



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**Departamento de Producción Animal**

**EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS INTERLEUCINAS 4, 5  
Y 13 EN EL CERDO TRAS LA VACUNACIÓN  
FRENTE A CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)**

**Juan José Quereda Torres**

**2009**

---



## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1 EL SISTEMA INMUNE.....	7
2.2 RESPUESTA T <sub>H2</sub> EN EL CERDO.....	20
2.2.1 Efecto de la edad.....	23
2.2.2 Efecto del género.....	23
2.2.3 Efecto de la camada.....	24
2.2.4 Efecto de la raza.....	24
2.2.5 Efecto del ambiente.....	25
2.2.6 Efecto del órgano muestreado.....	25
2.3 INMUNIDAD PASIVA POR TRANSFERENCIA DE CITOCINAS, ANTICUERPOS Y CÉLULAS VÍA CALOSTRO.....	26
2.4 INMUNIDAD ACTIVA FRENTE A LOS VIRUS POR VACUNACIÓN.....	30
2.4.1 Vacunas vivas atenuadas.....	32
2.4.2 Vacunas inactivadas.....	32
2.4.3 Nuevas tecnologías en la producción de vacunas.....	33
2.5 EFECTO DE LOS CpG-ODN.....	35
2.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE PROTEÍNA.....	38
2.7 GENES DE IL4, IL5 E IL13.....	44
2.8 PCV2.....	49
2.8.1 Efecto inmunomodulador de PCV2.....	56
2.8.2 Situación actual respecto a PCV2.....	58
2.8.3 Estrategias de lucha frente a PCV2.....	59
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL: ANIMALES Y PROTOCOLOS VACUNALES.....	65

3.1.1 <i>Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2</i> .....	65
3.1.2 <i>Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a PCV2</i> .....	66
3.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE LA SANGRE Y NÓDULOS LINFÁTICOS .....	67
3.3 EXTRACCIÓN ARN.....	69
3.4 DESTRUCCIÓN DEL ADN GENÓMICO .....	71
3.5 RETROTRANSCRIPCIÓN .....	73
3.6 Q-PCR Y EXPRESIÓN GÉNICA .....	75
3.7 PCR CLÁSICA DE PCV2 .....	80
3.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	82
3.8.1 <i>Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2</i> .....	82
3.8.2 <i>Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a PCV2</i> .....	83
3.8.3 <i>Correlaciones entre los niveles de expresión génica relativa de IL4, IL5 e IL13</i> .....	83
<b>4. RESULTADOS</b> .....	85
4.1 PCR PERFIL DE PCV2.....	87
4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR A TIEMPO REAL .....	87
4.3 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA PARA IL4, IL5 E IL13 EN ANIMALES VACUNADOS CONTRA PCV2 FRENTE A ANIMALES NO VACUNADOS .....	91
4.3.1 <i>Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente al grupo control a distintos días postvacunación independientemente de las horas</i> .....	91
4.3.2 <i>Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente al grupo control en cada hora de cada día</i> .....	95
4.3.3 <i>Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente a sí mismo y grupo control frente a sí mismo en cada hora de cada día</i> .....	103
4.4 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA PARA IL4, IL5 E IL13 EN LECHONES VACUNADOS Y NO VACUNADOS PROCEDENTES DE MADRES VACUNADAS Y NO VACUNADAS .....	121

4.4.1	<i>Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas en cada hora</i> .....	121
4.4.2	<i>Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a sí mismos en cada hora</i> .....	125
4.5	<b>CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE IL4, IL5 E IL13</b> .....	131
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	133
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	147
<b>7.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	151
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	157
8.1	INTRODUCTION.....	159
8.2	MATERIALS AND METHODS .....	161
8.2.1	<i>Experimental design: animals and vaccine protocols</i> .....	161
8.2.2	<i>Isolation of mononuclear cells and culture conditions</i> .....	162
8.2.3	<i>RNA extraction and cDNA synthesis</i> .....	163
8.2.4	<i>Oligonucleotide primers</i> .....	164
8.2.5	<i>Real-time Q-PCR</i> .....	165
8.2.6	<i>PCV2 classic PCR</i> .....	165
8.2.7	<i>Statistical study</i> .....	166
8.3	RESULTS AND DISCUSSION .....	167
8.4	CONCLUSIONS.....	175
<b>9.</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	177
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	181

# ***1. INTRODUCCIÓN***



El síndrome de adelgazamiento multisistémico postdestete causado por circovirus porcino tipo 2 (PCV2) produce en el cerdo graves consecuencias sanitarias y grandes pérdidas económicas en las explotaciones. En la actualidad, este virus infecta endémicamente las granjas porcinas a nivel mundial, lo que ha tenido como consecuencia el aumento de los niveles de mortalidad media en un 3-4% con respecto a la situación anterior a su aparición. Las pérdidas generadas por la infección de PCV2 en Europa se calculan entre 562 y 900 millones de € cada año. Esta situación ha hecho necesario el desarrollo de vacunas frente a este virus, las cuales han mostrado su capacidad para disminuir las pérdidas productivas asociadas a la infección por PCV2. Se han realizado diversos estudios que demuestran como estas vacunas aumentan el nivel de anticuerpos en los animales y disminuyen la gravedad de las lesiones asociadas a PCV2, así como el número de virus excretados, lo que lleva finalmente a una disminución de la mortalidad y del gasto de medicamentos, junto a un aumento en la ganancia media diaria. Las vacunas que existen en el mercado están autorizadas para la aplicación en cerdas reproductoras o en lechones. El escaso desarrollo del sistema inmune del lechón junto al hecho de que la vacunación de los neonatos puede favorecer la infección sistémica por PCV2, ha hecho que la vacunación de las madres se utilice ampliamente.

