recién descrito, los linfonodos gastrohepáticos obtenidos a partir de los animales control o infectados los días 1, 3, 7 y/o 31 pi con E75L o E75CV1 fueron utilizados para extraer el RNA o las proteínas totales.

Una vez confirmada la calidad de los RNA obtenidos, las muestras fueron enviadas a CABIMER (Sevilla) para su utilización en análisis de *microarray* basados en las secuencias genómicas del porcino, sobretodo centrado en genes que codifican proteínas relacionadas con el sistema inmunitario del cerdo (Affymetrix). Actualmente, todas las muestras ya han sido analizadas utilizando esta metodología, procediendo al análisis estadístico exhaustivo de los resultados. De todos modos, en primera instancia todos los puntos demuestran una resolución muy elevada, validando la elección y el tratamiento de las muestras.

De igual forma, el tratamiento de las muestras para proteómica pareció rendir los resultados esperados aunque en este caso, la calidad de las mismas varió mucho dependiendo del tiempo post-infección seleccionado, muy probablemente reflejo de dicha infección. En cualquier caso, en la presente Tesis se presentan los datos de día 3 pi, obtenidos por electroforesis bidimensional a partir del linfonodo gastrohepático.

Analizando los geles de electroforesis bidimensional se observó que, en general, la mayoría de las proteínas se localizaron dentro de un rango de pH de 5 a 8, observándose una menor resolución en la zona ácida. La reproducibilidad de los geles fue superior al 85% y se detectaron alrededor de 500 puntos (*spots*) bien resueltos en cada uno de ellos. De las 173 proteínas diferencialmente expresadas (PDE) se pudieron identificar 115 mediante espectrofotometría de masas y trampa iónica (anexo). Cabe añadir que mediante esta metodología se identificaron varias de las isoformas de una misma proteína o formas truncadas de la misma, entre las cuales se encontraron: albúmina, actina, colágeno y proteínas de choque térmico (HSPA5).

De las 115 PDE identificadas muchas se vieron alteradas en los dos tratamientos (tabla XI), mientras que otras sólo cambiaron la expresión bien tras la infección con la cepa virulenta E75L (tabla XII) o bien con el aislado atenuado E75CV1 (tabla XIII).

Tabla XI. PDE en linfonodo-gastrohepático a día 3 tras la infección con ambos virus: E75L (virulento) o E75CV1 (atenuado).

Proteína	E75L		E75CV1	
	Valor P	Ratio de cambio	Valor P	Ratio de cambio
Proteína ACTG1	0,0008	-7,9	0,0015	-12,8
β-actina	0,0060	-7,9	0,0062	-6,0
Actina citoplasmática 1	0,0003	-28,2	0,0000	-8,2
Actina citoplasmática 1	0,0108	-15,5	0,0104	-18,1
Actina citoplasmática 1	0,0062	-4,1	0,0005	-3,2
Actina citoplasmática 1	0,0010	-14,3	0,0130	-24,5
Actina citoplasmática 1	0,0000	-4,1	0,0000	-3,4
Actina citoplasmática 1	0,0043	-13,2	0,0013	-1,4
Actina citoplasmática 1	0,0001	-10,4	0,0001	-6,4
Actina citoplasmática 1	0,0082	-35,6	0,0080	-22,0
Actina citoplasmática 1	0,0020	-6,3	0,0055	-4,3
Actina citoplasmática 1	0,0005	-5,3	0,0009	-3,8
Actina citoplasmática 2	0,0000	-25,5	0,0000	-10,4
γ-actina citoplasmática 1	0,0360	-154,0	0,0418	-13,8
γ-actina citoplasmática 1	0,0009	-7,3	0,0224	-19,1
Subunidad 2 del complejo proteico 2/3 relacionado con la actina	0,0036	8,7	0,0017	13,1
Annexina A5	0,0034	3,2	0,0002	4,3
α-1-antitripsina	0,0029	4,2	0,0172	4,9
Subunidad β de la ATP sintasa	0,0000	8,6	0,0121	10,7
Proteína 1 del canal intracelular del cloro	0,0015	2,2	0,0000	4,0
Proteína semejante a la coactosina	0,0160	-4,6	0,0199	-4,6
Proteína reactiva C	0,0001	2,6	0,0080	2,2
Proteína 1 asociada al citoesqueleto	0,0116	2,2	0,0128	2,1
α-enolasa	0,0046	2,1	0,0000	3,0
Factor eucariótico 5A-1 de iniciación y translación	0,0027	-2,6	0,0063	-2,2
Subunidad β de la proteína de encapuchamiento F-actina	0,0006	2,0	0,0010	2,4
Cadena ligera de la ferritina	0,0001	11,6	0,0306	3,0
Proteína semejante a la ribonucleoporina D nuclear heterogénea	0,0343	2,6	0,0004	4,1
Subunidad α de la deshidrogenasa isocitrato (NAD) mitocondrial	0,0003	4,0	0,0004	4,6
Lamina-β1	0,0004	6,3	0,0103	8,5
Peroxiredoxina-2	0,0000	3,6	0,0000	4,5
Subunidad 1 del complejo activador del proteasoma	0,0002	2,7	0,0006	2,4
Subunidad 2 del complejo activador del proteasoma	0,0009	2,4	0,0006	2,8
Proteína homóloga a SEC13	0,0015	2,2	0,0012	2,4
Subunidad α del proteasoma tipo 6	0,0004	5,1	0,0000	4,3
Subunidad α del proteasoma tipo 4	0,0000	3,2	0,0026	4,0
Proteína DJ-1	0,0060	2,6	0,0000	3,2
Inhibidor β de disociación Rab GDP	0,0108	16,3	0,0077	12,4
Albumina sérica	0,0000	-12,7	0,0000	-24,3
Albumina sérica	0,0150	-9,4	0,0166	-12,4
Albumina sérica	0,0004	-2,6	0,0066	-2,7
Albumina sérica	0,0005	-3,1	0,0003	-3,1
Albumina sérica	0,0079	-8,8	0,0045	-6,8
Albumina sérica	0,0000	-3,0	0,0000	-2,4

Albúmina sérica	0,0009	-2,5	0,0005	-2,8
Albúmina sérica	0,0020	-3,6	0,0087	-2,2
Albúmina sérica	0,0010	-4,1	0,0072	-3,2
Albúmina sérica	0,0118	-8,1	0,0132	-5,3
Albúmina sérica	0,0006	-4,1	0,0010	-3,0
Albúmina sérica	0,0001	-7,6	0,0000	-4,7
Albúmina sérica	0,0000	-4,4	0,0046	-5,4
Albúmina sérica	0,0029	-4,4	0,0188	-5,2
Hidrolasa formilglutaciona S	0,0066	2,0	0,0019	2,5
α-tubulina	0,0001	-11,9	0,008	-34,8
Cadena β de la tubulina	0,0008	-3,5	0,0012	-2,5
Enzima E2K conjugado a ubiquitina	0,0002	-2,4	0,0057	-2,8
Vimentina	0,0307	-2,1	0,0140	-2,3
Proteína 14-3-3 β/α	0,0000	-11,1	0,0000	-8,9
Proteína 14-3-3 γ	0,0190	-89,7	0,0210	-17,3
Proteína 14-3-3 z/δ	0,000	-7,3	0,0001	-16,5
deshidrogenasa hidroxisteroide 14 β 17	0,0062	-9,8	0,0070	-5,9

Tabla XII. PDE en linfonodo-gastrohepático a día 3 tras la infección con la cepa virulenta E75L.

Proteína	E75L	
	Valor P	Ratio de cambio
Actina citoplasmática 1	0,0000	-15,9
Actina citoplasmática 2	0,0029	-2,3
Reductasa de la aldosa	0,0016	-2,0
Antitrombina-III	0,0002	3,3
Anhidrasa carbónica 2	0,0112	3,3
Endoplasmina	0,0289	3,1
β-enolasa	0,0106	-2,9
Proteína soluble de adhesión a NSF α	0,0014	2,6
Aminotransferasa ornitina mitocondrial	0,0327	-2,0
Inhibidor de la ribonucleasa	0,0162	-5,7
Pirofosfoquinasa fosfato de la ribosa	0,0091	-4,9
Dominio SAP-conteniendo la ribonucleoproteína	0,0269	-3,3
Sero transferrina	0,0018	-94,4
Albúmina sérica	0,0000	-6,2
Albúmina sérica	0,0000	-3,3
Albúmina sérica	0,0000	6,8
Albúmina sérica	0,0000	-2,5
Albúmina sérica	0,0325	-2,5
Albúmina sérica	0,0039	-11,5
Albúmina sérica	0,0216	-12,7
Proteína semejante tioredoxina 1	0,0393	1,9
Tropomodulina Ubicua (U-Tmod)	0,0051	-10,5
Proteína 14-3-3 ε	0,0337	-2,0
Proteína de 78 kDa regulada por la glucosa	0,0072	2,6

Tabla XIII. PDE en linfonodo-gastrohepático a día 3 tras la infección con el aislado E75CV1.

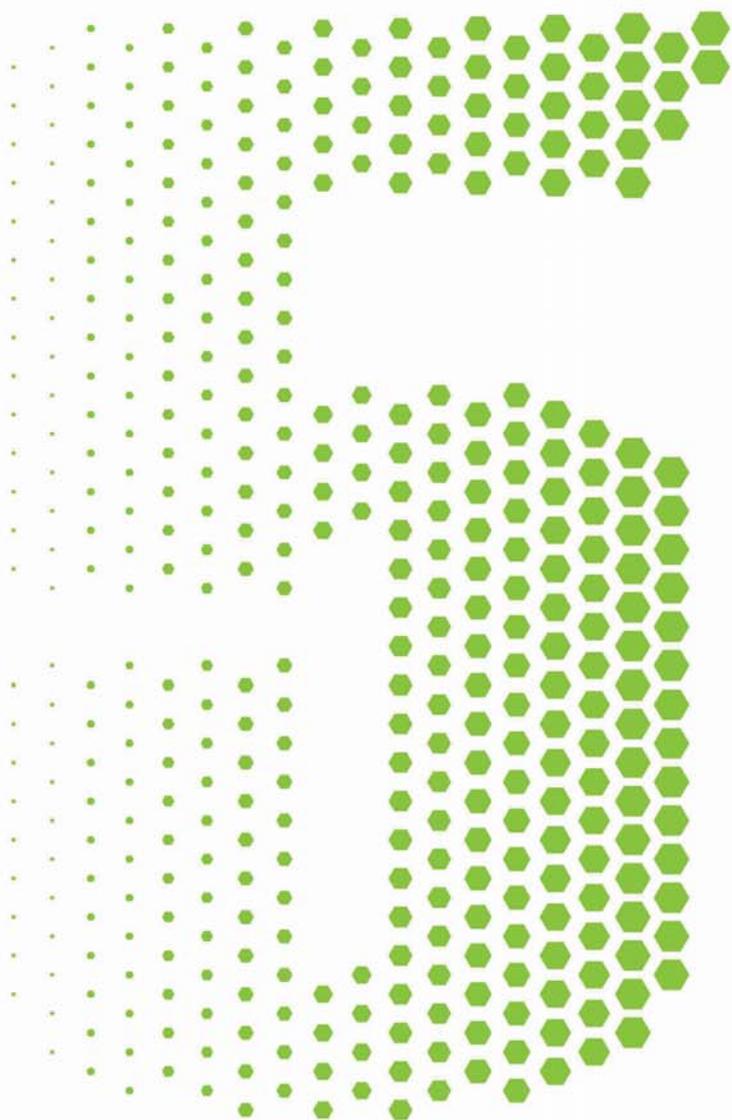
Proteína	E75CV1	
	Valor P	Ratio de cambio
β -actina	0,0119	-23,4
Subunidad β de la sintasa de ATP mitocondrial	0,0043	-11,2
Cadena α -1(I) del colágeno	0,0057	3,2
Cadena α -1(II) del colágeno	0,0204	2,9
Cadena B de la deshidrogenasa del lactato L	0,0007	4,6
Proteína de encapsamiento de macrófagos	0,0268	1,8
Proteína asociada a microtúbulos, familia RP/EB, miembro 1	0,0440	1,9
Proteína soluble de adhesión a NSF α	0,0021	5,2
Sintetasa del fosforibosil pirofosfato 1	0,0003	5,6
Isomerasa de la proteína bisulfito A3	0,0005	2,8
Proteína DJ-1	0,0329	2,9
Proteína de 40 KDa	0,0327	-2,8
Proteína Rab-15 relacionada con Ras	0,0025	2,3
Inhibidor de la disociación de Rho-GDP 1	0,0003	2,5
Reductasa del peróxido dependiente de la tioredoxina, mitocondrial	0,0002	1,6
Isomerasa del trifosfato	0,0037	3,1
Serotransferrina	0,0127	1,6
Serotransferrina	0,0015	-4,9
Serotransferrina	0,0000	-3,6
Serotransferrina	0,0011	2,3
Serotransferrina	0,0061	2,4
Serotransferrina	0,0005	3,0
Serotransferrina	0,0112	2,7
Sorcina	0,0000	3,6

Las PDE identificadas se clasificaron en 4 grupos para su análisis funcional, teniendo en cuenta si se había alterado su expresión en ambos grupos de infección o solo en uno de ellos (tabla XIV). De este modo, en el grupo I se incluyeron todas las PDE que vieron alterada su expresión tras la infección con la cepa virulenta E75L (coincidentes o no con las PDE alteradas en la infección con E75CV1), en el grupo II se englobaron todas las PDE alteradas tras la infección con el aislado atenuado E75CV1 (coincidentes o no con las PDE alteradas en la infección con E75L) y finalmente, en los grupos III y IV se incluyeron aquellas PDE que vieron modificada su expresión sólo tras la infección con E75L o con E75CV1, respectivamente, con el objetivo de encontrar las diferencias en la respuesta inmune producidas por dos virus homólogos con distinta virulencia. En la infección con la cepa E75L (virulenta) se identificaron 85 PDE, 29 de ellas sobre-expresadas y 56 sub-expresadas. Asimismo, en la infección con E75CV1 (atenuado) se hallaron 94 PDE, 49 sobre-expresadas y 45 sub-expresadas. Como ya era de esperar, el número de PDE afectado sólo por uno de los tratamientos fue considerablemente menor.

Tabla XIV. Número de PDE a día 3 tras ambas infecciones o sólo en una de ellas.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Proteínas sobre-expresadas	29	49	7	27
Proteínassub-expresadas	56	45	17	6
TOTAL	85	94	24	33

Viendo todos estos datos en conjunto, se constató que el análisis de las PDE del linfonodo gastrohepático de tan solo un punto temporal (día 3 pi) del ensayo permitió detectar diferencias en multitud de procesos afectados por la infección con el VPPA en general, a la vez que permitía vislumbrar procesos diferencialmente afectados tras la infección con dos cepas homólogas con distinto grado de virulencia. Es evidente, que para sacar conclusiones en firme será necesario el análisis en profundidad de los datos aquí presentados, así como de los demás puntos temporales seleccionados; tarea en la que se encuentra centrada gran parte de la línea actual de investigación de nuestro grupo, incluyendo por supuesto a nuestros colaboradores: el Dr. Juan José Garrido y la Dra. Ángela Moreno.



DISCUSIÓN

"El cerdo no sueña con rosas, sino con bellotas"

La PPA es una enfermedad del ganado porcino que provoca grandes pérdidas económicas en los países afectados y para la que, a día de hoy, no existe tratamiento ni vacuna eficaz, dejando como única medida de contención el diagnóstico temprano de la misma y el sacrificio masivo de los animales infectados. El panorama aún es más dramático en los países del África subsahariana, donde la enfermedad es endémica y las medidas recién descritas son de imposible aplicación, quedando destruida la que es, en ocasiones, la única fuente de proteínas de la dieta. A pesar de los intentos realizados hasta el momento por conseguir una vacuna segura y eficaz, todavía estamos lejos del éxito total, por lo que cualquier avance en este sentido resulta totalmente necesario. Así pues, el trabajo realizado durante la presente Tesis se ha centrado en este objetivo, concentrándonos en la generación de nuevas estrategias vacunales capaces de generar la mayor protección posible frente a la PPA, facilitando a su vez la identificación de nuevos antígenos relevantes y profundizando en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos importantes en protección y/o patogenicidad viral.

Como se ha comentado con anterioridad, el trabajo de la presente Tesis partió de resultados previos obtenidos en el laboratorio, en los que se describía la generación de una vacuna de DNA (pCMV-UbsHAPQ) que, a pesar de codificar únicamente 3 antígenos virales (de los más de 150 posibles) fusionados al polipéptido celular ubiquitina, era capaz de proteger al 33% de los animales vacunados frente a la infección letal con el VPPA (Argilaguet *et al.*, 2012b). Como cabía esperar, a causa de la presencia de ubiquitina en la vacuna (Rodríguez *et al.*, 1997), la protección fue conferida en ausencia de anticuerpos, coincidiendo, además, con un aumento de células T-CD8⁺ en sangre periférica, ratificando así la importancia de esta subpoblación celular en protección frente al VPPA (Oura *et al.*, 2005). Los primeros esfuerzos realizados en esta Tesis han permitido, por primera vez para el caso del VPPA, identificar dos epítomos T-CD8⁺ con potencial protector. La caracterización de los péptidos F3 y A6 permitió cerrar el trabajo y la publicación definitiva del artículo correspondiente (Argilaguet *et al.*, 2012b). Adicionalmente, los resultados obtenidos permitieron ratificar, por un lado, que las

proteínas recombinantes p54, p30 y sHA, utilizadas previamente como estímulos en los ensayos *in vitro*, no se presentaban eficientemente en SLA-I; y por el otro, que la limitada presentación antigénica de E75L, obedecía a un fenómeno de inmunodominancia que afectaba negativamente a los péptidos F3 y A6 (Takamatsu *et al.*, 2012). Siguiendo con este mismo fenómeno, no todos los cerdos protegidos (convencionales o SPF), respondieron en la misma medida frente a los dos péptidos, sugiriendo cierta inmunodominancia de un epítipo frente al otro, muy probablemente dependiendo del haplotipo del animal; hipótesis que esperamos pueda ser confirmada en el futuro mediante el haplotipado de los animales supervivientes.

Curiosamente los dos péptidos frente a los que respondieron las PBMC (F3 y A6), de los 53 diseñados en base a las secuencias de las proteínas virales p30, p54 y sHA, pertenecían a la secuencia de sHA, integrados en el mismo dominio extracelular. Varias son las explicaciones plausibles para explicar la falta de respuesta frente a los otros 51 péptidos diseñados como potenciales epítopos CTL: limitaciones en las predicciones teóricas, limitaciones técnicas, el establecimiento de una jerarquía de inmunodominancia que enmascare otras posibles respuestas o la ausencia real de otros epítopos con potencial protector en la secuencia de p30, p54 y sHA. De todos modos, el hecho de que ninguno de los epítopos diseñados en base a la secuencia de las proteínas p54 y p30; esta última previamente descrita como potencial diana de CTL (Alonso *et al.*, 1997), estimulara específicamente a las PBMC, puede ayudar a explicar la falta de protección conferida por las vacunas DNA codificando exclusivamente estas dos proteínas (Argilaguuet *et al.*, 2011). La inmunización de cerdos convencionales y SPF con los dos péptidos (F3 y A6) permitió confirmar su capacidad protectora.

El hecho innegable de que el protocolo de inmunización con péptidos y adyuvante de Freund resulte totalmente subóptimo a la hora de inducir respuestas CTL (Ramirez *et al.*, 2007), junto con el hecho de que los péptidos cortos solubles son fácilmente degradables una vez inyectados, permite ser optimistas en cuanto a la obtención de una protección mayor si se administran en el futuro como parte integral de una formulación vacunal más compleja y optimizada.

Con el objetivo de mejorar el grado de protección conferido por nuestras vacunas DNA, decidimos apostar por una estrategia basada en la inmunización con librerías genómicas de expresión (ELI), descrita por primera vez para conferir protección frente a *Mycoplasma pulmonis* en un modelo de ratón (Barry *et al.*, 1995). La estrategia ELI consiste en la inmunización con complejas mezclas de plásmidos que contienen fragmentos más o menos al azar obtenidos del genoma del patógeno en particular y que ha demostrado ser eficaz frente a patógenos mucho más complejos que el VPPA, como puede ser el propio *Mycoplasma*, o parásitos tales como *Trypanosoma cruzi* (Fralish and Tarleton, 2003; Tekiel *et al.*, 2009) o *Leishmania major* (Piedrafita *et al.*, 1999). En algunos casos, la utilización de ELI ha permitido la identificación individual de antígenos inmunoprotectores, como ocurrió con una ELI de más de 50.000 clones obtenida de *Chlamydomophila psittaci*, a partir de la cual se llegaron a identificar 5 epítomos con potencial protector en bóvidos (Barry *et al.*, 2004).

La obtención de dos librerías en paralelo con los fragmentos SD y SB del genoma del VPPA permitió obtener dos conclusiones que facilitaron las tareas subsiguientes. Por un lado, se descartó la utilización de sHA como adyuvante genético para nuestras ELI futuras, confirmando los datos previamente obtenidos con la construcción pCMV-sHAPQ (Argilaguët *et al.*; 2011) y ratificando que lo importante no es potenciar una respuesta inmune *per se* (en su caso anticuerpos y células T-CD4⁺), sino estimular una respuesta inmune capaz de proteger (ni pCMV-sHAPQ ni sHA-ELI_{SD/SB} confirieron protección alguna frente al VPPA). Por el otro, reafirmó el enorme potencial de la ubiquitina como potenciador de la respuesta protectora de nuestras vacunas, muy probablemente ratificando la relevancia de la respuesta T-CD8⁺ en protección.

La co-inmunización de cerdos convencionales con pCMV-UbsHAPQ más Ub-ELI_{SD/SD} (Ub-ELI_{SD/SB-sHAPQ}) no sólo permitió mejorar la protección conferida por el plásmido pCMV-UbsHAPQ, sino además confirmar la eficacia de la estrategia ELI y evidenciar la existencia de epítomos con capacidad protectora en las secuencias comprendidas en SD y/o SB.

La secuenciación selectiva de cada uno de los 380 clones que forman parte de la librería Ub-ELI_{SD/SD}, permitió confirmar la presencia de 7 plásmidos que contenían secuencias del genoma que mantenían la pauta de lectura con la ubiquitina. Un estudio *in silico* de la secuencia correspondiente a los fragmentos SD y SB de Ba71V, permitió predecir la obtención teórica de 11 clones que, manteniendo la fase 1 de lectura de la ubiquitina, codificaban fragmentos correspondientes a ORF previamente descritas, con lo que la representatividad de nuestra ELI parecía estar asegurada. Estos resultados demuestran que la estrategia ELI es de gran utilidad a la hora de identificar antígenos protectores en patógenos complejos como el VPPA. Así, la selección de estos 7 clones (a partir de los 380 originales) permitió confirmar su capacidad protectora, primero en cerdos convencionales y posteriormente en ensayos de co-inmunización con pCMV-UbsHAPQ en cerdos SPF. Independientemente de la protección conferida por estos 7 clones, no se debe descartar la presencia de posibles secuencias protectoras en el resto de la librería, a pesar de no corresponder con ORF previamente descritas (Jenson *et al.*, 2000).

Curiosamente, tres de los siete clones identificados a partir de la ELI coinciden con polipéptidos de 3 proteínas previamente implicadas en la respuesta humoral frente al VPPA: p10, pp220 y pCP312R (Ivanov *et al.*, 2011; Kollnberger *et al.*, 2002). Aunque su implicación en respuesta celular nunca antes se ha sugerido, cualquiera de estas proteínas representa un buen candidato teórico al que adscribir la protección observada tras la inmunización con los 7 clones. Actualmente nos encontramos en el proceso de identificación final de el/los posible/s epítopo/s T-CD8⁺ involucrados en protección, utilizando péptidos cortos solapantes. El mapeo de epítomos con péptidos solapantes resultaría económicamente inviable a partir del genoma completo del VPPA (más de 150 proteínas, algunas con más de 3.000 aminoácidos) y sólo será abordable gracias a esta labor previa de reducción de las secuencias potencialmente implicadas en protección a unos pocos polipéptidos de tamaño relativamente corto.

La identificación definitiva de los epítomos protectores a partir de los 7 clones permitirá su inclusión junto con F3 y A6 en una única construcción vacunal optimizada,

experimentos que formarán parte de una tesis doctoral actualmente en curso en el laboratorio.

Visto el éxito de esta primera prueba de concepto, se generó Ub-ELI_{completa}, una nueva ELI basada en el 76,5% del genoma del VPPA. Dificultades técnicas, algunas de ellas inherentes al método de obtención de las ELI, imposibilitaron la representación total del genoma viral, quedando excluidos los extremos altamente repetitivos del genoma, así como la pérdida de los extremos 5' y 3' de cada uno de los fragmentos de restricción utilizados, por incompatibilidad con los sitios de clonaje en pCMV-Ub (*BglIII* y *BclI*). De igual modo, aquellos fragmentos *Sau3AI* que, conteniendo un ATG iniciador de una ORF precedido por un codón de terminación (presentes de forma natural en el genoma), también verían imposibilitada su expresión. Independientemente de sus limitaciones, Ub-ELI_{completa} fue capaz de proteger a más del 50% de los cerdos inmunizados, convencionales o SPF, frente al desafío letal con VPPA. Este grado de protección no deja de ser sorprendente, teniendo en cuenta que en el caso de los cerdos SPF la protección llegó a ser prácticamente total en el 50% de los cerdos protegidos, al menos en lo que se refiere a su capacidad para controlar totalmente la viremia y la excreción viral; fenómeno no observado hasta el momento para ninguna de las vacunas DNA ensayadas, incluyendo la combinación pCMV-UbsHAPQ más Ub-ELI_{SD/SB}. Siendo conscientes de que la formulación vacunal está lejos de resultar óptima; habiéndose inoculado más de 4.000 plásmidos a la vez a una concentración de 0,15 µg/plásmido/dosis en lugar de los 600 µg/plásmido/dosis óptimos, podemos permitirnos confiar en un grado de protección mucho más sólido en un futuro próximo. En este sentido cabe destacar que una de las direcciones prioritarias de nuestra línea de investigación y parte de una nueva tesis doctoral del grupo, consiste en identificar los antígenos responsables de la protección conferida por estas vacunas. Para facilitar esta tarea, durante la presente Tesis se ha realizado la puesta a punto de técnicas que permitirán la identificación *in vitro* de aquellos clones de la librería que sean capaces de estimular específicamente la proliferación de células T-CD8⁺. Una de estas técnicas es el aislamiento de fibroblastos

primarios de cada uno de los cerdos protegidos, a la que hay que añadir la caracterización de su capacidad para la presentación de péptidos específicos mediante SLA-I, con la dificultad añadida de utilizar VPPA como estímulo al provocar una evidente disminución de la expresión de SLA-I en su superficie. Más recientemente, también se han optimizado los protocolos de transfección de cultivos primarios, aumentando su eficiencia a más de un 35%; suficiente como para plantearse la inminente puesta a punto de un ensayo de estimulación de la proliferación *in vitro* basado en el marcaje mediante CFSE (Banks *et al.*, 2011), que permitirá el posterior fenotipaje de las células estimuladas.

Al igual que sucedió en su momento para los péptidos F3 y A6 de sHA, la carencia de péptidos T-CD8⁺ identificados en VPPA ha impedido confirmar al 100% la identidad de las células responsables de la protección tras la inmunización con Ub-ELI_{completa}, a pesar de que casi sin lugar a dudas se trate en exclusiva de células T-CD8⁺. Coincidiendo con esta hipótesis, cabe destacar que, tanto los linfocitos T-CD8⁺ como los doble positivos de memoria T-CD4⁺CD8⁺ (Alonso *et al.*, 1997; Nascimbeni *et al.*, 2004), aumentaba inmediatamente tras la infección viral, coincidiendo con el control de la viremia de los animales supervivientes, llegando a incrementar exponencialmente su número al final del ensayo de una manera similar a lo ya descrito para los cerdos supervivientes inmunizados con el plásmido pCMV-UbsHAPQ (Argilaguet *et al.*, 2012b).

Por último, cabe destacar que los animales supervivientes a la infección letal con el VPPA, tanto vacunados con Ub-ELI_{7clones-sHAPQ} como vacunados con Ub-ELI_{completa}, se encontraban libres de virus al final del experimento, no solo en sangre sino también en excreciones; lo que evitaría la transmisión del VPPA a cerdos susceptibles.

Como para muchos otros patógenos que tienen como diana principal las células del sistema inmunitario (Eugenin *et al.*, 2006; Hulst *et al.*, 2012; Tumpey *et al.*, 2005), la infección con el virus E75L virulento provoca una “tormenta de citoquinas”, detectable en suero. Como cabía esperar, los animales protegidos tras la vacunación con DNA, fueron capaces de controlar, en mayor o menor medida, este desorden del sistema

inmunológico porcino y, a la ya previamente descrita secreción de TNF α , cabe añadir el evidente control de IFN α y de sCD163.

TNF α se ha relacionado históricamente con el daño en las células endoteliales vasculares y con la apoptosis, ambos observables en infecciones agudas con VPPA virulentos, sugiriéndose además una relación directa entre la cantidad de células infectadas y el daño tisular producido (Carrasco *et al.*, 1996a; Gomez del Moral *et al.*, 1999; Oura *et al.*, 1998b; Salguero *et al.*, 2005); observación aquí ratificada al vislumbrar una coincidencia total entre los niveles de TNF α en suero y el número de macrófagos infectados en sangre (SWC3⁺p30⁺).

Las observaciones respecto a IFN α admiten, sin embargo, una mayor controversia, ya que en el único trabajo citado recientemente en la literatura, se describe un efecto prácticamente inverso al que recurrentemente nos encontramos tras la infección con E75L virulento en el laboratorio. Así, tras la infección experimental con un virus virulento aislado recientemente del Cáucaso, se observa un aumento inicial de esta citoquina en suero, que a medida que avanza la infección va disminuyendo (Karalyan *et al.*, 2012b); justo a la inversa de lo que cabría esperar para infecciones sistémicas, que suelen correlacionar, como en nuestro caso, con altos niveles de TNF α e IFN α en suero (Murphy *et al.*, 2008). En concordancia con lo controvertido de los resultados; el IFN de tipo I, incluido IFN α , parecería jugar un papel dual durante la infección. Por un lado, el virus ha evolucionado generando estrategias que permiten, en la medida de lo posible, inhibir o disminuir los efectos antivirales del IFN tipo I; habiéndose involucrado hasta el momento varios antígenos virales en el proceso: pA276L (MGF360), pA528R (MGF530), pI329L y pA238L (Correia *et al.*, 2012) y cuya delección, en algunos casos, provoca la atenuación del virus (Afonso *et al.*, 2004; Neilan *et al.*, 2002; Zsak *et al.*, 2001). A este papel clave del IFN tipo I durante las fases tempranas de defensa frente al VPPA (inmunidad innata), se contrapondría, sin embargo, su total desregulación a tiempos tardíos tras la infección, coincidiendo con la invasión masiva y sistémica por parte del VPPA.

Por último, cabe destacar los elevados niveles de un nuevo mediador soluble, sCD163, encontrados en el suero de los animales infectados con el virus E75L virulento en las

etapas terminales de la infección. Los datos de RRT-qPCR en órganos linfoides, junto con los del ELISA de detección de sCD163, permiten proponer este indicador de inflamación (Onofre *et al.*, 2009) como un marcador de patogenia viral en ensayos de infección con VPPA *in vivo*, del mismo modo que previamente ha sido utilizado como marcador para el diagnóstico de sepsis (Moller *et al.*, 2006), de CID (Chung *et al.*, 2011) o de enfermedades inflamatorias crónicas (Matsushita *et al.*, 2002). Varias son las ventajas de utilizar este factor como marcador para el diagnóstico de patogenia: i) es extremadamente estable a temperatura ambiente (hasta 24 horas sin refrigerar), lo cual facilitaría la recogida de muestras en campo; ii) permanece inalterable tras los procesos de congelación y descongelación (Moller *et al.*, 2002) y iii) su vida media es mayor que la de muchas citoquinas pro-inflamatorias, por ejemplo TNF α (Etzerodt *et al.*, 2010; Hintz *et al.*, 2002). Sin embargo, la sensibilidad de la técnica impide su utilización como marcador temprano de PPA, por lo que su utilidad en condiciones de campo necesita de análisis más exhaustivos.

La validez de todos estos parámetros: viremia, excreción viral, leucopenia y secreción de factores solubles, como marcadores de virulencia, se vio ratificada al observar una clara reducción, o incluso inhibición, de todos y cada uno de ellos en los animales vacunados y protegidos, independientemente del método de inmunización utilizado: DNA o virus atenuado. Así, se confirmó que el control de los estadios iniciales de replicación viral junto con la reducción del número de células infectadas por el virus, permite evitar la “tormenta de citoquinas”, característica de la inmunopatogenia producida por cepas virulentas del VPPA. El hecho de que los niveles de protección conferidos con el virus atenuado fuera incluso mejor que el de las vacunas DNA se podría explicar de muchas maneras distintas y/o complementarias. Por un lado, nuestras vacunas ELI fueron diseñadas para inducir únicamente una respuesta T-CD8⁺, obviando quizás otro tipos de respuestas implicadas en protección frente al VPPA: anticuerpos o respuesta T-CD4⁺ (Argilaguet *et al.*, 2012a; Onisk *et al.*, 1994). Por otro lado, cada uno de los plásmidos contenidos en las ELI se encontraban en concentraciones subóptimas, factor que podría ser solucionable una vez identificado el/los plásmido/s protector/es (Barry *et al.*, 2004).