Consecuencia de la vacunación se produce en el animal una respuesta inmune que le protegerá en caso de que contacte con PCV2. La respuesta inmune se clasifica desde un punto de vista funcional en celular o  $T_{H1}$  y humoral o  $T_{H2}$ . La respuesta  $T_{H2}$  está regulada por las interleucinas (IL) IL4, IL5, IL10 e IL13. Este trabajo se realizó para estudiar el efecto de la estimulación con antígenos de PCV2 sobre la expresión

génica de interleucinas  $T_{H2}$  en células mononucleares. Para ello se empleó un grupo de cerdos vacunados y revacunados frente a PCV2 y un grupo de lechones vacunados que nacieron y se encalostaron de madres vacunadas o no con la misma vacuna frente a PCV2.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- ✚ Evaluar la respuesta inmune  $T_{H2}$  de los animales vacunados y revacunados frente a PCV2 cuando son reestimulados con péptidos antigénicos del fragmento de lectura abierto 2 (ORF, del inglés Open Reading Frame) de PCV2.

- ✚ Estudiar el efecto de la vacunación de las madres de forma aislada o en combinación con la vacunación de los lechones sobre la respuesta de las células mononucleares periféricas de la sangre ante la reestimulación con péptidos del ORF2 de PCV2.

- ✚ Aumentar el conocimiento sobre la cinética y el tipo de interleucinas que intervienen en la respuesta  $T_{H2}$  del cerdo, a la vez que comprobar si existe algún tipo de correlación entre ellas.

***2. REVISIÓN***  
***BIBLIOGRÁFICA***



## 2.1 EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmunitario actúa en dos fases para dar respuesta a las agresiones que recibe el organismo. En primer lugar actúa la respuesta inmune innata, que es una primera barrera que se crea mientras se establece la respuesta inmune adaptativa, donde los linfocitos T y B lucharán específicamente contra el agente agresor. Las células que forman el sistema inmune innato son los macrófagos, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés: natural killer) (Janeway *et al.*, 2001).

La respuesta inmune innata utiliza receptores que reconocen patrones moleculares específicos y que se encuentran a nivel de la superficie celular. Un tipo de estos receptores son los llamados receptores tipo peaje: TLR (del inglés Toll Like Receptor). Estos TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos: PAMP (del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns), que son estructuras moleculares comunes a diferentes patógenos. De esta manera, cuando un TLR reconoce a su PAMP específico se produce una rápida activación que conlleva cambios a nivel intracelular que establecerán la activación de la respuesta inflamatoria. Al contrario que la respuesta inmune adquirida, la respuesta inmune innata no necesita de la activación clonal de las células para producir una respuesta, ello le permite ser mucho más rápida y producir una acción inmediata contra el agente que estimuló su activación. En la actualidad se conocen 11 TLR diferentes en mamíferos. Entre los diferentes PAMPs se encuentran: peptidoglicanos (TLR2), ARN de doble cadena (TLR3), lipopolisacáridos (TLR4), flagelina (TLR5), ARN de cadena simple (TLR7 y TLR8) y ADN bacteriano con secuencias dinucleotídicas de citosina fosfato guanina (CpG-ODN por sus siglas en

inglés) (TLR9) (O'Neill, 2004). Es posible que un mismo TLR reconozca simultáneamente patrones bacterianos y víricos, como es el caso del TLR4, que reconoce la presencia de lipopolisacáridos bacterianos y del virus sincitial respiratorio. Las células que presentan TLR son los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos (Nathanson *et al.*, 2007). Los macrófagos activados secretan diversas citocinas, que son proteínas pequeñas de aproximadamente 25 kDa capaces de producir una respuesta en aquellas células que posean los receptores adecuados. Entre las citocinas producidas por los macrófagos encontramos: IL1, IL6, IL12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL8. Estos mediadores van a desencadenar una respuesta a nivel sistémico caracterizada por fiebre, anorexia y sueño (unión de citocinas a receptores situados a nivel del cerebro), leucocitosis (unión de citocinas a receptores en sistema inmune), aumento de las concentraciones de ACTH y cortisol (producido en glándulas adrenales tras la acción de la corticotropina liberada por la pituitaria y el cerebro en respuesta a los niveles de citocinas circulantes), descenso de los niveles de la hormona tiroidea, disminución de los niveles de hierro y zinc y alteración en los niveles plasmáticos de las proteínas de fase aguda, producidas por los hepatocitos en respuesta a las citocinas séricas (Eckersall, 1996). Las células infectadas por virus producen un tipo de proteínas especiales llamadas interferones (IFN). Estas proteínas tienen como misión impedir la replicación viral en las células del hospedador. Los IFN se clasifican en Tipo 1 y 2. Los de Tipo 1 son el IFN- $\alpha$  (se trata de una familia compuesta por diferentes proteínas muy similares entre sí) y el IFN- $\beta$ . El INF de Tipo 2 se denomina IFN- $\gamma$  y no es producido por las células infectadas por virus sino por linfocitos T auxiliares tipo 1, linfocitos T citotóxicos, células dendríticas y células NK dentro de la respuesta inmune adquirida. La señal que le indica a la célula que se encuentra infectada por un virus es la presencia de ARN de doble cadena. Este tipo de ARN es parte del ciclo infeccioso de

todos los virus y nunca se encuentra de manera natural en las células de los mamíferos. Los IFN Tipo 1 secretados por las células infectadas por virus son capaces de unirse a los receptores celulares específicos que las propias células infectadas y las no infectadas poseen para ellos. La unión a su receptor induce cambios en la transcripción genética que acabarán induciendo la síntesis de proteínas que impiden la replicación viral en las células. La unión de estos IFN activa a las células a producir más complejo mayor de histocompatibilidad tipo uno (MHC<sub>I</sub> por sus siglas en inglés), lo que facilitará a las células del sistema inmune reconocer a las células infectadas. Los IFN Tipo 1 también protegen al organismo de la infección vírica al activar a las células NK (productoras de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) que destruirán las células infectadas por el virus (Salmon *et al.*, 1989; Janeway *et al.*, 2001).

Los leucocitos que participan en la respuesta inmune adquirida, derivan de precursores que se encuentran en la médula ósea. Un tipo especial de estos leucocitos son los llamados linfocitos, los cuales madurarán en los órganos linfoides primarios o centrales que son la médula ósea y el timo. En estos órganos se desarrollan los procesos que permitirán la autotolerancia, mecanismo por el que los linfocitos que reconocen cómo extraños los propios antígenos del cuerpo entrarán en apoptosis o muerte celular programada. Este mecanismo de eliminación de los linfocitos autoreactivos se llama delección clonal. Existen tres poblaciones de linfocitos con funciones distintas: linfocitos T, linfocitos B y células NK.

Los linfocitos T son aquellos que tras abandonar la médula ósea, madurarán a nivel tímico. A nivel del timo existe otro proceso de selección de linfocitos: la selección positiva, la cual asegura que las células T maduras sean capaces de responder a los péptidos que les van a presentar las células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés: Antigen Presenting Cells) propias. Los linfocitos B madurarán a nivel de distintos órganos dependiendo de la especie: bolsa de Fabricio en las aves y médula ósea en el resto de mamíferos. Una vez que han madurado los linfocitos migran a los órganos linfoides secundarios, que son:

✚ Nódulos linfáticos: encargados de filtrar la linfa y así captar los antígenos que provienen de los tejidos. Los nódulos linfáticos porcinos tienen la peculiaridad de que su estructura anatómica es invertida a la del resto de especies (Binns *et al.*, 1982).

✚ Bazo: filtra la sangre y capta los antígenos presentes en ella.

✚ Tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT): encargado de procesar los antígenos presentes a nivel de las mucosas. Recibe diferentes nombres en función de su localización: BALT si es el asociado a los bronquios y GALT el asociado a las mucosas del aparato digestivo.

✚ Médula ósea: éste órgano actúa como órgano linfoide secundario en las respuestas inmunes secundarias.

Durante su vida los linfocitos no se quedan inmobilizados en los órganos linfoides, sino que entran y salen de éstos gracias a la circulación sanguínea y linfática. Este hecho favorece que las células linfoides puedan entrar en contacto con sus

antígenos específicos en los diferentes órganos linfoides periféricos. Los linfocitos poseen cuatro características fundamentales para su función:

- ✚ Diferenciación de antígenos propios y ajenos.
- ✚ Especificidad: cada linfocito posee un receptor TCR (linfocitos T, del inglés T Cell Receptor) o BCR (linfocitos B, del inglés B Cell Receptor) que sólo reconoce un antígeno concreto.
- ✚ Diversidad: existen tantos receptores (TCR o BCR) como posibles antígenos en la naturaleza.
- ✚ Memoria: cuando se produce el contacto con un antígeno se generan células efectoras y células de memoria que permitirán una respuesta más rápida en caso de un segundo contacto.

En los órganos linfoides se desarrollarán las respuestas inmunes adaptativas frente a los antígenos detectados. Si los linfocitos no entran en contacto con su antígeno específico tendrán una vida corta, que va desde unos días a pocas semanas para finalmente morir por muerte celular programada. Sin embargo, si estos linfocitos contactan con sus antígenos específicos, proliferarán y se diferenciarán en dos subpoblaciones: células efectoras y células de memoria (algunas de las cuales persistirán durante muchos años o incluso toda la vida del animal).

Los linfocitos B reconocen los antígenos libres mediante sus receptores BCR que poseen a nivel de membrana. Estos BCR son inmunoglobulinas situadas en la membrana plasmática y cuando se unen a su antígeno específico, son introducidos al interior de la célula para ser procesados y presentados vía MHC<sub>II</sub>. Existen BCR

constituidos por diversos tipos de cadenas:  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  y  $\epsilon$ . Los BCR pueden ser liberados de la membrana plasmática celular y pasar al torrente sanguíneo como anticuerpos circulantes. Cada linfocito B sintetiza un único tipo de BCR específico de un antígeno particular, por lo que cada célula B sólo reacciona con un antígeno. Cuando se produce la proliferación clonal, se generan dos subpoblaciones de linfocitos B: una de células plasmáticas secretoras de anticuerpos y otra de células B de memoria. Para que los linfocitos B se activen y proliferen necesitan de dos estímulos; uno directo y otro indirecto. El estímulo directo es la unión del BCR con el antígeno específico frente al cual fue diseñado. El estímulo indirecto es la presencia de las interleucinas fabricadas por un tipo especial de linfocitos T, en concreto los  $T_{H2}$  (del inglés T Helper) (figura 1). Sin embargo, existen componentes bacterianos capaces de inducir la síntesis de anticuerpos en ausencia de linfocitos  $T_H$ . A estos antígenos se les conoce como “timo-independientes” pues no necesitan a los linfocitos T para estimular la producción de anticuerpos (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Cuando los TCR de los linfocitos se unen a sus antígenos específicos, se produce la transducción de la señal hacia el interior del citoplasma provocando la activación celular. Existen dos tipos de TCR: TCR1 (TCR- $\gamma\delta$ ) y TCR2 (TCR- $\alpha\beta$ ). En la membrana plasmática de los linfocitos T existen otras moléculas, entre ellas cabe destacar:



CD3: transductor de señales asociado al TCR.