Finalmente, el hecho de que la infección letal fuera realizada con un virus heterólogo (E75L), quizá esté haciéndonos minusvalorar la eficacia de nuestras vacunas ELI, obtenidas a partir del genoma incompleto del aislado apatógeno Ba71V. A este respecto cabe destacar, que si bien la inmunización con E75CV1 demostró una protección óptima frente al virus homólogo virulento E75L, resultó ser muy poco eficiente frente a Ba71L, virus recientemente disponible en el laboratorio y todavía sin secuenciar que, a pesar de su más que probable proximidad genética, demostró ser heterólogo respecto a E75L. Así, el hecho de que el virus atenuado fuera incluso menos eficiente que las propias Ub-ELI frente a un virus heterólogo, permite ser optimistas en cuanto a la futura utilidad de nuestras vacunas DNA. De todos modos, es importante remarcar que el planteamiento inicial fue el de generar las librerías a partir del aislado E75L, para el que se tenía puesto a punto la infección *in vivo*. Desafortunadamente, todos los intentos de obtener un DNA viral libre de DNA celular (o de otros virus DNA), resultaron infructuosos, forzando la utilización de un método alternativo de obtención del genoma viral con mayor pureza: las librerías disponibles en su momento del genoma de virus apatógeno Ba71V (Ley *et al.*, 1984); aún siendo conscientes de las limitaciones que este método podría conllevar, incluyendo la variabilidad debido a su adaptación y pase en cultivo celular. Actualmente, nos encontramos no sólo intentando identificar tantos epítomos T-CD8⁺ como sea posible a partir de nuestras librerías, sino que además estamos intentando mejorar las mismas, clonando todas las ORF de E75CV1 fusionados a la ubiquitina. En paralelo, estamos explorando la posibilidad de utilizar virus inducibles del VPPA (Rodríguez *et al.*, 2009; Suarez *et al.*, 2010) en estrategias de *prime-boosting* junto con el DNA, con el objetivo de potenciar no sólo la respuesta T-CD8⁺, sino además la respuesta T-CD4⁺ y de anticuerpos.

La utilización de cerdos SPF ha permitido profundizar en algunas cuestiones que hasta el momento, al menos en nuestro laboratorio, no se habían abordado. Por un lado, los cerdos SPF permitieron confirmar los datos de protección obtenidos en cerdos convencionales y demostraron ser excelentes como modelos para diseccionar la respuesta inmune; y por el otro, demostraron poseer una susceptibilidad mucho mayor

al VPPA que los cerdos convencionales. Comenzando por este último fenómeno, no dejó de ser sorprendente que una misma dosis de E75CV1 resultara prácticamente inocua para los cerdos Landrace x Large White convencionales, y que, sin embargo, provocara el 100% de mortalidad en cerdos SPF. Estos resultados encajan a la perfección con los recientemente publicados y apenas discutidos por King y colaboradores (King *et al.*, 2011), en los que se observa una exacerbada susceptibilidad de los cerdos SPF a la infección con VPPA. Al igual que lo descrito para otros patógenos, la alta susceptibilidad de los cerdos SPF muy probablemente venga explicada por el diferencial grado de madurez de su sistema inmunológico cuando se compara con animales sometidos a continuas infecciones por los múltiples microorganismos que circulan en las granjas convencionales (Clapperton *et al.*, 2009). El hecho de que las líneas de cerdos SPF sean altamente endogámicas a provocado una marcada reducción del polimorfismos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), entre ellos los receptores tipo Toll (TLR), a los que se ha relacionado con la susceptibilidad del porcino de sufrir neumonías (Uenishi *et al.*, 2011), convirtiéndose así en otro factor de riesgo a tener en cuenta. Independientemente de su susceptibilidad a las infecciones, una ventaja de la “inmadurez inmunológica” de estos cerdos se refleja en la ausencia de fondos indeseables en los ensayos inmunológicos realizados *in vitro*, habiendo permitido ratificar fenómenos vislumbrados en animales convencionales, tales como la inmunodominancia que afecta a los epítomos F3 y A6, dependiendo del haplotipo del animal vacunado.

Los experimentos con cerdos SPF han servido además para confirmar que, ante un desafío menos agresivo (10^4 UHA₅₀ E75CV1) como el que se venía practicando con los cerdos convencionales (10^4 UHA₅₀ E75L), la vacuna Ub-ELI_{completa} era capaz de controlar totalmente la infección viral sin que se observara viremia ni excreción viral a lo largo de la infección, con la importancia que esto supone a la hora de evitar la transmisión intraespecífica del virus. Así pues, estamos convencidos que el potencial protector de nuestras vacunas DNA en cerdos convencionales ha sido probablemente subestimado; siendo capaces las mismas no sólo de controlar totalmente la infección, sino además de

proteger frente a desafíos heterólogos. Este último fenómeno, se podría explicar por la capacidad de las vacunas basadas en múltiples plásmidos de conferir una respuesta, si bien no óptima desde el punto de vista cuantitativo y en comparación con la inmunización con virus atenuados, sí policlonal, permitiendo que cada animal responda individualmente y dependiendo de su haplotipo, frente a un repertorio distinto de epítomos codificados por la vacuna. De este modo, además, también se evitaría el escape de mutantes. Por el contrario, las vacunas basadas en virus atenuados, aunque muy eficaces desde el punto de vista de la respuesta cuantitativa que inducen, podrían estar sujetas a un claro fenómeno de inmunodominancia mucho más marcado, que limita la inducción de dicho repertorio (Fowler *et al.*, 2012; Takamatsu *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2012); fenómeno descrito con anterioridad para muchos otros virus (Rodríguez *et al.*, 2002).

La puesta a punto de la infección con el virus atenuado E75CV1 permitió confirmar los resultados de protección frente al virus homólogo obtenidos décadas atrás (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1983), añadiendo además nuevos datos en lo concerniente a la inseguridad del método (Alonso *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1992; Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Onisk *et al.*, 1994; Zsak *et al.*, 1993). Si bien la dosis de 10^4 UHA₅₀ resultó segura y eficaz en términos de protección, esta misma dosis resultó letal para los cerdos SPF, coincidiendo con resultados previos (King *et al.*, 2011) y bien podría serlo para animales convencionales con un estatus inmunológico comprometido. Aún más relevante es que el aumento de un logaritmo del inóculo provocara que el 50% de los animales acabaran sufriendo signos de PPA indistinguibles a los del virus homólogo virulento E75L del que proceden. Además, y aún más extraño, la inoculación de 10^2 UHA₅₀ (2 logaritmos por debajo de la dosis óptima) provocó la aparición de animales portadores de virus que a tiempos tardíos tras la infección sufrieron un brote agudo e inesperado de enfermedad; tal y como se ha descrito en ensayos de campo realizados con anterioridad y que hicieron descartar su uso en condiciones naturales (Manso Ribeiro, 1962). Independientemente de los cambios de secuencia implicados en la adquisición de

atenuación por parte de E75CV1 (secuenciación actualmente en marcha), todos estos datos demuestran a la perfección que la frontera entre enfermedad y protección está gobernada por un fino equilibrio inmunológico que ha de ser caracterizado al detalle si se quieren diseñar estrategias eficientes en el futuro frente a la PPA. Así pues, independientemente de su validez como vacuna de futuro, nuestro modelo de protección homóloga con el virus atenuado puede resultar de enorme utilidad.

La primera sorpresa que este modelo de protección presentó se refiere a la ausencia detectable de anticuerpos capaces de inhibir la infección *in vitro* en macrófagos tras la infección con el virus atenuado. Estos datos coinciden con resultados obtenidos por nuestros colegas de Pirbright; UK (Linda Dixon; comunicación personal) pero contrastan con muchos otros descritos en la literatura y que estamos lejos de poner en duda (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1986a). Una posible explicación a las diferencias observadas podría residir en el método de elección para medir el efecto de los anticuerpos *in vitro*, en su gran mayoría basado en un ensayo de reducción del número de placas virales en monocapas de líneas celulares. Si bien este método es perfectamente válido, su significado biológico se encuentra en discusión. La relevancia de los anticuerpos en protección y la polémica que estos suscitan en la comunidad científica ha sido fruto de una excelente revisión recientemente publicada y de recomendada lectura (Escribano *et al.*, 2012).

La segunda sorpresa que nos encontramos, fue la reducida capacidad protectora de E75CV1 frente a Ba71L, virus que por proximidad cronológica y geográfica podrían haber sido considerados como filogenéticamente indistinguibles. La comparación de las secuencias de E75L (PRJEA42377) y Ba71V (PRJNA15242) (Yanez *et al.*, 1995), versión apatógena del VPPA tras su pase seriado en células Vero, corroboran esta proximidad filogenética, mostrando como diferencias más reseñables aquellas ya descritas como implicadas en atenuación y que afectan principalmente a las familias multigénicas, así como a los extremos LTR (*long terminal repeats*) del genoma viral (Dixon *et al.*, 2012). La

secuenciación total del genoma del virus atenuado E75CV1 y del aislado virulento Ba71L está siendo abordada actualmente en nuestro laboratorio y en el de nuestra colaboradora, la Dra. M. L. Salas, lo que posibilitará completar totalmente la fotografía, identificando no sólo las regiones implicadas en la atenuación sino aquellas potencialmente responsables de la protección heteróloga.

Estudios previos realizados con otros modelos de virus atenuados, correlacionaban la protección homóloga con la presencia previa de linfocitos T capaces de secretar IFN γ *in vitro* en respuesta a la estimulación con dicho virus y la falta de protección, con la incapacidad de responder frente al virus heterólogo (King *et al.*, 2011). La ausencia de datos de estimulación cruzada *in vitro* usando E75L y Ba71L impiden confirmar esta hipótesis, aunque nuestros resultados de inmunización con E75CV1 confirman la potente respuesta celular específica generada tras la estimulación *in vitro* con E75L, detectable a día 28 pi, mediante un ELISPOT de IFN γ . La protección conferida frente a E75L parecía coincidir a su vez con la detección por ELISPOT de un elevadísimo número de células T-secretores de IFN γ , que desafortunadamente no fue posible cuantificar, impidiendo evaluar la existencia o no de un incremento (*boost*) de la respuesta específica respecto al momento del desafío. En cualquier caso, este efecto de re-estimulación de la respuesta específica *in vivo* sí parecía quedar patente al realizar el recuento de linfocitos T al final del ensayo. Contrariamente a lo descrito tras la vacunación con DNA, capaz de estimular únicamente una respuesta T-CD8 $^+$ y T-CD4 $^+$ CD8 $^+$, la vacunación con E75CV1 parecía estimular todas y cada una de las subpoblaciones de células T incluyendo no sólo los T-CD8 $^+$ y T-CD4 $^+$ CD8 $^+$ sino que además y sobre todo los T-CD4 $^+$, que partían de una posición privilegiada en cuanto a su número en el torrente circulatorio a la hora de afrontar el desafío con E75L. Estos resultados permiten atribuir a esta población celular un papel importante en la protección frente al VPPA, confirmando estudios previos (Takamatsu *et al.*, 2012). Una de las líneas prioritarias del grupo es la identificación de los antígenos y/o epítomos T-CD4 $^+$ y T-CD8 $^+$ implicados en la protección conferida por E75CV1, utilizando en este último caso la Ub-ELI_{completa} y los protocolos de detección que se están poniendo

a punto en el laboratorio, partiendo de los 200 clones identificados que mantienen la pauta de lectura con la ubiquitina. El hecho de que las células T-CD4⁺ jueguen papeles pleiotrópicos durante la respuesta inmune no permite aventurar el mecanismo por el cual ejerce su función aunque sin duda, bien podría contribuir al mantenimiento de la respuesta T-CD8⁺ y B de memoria. A este respecto, cabe destacar que la respuesta de anticuerpos específicos, detectada mediante ELISA no se vio aumentada como consecuencia de la reinfección con E75L, coincidiendo con resultados previamente descritos (Oura *et al.*, 2005) y, a su vez, concordaba con un bloqueo total de la proliferación *in vivo* de los linfocitos B (CD21⁺), llegando al final del ensayo con recuentos menores que los iniciales.

La puesta a punto del modelo de infección con el virus atenuado E75CV1, también permitió plantear un estudio comparativo de la inmunopatogenia provocada por dos virus homólogos que difieren en su grado de virulencia: E75L virulento y E75CV1 atenuado. Varias son las ventajas principales que presenta el diseño experimental aquí seguido respecto a lo actualmente descrito en la literatura especializada:

- i) A las ya clásicas descripciones comparativas entre virus virulentos y atenuados que reflejan cambios en la viremia, excreción viral, signos clínicos, hallazgos histopatológicos, etc., se le ha añadido la profunda caracterización de la cinética de inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa, tanto humoral como celular. Adicionalmente, la toma de muestras de tejido linfoide de forma seriada permitirá profundizar en los cambios observados tras la infección utilizando las técnicas más avanzadas de transcriptómica y proteómica.
- ii) A diferencia de otros estudios similares que han sido realizados con virus atenuados y virulentos de distinta procedencia y que ha dificultado sobremedida la interpretación de los resultados en el pasado (Gomez-Villamandos *et al.*, 1996; Oura *et al.*, 1998b; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997) en el presente trabajo se ha utilizado una misma dosis (10^4 UHA₅₀) de dos virus totalmente homólogos. El hecho de que la atenuación del virus E75CV1 haya consistido en la simple

- adaptación de E75L a la línea celular CV1 tras tres pases únicos en cultivo, garantiza la mínima deriva genética posible entre ambos virus. La secuenciación completa de E75CV1 (en curso) permitirá conocer las diferencias genéticas existentes respecto E75L, recientemente secuenciado (PRJEA42377) y confirmar o ampliar lo poco que se ha descrito sobre factores virales implicados en virulencia (Dixon *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2012).
- iii) La incorporación de un grupo experimental que consiste en cerdos recuperados de la infección con E75CV1 a día 31 pi, permitió no sólo completar la cinética seguida por el virus atenuado *in vivo* sino que además debería arrojar luz sobre los mecanismos intrínsecos implicados en la protección conferida por este modelo experimental, así como sobre los antígenos virales implicados en la misma.
 - iv) El sacrificio seriado de grupos de cerdos tras la infección con cada uno de los virus demostró ser un acierto al permitir no sólo evaluar el daño tisular provocado por el virus, sino además concentrar los estudios de transcriptómica y proteómica al linfonodo gastrohepático, el órgano linfoide diana por excelencia del VPPA.

La idoneidad del linfonodo gastrohepático para estos estudios parece venir avalada por ser el primer tejido en el que se detecta la presencia de antígenos virales tras la infección, incluso antes de detectar virus en suero o en excreciones. Además es uno de los órganos más afectado por la infección del VPPA y en el que mayores diferencias se encontraron en cuanto a lesiones macro y microscópicas comparando las dos infecciones. Estos datos concuerdan a la perfección con estudios anteriores en los que se aseguraba que el linfonodo gastrohepático es uno de los órganos colonizados tempranamente por el VPPA en infecciones *in vivo* y en el que las cepas virulentas y atenuadas difieren en el grado y el tipo de lesiones generadas (Oura *et al.*, 1998b; Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997; Salguero *et al.*, 2002). La utilización de este tejido permitió obtener muestras de calidad para su procesamiento y utilización en transcriptómica y

proteómica, estudios éstos últimos que no podrían ser realizados a partir de sangre total, debido principalmente a interferencias con proteínas presentes de forma masiva en los eritrocitos que distorsionarían los análisis.

Previo al análisis transcriptómico general que está siendo explorado actualmente, se realizó un esfuerzo por caracterizar la expresión diferencial de una batería de genes seleccionados por su implicación en procesos clave en la respuesta inmunitaria del porcino. Un análisis global de nuestros resultados de RRT-qPCR permitió confirmar a *grosso modo* que el virus atenuado E75CV1 es capaz, en igualdad de dosis, de estimular una respuesta inmune innata más eficientemente que el virus E75L virulento. La presencia selectiva de infiltrados de macrófagos (MAC387⁺) en el linfonodo gastrohepático de animales infectados con E75CV1 y la sobre-expresión de *CD163*, tan pronto como a día 1 pi, podría ayudar a explicar el complejo perfil de citoquinas inicialmente observado. A pesar del inicial equilibrio Th1/Th2 (*IFN γ /IL4*) que parece gobernar la respuesta en sus inicios, ésta parece derivar inmediatamente hacia una respuesta casi exclusiva de tipo Th1, quizás esencial para controlar la replicación del virus y condicionar la respuesta inmune adaptativa de futuro, como se ha demostrado para tantos otros patógenos (Piriou *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2001; Warfel and Merkel, 2012). Apoyando esta hipótesis, la sobre-expresión de los niveles del mRNA de *IFN γ* se vio mantenida a lo largo de la infección, incluso tras la eliminación del virus del torrente circulatorio (día 31 pi). Si bien la presencia de un número de células T-secretores de *IFN γ* específicas frente al virus se había correlacionado ya previamente con protección (Argilaguet *et al.*, 2011; Argilaguet *et al.*, 2012b; King *et al.*, 2011; Takamatsu *et al.*, 2012), estos datos podrían, a su vez, representar una primera evidencia de la relevancia que podría tener este tipo de respuesta como barrera inicial contra la infección. El desbalance de la respuesta de memoria provocada por la infección con E75CV1 (día 31 pi), hacia un perfil típicamente Th1, vendría a su vez reforzado por la clarísima inhibición que se observa para el gen *IL4*; firma por antonomasia de una respuesta Th2. De este modo, dichos resultados podrían ayudar a explicar el hecho de que tras la reinfección

con el virus E75L virulento, no existiera un aumento en el número de células B (CD21⁺) circulantes ni de anticuerpos específicos frente al VPPA mientras que se observa el efecto inverso para las células T.