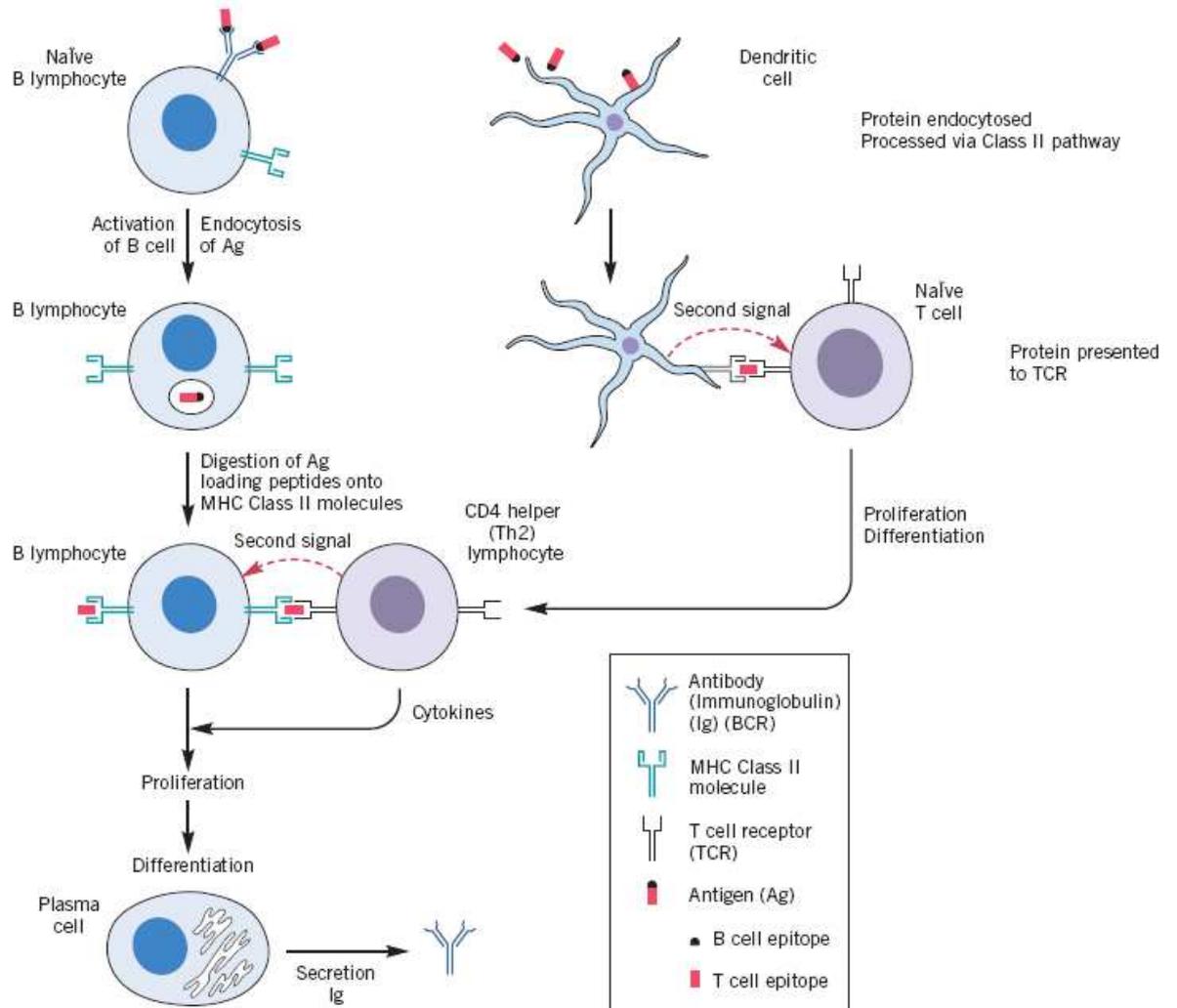


CD4: receptor para el  $MHC_{II}$  de las APC. Está asociado al TCR en los linfocitos T cooperadores o auxiliares.



CD8: receptor para el  $MHC_I$  de las células. Está asociado al TCR en los linfocitos T citotóxicos.

Figura 1: Presentación de antígenos y desarrollo de la respuesta  $T_H2$  (fuente: Nathanson *et al.*, 2007).