La comparativamente reducida activación inicial de la respuesta inmune innata en respuesta a la infección con el VPPA, podría obedecer a la presencia de factores de virulencia en E75L, descrita previamente su implicación en diversas estrategias de evasión de la respuesta inmune (Dixon *et al.*, 2004), incluyendo genes relacionados con la inhibición de la activación linfocitaria (Borca *et al.*, 1998), la inhibición de IFN tipo I (Afonso *et al.*, 2004; Correia *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 1996) o la inhibición de los factores de transcripción NFκB (Powell *et al.*, 1996; Revilla *et al.*, 1998) o NFAT (Miskin *et al.*, 2000); activadores clave para la secreción de la mayoría de los factores solubles relacionados con la respuesta inflamatoria. Si bien algunos de estos genes han sido caracterizados y podrían ser responsables de las diferencias observadas *in vivo* entre E75L y E75CV1; el diferente grado de activación e inhibición del sistema inmune por parte de ambos virus podría obedecer a muchos otros factores aún por caracterizar (Gil *et al.*, 2003). En cualquier caso, la evasión del sistema inmune por parte de E75L encajaría no sólo con el perfil de mRNA que se observa a tiempos tempranos tras la infección, sino además con el hecho de que el virus replique mucho más eficientemente *in vivo* que E75CV1. Este último hecho permitió su detección en grandes cantidades a partir de día 3 pi, desembocando a tiempos más tardíos en una reversión total de la respuesta, caracterizada básicamente por la infiltración masiva de macrófagos, muchos de ellos infectados, la depleción linfocitaria y la típica “tormenta de citoquinas”, que se puede observar no sólo a nivel transcripcional, sino además a nivel de proteínas secretadas en el torrente circulatorio.

Merece la pena destacar, por novedoso, la peculiar regulación que parece sufrir durante la infección, el gen correspondiente a *CD163*; pudiendo resultar un útil marcador de virulencia para el VPPA. El hecho de que *CD163* viera inhibida su expresión a tiempos tempranos tras la infección con E75L, para a posteriori aumentar dramáticamente alcanzando el pico de expresión en fases terminales, tanto en lo que se refiere a los

niveles de mRNA en linfonodo como de CD163 soluble en suero, indica muy probablemente un papel dual durante la infección con cepas virulentas de VPPA. El hecho de que CD163 haya sido descrito como un potencial receptor para el VPPA (Sanchez-Torres *et al.*, 2003) podría ayudar a explicar la bajada inicial en los niveles de expresión de esta molécula, inhibición exacerbada a día 3 pi, de manera proporcional a la cantidad de virus presente en el órgano linfoide. El hecho de que esta inercia se viera invertida a día 7 pi, justo cuando más virus hay, podría no tener nada que ver con su función como marcador de superficie de macrófagos, sino que bien podría reflejar la sobre-expresión de sCD163, producto de la escisión del ectodominio del receptor CD163 (Droste *et al.*, 1999), que ha sido implicado en procesos inflamatorios (Onofre *et al.*, 2009); encajando así a la perfección con el resto de fenómenos descritos en las etapas terminales de fase aguda. Coincidiendo con esta hipótesis, CD163 de superficie no se vio aumentado en ningún momento tras la infección, al menos medido por citometría de flujo y utilizando PBMC. La imposibilidad de poder discernir a nivel de mRNA entre *CD163* y *sCD163* aconsejaría cuantificar los niveles de CD163 presentes en la superficie de los macrófagos a nivel de proteína en el linfonodo gastrohepático. Quizás ahondando en la relevancia que *CD163* parece jugar durante la infección, cabe destacar la cinética de expresión inversa que parece observarse para el caso de la infección con el virus atenuado E75CV1, con una tendencia hacia la sobre-expresión a día 1 pi y una clara inhibición de la misma a día 7 pi. Si bien el aumento en la expresión de *CD163* a día 1 pi podría relacionarse con la observación de infiltrados de macrófagos en el linfonodo, la inhibición a día 7 pi coincide con el pico máximo de virus y con la ausencia de CD163 en suero. Finalmente, cabe destacar la sorprendente subida en los niveles de expresión del mRNA de *CD163* a día 31 pi, pudiendo reflejar de nuevo la presencia de macrófagos en el linfonodo, que bien podrían jugar un papel clave en la protección temprana frente a la infección con el virus homólogo virulento. Si esto se confirmara, *CD163* podría ser utilizado como un marcador de protección, del mismo modo que ha sido recientemente propuesto como marcador favorable en pacientes con cáncer de pecho (Mansfield *et al.*, 2012).

Finalmente, cabe destacar que los linfonodos de los animales recuperados de la infección con E75CV1, son capaces de sobre-expresar junto con *CD163*, *IFN γ* y *NF κ B*, dos factores más: *IL23* y *TGF β R1*, curiosamente esenciales durante la diferenciación de las células T-CD4⁺ hacia un tercer fenotipo recientemente descrito, Th17 (Essakalli *et al.*, 2010). Curiosamente, las células Th17, inicialmente reconocidas como mediadoras de procesos crónicos de inflamación, se proponen ahora como una subpoblación de células T colaboradoras implicadas en protección *per se* o junto a células Th1 de memoria (Lindenstrom *et al.*, 2012), resultando una más que interesante subpoblación a estimular tras la vacunación. El perfil completo de *array* de transcriptómica y proteómica permitirá confirmar si la vacunación con el virus atenuado E75CV1 es capaz de provocar este tipo de respuesta de memoria.

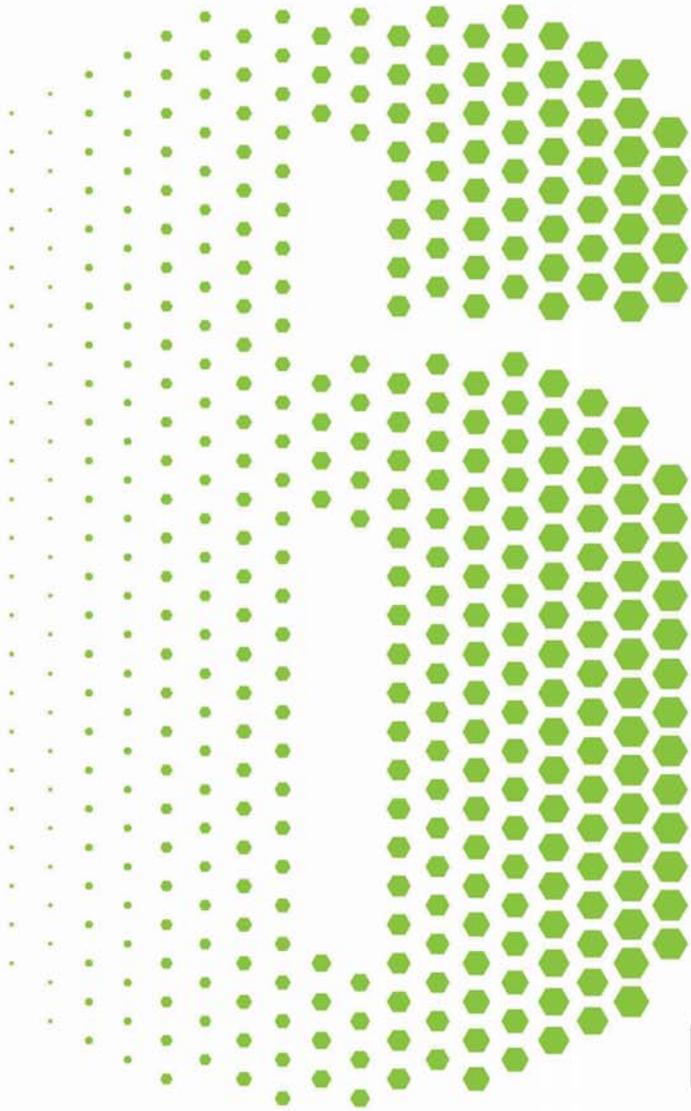
Uno de los resultados más valiosos para nuestra línea de investigación futura procede, curiosamente, de la discordancia observada en los resultados de expresión diferencial de genes entre el linfonodo gastrohepático y la sangre. Estos resultados confirman de una vez por todas que la sangre no es el tejido ideal para realizar este tipo de estudios, al menos en el caso de PPA, a pesar de la indiscutible ventaja que supone utilizar un mismo grupo de animales para estudiar la cinética de la infección y de la respuesta inducida. A las evidentes diferencias que existen intrínsecamente entre ambos tejidos, hay que añadir la necesidad del VPPA de infectar inicialmente macrófagos maduros, residentes únicamente en órganos sólidos, con lo que la sangre únicamente podría reflejar indirectamente lo que ocurre en los órganos diana, restando utilidad a su interpretación. Independientemente de las conclusiones que pudieran ser extraídas de nuestros estudios de RRT-qPCR y de los ELISA de citoquinas, siempre hemos sido conscientes de que estos datos reflejan únicamente una pequeña parte de la compleja realidad que ocurre en el animal tras la infección con el VPPA. De ahí que planteáramos una aproximación mucho más ambiciosa que consiste en un análisis transcriptómico y proteómico total, a lo largo del tiempo tras la infección con E75L o E75CV1.

A día de hoy nos encontramos analizando los datos de dos *array* de expresión diferencial: uno basado en el análisis de la expresión génica y el otro en la expresión proteica, que son totalmente complementarios, siendo el primer análisis de estas características realizado hasta el momento, en nuestro conocimiento, en PPA.

Lejos de pretender sacar conclusiones definitivas sobre la patogenia viral, un análisis somero de las PDE durante la infección con E75L o E75CV1 a día 3 pi, permitió:

- i) Confirmar que el número de PDE así como su nivel de afectación era inversamente proporcional a la presencia de virus en el tejido, quizá reflejando la inhibición de la transcripción celular descrita para el VPPA (Sanchez *et al.*, 2012a). Así, en la infección con la cepa E75L (virulenta) se identificaron 85 PDE, 29 de ellas sobre-expresadas y 56 sub-expresadas, mientras que en la infección con el E75CV1 (atenuado) se hallaron 94 PDE, 49 sobre-expresadas y 45 sub-expresadas. Interesante destacar que ninguna de las proteínas tenía un origen viral.
- ii) Correspondiendo con la patología típica de PPA aguda (Kleiboeker, 2002), las PDE, tras la infección con E75L, correspondían con factores implicados en procesos biológicos de coagulación sanguínea, respuesta al estrés, activación de plaquetas y apoptosis por Myc (ruta 14-3-3), mientras que las PDE en E75CV1 correspondían en gran medida con el procesamiento metabólico del RNA y procesamiento y presentación antigénica (subunidades del proteasoma o la disulfuro isomerasa); de nuevo encajando a la perfección con etapas iniciales claves para provocar una respuesta inmune de memoria protectora.
- iii) De entre las rutas de señalización más afectadas por ambos virus, cabe destacar dos de ellas: la ruta 14-3-3, implicada en el ciclo celular y la apoptosis, la respuesta al estrés, la señalización celular y la regulación transcripcional (Aoki *et al.*, 2000) y la ruta de la endocitosis mediada por clatrina; quizás demostrando la implicación de este mecanismo en la entrada del virus *in vivo*; contribuyendo a aclarar la controversia existente al respecto (Hernaiz and Alonso, 2010).

Un examen más en profundidad de estos datos y de los que actualmente están en fase de análisis, permitirá obtener una visión mucho más completa de los principales mecanismos que juegan un papel durante la patogenia viral y, a su vez, sobre los mecanismos implicados en protección. De este conocimiento, estamos seguros, dependerá el diseño racional de una vacuna segura y eficaz frente a la PPA.



CONCLUSIONES

"El cochino que mama y come, dos cuerpos pone"

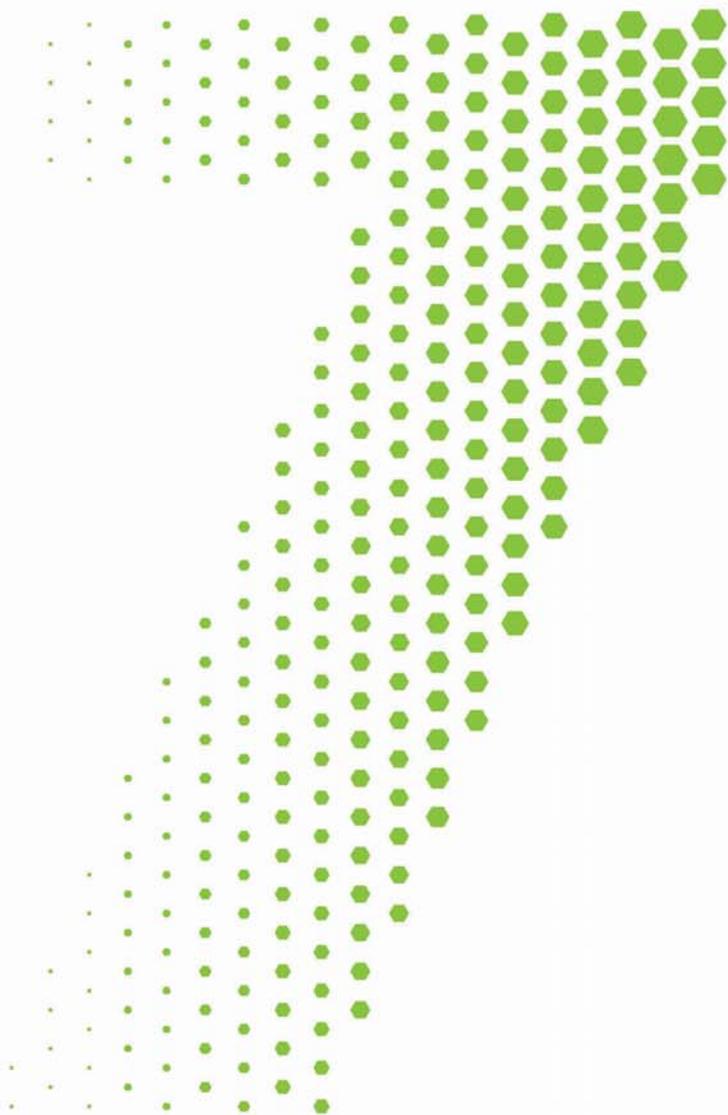
- 1) Por primera vez se han podido caracterizar dos epítomos T-CD8⁺ del VPPA con capacidad protectora. Ambos epítomos: F3 y A6; se localizan en la hemaglutinina del virus.
- 2) La inmunización de cerdos con Ub-ELI_{SD/SB} permite demostrar la existencia de nuevos antígenos virales con potencial protector. La protección conferida fue absolutamente dependiente de la presencia de ubiquitina como adyuvante genético y, consecuentemente, se produjo en ausencia de anticuerpos detectables en los animales vacunados.
- 3) La protección conferida por Ub-ELI_{SD/SB}, inicialmente compuesta por 380 plásmidos, fue equivalente a la conseguida tras la inmunización con 7 clones individuales, codificando fragmentos de las proteínas: pCP312R, pp220, pp60, pD339L, p10, proteína homóloga a Bcl2 y helicasa del VPPA; todos ellos fusionados a ubiquitina.
- 4) La co-inmunización mediante estos 7 clones junto con el plásmido pCMV-UbsHAPQ permite mejorar los niveles de protección conseguidos con este último.
- 5) La inmunización con Ub-ELI_{completa} protege al 60% de los cerdos convencionales frente a la infección letal con un aislado heterólogo del VPPA y en ausencia de anticuerpos detectables antes de la infección. Dicha protección correlaciona con el número de linfocitos T-CD8⁺ y T-CD4⁺CD8⁺ presentes en circulación a día 21 pi en los animales supervivientes. El empleo de cerdos SPF permite además demostrar que la mitad de los animales protegidos lo están, por primera vez en el caso de la vacunación con DNA, de una forma total, no pudiéndose detectar viremia ni excreción viral en ningún momento tras la infección.

- 6) La dosis de 10^4 UHA₅₀ del aislado atenuado E75CV1 es óptima para la inmunización de cerdos convencionales, pero resulta letal en cerdos SPF. Asimismo, la inmunización de cerdos convencionales con E75CV1 genera una respuesta inmune protectora frente al virus homólogo virulento (E75L), pero no es capaz de conferir una protección sólida frente al virus Ba71L; lo que permite clasificarlo como heterólogo.

- 7) La protección mediada por el virus atenuado E75CV1 correlaciona con la expansión en sangre de linfocitos T tras la infección con el virus homólogo virulento E75L y es detectable a día 10 pi. A diferencia de nuestras vacunas DNA, la proliferación en esta ocasión no sólo afecta a los linfocitos T-CD8⁺, sino también a los T-CD4⁺. (T-CD4⁺ y T-CD4⁺CD8⁺) Cabe destacar que, a pesar de la evidente presencia de anticuerpos específicos frente al virus tras la inmunización con E75CV1, no se ha podido demostrar su capacidad neutralizante. Además, tras la infección con E75L, no aumentó el número de células B en circulación ni el título de dichos anticuerpos específicos.

- 8) Los virus homólogos E75CV1 (atenuado) y E75L (virulento) son capaces de modular la respuesta del sistema inmune tanto innata como adaptativa desde etapas iniciales de la infección, incluso antes de que el virus sea detectable de forma masiva. Así, la cepa E75L es capaz de evadir en gran medida la respuesta innata, facilitándose la replicación viral y diseminación del virus y, en las últimas etapas de la enfermedad, la liberación masiva de mediadores inmunológicos que contribuyen a la patogenia de la PPA. En claro contraste, en etapas tempranas de la infección, el virus homólogo E75CV1, es reconocido por el sistema inmune innato, disparando una cascada de señales de transducción que modulan la respuesta inmune adaptativa hacia una respuesta Th1.

- 9) Los datos preliminares de proteómica comparada realizados en linfonodo gastrohepático obtenido a día 3 pi permiten confirmar una marcada alteración de las rutas de presentación antigénica, específicamente en los animales infectados con E75CV1, datos que encajan a la perfección con las conclusiones extraídas hasta el momento.



ANEXOS

"La vida del puerco, corta y gorda"

Tabla anexo I. PDE identificadas mediante espectrofotometría de masas.

MALDI-TOF/TOF							Virulento - Control		Atenuado - Control	
N° Acceso Uniprot - Gen	Proteína	P,I Teorico-experimental	MS Teorica-experimental	Score	N° Peptidos	Cobertura de secuencia (%)	Valor P	Tasa de cambio	Valor P	Tasa de cambio
Q96FU6 - ACTG1	ACTG1 protein	5,24-5,81	18,72-23,19	347	11	76	0,0008	-7,9	0,0115	-12,8
Q6QAA1 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,56-5,73	41,32-25,39	149	8	38	0,0000	-15,9	*	*
P63261 - ACTG	Actin, cytoplasmic 2	5,31-5,60	42,10-25,07	182	7	29	0,0029	-2,3	*	*
P63261 - ACTG	Actin, cytoplasmic 2	5,56-5,67	41,33-21,65	242	12	39	0,0000	-25,5	0,0000	-10,4
B1ATY0 - ACTG1	Actin, gamma, cytoplasmic 1	5,15-5,82	32,94-23,00	128	8	38	0,0360	Ausente	0,0418	-13,8
B1ATY0 - ACTG1	Actin, gamma, cytoplasmic 1	5,49-5,72	37,66-22,65	230	9	34	0,0009	-7,3	0,0224	-19,1
A1E281 - ACTB	Beta-actin	5,93-5,37	13,58-20,14	361	7	72	*	*	0,0119	-23,4
A1E281 - ACTB	Beta-actin	5,93-5,55	13,58-19,15	177	7	66	0,0060	-7,9	0,0062	-6,0
O15144 - ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	8,2-7,32	33,98-36,18	167	14	45	0,0036	8,7	0,0017	13,1
P80276 - AKR1B1	Aldose reductase	5,65-6,74	36,09-40,49	631	14	59	0,0016	-2,0	*	*
P06733 - ENO1	Alpha-enolase ponerla en la E	7,01-6,97	47,48-56,21	508	20	46	0,0046	2,1	0,0000	3,0
P08758 - ANXA5	Annexin A5	4,94-5,26	35,84-35,71	833	20	59	0,0034	3,2	0,0002	4,3
P01009 - SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	5,54-5,44	47,44-69,36	72	5	11	0,0029	4,2	0,0172	4,9
Q0QEN7 - ATP5B	ATP synthase subunit beta	4,99-5,34	47,05-54,39	717	19	58	0,0000	8,6	0,0121	10,7
P00918 - CA2	Carbonic anhydrase 2	6,497,39	29,29-33,13	82	7	35	0,0112	1,9	*	*
O00299 - CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	5,18-5,61	27,34-34,40	590	15	62	0,0015	2,2	0,0000	4,0
P12109 - COL6A1	Collagen alpha-1 (IV) chain	5,27-5,37	110,86-152,39	144	9	11	*	*	0,0204	2,9
P12109 - COL6A1	Collagen alpha-1 (IV) chain	5,24-5,41	109,74-151,30	397	21	22	*	*	0,0057	3,2
Q8HXL4 - TBCB	Cytoskeleton-associated protein 1	5,23-5,6	27,72-35,91	121	6	30	0,0116	2,2	0,0128	2,1
P14625 - HSP90AB1	Endoplasmic	4,75-5,02	92,74-105,47	733	32	41	0,0289	3,1	*	*
P63241 - EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	5,0-5,51	18,39-20,54	444	8	39	0,0027	-2,6	0,0063	-2,2
Q9HC38 - GLOD4	Glyoxalase domain-containing protein 4	5,19-5,59	33,50-37,35	190	12	24	*	*	0,0263	1,8
P04899 - GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	5,35-5,65	41,00-42,02	503	18	52	*	*	0,0122	5,4
O14979 - HNRPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	8,81-7,36	30,36-40,28	154	7	21	0,0343	2,6	0,0004	4,1
Q6MZU6 - IGHM	IgG heavy chain	6,82-7,73	52,95-61,14	420	10	25	*	*	0,0247	6,1
P56471 - IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	6,72-6,6	40,06-42,00	333	18	50	0,0003	4,0	0,0004	4,6
P30740 - SERPINB1	Leukocyte elastase inhibitor	6,13-6,90	42,65-43,60	581	21	57	*	*	0,0057	2,9
P40121 - CAPG	Macrophage-capping protein	6,04-6,87	39,08-44,49	423	11	26	*	*	0,0268	1,8
Q2XVP5 - MAPRE1	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member1	5,19-5,65	30,14-35,20	248	8	44	*	*	0,0440	1,9

* Proteína que no presento cambio diferencial es ese tratamiento.

MALDI-TOF/TOF							Virulento - Control		Atenuado - Control	
N° Acceso Uniprot - Gen	Proteína	P, I Teorico-experimental	MS Teorica-experimental	Score	N° Peptidos	Cobertura de secuencia (%)	Valor P	Tasa de cambio	Valor P	Tasa de cambio
P54920 - NAPA	Alpha-soluble NSF attachment protein	5,23-5,56	33,66-36,35	438	17	65	0,0014	2,6	0,0021	5,2
P04181 - OAT	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	6,44-6,76	48,78-51,64	211	19	48	0,0327	-2,0	*	*
B1ALA9 - PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	7,62-7,53	24,46-38,62	76	8	37	*	*	0,0003	5,6
Q64L94 - PSME1	Proteasome activator complex subunit1	5,78-6,3	28,77-32,97	735	21	63	0,0002	2,7	0,0006	2,4
Q863Z0 - PSME2	Proteasome activator complex subunit 2	5,41-6,04	27,44-34,19	659	18	71	0,0009	2,4	0,0006	2,8
A8MV37 - SEC13	Protein SEC13 homolog	5,15-5,48	35,99-40,12	420	8	33	0,0015	2,2	0,0012	2,4
Q4GWZ2 - RPSA	Protein 40kD	4,8-5,07	32,84-44,01	588	13	61	*	*	0,0327	-2,8
P50395 - GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	6,31-6,45	50,74-53,26	311	18	49	0,0108	16,3	0,0077	12,4
P13489 - RNH1	Ribonuclease inhibitor	4,76-5,07	50,70-51,63	333	19	64	0,0162	-5,7	*	*
F1SG10 - PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	6-7,09	35,17-38,95	541	15	52	0,0091	-4,9	*	*
O43396 - TXNL1	Thioredoxin-like protein 1	4,89-5,29	33,13-38,12	118	9	45	0,0393	1,9	*	*
O89052 - TUBA1B	Alpha-tubulin	4,85-5,6	11,05-19,26	152	5	60	0,0001	-11,9	0,0008	-34,8
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-5,38	69,69-24,62	147	9	18	0,0000	-12,7	0,0000	-24,3
P08835 - ALB	Serum albumin	5,92-5,53	71,34-19,80	608	16	28	0,0150	-9,4	0,0166	-12,4
P02768 - ALB	Serum albumin	5,92-6,22	71,34-43,98	491	18	37	0,0020	-3,6	0,0087	-2,2
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,46	71,64-20,87	95	5	11	*	*	0,0011	2,3
P02768 - ALB	Serum albumin	5,92-6,39	71,36-47,35	829	30	41	*	*	0,0061	2,4
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,05	71,64-21,16	563	17	22	0,0006	-4,1	0,0010	-3,0
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,11	69,69-21,81	484	15	22	0,0001	-7,6	0,0000	-4,7
F1RUN2 - ALB	Serum albumin	5,98-7,1	69,67-21,20	611	18	22	0,0000	-4,4	0,0046	-5,4
P02768 - ALB	Serum albumin	5,92-6,91	71,36-78,16	820	27	49	*	*	0,0112	2,7
Q9GJT2 - ESD	S-formylglutathione hydrolase	6,54-6,16	31,97-31,39	331	9	48	0,0066	2,0	0,0019	2,5
Q9NOY9 - TMOD3	Ubiquitous tropomodulin U-Tmod	4,98-5,41	39,72-43,57	86	4	21	0,0051	-10,5	*	*
P08670 - VIM	Vimentin	5,06-5,05	53,67-45,75	737	26	61	0,0307	-2,1	0,0140	-2,3
P31946 - YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	7,66-6,22	24,71-23,76	248	16	63	0,0000	-11,1	0,0000	-8,9
P62258 - YWHAE	14-3-3 protein epsilon	5,73-5,49	21,00-25,32	96	3	26	0,0337	-2,0	*	*
P61981 - YWHAG	14-3-3 protein gamma	4,8-6,17	28,32-25,09	131	12	47	0,0190	-19,8	0,0210	-17,3
P63104 - YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	4,97-5,94	29,41-24,04	172	14	46	0,0000	-7,3	0,0001	-16,5
P11021 - HSPA5	78 kDa glucose regulated protein	5,68-5,26	73,93-82,53	1100	28	46	0,0072	2,6	*	*

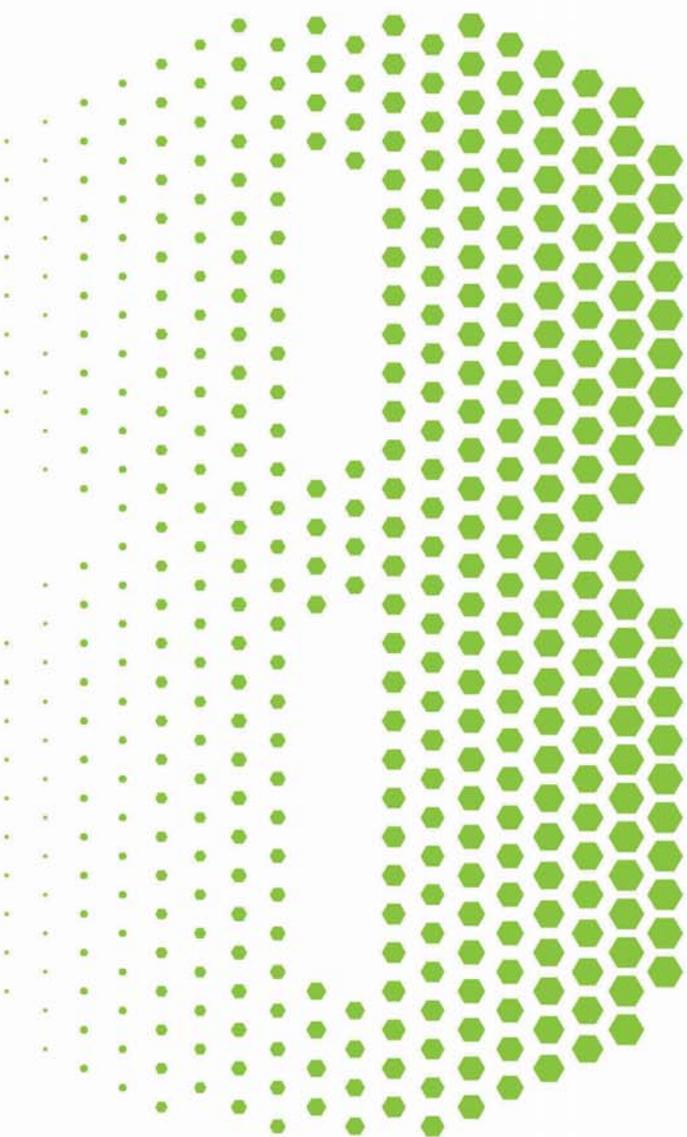
* Proteína que no presento cambio diferencial es ese tratamiento.

TRAMPA IONICA							Virulento - Control		Atenuado - Control	
N° Acceso Uniprot - Gen	Proteína	P,I Teorico-experimental	MS Teorica-experimental	Score	N° Peptidos	Cobertura de secuencia (%)	Valor P	Tasa de cambio	Valor P	Tasa de cambio
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,65	40,44-31,73	99,7	15	29	0,0003	-28,2	0,0000	-8,2
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,62	40,44-31,04	69,1	16	21	0,0108	-15,5	0,0104	-18,1
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,60	40,44-30,76	86,6	14	27	0,0062	-4,1	0,0005	-3,2
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,83	40,44-26,22	95,7	11	24	0,0010	-14,3	0,0130	-24,5
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,91	40,44-31,21	162,2	34	39	0,0000	-4,1	0,0000	-3,4
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,92	40,44-31,51	164,8	27	39	0,0043	-13,2	0,0013	-1,4
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,97	40,44-33,08	198,8	31	42	0,0001	-10,4	0,0001	-6,4
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,82	40,44-26,86	73,1	12	29	0,0082	-35,6	0,0080	-22,0
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-5,72	40,44-34,93	129,3	21	33	0,0020	-6,3	0,0055	-4,3
P84856 - ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,55-6,16	40,44-29,25	74,9	8	22	0,0005	-5,3	0,0009	-3,8
P32262 - SERPINC1	Antithrombin-III	6,44-5,59	52,49-64,68	69,5	7	16	0,0002	3,3	*	*
P00829 - ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,15-6,23	56,28-30,82	135,1	20	29	*	*	0,0043	-11,2
Q2HU57 - COTL1	Coactosin-like protein	5,10-5,31	16,01-19,24	63,4	9	36	0,0160	-4,6	0,0199	-4,6
O19062 - CRP	C-reactive protein	5,75-6,08	24,92-29,7	41,8	4	19	0,0001	2,6	0,0080	2,2
P13929 - ENO3	Beta-enolase	7,58-5,83	46,93-31,69	28,5	3	9	0,0106	-2,9	*	*
Q5R507 - CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	5,69-6,17	30,62-35,52	65,1	9	25	0,0006	2,0	0,0010	2,4
P19133 - FTL	Ferritin light chain	5,80-6,48	8,78-25,61	18,7	2	32	0,0001	11,6	0,0306	3,0
Q8MJ14 - GPX1	Glutathione peroxidase 1	6,73-6,7	22,44-29,75	49,6	4	22	*	*	0,0013	5,1
P11142 - HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,37-5,75	70,89-77,88	99,7	10	27	*	*	0,0052	8,4
Q8VHV7 - HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5,7-7,09	49,18-30,29	17,3	2	6	*	*	0,0135	2,6
P20700 - LMNB1	Lamin-B1	5,11-5,37	66,40-25,59	79,1	8	14	0,0004	6,3	0,0103	8,5
P00336 - LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	5,57-6,10	36,61-40,28	49,9	6	18	*	*	0,0004	2,1
P00336 - LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	5,57-6,09	36,61-39,72	91,4	13	33	*	*	0,0007	4,6
P52552 - PRDX2	Peroxiredoxin-2	4,66-5,30	14,16-27,76	57,4	6	11	0,0000	3,6	0,0000	4,5
P60900 - PSMA6	Proteasome subunit alpha type-6	6,34-7,08	27,39-31,94	44,9	5	26	0,0004	5,1	0,0000	4,3
P28070 - PSMB4	Proteasome subunit beta type-4	5,7-6,19	29,20-30,2	21,3	2	11	0,0000	3,2	0,0026	4,0
P30101 - PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	5,98-6,37	56,78-63,73	183,7	20	38	*	*	0,0005	2,8
Q5E946 - PARK7	Protein DJ-1	6,84-6,74	20,03-29,03	64,6	9	42	0,0060	2,6	0,0000	3,2
Q5E946 - PARK7	Protein DJ-1	6,84-7,09	20,03-29,63	105,4	17	46	*	*	0,0329	2,9
P59190 - RAB1D	Ras-related protein Rab-15	5,53-5,72	24,39-27,58	21,4	2	11	*	*	0,0025	2,3

* Proteína que no presento cambio diferencial es ese tratamiento.