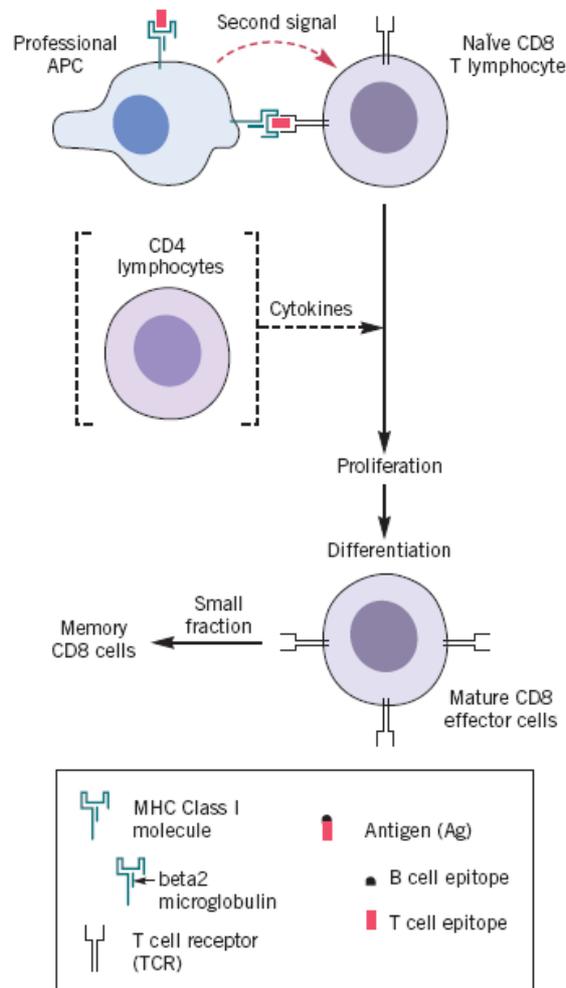
Los linfocitos T que poseen  $TCR_2$  pueden ser  $CD4^+$  o  $CD8^+$ . Los  $T CD4^+$  son linfocitos cooperadores o  $T_H$  (T Helper). Este  $TCR_2$  unido al  $CD4$  permite a la célula reconocer los antígenos que las APC muestran en su  $MHC_{II}$ . Estos linfocitos  $T_H$  necesitan de un doble estímulo para activarse; en primer lugar entrar en contacto directo con su antígeno específico presentado vía  $MHC_{II}$  por una APC y en segundo

lugar un estímulo indirecto que consiste en recibir las citocinas secretadas por las APC. En función de las interleucinas que reciba el linfocito  $T_H$  se diferenciará hacia célula  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ .

Los linfocitos  $T\ CD8^+$  son los llamados  $T$  citotóxicos ( $T_C$ ). Son capaces de reconocer antígenos presentados vía  $MHC_I$ . Los antígenos presentados por esta vía provienen siempre del ambiente intracelular, por lo que sirven para identificar células infectadas con virus o células cancerosas. Los linfocitos  $T_C$ , al igual que los  $T_H$ , necesitan de dos estímulos para activarse y proliferar, uno directo y uno indirecto. Para el  $T_C$  el estímulo directo es el contacto con el  $MHC_I$  que porta el antígeno específico que reconoce ese TCR específico de ese linfocito. El estímulo indirecto son las citocinas que el linfocito  $T_{H1}$  libera y las moléculas de activación sintetizadas por la célula dendrítica en respuesta a las citocinas que los linfocitos  $T_H$  específicos han producido en respuesta al contacto con el  $MHC_{II}$  de tales células dendríticas (figura 2). Los mecanismos que posee el linfocito  $T_C$  para destruir células afectadas son diversos, entre ellos se incluyen: perforinas (proteínas liberadas por el linfocito que crearán poros en la membrana de la célula a destruir), fragmentinas (endo-exonucleasas que degradarán el material genético de la célula y de los microorganismos que haya en el interior de ella), citocinas ( $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  e  $IFN-\gamma$ ) y CD95-L o también llamado FAS-ligando (induce la apoptosis de la célula al unirse a su receptor CD95).

Aparte de los linfocitos  $T\ CD4^+$  y  $T\ CD8^+$ , existen linfocitos doble positivos  $CD4+CD8+$ . Cada vez que un linfocito  $T\ CD4^+$  o  $T\ CD8^+$  recibe los estímulos directos e indirectos necesarios, se produce su activación, proliferación, y generación de una subpoblación de linfocitos  $T$  de memoria.

Figura 2: Presentación de antígenos y desarrollo de la respuesta  $T_{H1}$  (fuente: Nathanson *et al.*, 2007).



Las APC están especializadas en procesar los antígenos exógenos para presentarlos vía  $MHC_{II}$ . A su vez están encargadas de fabricar interleucinas para estimular a otros grupos celulares: linfocitos  $T_H$  entre otros. Existen diversos tipos de APC: macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Los macrófagos son muy importantes tras el primer contacto, pero su eficiencia presentadora no es muy alta pues sus lisosomas degradan mucho los antígenos que han de mostrar. Las células dendríticas

reciben el nombre de células de Langerhans si se encuentran a nivel de la piel y células interdigitantes y dendríticas foliculares si están en los tejidos linfoides. Estas células son más eficientes que los macrófagos pues destruyen los antígenos en menor grado que ellos. Las células dendríticas pueden tener un origen mieloide o linfoide y controlan la activación de linfocitos T y B, siendo el nexo de unión entre la respuesta inmune innata y la adquirida (Summerfield *et al.*, 2003; 2009). Los linfocitos B captan los antígenos mediante su BCR. Cuando las APC captan un antígeno, lo procesan y lo presentan a nivel de la membrana plasmática unido a la molécula del MHC<sub>II</sub> (molécula sólo presente en estas células). En las células dendríticas existe una excepción a lo anterior: es la llamada presentación antigénica cruzada. Este mecanismo especial permite que las proteínas fagocitadas sean presentadas en el contexto MHC<sub>I</sub>, a pesar de que la célula no se encuentre infectada por el microorganismo que tiene esas proteínas concretas. Así, las células dendríticas son capaces de presentar los antígenos exógenos tanto vía MHC<sub>I</sub> como MHC<sub>II</sub> (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