TRAMPA IONICA							Virulento - Control		Atenuado - Control	
N° Acceso Uniprot - Gen	Proteína	P,I Teorico-experimental	MS Teorica-experimental	Score	N° Peptidos	Cobertura de secuencia (%)	Valor P	Tasa de cambio	Valor P	Tasa de cambio
P19803 - ARHGDI A	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	5,1-5,45	23,42-30,96	69,6	11	29	*	*	0,0003	2,5
P35705 - PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	7,15-6,46	28,19-29,95	66,3	6	29	*	*	0,0002	1,6
Q29371 - TPIS	Triosephosphate isomerase	7,01-7,59	26,72-30,85	84	10	43	*	*	0,0037	3,1
P82979 - SARNP	SAP domain-containing ribonucleoprotein	6,10-6,86	23,67-35,85	23,6	2	10	0,0269	-3,3	*	*
P09571 - TF	Serotransferrin	6,93-6,26	76,96-68,16	36,2	4	6	*	*	0,0127	1,6
P09571 - TF	Serotransferrin	6,93-7,48	76,96-28,3	20,8	2	3	0,0018	Ausente	0,0015	-4,9
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-5,57	69,69-29,7	34,3	6	6	0,0000	-6,2	0,0000	-3,6
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-5,99	69,69-31,04	126,6	18	18	0,0004	-2,6	0,0066	-2,7
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-5,71	69,69-29,95	60,1	7	8	0,0005	-3,1	0,0003	-3,1
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,27	69,69-31,27	133,8	19	20	0,0079	-8,8	0,0045	-6,8
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,05	69,69-43,08	194,5	25	26	0,0000	-3,0	0,0000	-2,4
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,08	69,69-43,63	155,3	19	18	0,0009	-2,5	0,0005	-2,8
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,41	69,69-37,07	79,7	9	11	0,0010	-4,1	0,0072	-3,2
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,39	69,69-44,05	106	12	18	0,0000	-3,3	*	*
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,58	69,69-77,48	253,2	28	37	*	*	0,0005	3,0
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,44	69,69-76,77	368,5	52	46	0,0000	6,8	*	*
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,65	69,69-31,05	52,3	5	7	0,0000	-2,5	*	*
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-6,87	69,69-34,38	78,7	9	11	0,0118	-8,1	0,0132	-5,3
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,15	69,69-32,87	21,7	2	3	0,0325	-4,5	*	*
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,20	69,69-33,50	149,1	20	21	0,0039	-11,5	*	*
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,38	69,69-34,37	111,6	11	14	0,0029	-4,4	0,0188	-5,2
P08835 - ALB	Serum albumin	6,08-7,42	69,69-35,04	47,2	6	6	0,0216	-12,7	*	*
Q6P069 - SRI	Sorcin	5,32-5,43	21,62-25,70	53,7	8	36	*	*	0	3,6
P07437 - TUBB	Tubulin beta chain	4,78-5,50	49,67-38,14	75,9	8	21	0,0008	-3,5	0,0012	-2,5
P61085 - UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	5,33-5,61	22,40-28,65	81,2	8	43	0,0002	-2,4	0,0057	-2,8
Q9MYP6 - ACT3	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14	6,19-6,22	28,42-33,33	23,8	2	7	0,0062	-9,8	0,0070	-5,9

* Proteína que no presenta cambio diferencial en ese tratamiento.



BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, C. L., Neilan, J. G., Kutish, G. F. and Rock, D. L. (1996). An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol*, **70**, 4858-4863.
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. A., Gibb, T. R., Bean, T. J., Zsak, L. and Rock, D. L. (2004). African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol*, **78**, 1858-1864.
- Aguero, M., Fernandez, J., Romero, L., Sanchez Mascaraque, C., Arias, M. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (2003). Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J Clin Microbiol*, **41**, 4431-4434.
- Aguero, M., Fernandez, J., Romero, L. J., Zamora, M. J., Sanchez, C., Belak, S., Arias, M. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (2004). A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet Res*, **35**, 551-563.
- Alcami, A., Carrascosa, A. L. and Vinuela, E. (1989). Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology*, **168**, 393-398.
- Alejo, A., Andres, G. and Salas, M. L. (2003). African Swine Fever virus proteinase is essential for core maturation and infectivity. *J Virol*, **77**, 5571-5577.
- Almazan, F., Rodriguez, J. M., Andres, G., Perez, R., Vinuela, E. and Rodriguez, J. F. (1992). Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J Virol*, **66**, 6655-6667.
- Almazan, F., Rodriguez, J. M., Angulo, A., Vinuela, E. and Rodriguez, J. F. (1993). Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J Virol*, **67**, 553-556.
- Almeida, J. D., Waterson, A. P. and Plowright, W. (1967). The morphological characteristics of African swine fever virus and its resemblance to tipula iridescent virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, **20**, 392-396.
- Almendral, J. M., Almazan, F., Blasco, R. and Vinuela, E. (1990). Multigene families in African swine fever virus: family 110. *J Virol*, **64**, 2064-2072.
- Alonso, F., Dominguez, J., Vinuela, E. and Revilla, Y. (1997). African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus Res*, **49**, 123-130.

- Anderson, E. C., Hutchings, G. H., Mukarati, N. and Wilkinson, P. J. (1998). African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol*, **62**, 1-15.
- Andres, G., Alejo, A., Salas, J. and Salas, M. L. (2002a). African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol*, **76**, 12473-12482.
- Andres, G., Alejo, A., Simon-Mateo, C. and Salas, M. L. (2001a). African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *J Biol Chem*, **276**, 780-787.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Salas, M. L. and Rodriguez, J. M. (2002b). Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. *J Virol*, **76**, 2654-2666.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Vinuela, E., Salas, M. L. and Rodriguez, J. M. (2001b). African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol*, **75**, 6758-6768.
- Andres, G., Simon-Mateo, C. and Vinuela, E. (1997). Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol*, **71**, 2331-2341.
- Angulo, A., Alcami, A. and Vinuela, E. (1993). Virus-host interactions in African swine fever: the attachment to cellular receptors. *Arch Virol Suppl*, **7**, 169-183.
- Aoki, H., Hayashi, J., Moriyama, M., Arakawa, Y. and Hino, O. (2000). Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol*, **74**, 1736-1741.
- Argilaguuet, J. M. (2009). Desarrollo de nuevas estrategias vacunales frente a la peste porcina africana. Tesis Doctoral. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Argilaguuet, J. M., Perez-Martin, E., Gallardo, C., Salguero, F. J., Borrego, B., Lacasta, A., Accensi, F., Diaz, I., Nofrarias, M., Pujols, J., Blanco, E., Perez-Filgueira, M., Escribano, J. M. and Rodriguez, F. (2011). Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*, **29**, 5379-5385.
- Argilaguuet, J. M., Perez-Martin, E., Lopez-Soria, S., Escribano, J. M., Giesow, K., Keil, G. and Fernando, R. (2012a). BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African Swine Fever Virus. *Antiviral Res*, **In press**.
- Argilaguuet, J. M., Perez-Martin, E., Nofrarias, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., Lopez-Soria, S., Escribano, J. M., Reche, P. A. and Rodriguez, F. (2012b). DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies. *PLoS One*, **7**, e40942.

- Babiuk, L. A., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B. and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2003). Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, **21**, 649-658.
- Bachmann, M. F., Kundig, T. M., Freer, G., Li, Y., Kang, C. Y., Bishop, D. H., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1994). Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur J Immunol*, **24**, 2228-2236.
- Ballester, M., Rodriguez-Carino, C., Perez, M., Gallardo, C., Rodriguez, J. M., Salas, M. L. and Rodriguez, F. (2011). Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection. *J Virol*, **85**, 8263-8269.
- Banks, H. T., Sutton, K. L., Thompson, W. C., Bocharov, G., Doumic, M., Schenkel, T., Argilaguet, J., Giest, S., Peligero, C. and Meyerhans, A. (2011). A new model for the estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. *J Immunol Methods*, **373**, 143-160.
- Barderas, M. G., Rodriguez, F., Gomez-Puertas, P., Aviles, M., Beitia, F., Alonso, C. and Escribano, J. M. (2001). Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol*, **146**, 1681-1691.
- Barry, M. A., Howell, D. P., Andersson, H. A., Chen, J. L. and Singh, R. A. (2004). Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol Rev*, **199**, 68-83.
- Barry, M. A., Lai, W. C. and Johnston, S. A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature*, **377**, 632-635.
- Basta, S., Gerber, H., Schaub, A., Summerfield, A. and McCullough, K. C. (2010). Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages. *Vet Microbiol*, **140**, 9-17.
- Basto, A. P., Nix, R. J., Boinas, F., Mendes, S., Silva, M. J., Cartaxeiro, C., Portugal, R. S., Leitao, A., Dixon, L. K. and Martins, C. (2006). Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *J Gen Virol*, **87**, 1863-1871.
- Bastos, A. D., Penrith, M. L., Cruciere, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. and G, R. T. (2003). Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol*, **148**, 693-706.
- Beltran-Alcrudo, D., Lubroth, J., Depner, K. and De, S. (2008). African swine fever virus in the Caucasus. *EMPRES watch FAO, Rome*.
- Blasco, R., de la Vega, I., Almazan, F., Aguero, M. and Vinuela, E. (1989). Genetic variation of African swine fever virus: variable regions near the ends of the viral DNA. *Virology*, **173**, 251-257.

- Boinas, F. S., Wilson, A. J., Hutchings, G. H., Martins, C. and Dixon, L. J. (2011). The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One*, **6**, e20383.
- Bool, P. H., Ordas, A. and Sanchez Botija, C. (1969). El diagnostico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). *Bull. OIE.*, 819-839.
- Borca, M. V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Burrage, T. G. and Rock, D. L. (1998). Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol*, **72**, 2881-2889.
- Borca, M. V., Irusta, P., Carrillo, C., Afonso, C. L., Burrage, T. and Rock, D. L. (1994a). African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology*, **201**, 413-418.
- Borca, M. V., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Irusta, P., Carrillo, C., Brun, A., Sussman, M. and Rock, D. L. (1994b). An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology*, **199**, 463-468.
- Borrego, B., Argilagué, J. M., Pérez-Martin, E., Domínguez, J., Pérez-Filgueira, M., Escribano, J. M., Sobrino, F. and Rodríguez, F. (2011). A DNA vaccine encoding foot-and-mouth disease virus B and T-cell epitopes targeted to class II swine leukocyte antigens protects pigs against viral challenge. *Antiviral Res*, **92**, 359-363.
- Boshoff, C. I., Bastos, A. D., Gerber, L. J. and Vosloo, W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999). *Vet Microbiol*, **121**, 45-55.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Breese, S. S., Jr. and DeBoer, C. J. (1966). Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, **28**, 420-428.
- Brookes, S. M., Dixon, L. K. and Parkhouse, R. M. (1996). Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology*, **224**, 84-92.
- Brookes, S. M., Hyatt, A. D., Wise, T. and Parkhouse, R. M. (1998). Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during African swine fever

- virus particle assembly: ultrastructural in situ hybridisation and DNase-gold labelling. *Virology*, **249**, 175-188.
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M. and Alonso, C. (1996). African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology*, **225**, 227-230.
- Bullido, R., Domenech, N., Alvarez, B., Alonso, F., Babin, M., Ezquerro, A., Ortuno, E. and Dominguez, J. (1997). Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev Comp Immunol*, **21**, 311-322.
- Canals, A., Alonso, F., Tomillo, J. and Dominguez, J. (1992). Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated African swine fever viruses. *Vet Microbiol*, **33**, 117-127.
- Carpintero, R., Alonso, C., Pineiro, M., Iturralde, M., Andres, M., Le Potier, M. F., Madec, F., Alava, M. A., Pineiro, A. and Lampreave, F. (2007). Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Vet Res*, **38**, 741-753.
- Carrasco, L., Bautista, M. J., Gomez-Villamandos, J. C., Martin de las Mulas, J., Chacon, M. d. L. F., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1997). Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. *Vet Res*, **28**, 93-99.
- Carrasco, L., de Lara, F. C., Martin de las Mulas, J., Gomez-Villamandos, J. C., Perez, J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1996a). Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J Comp Pathol*, **115**, 415-428.
- Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Martin de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1996b). In vivo replication of African swine fever virus (Malawi '83) in neutrophils. *Vet Res*, **27**, 55-62.
- Carrasco, L., Nunez, A., Salguero, F. J., Diaz San Segundo, F., Sanchez-Cordon, P., Gomez-Villamandos, J. C. and Sierra, M. A. (2002). African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. *J Comp Pathol*, **126**, 194-201.
- Carrascosa, J. L., Carazo, J. M., Carrascosa, A. L., Garcia, N., Santisteban, A. and Vinuela, E. (1984). General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, **132**, 160-172.

- Carrillo, C., Borca, M. V., Afonso, C. L., Onisk, D. V. and Rock, D. L. (1994). Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J Virol*, **68**, 580-583.
- CCAC, C. C. o. A. C. (1993). Guide to the care and use of experimental animals. http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf. CCAC.
- Clapperton, M., Diack, A. B., Matika, O., Glass, E. J., Gladney, C. D., Mellencamp, M. A., Hoste, A. and Bishop, S. C. (2009). Traits associated with innate and adaptive immunity in pigs: heritability and associations with performance under different health status conditions. *Genet Sel Evol*, **41**, 54.
- Cobbold, C. and Wileman, T. (1998). The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. *J Virol*, **72**, 5215-5223.
- Cobbold, C., Windsor, M. and Wileman, T. (2001). A virally encoded chaperone specialized for folding of the major capsid protein of African swine fever virus. *J Virol*, **75**, 7221-7229.
- Colgrove, G. S., Haelterman, E. O. and Coggins, L. (1969). Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am J Vet Res*, **30**, 1343-1359.
- Correia, S., Ventura, S. and Parkhouse, R. M. (2012). Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV. *Virus Res*.
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D. U. and Dixon, L. K. (2009). African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**, 2683-2696.
- Crosby, K., Yatko, C., Dersimonian, H., Pan, L. and Edge, A. S. (2004). A novel monoclonal antibody inhibits the immune response of human cells against porcine cells: identification of a porcine antigen homologous to CD58. *Transplantation*, **77**, 1288-1294.
- Cuesta-Geijo, M. A., Galindo, I., Hernaez, B., Quetglas, J. I., Dalmau-Mena, I. and Alonso, C. (2012). Endosomal Maturation, Rab7 GTPase and Phosphoinositides in African Swine Fever Virus Entry. *PLoS One*, **7**, e48853.
- Chacon, M. R., Almazan, F., Nogal, M. L., Vinuela, E. and Rodriguez, J. F. (1995). The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology*, **214**, 670-674.

- Chapman, D. A., Darby, A. C., Da Silva, M., Upton, C., Radford, A. D. and Dixon, L. K. (2011). Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg Infect Dis*, **17**, 599-605.
- Chapman, D. A., Tcherepanov, V., Upton, C. and Dixon, L. K. (2008). Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol*, **89**, 397-408.
- Childerstone, A., Takamatsu, H., Yang, H., Denyer, M. and Parkhouse, R. M. (1998). Modulation of T cell and monocyte function in the spleen following infection of pigs with African swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, **62**, 281-296.
- Chung, S., Kim, J. E., Park, S., Han, K. S. and Kim, H. K. (2011). Neutrophil and monocyte activation markers have prognostic impact in disseminated intravascular coagulation: in vitro effect of thrombin on monocyte CD163 shedding. *Thromb Res*, **127**, 450-456.
- De Boer, C. J., Hess, W. R. and Dardiri, A. H. (1969). Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from African swine fever. *Arch Gesamte Virusforsch*, **27**, 44-54.
- De Boer, C. J., Pan, I. C. and Hess, W. R. (1972). Immunology of African swine fever. *J Am Vet Med Assoc*, **160**, 528-532.
- De Tray, D. E. (1957). African swine fever in wart hogs (*Phacochoerus aethiopicus*). *Jour Amer Vet Med Assoc*, **130**, 537-540.
- de Villiers, E. P., Gallardo, C., Arias, M., da Silva, M., Upton, C., Martin, R. and Bishop, R. P. (2010). Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, **400**, 128-136.
- Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M., Zuber, B. and Takamatsu, H. H. (2006). Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol*, **110**, 279-292.
- Diaz, I. and Mateu, E. (2005). Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, **106**, 107-112.
- Diez-Rivero, C. M., Chenlo, B., Zuluaga, P. and Reche, P. A. (2010). Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine. *Proteins*, **78**, 63-72.
- Dimmock, N. J. (1993). Neutralization of animal viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, **183**, 1-149.

- Dixon, L., Costa, J. V., Escribano, J. M., Rock, D. L., Viñuela, E. and Wilkinson, P. J. (2000). Asfarviridae. *IN: Regenmortel, M.H.V., Van, F.C.M.B.D.H.L.O. (Eds.), Academic Press, London. 159-165.*
- Dixon, L. K., Abrams, C. C., Bowick, G., Goatley, L. C., Kay-Jackson, P. C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R. and Zhang, F. (2004). African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol*, **100**, 117-134.
- Dixon, L. K., Chapman, D. D., Netherton, C. L. and Upton, C. (2012). African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*.
- Droste, A., Sorg, C. and Hogger, P. (1999). Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 110-113.
- Edelsten, R. M. and Chinombo, D. O. (1995). An outbreak of African swine fever in the southern region of Malawi. *Rev Sci Tech*, **14**, 655-666.
- Edwards, J. F., Dodds, W. J. and Slauson, D. O. (1984). Coagulation changes in African swine fever virus infection. *Am J Vet Res*, **45**, 2414-2420.
- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Salas, J. and Rodriguez, J. M. (2006). Generation of filamentous instead of icosahedral particles by repression of African swine fever virus structural protein pB438L. *J Virol*, **80**, 11456-11466.
- Escribano, J. M., Galindo, I. and Alonso, C. (2012). Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res*.
- Escribano, J. M., Pastor, M. J., Arias, M. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (1990). Confirmación de sueros positivos a ELISA-peste porcina africana, mediante la técnica de "Immunoblotting". Utilización de las proteínas inducidas por el virus con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un "kit" de diagnóstico. (Confirmation of sera positive by ASF ELISA with the immunoblotting technique. Use of virus-induced proteins of 23-25 kDa in the development of a diagnostic kit.). *Med Vet*, **7**, 135-141.
- Escribano, J. M., Pastor, M. J. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. *Am J Vet Res*, **50**, 1118-1122.
- Essakalli, M., Brick, C., Bennani, N., Benseffaj, N., Ouadghiri, S. and Atouf, O. (2010). [The latest TH17 lymphocyte in the family of T CD4+ lymphocytes]. *Pathol Biol (Paris)*, **58**, 437-443.

- Etzerodt, A., Maniecki, M. B., Moller, K., Moller, H. J. and Moestrup, S. K. (2010). Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, **88**, 1201-1205.
- Eugenin, E. A., Osiecki, K., Lopez, L., Goldstein, H., Calderon, T. M. and Berman, J. W. (2006). CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci*, **26**, 1098-1106.
- Farez, S. and Morley, R. S. (1997). Potential animal health hazards of pork and pork products. *Rev Sci Tech*, **16**, 65-78.
- Fernandez, A., Perez, J., Carrasco, L., Bautista, M. J., Sanchez-Vizcaino, J. M. and Sierra, M. A. (1992a). Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. *Zentralbl Veterinarmed B*, **39**, 393-402.
- Fernandez, A., Perez, J., Martin de las Mulas, J., Carrasco, L., Dominguez, J. and Sierra, M. A. (1992b). Localization of African swine fever viral antigen, swine IgM, IgG and C1q in lung and liver tissues of experimentally infected pigs. *J Comp Pathol*, **107**, 81-90.
- Forman, A. J., Wardley, R. C. and Wilkinson, P. J. (1982). The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol*, **74**, 91-100.
- Fowler, V., Robinson, L., Bankowski, B., Cox, S., Parida, S., Lawlor, C., Gibson, D., O'Brien, F., Ellefsen, B., Hannaman, D., Takamatsu, H. H. and Barnett, P. V. (2012). A DNA vaccination regime including protein boost and electroporation protects cattle against foot-and-mouth disease. *Antiviral Res*, **94**, 25-34.
- Fralish, B. H. and Tarleton, R. L. (2003). Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, **21**, 3070-3080.
- Galindo-Cardiel, I., Ballester, M., Solanes, D., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Argilagué, J. M., Lacasta, A., Accensi, F. and Rodriguez, F. (2012). Suggested guidelines for clinical and pathological assessment in African swine fever virus vaccine development. *Virus Res*, **In press**.
- Gallardo, C., Blanco, E., Rodriguez, J. M., Carrascosa, A. L. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (2006). Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*, **44**, 950-956.

- Gallardo, C., Mwaengo, D. M., Macharia, J. M., Arias, M., Taracha, E. A., Soler, A., Okoth, E., Martin, E., Kasiti, J. and Bishop, R. P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, **38**, 85-95.
- García-Beato, R., Salas, M. L., Vinuela, E. and Salas, J. (1992). Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology*, **188**, 637-649.
- García-Escudero, R., Andrés, G., Almazán, F. and Vinuela, E. (1998). Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J Virol*, **72**, 3185-3195.
- Gil Dones, F. (2003). Desarrollo de estrategias de sobreexpresión de antígenos vacunales en plantas transgénicas. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*.
- Gil, S., Sepulveda, N., Albina, E., Leitao, A. and Martins, C. (2008). The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFN α , TNF α and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. *Arch Virol*, **153**, 1845-1854.
- Gil, S., Spagnuolo-Weaver, M., Canals, A., Sepulveda, N., Oliveira, J., Aleixo, A., Allan, G., Leitao, A. and Martins, C. L. (2003). Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Arch Virol*, **148**, 2077-2097.
- Glaum, M. C., Wang, Y., Raible, D. G. and Schulman, E. S. (2001). Degranulation influences heparin-associated inhibition of RT-PCR in human lung mast cells. *Clin Exp Allergy*, **31**, 1631-1635.
- Gomez-Puertas, P. and Escribano, J. M. (1997). Blocking antibodies inhibit complete African swine fever virus neutralization. *Virus Res*, **49**, 115-122.
- Gomez-Puertas, P., Oviedo, J. M., Rodríguez, F., Coll, J. and Escribano, J. M. (1997). Neutralization susceptibility of African swine fever virus is dependent on the phospholipid composition of viral particles. *Virology*, **228**, 180-189.
- Gomez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C. and Escribano, J. M. (1998). The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, **243**, 461-471.

- Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Ramiro-Ibanez, F., Ruiz-Gonzalvo, F., Alonso, C. and Escribano, J. M. (1996). Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol*, **70**, 5689-5694.
- Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Caballero, M. J., Hervas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1997). African swine fever virus infection of bone marrow: lesions and pathogenesis. *Vet Pathol*, **34**, 97-107.
- Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Chacon-Manrique de Lara, F., Hervas, J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1998). Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. *J Comp Pathol*, **118**, 1-13.
- Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Hervas, J., Carrasco, L., de Lara, F. C., Perez, J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1996). Subcellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever. *J Comp Pathol*, **115**, 327-341.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Martin de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1995). Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J Gen Virol*, **76 (Pt 9)**, 2399-2405.
- Gomez del Moral, M., Ortuno, E., Fernandez-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerro, A. and Dominguez, J. (1999). African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol*, **73**, 2173-2180.
- Gonzalez, A., Talavera, A., Almendral, J. M. and Vinuela, E. (1986). Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res*, **14**, 6835-6844.
- Gonzalez Juarrero, M., Mebus, C. A., Pan, R., Revilla, Y., Alonso, J. M. and Lunney, J. K. (1992). Swine leukocyte antigen and macrophage marker expression on both African swine fever virus-infected and non-infected primary porcine macrophage cultures. *Vet Immunol Immunopathol*, **32**, 243-259.
- Gregg, D. A., Mebus, C. A. and Schlafer, D. H. (1995). Early infection of interdigitating dendritic cells in the pig lymph node with African swine fever viruses of high and low virulence: immunohistochemical and ultrastructural studies. *J Vet Diagn Invest*, **7**, 23-30.
- Griebel, P. J., Ohmann, H. B., Lawman, M. J. and Babiuk, L. A. (1990). The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T lymphocytes. *J Gen Virol*, **71 (Pt 2)**, 369-377.

- Hammer, G. E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D. and Shastri, N. (2006). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol*, **7**, 103-112.
- Hawes, P. C., Netherton, C. L., Wileman, T. E. and Monaghan, P. (2008). The envelope of intracellular African swine fever virus is composed of a single lipid bilayer. *J Virol*, **82**, 7905-7912.
- Heath, C. M., Windsor, M. and Wileman, T. (2001). Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol*, **153**, 449-455.
- Heath, C. M., Windsor, M. and Wileman, T. (2003). Membrane association facilitates the correct processing of pp220 during production of the major matrix proteins of African swine fever virus. *J Virol*, **77**, 1682-1690.
- Hernaez, B. and Alonso, C. (2010). Dynamin- and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. *J Virol*, **84**, 2100-2109.
- Hernaez, B., Escribano, J. M. and Alonso, C. (2006). Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera. *Virology*, **350**, 1-14.
- Hess, W. R., Endris, R. G., Lousa, A. and Caiado, J. M. (1989). Clearance of African swine fever virus from infected tick (Acari) colonies. *J Med Entomol*, **26**, 314-317.
- Heuschele, W. P., and L. Coggins. (1965). Studies on the transmission of African swine fever virus by arthropods. *Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass.*, **69**, 94-100.
- Heuschele, W. P. and Coggins, L. (1969). Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull Epizoot Dis Afr*, **17**, 179-183.
- Hintz, K. A., Rassias, A. J., Wardwell, K., Moss, M. L., Morganelli, P. M., Pioli, P. A., Givan, A. L., Wallace, P. K., Yeager, M. P. and Guyre, P. M. (2002). Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, **72**, 711-717.
- Hulst, M., Loeffen, W. and Weesendorp, E. (2012). Pathway analysis in blood cells of pigs infected with classical swine fever virus: comparison of pigs that develop a chronic form of infection or recover. *Arch Virol*.
- ILAR, I. o. L. A. R., Comission on Life Science, National Research Council. (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *The National Academies Press*.

- Ito, M., Koide, W., Watanabe, M., Kamiya, H. and Sakurai, M. (1997). Apoptosis of cord blood T lymphocytes by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **78 (Pt 8)**, 1971-1975.
- Ivanov, V., Efremov, E. E., Novikov, B. V., Balyshv, V. M., Tsibanov, S., Kalinovskiy, T., Kolbasov, D. V., Niedzwiecki, A. and Rath, M. (2011). Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pigs infected by African swine fever virus. *Mol Med Report*, **4**, 395-401.
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res*, **117**, 156-184.
- Izraeli, S., Pfliegerer, C. and Lion, T. (1991). Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6051.
- Jenson, J. S., Childerstone, A., Takamatsu, H., Dixon, L. K. and Parkhouse, R. M. (2000). The cellular immune recognition of proteins expressed by an African swine fever virus random genomic library. *J Immunol Methods*, **242**, 33-42.
- Jeurissen, S. H., Wagenaar, F., Pol, J. M., van der Eb, A. J. and Noteborn, M. H. (1992). Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J Virol*, **66**, 7383-7388.
- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M. and Wileman, T. (2004). Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J Virol*, **78**, 7990-8001.
- Karalyan, Z., Zakaryan, H., Arzumanyan, H., Sargsyan, K., Voskanyan, H., Hakobyan, L., Abroyan, L., Avetisyan, A. and Karalova, E. (2012a). Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. *BMC Vet Res*, **8**, 18.
- Karalyan, Z., Zakaryan, H., Sargsyan, K., Voskanyan, H., Arzumanyan, H., Avagyan, H. and Karalova, E. (2012b). Interferon status and white blood cells during infection with African swine fever virus in vivo. *Vet Immunol Immunopathol*, **145**, 551-555.
- Kay-Jackson, P. C., Goatley, L. C., Cox, L., Miskin, J. E., Parkhouse, R. M., Wienands, J. and Dixon, L. K. (2004). The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7. *J Gen Virol*, **85**, 119-130.
- King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Grierson, S. S., Wilkinson, P. J., Dixon, L. K., Bastos, A. D. and Drew, T. W. (2003). Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*, **107**, 53-61.

- King, K., Chapman, D., Argilaguët, J. M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C. A., Netherton, C. L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M. F., Dixon, L. K. and Takamatsu, H. H. (2011). Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, **29**, 4593-4600.
- Kleiboeker, S. B. (2002). Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **18**, 431-451.
- Kleiboeker, S. B., Burrage, T. G., Scoles, G. A., Fish, D. and Rock, D. L. (1998). African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *J Virol*, **72**, 1711-1724.
- Kollnberger, S. D., Gutierrez-Castaneda, B., Foster-Cuevas, M., Corteyn, A. and Parkhouse, R. M. (2002). Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J Gen Virol*, **83**, 1331-1342.
- Konno, S., Taylor, W. D., Hess, W. R. and Heuschele, W. P. (1972). Spleen pathology in African swine fever. *Cornell Vet*, **62**, 486-506.
- Leifert, J. A., Rodriguez-Carreno, M. P., Rodriguez, F. and Whitton, J. L. (2004). Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev*, **199**, 40-53.
- Leitao, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M., Portugal, F., Vigarrio, J. D. and Martins, C. L. (2001). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol*, **82**, 513-523.
- Leitao, A., Malur, A., Cartaxeiro, C., Vasco, G., Cruz, B., Cornelis, P. and Martins, C. L. (2000). Bacterial lipoprotein based expression vectors as tools for the characterisation of African swine fever virus (ASFV) antigens. *Arch Virol*, **145**, 1639-1657.
- Leitao, A., Malur, A., Cornelis, P. and Martins, C. L. (1998). Identification of a 25-aminoacid sequence from the major African swine fever virus structural protein VP72 recognised by porcine cytotoxic T lymphocytes using a lipoprotein based expression system. *J Virol Methods*, **75**, 113-119.
- Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. (2000). An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol*, **74**, 1275-1285.
- Ley, V., Almendral, J. M., Carbonero, P., Beloso, A., Vinuela, E. and Talavera, A. (1984). Molecular cloning of African swine fever virus DNA. *Virology*, **133**, 249-257.

- Lindenstrom, T., Woodworth, J., Dietrich, J., Aagaard, C., Andersen, P. and Agger, E. M. (2012). Vaccine-induced th17 cells are maintained long-term postvaccination as a distinct and phenotypically stable memory subset. *Infect Immun*, **80**, 3533-3544.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lu, Y. Y., Koga, Y., Tanaka, K., Sasaki, M., Kimura, G. and Nomoto, K. (1994). Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **68**, 390-399.
- Lubisi, B. A., Bastos, A. D., Dwarka, R. M. and Vosloo, W. (2005). Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol*, **150**, 2439-2452.
- Lunney, J. K. (1994). Current status of the swine leukocyte antigen complex. *Vet Immunol Immunopathol*, **43**, 19-28.
- Lunney, J. K. and Pescovitz, M. D. (1987). Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol*, **17**, 135-144.
- Malmquist, W. A. (1962). Propagation, modification, and hemadsorption of African swine fever virus in cell cultures. *Am J Vet Res*, **23**, 241-247.
- Malmquist, W. A. and Hay, D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res*, **21**, 104-108.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, NY*.
- Mansfield, A. S., Heikkila, P., von Smitten, K., Vakkila, J. and Leidenius, M. (2012). The presence of sinusoidal CD163(+) macrophages in lymph nodes is associated with favorable nodal status in patients with breast cancer. *Virchows Arch*, **461**, 639-646.
- Manso Ribeiro, J. (1962). Déclaration sur la Vaccination Contre la Peste Porcine Africaine à la XXX^a Session Générale de l'Office International des Epizootics. . *Buff. off. Internat. Epizoot.*, **58**, 1031-1040.
- Manso Ribeiro, J., J.A. Rosa Azevedo, M.J.O. Teixeira, M.C. Braco Forte, A.M. Rodrigues Ribeiro, F. Oliveira, E. Noronha, C. Grave Pereira and J. Dias Vigario. (1958). Peste porcine proveoquéé par une souche différente (Souche L) de la souche classique. *Bull. Off. int. Epiz.*, **50**, 516-534.

- Martins, C. L., Lawman, M. J., Scholl, T., Mebus, C. A. and Lunney, J. K. (1993). African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch Virol*, **129**, 211-225.
- Martins, C. L. and Leitaó, A. C. (1994). Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Vet Immunol Immunopathol*, **43**, 99-106.
- Martins, C. L., Scholl, T., Mebus, C. A., Fisch, H. and Lawman, M. J. (1987). Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Viral Immunol*, **1**, 177-190.
- Matsushita, N., Kashiwagi, M., Wait, R., Nagayoshi, R., Nakamura, M., Matsuda, T., Hogger, P., Guyre, P. M., Nagase, H. and Matsuyama, T. (2002). Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol*, **130**, 156-161.
- Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 560-564.
- McCullough, K. C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., Saalmuller, A. and Summerfield, A. (1999). Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*, **98**, 203-212.
- McKercher, P. D., Hess, W. R. and Hamdy, F. (1978). Residual viruses in pork products. *Appl Environ Microbiol*, **35**, 142-145.
- Mebus, C. A. (1988). African swine fever. *Adv Virus Res*, **35**, 251-269.
- Mebus, C. A. and Dardiri, A. H. (1979). Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 227-239.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C. and Dixon, L. K. (2000). African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol*, **74**, 9412-9420.
- Mohamadzadeh, M., Chen, L. and Schmaljohn, A. L. (2007). How Ebola and Marburg viruses battle the immune system. *Nat Rev Immunol*, **7**, 556-567.
- Moller, H. J., Hald, K. and Moestrup, S. K. (2002). Characterization of an enzyme-linked immunosorbent assay for soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*, **62**, 293-299.
- Moller, H. J., Moestrup, S. K., Weis, N., Wejse, C., Nielsen, H., Pedersen, S. S., Attermann, J., Nexø, E. and Kronborg, G. (2006). Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med*, **34**, 2561-2566.

- Montgomery, R. E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J. Comp. Pathol.*, **34**, 59-191, 243-262.
- Moore, D. M., Zsak, L., Neilan, J. G., Lu, Z. and Rock, D. L. (1998). The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol*, **72**, 10310-10315.
- Moulton, J. and Coggins, L. (1968). Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet*, **58**, 364-388.
- Moulton, J. E., Pan, I. C., Hess, W. R., DeBoer, C. J. and Tessler, J. (1975). Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am J Vet Res*, **36**, 27-32.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2008). Immunobiology. *Garland Science. Seventh Edition*.
- Nascimbeni, M., Shin, E. C., Chiriboga, L., Kleiner, D. E. and Rehmann, B. (2004). Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, **104**, 478-486.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Kutish, G. F. and Rock, D. L. (2004). Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, **319**, 337-342.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Afonso, C. L. and Rock, D. L. (2002). Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J Virol*, **76**, 3095-3104.
- Netherton, C., Rouiller, I. and Wileman, T. (2004). The subcellular distribution of multigene family 110 proteins of African swine fever virus is determined by differences in C-terminal KDEL endoplasmic reticulum retention motifs. *J Virol*, **78**, 3710-3721.
- Nogal, M. L., Gonzalez de Buitrago, G., Rodriguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A. L., Salas, M. L. and Revilla, Y. (2001). African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol*, **75**, 2535-2543.
- Norley, S. G. and Wardley, R. C. (1983). Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine-fever virus infection. *Immunology*, **49**, 593-597.
- OIE, W. O. o. A. H. (2011). WAHID database. Disease information. Disponible en http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary&disease_type=Terrestrial&disease_id=12 (última consulta Julio, 2012).