El primer paso que conduce al establecimiento de una respuesta inmune adaptativa protectora es la activación en los órganos linfáticos de las células T. Estas células T se activarán gracias a la acción de las APC que portarán el antígeno para el que esos linfocitos T son específicos. Cuando las APC captan un antígeno se dirigen a un órgano linfático y este hecho, junto a que los linfocitos T están siempre recirculando por los órganos linfáticos, asegura que las APC y los linfocitos específicos para cada antígeno establezcan contacto. De esta manera, todas las células T que son específicas de un antígeno, pueden ser reclutadas en 2 días tras la puesta en contacto del organismo con el antígeno.

Las células dendríticas controlan la activación de linfocitos T y B. Estudios realizados en humanos demuestran que las células dendríticas son uno de los elementos clave que dirigirán la diferenciación de los linfocitos  $T_{H0}$  hacia los subtipos  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  o T reguladores ( $T_{Reg}$ ). Existen grupos de células dendríticas con diferentes orígenes que estimulan concretamente respuestas  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  o  $T_{Reg}$ , son las llamadas células dendríticas tipo I ( $CDT_1$ ), tipo II ( $CDT_2$ ) o reguladoras, respectivamente (Shortman y Liu, 2002). Rissoan *et al.* (1999) demostraron en células dendríticas cultivadas *in vitro* que las diferentes subpoblaciones  $CDT_1$  y  $CDT_2$  tienen orígenes distintos, en concreto sus precursores son mieloides o linfoides, respectivamente. En ratones se ha descubierto como el microambiente generado por las señales enviadas por las células del estroma y los mediadores inflamatorios son capaces de influenciar la acción de las células dendríticas (Boonstra *et al.*, 2003). Las diferentes características de los patógenos hacen que éstos interactúen de manera diferente con los macrófagos, células dendríticas, células NK y células T  $CD4^+$  NK1.1 (un subtipo de linfocitos T  $CD4^+$  que expresan un marcador típico de células NK llamado NK1.1), influyendo así en el equilibrio de las citocinas sintetizadas por las APC al inicio de la respuesta inmune adaptativa. Este equilibrio de citocinas influye profundamente en la fase proliferativa inicial de activación de células T, determinando si las células  $T_H$  evolucionan a  $T_{H1}$  o a  $T_{H2}$ . El paso a  $T_{H1}$  o a  $T_{H2}$  implica el desarrollo de respuestas predominantemente celulares o humorales, respectivamente (lo que supondrá el éxito o el fracaso del sistema inmune sobre el patógeno). El mecanismo exacto por el que las células  $T_H$  se diferencian no está totalmente claro, pero diversos experimentos *in vitro* han elucidado algunas de las bases subyacentes. Cuando las células  $T_H$  son estimuladas en presencia de IL12 e IFN- $\gamma$  (secretados por macrófagos, células dendríticas y células NK en las infecciones por bacterias intracelulares y por virus) se transforman en  $T_{H1}$ . Si las células  $T_H$  son

estimuladas en presencia de IL4 e IL6 se diferenciarán a  $T_{H2}$ . Una fuente importante de IL4 son las células T CD4 Nk1.1, T CD4 LACK-específicas y otras células como mastocitos, basófilos y eosinófilos (O'Garra, 1998; Agnello *et al.*, 2003).

Los subtipos  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  se regulan mutuamente. Se ha observado como una vez que la respuesta inmune ha evolucionado hacia un subtipo es muy difícil cambiar hacia el otro. Las células  $T_{H2}$  sintetizan IL4 e IL10 que se piensa que inhibe la síntesis de IL12 y TGF- $\beta$  por parte de los macrófagos impidiendo así la activación de los  $T_{H1}$ . De la misma manera los  $T_{H1}$  producen IFN- $\gamma$  que impide la proliferación de las  $T_{H2}$  (Moore *et al.*, 1993; Janeway *et al.*, 2001; Zhuang *et al.*, 2009). Sin embargo, Rissoan *et al.* (1999) demostraron cómo existe otro tipo de regulación a nivel de las células  $T_H$  maduras para evitar respuestas  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$  demasiado largas. Así, se ha visto cómo en cultivos celulares humanos de células mononucleares periféricas de la sangre (PBMC por sus siglas en inglés) y células del cordón umbilical, la IL4 potencia la maduración de las  $CDT_1$  y destruye las  $CDT_2$ , siendo este efecto potenciado por la IL10 e inhibido por el IFN- $\gamma$ . Los linfocitos  $T_{H2}$  activan efectivamente a las células B, mientras que las células  $T_{H1}$  son vitales para la activación de los macrófagos.

Aparte de las características ya vistas, la diferenciación de las células  $T_H$  también se ve influenciada por la naturaleza y la cantidad de péptido antigénico. Generalmente, altas dosis de antígeno polarizan hacia respuestas  $T_{H1}$ , mientras que bajas dosis inducen respuestas tipo  $T_{H2}$  (Boonstra *et al.*, 2003). Por tanto, existen diversos mecanismos para balancear ambas respuestas. Los animales con capacidad reducida para balancear ambas respuestas mostrarán debilidad para dar respuesta a la

infección por patógenos intracelulares o extracelulares dependiendo de su reducida capacidad para generar respuestas  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ , respectivamente. Por tanto, es recomendable en los programas de selección animal evitar seleccionar animales que posean desviaciones inmunes hacia la producción de respuestas puras  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ , buscando en su lugar animales que posean una respuesta inmune balanceada (Stear *et al.*, 2001).

En las respuestas  $T_{H1}$  los linfocitos  $T_H$  sintetizan moléculas activadoras de linfocitos  $T_C$  y de macrófagos infectados o que han internalizado patógenos (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , FAS-Ligando y CD40-Ligando), IL2, IL3 y TNF- $\beta$ . La IL2 y el IFN- $\gamma$  hacen que el isotipo de anticuerpo sintetizado cambie a IgG2, induciendo citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (de Groot *et al.*, 2005). En las respuestas  $T_{H2}$  los linfocitos  $T_H$  fabrican moléculas activadoras de células B (IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, IL21 y CD40-Ligando), IL3, GM-CSF, IL10, TGF- $\beta$  y eotaxina (Swain *et al.*, 1990). Las IL4, IL5, IL10 e IL13 favorecen la síntesis de anticuerpos con isotipos IgG1 e IgE, que protegen frente a patógenos extracelulares (Janeway *et al.*, 2001).

En los últimos años se ha descubierto que existen otros subtipos de células  $T_H$  llamadas  $T_{H17}$  y  $T_{Reg}$ . Las células  $T_{H17}$  secretan IL17, IL17F, IL6, IL22 y TNF- $\alpha$ , siendo importantes en los mecanismos de regulación de la autoinmunidad y en la lucha contra bacterias extracelulares mediante la inflamación de tejidos y la activación de neutrófilos. Los linfocitos T reguladores secretan IL10 y TGF- $\beta$  y su labor es suprimir la activación del sistema inmune, mantener la homeostasis e inducir tolerancia a

antígenos propios (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Kaiko *et al.*, 2008).

Excepto los agnatos (como la lamprea), el resto de animales vertebrados a partir de los peces cartilagosos (representados por el tiburón) poseen linfocitos T, B, expresan moléculas de MHC<sub>I</sub>, MHC<sub>II</sub> y producen anticuerpos. Debido a que en diferentes especies se reconoce el mismo fenotipo de células se tiende a asumir que los mecanismos regulatorios de una especie son válidos para las demás. De esta manera durante mucho tiempo los conocimientos inmunológicos obtenidos en ratones y humanos (donde los medios para la investigación son mayores) se han aplicado a otras especies donde los recursos son menores, como por ejemplo los animales de consumo y compañía.

## **2.2 RESPUESTA TH2 EN EL CERDO**

La IL4 es la citocina comúnmente usada para monitorizar respuestas T<sub>H2</sub>. Hay estudios realizados en ratones knock-out para la IL4 que demuestran que esta citocina es esencial para la producción de otras citocinas T<sub>H2</sub>, para generar respuestas inmunes dependientes de estas citocinas (Kopf *et al.*, 1993) y para la producción de anticuerpos (Kuhn *et al.*, 1991). Los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune del cerdo son muy similares a los descritos en especies más estudiadas como el ratón y el humano (Raymond y Wilkie, 2004). Nguyen *et al.* (2007) demostraron como al estimular con IL4 células mononucleares purificadas de bazos de lechones gnotobioticos cultivadas en presencia de lipopolisacárido (LPS) o rotavirus, se inducía un cambio de isotipo a IgA e IgG en el cultivo con LPS y a IgA en el cultivo con rotavirus. Además, se observó como

la IL4 potenciaba la proliferación y supervivencia de células B. De la fuente *et al.* (2009) describen como los cerdos que sobreviven a un desafío con *Haemophilus parasuis* y que producen niveles detectables de ARNm de IL4, experimentan una seroconversión aumentando sus niveles de IgM e IgG. Contrariamente a estos resultados, Murtaugh *et al.* (2009) describen que en sus estudios la IL4 no estimulaba a los linfocitos B porcinos, llegando a bloquear la secreción de anticuerpos e IL6 y suprimir la proliferación de células B estimuladas con antígenos. Los mismos autores observaron como la IL4 no produce tampoco la proliferación de linfocitos B, pero sí que induce crecimiento celular en linfoblastos de manera dosis dependiente. Estos resultados hacen pensar que a pesar de que el gen de la IL4 y su proteína se han conservado evolutivamente hasta el cerdo, esta citocina podría tener en esta especie una función diferente a la observada en los ratones y humanos en los que la IL4 si estimula a los linfocitos B, siendo esencial para la producción de anticuerpos. De hecho, en macrófagos alveolares porcinos la IL4 actúa como supresora de la expresión de citocinas inflamatorias (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8 y TNF- $\alpha$ ) a nivel transcripcional (Zhou *et al.*, 1994) y de la oxidasa NADPH mediante regulación postranscripcional (Zhou *et al.*, 1995). Por todos estos motivos se piensa que la IL4 en el cerdo podría funcionar como coordinadora de respuestas inflamatorias e inmunes (Zhou *et al.*, 1994; Murtaugh *et al.*, 2009). En estudios realizados por Darwich *et al.* (2003a; 2003b) y De Groot *et al.* (2005) se observa cómo en el cerdo, los niveles de expresión ARNm y proteína de la IL4 en suero, órganos linfoides y PBMC cultivadas *in vitro* son bajos.