- OIE, W. O. o. A. H. (2012). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. *OIE*,
Section 2.8.1. African swine fever.
- Oleaga-Perez, A., Perez-Sanchez, R. and Encinas-Grandes, A. (1990). Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet Rec*, **126**, 32-37.
- OMS, O. M. d. I. S. (1998). Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9811.pdf>.
OMS. Ginebra, 1998.
- Onisk, D. V., Borca, M. V., Kutish, G., Kramer, E., Irusta, P. and Rock, D. L. (1994). Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology*, **198**, 350-354.
- Onofre, G., Kolackova, M., Jankovicova, K. and Krejsek, J. (2009). Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, **52**, 57-61.
- Ortin, J., Enjuanes, L. and Vinuela, E. (1979). Cross-links in African swine fever virus DNA. *J Virol*, **31**, 579-583.
- Oura, C. A., Denyer, M. S., Takamatsu, H. and Parkhouse, R. M. (2005). In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol*, **86**, 2445-2450.
- Oura, C. A., Powell, P. P., Anderson, E. and Parkhouse, R. M. (1998a). The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J Gen Virol*, **79 (Pt 6)**, 1439-1443.
- Oura, C. A., Powell, P. P. and Parkhouse, R. M. (1998b). African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol*, **79 (Pt 6)**, 1427-1438.
- Pan, I. C., De Boer, C. J. and Heuschele, W. P. (1970). Hypergammaglobulinemia in swine infected with African swine fever virus. *Proc Soc Exp Biol Med*, **134**, 367-371.
- Pan, I. C., Trautman, R., Hess, W. R., DeBoer, C. J., Tessler, J., Ordas, A., Botija, C. S., Ovejero, J. and Sanchez, M. C. (1974). African swine fever: comparison of four serotests on porcine serums in Spain. *Am J Vet Res*, **35**, 787-790.
- Pan, I. C., Whyard, T. C., Hess, W. R., Yuasa, N. and Shimizu, M. (1988). Epitopic diversity of African swine fever virus. *Virus Res*, **9**, 93-106.
- Parker, J., Plowright, W. and Pierce, M. A. (1969). The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet Rec*, **85**, 668-674.

- Pastor, M. J., Arias, M., Alcaraz, C., De Diego, M. and Escribano, J. M. (1992). A sensitive dot immunobinding assay for serodiagnosis of African swine fever virus with application in field conditions. *J Vet Diagn Invest*, **4**, 254-257.
- Pastor, M. J., Arias, M. and Escribano, J. M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res*, **51**, 1540-1543.
- Pastor, M. J., Laviada, M. D., Sanchez-Vizcaino, J. M. and Escribano, J. M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can J Vet Res*, **53**, 105-107.
- Piedrafita, D., Xu, D., Hunter, D., Harrison, R. A. and Liew, F. Y. (1999). Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. *J Immunol*, **163**, 1467-1472.
- Piriou, L., Chevallier, S., Hutet, E., Charley, B., Le Potier, M. F. and Albina, E. (2003). Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res*, **34**, 389-404.
- Plowright, W. and Parker, J. (1967). The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch Gesamte Virusforsch*, **21**, 383-402.
- Plowright, W., Parker, J., Peirce, M. A. (1969). African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*, **221**, 1071-1073.
- Plowright, W., Perry, C. T. and Greig, A. (1974). Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, *Ornithodoros moubata* porcinus, Walton. *Res Vet Sci*, **17**, 106-113.
- Powell, P. P., Dixon, L. K. and Parkhouse, R. M. (1996). An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol*, **70**, 8527-8533.
- Ramirez, F., Ghani, Y., Gao, L. and Stauss, H. (2007). Dendritic cell immunization induces Nonprotective WT1-specific CTL responses in mouse. *J Immunother*, **30**, 140-149.
- Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J. M. and Alonso, C. (1996). Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol*, **77 (Pt 9)**, 2209-2219.
- Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Ruiz-Gonzalvo, F., Escribano, J. M. and Alonso, C. (1997). Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. *Virus Res*, **47**, 31-40.

- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M. and Claverie, J. M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344-1350.
- Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am Hyg*, **27**, 493-497.
- Reis, A. L., Parkhouse, R. M., Penedos, A. R., Martins, C. and Leitao, A. (2007). Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *J Gen Virol*, **88**, 2426-2434.
- Rennie, L., Wilkinson, P. J. and Mellor, P. S. (2001). Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Med Vet Entomol*, **15**, 140-146.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Vinuela, E. and Fresno, M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem*, **273**, 5405-5411.
- Revilla, Y., Cebrian, A., Baixeras, E., Martinez, C., Vinuela, E. and Salas, M. L. (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology*, **228**, 400-404.
- Rodriguez, F., Harkins, S., Slifka, M. K. and Whitton, J. L. (2002). Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol*, **76**, 4251-4259.
- Rodriguez, F., Slifka, M. K., Harkins, S. and Whitton, J. L. (2001). Two overlapping subdominant epitopes identified by DNA immunization induce protective CD8(+) T-cell populations with differing cytolytic activities. *J Virol*, **75**, 7399-7409.
- Rodriguez, F. and Whitton, J. L. (2000). Enhancing DNA immunization. *Virology*, **268**, 233-238.
- Rodriguez, F., Zhang, J. and Whitton, J. L. (1997). DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol*, **71**, 8497-8503.
- Rodriguez, I., Nogal, M. L., Redrejo-Rodriguez, M., Bustos, M. J. and Salas, M. L. (2009). The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event. *J Virol*, **83**, 12290-12300.
- Rodriguez, J. M., Garcia-Escudero, R., Salas, M. L. and Andres, G. (2004). African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol*, **78**, 4299-1313.

- Rodriguez, J. M. and Salas, M. L. (2012). African swine fever virus transcription. *Virus Res.*
- Rodriguez, J. M., Salas, M. L. and Vinuela, E. (1996). Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus. *J Virol*, **70**, 8584-8589.
- Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M. L., Vinuela, E., Cuezva, J. M. and Salas, J. (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol*, **72**, 7583-7588.
- Rojo, G., Garcia-Beato, R., Vinuela, E., Salas, M. L. and Salas, J. (1999). Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology*, **257**, 524-536.
- Ronish, B., Hakhverdyan, M., Stahl, K., Gallardo, C., Fernandez-Pinero, J., Belak, S., Leblanc, N. and Wangh, L. (2011). Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*, **172**, 8-15.
- Rowlands, R. J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E. and Dixon, L. K. (2008). African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*, **14**, 1870-1874.
- Ruiz-Gonzalvo, F. and Coll, J. M. (1993). Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells. *Virology*, **196**, 769-777.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Rodriguez, F. and Escribano, J. M. (1996). Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, **218**, 285-289.
- Ruiz Gonzalvo, F., Caballero, C., Martinez, J. and Carnero, M. E. (1986a). Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. *Am J Vet Res*, **47**, 1858-1862.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, E. and Bruvel, V. (1983). Immunological responses of pigs to partially attenuated African Swine Fever Virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. . In: P.J. Wilkinson (Ed.), *African Swine Fever. Proc. EUR 8466 EN, CEC/FAO Research Seminar. Sardinia. September 1981*.206-216.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M. E., Caballero, C. and Martinez, J. (1986b). Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am J Vet Res*, **47**, 1249-1252.
- Saalmuller, A., Weiland, F. and Reddehase, M. J. (1991). Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen. *Immunobiology*, **183**, 102-114.

- Sakaguchi, E., Kayano, K., Segawa, M., Aoyagi, M., Sakaida, I. and Okita, K. (2001). [Th1/Th2 imbalance in HCV-related liver cirrhosis]. *Nihon Rinsho*, **59**, 1259-1263.
- Salas, M. (1999). African Swine Fever Virus (Asfarviridae). In: *Allan Granof, R.G.W. (ed.) Encyclopedia of Virology. Academic Press, London 30-38.*
- Salas, M. L. and Andres, G. (2012). African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.*
- Salguero, F. J., Gil, S., Revilla, Y., Gallardo, C., Arias, M. and Martins, C. (2008). Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus (E-70) deleted on A238L. *Vet Immunol Immunopathol*, **124**, 107-119.
- Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sanchez-Cordon, P. J., Carrasco, L. and Gomez-Villamandos, J. C. (2002). Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, **90**, 11-22.
- Salguero, F. J., Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Fernandez de Marco, M. and Gomez-Villamandos, J. C. (2005). Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol*, **132**, 289-302.
- Sanchez-Cordon, P. J., Romero-Trevejo, J. L., Pedrera, M., Sanchez-Vizcaino, J. M., Bautista, M. J. and Gomez-Villamandos, J. C. (2008). Role of hepatic macrophages during the viral haemorrhagic fever induced by African Swine Fever Virus. *Histol Histopathol*, **23**, 683-691.
- Sanchez-Torres, C., Gomez-Puertas, P., Gomez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J. M., Ezquerro, A. and Dominguez, J. (2003). Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol*, **148**, 2307-2323.
- Sanchez-Vizcaino, J. M. (2006). African swine fever. In *Diseases of swine. eds. Iowa State University, USA, Ninth Edition, Straw B., D'Allaire S., Mengeling W., Taylor D.*, 291-298.
- Sanchez Botija, C. (1963). Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la P.P.A. en los artrópodos mediante la prueba de hemadsorción. *Bull. Off. int. Epiz.*, **68**, 895-899.
- Sanchez, E. G., Quintas, A., Nogal, M., Castello, A. and Revilla, Y. (2012a). African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res.*

- Sanchez, E. G., Quintas, A., Perez-Nunez, D., Nogal, M., Barroso, S., Carrascosa, A. L. and Revilla, Y. (2012b). African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells. *PLoS Pathog*, **8**, e1002754.
- Schiefer, B. and Searcy, G. (1975). Disseminated intravascular coagulation and consumption coagulopathy. *Can Vet J*, **16**, 151-159.
- Schlafer, D. H., McVicar, J. W. and Mebus, C. A. (1984). African swine fever convalescent sows. Subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1361-1366.
- Schloer, G. M. (1985). Polypeptides and structure of African swine fever virus. *Virus Res*, **3**, 295-310.
- Sharman, E. C. (1971). African Swine Fever. *Proceedings of 75th Annual Meeting U.S. Animal Health Association*, 176-179.
- Sierra, M. A., Bernabe, A., Mozos, E., Mendez, A. and Jover, A. (1987). Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet Pathol*, **24**, 460-462.
- Sierra, M. A., Quezada, M., Fernandez, A., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., Martin de las Mulas, J. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (1989). Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. *Vet Pathol*, **26**, 173-176.
- Smith, G. L. and Law, M. (2004). The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res*, **106**, 189-197.
- Sogo, J. M., Almendral, J. M., Talavera, A. and Vinuela, E. (1984). Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA. *Virology*, **133**, 271-275.
- Steyn, D. G. (1932). East african virus disease in pigs. *18th Rep. Director vet. Serv. Animal Industry, Sth Africa.*, 99-109.
- Stone, S. S. and Hess, W. R. (1967). Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am J Vet Res*, **28**, 475-481.
- Suarez, C., Salas, M. L. and Rodriguez, J. M. (2010). African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development. *J Virol*, **84**, 176-187.
- Sumption, K. J., Hutchings, G. H., Wilkinson, P. J. and Dixon, L. K. (1990). Variable regions on the genome of Malawi isolates of African swine fever virus. *J Gen Virol*, **71 (Pt 10)**, 2331-2340.
- Takamatsu, H., Denyer, M., Lacasta, A., Stirling, C., Argilaguuet, J., Netherton, C., Oura, C., Martins, C. and Rodriguez, F. (2012). Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res*, **S0168-1702**.

- Takashima, A. (2001). Establishment of fibroblast cultures. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 2**, Unit 2 1.
- Tekiel, V., Alba-Soto, C. D., Gonzalez Cappa, S. M., Postan, M. and Sanchez, D. O. (2009). Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypanosome cDNA expression library. *Vaccine*, **27**, 1323-1332.
- Thomson, G. R., Gainaru, M. D. and Van Dellen, A. F. (1980). Experimental infection of warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*) with African swine fever virus. *Onderstepoort J Vet Res*, **47**, 19-22.
- Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J. K., Palese, P., Swayne, D. E., Pantin-Jackwood, M. J., Schultz-Cherry, S., Solorzano, A., Van Rooijen, N., Katz, J. M. and Basler, C. F. (2005). Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*, **79**, 14933-14944.
- Uenishi, H., Shinkai, H., Morozumi, T., Muneta, Y., Jozaki, K., Kojima-Shibata, C. and Suzuki, E. (2011). Polymorphisms in pattern recognition receptors and their relationship to infectious disease susceptibility in pigs. *BMC Proc*, **5 Suppl 4**, S27.
- Vallee, I., Tait, S. W. and Powell, P. P. (2001). African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *J Virol*, **75**, 10372-10382.
- Vial, L., Wieland, B., Jori, F., Etter, E., Dixon, L. and Roger, F. (2007). African swine fever virus DNA in soft ticks, Senegal. *Emerg Infect Dis*, **13**, 1928-1931.
- Villeda, C. J., Gomez-Villamandos, J. C., Williams, S. M., Hervas, J., Wilkinson, P. J. and Vinuela, E. (1995). The role of fibrinolysis in the pathogenesis of the haemorrhagic syndrome produced by virulent isolates of African swine fever virus. *Thromb Haemost*, **73**, 112-117.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. and Vinuela, E. (1993a). Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol*, **133**, 467-475.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. and Vinuela, E. (1993b). Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Arch Virol*, **130**, 71-83.

- Vydelingum, S., Baylis, S. A., Bristow, C., Smith, G. L. and Dixon, L. K. (1993). Duplicated genes within the variable right end of the genome of a pathogenic isolate of African swine fever virus. *J Gen Virol*, **74 (Pt 10)**, 2125-2130.
- Walker, J. M., Raue, H. P. and Slifka, M. K. (2012). Characterization of CD8+ T Cell Function and Immunodominance Generated with an H2O2-Inactivated Whole-Virus Vaccine. *J Virol*, **86**, 13735-13744.
- Wardley, R. C., Norley, S. G., Wilkinson, P. J. and Williams, S. (1985). The role of antibody in protection against African swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, **9**, 201-212.
- Warfel, J. M. and Merkel, T. J. (2012). Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol*.
- Wesley, R. D. and Pan, I. C. (1982). African swine fever virus DNA: restriction endonuclease cleavage patterns of wild-type, Vero cell-adapted and plaque-purified virus. *J Gen Virol*, **63**, 383-391.
- Wesley, R. D. and Tuthill, A. E. (1984). Genome relatedness among African swine fever virus field isolates by restriction endonuclease analysis. *Prev Vet Med*, 53-62.
- Wheater, P. R., Burkitt, H. G. and Daniels, V. G. (1987). Histología funcional. *Ed. Jims, Segunda Edición*.
- Whittall, J. T. and Parkhouse, R. M. (1997). Changes in swine macrophage phenotype after infection with African swine fever virus: cytokine production and responsiveness to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Immunology*, **91**, 444-449.
- Wieland, B., Dhollander, S., Salman, M. and Koenen, F. (2011). Qualitative risk assessment in a data-scarce environment: a model to assess the impact of control measures on spread of African Swine Fever. *Prev Vet Med*, **99**, 4-14.
- Wilkinson, P. J., Wardley, R. C. and Williams, S. M. (1981). African swine fever virus (Malta/78) in pigs. *J Comp Pathol*, **91**, 277-284.
- Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J. F. and Vinuela, E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, **208**, 249-278.
- Yozawa, T., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Lu, Z. and Rock, D. L. (1994). Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome. *Virology*, **202**, 997-1002.

- Zeromski, J., Mozer-Lisewska, I., Kaczmarek, M., Kowala-Piaskowska, A. and Sikora, J. (2011). NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **59**, 449-455.
- Zhang, F., Hopwood, P., Abrams, C. C., Downing, A., Murray, F., Talbot, R., Archibald, A., Lowden, S. and Dixon, L. K. (2006). Macrophage transcriptional responses following in vitro infection with a highly virulent African swine fever virus isolate. *J Virol*, **80**, 10514-10521.
- Zsak, L., Caler, E., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. (1998). A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol*, **72**, 1028-1035.
- Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Neilan, J. G., Kutish, G. F., Moore, D. M. and Rock, D. L. (2001). African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol*, **75**, 3066-3076.
- Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. (1996). An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol*, **70**, 8865-8871.
- Zsak, L., Onisk, D. V., Afonso, C. L. and Rock, D. L. (1993). Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virology*, **196**, 596-602.

“No diguis blat que no sigui al sac i ben lligat”