La IL5 ha sido menos empleada para monitorizar la respuesta inmune del cerdo tras la infección con diversos patógenos, por lo que la información relativa a ella es más

reducida. A pesar de ello, la IL5 ha mostrado cambios de expresión que a priori hacen interesante su monitorización en estudios de protección inmunológica (Dawson *et al.*, 2005; Kringel *et al.*, 2006).

Bautista *et al.* (2007) propusieron que en el cerdo la IL13 desarrolla las mismas funciones que la IL4 desempeña en otras especies. Esta conclusión la obtuvieron tras generar *in vitro* células dendríticas derivadas de monocitos con IL13 y factor estimulante de colonias granulocito/macrófago (FEC-GM), que previamente siempre se había realizado con IL4 y FEC-GM. Las células dendríticas generadas poseían todas las moléculas características de estas células: expresión del MHC y moléculas coestimuladoras de células T, siendo además capaces de fagocitar antígenos y presentarlos. Teniendo en cuenta que los niveles de IL4 que se detectan en los cerdos vivos son muy bajos y que los de IL13 son más altos (Raymond y Wilkie, 2004; Raymond *et al.*, 2006), se ha sugerido que la IL5, IL9 o IL13 (u otra citocina que se halle cerca del locus de la IL4) asume en el cerdo el papel que la IL4 tiene en la respuesta  $T_{H2}$  de otras especies, probablemente debido a que ambas citocinas compartan un receptor común en los precursores de las células dendríticas (Bautista *et al.*, 2007). Cabe señalar que, contrariamente a lo anteriormente expuesto, Murtaugh *et al.* (2009) encontraron escaso efecto en los niveles de IL13 tras estimular con mitógenos PBMC cultivadas *in vitro*, necesitando 40 ciclos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para poder detectar el ARNm de la IL13.

Se ha comprobado cómo existen diferencias individuales en la producción de citocinas (Edfors-Lilja *et al.*, 1991; Scamurra *et al.*, 1996; De Groot *et al.*, 2005; Suárez

*et al.*, 2003), existiendo un importante componente genético que influye en la capacidad de su producción (Jensen y Chrisyensen 1981; Kelm *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2003). Estas diferencias genéticas son causadas en parte por polimorfismos en las regiones promotoras o codificantes del gen en cuestión. También se han descrito diferencias en función de la edad, género, camada, raza y ambiente.

### ***2.2.1 Efecto de la edad***

Joling *et al.* (1993) describen diferencias significativas dependientes de la edad en la reactividad de los linfocitos estimulados con concanavalina A (Con A). De Groot *et al.* (2005) relataron que la variación en la cantidad de citocinas producidas (medidas por ELISA, del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es moderadamente consistente entre edades. Así, los cerdos que producen muchas citocinas a las dos semanas de edad tienden a producir también altos niveles a las 5 y 8 semanas de edad. La producción de estas citocinas tendía a aumentar con la edad de los cerdos.

### ***2.2.2 Efecto del género***

Joling *et al.* (1993) no encontraron diferencias según el sexo para linfocitos estimulados con los mitógenos Con A y fitohemaglutinina (PHA). Sin embargo, De Groot *et al.* (2005) describieron como hembras y machos diferían en su capacidad para sintetizar citocinas, encontrando diferencias en el ratio IL2/IL4.

### ***2.2.3 Efecto de la camada***

Edfors-Lilja *et al.* (1991) demostraron como existían diferencias en las cinéticas de producción de IL2 entre diversas camadas. Joling *et al.* (1993) también observaron diferencias entre camadas en su capacidad de respuesta de los linfocitos porcinos ante la estimulación con mitógenos. De Groot *et al.* (2005) detectaron este efecto para los ratios IL2/IL4 e IFN- $\gamma$ /IL10 en las diferentes camadas.

### ***2.2.4 Efecto de la raza***

En estudios que empleaban la raza Yorkshire se demostró como los linfocitos T expuestos a células dendríticas mieloides porcinas estimuladas *in vitro* con lisozima de huevo blanco de gallina producían altos niveles de ARNm de IL13, nada de ARN de IL4 y niveles moderados de IFN- $\gamma$ , sugiriendo así una respuesta T<sub>H2</sub> (Raymond y Wilkie, 2004). Este estudio a su vez demostró cómo en el cerdo el tipo de antígeno también determina la diferenciación de los T<sub>H0</sub> hacia T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub>. Reddy *et al.* (2000) tampoco encontraron niveles de ARNm detectables de IL4 en linfocitos eferentes de nódulos linfáticos estimulados con lisozima de huevo blanco de gallina, LPS, PHA o *Mycobacterium bovis* en cerdos Yorkshire. Por tanto, parece que los cerdos Yorkshire no producen IL4. Sin embargo, Verfaille *et al.* (2001) fueron capaces de detectar niveles de ARNm de IL4 en PBMC de Landrace belga no estimuladas. Esto hace pensar que existan diferencias entre las razas de cerdos en las interleucinas empleadas para regular la respuesta inmune. Joling *et al.* (1993) clasificaron las razas porcinas en función de la capacidad de respuesta de los linfocitos en: respondedores altos (Landrace finés), intermedios (Landrace holandés y Large White) y bajos (Landrace noruego).

Murtaugh *et al.* (2009) plantearon la posibilidad de que los cerdos, al poseer mayor variabilidad genética, tengan distintas moléculas efectoras en la regulación  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  que las ya descritas en los ratones de líneas muy consanguíneas utilizados para estudios inmunológicos.

### ***2.2.5 Efecto del ambiente***

El ambiente tiene una influencia muy importante sobre la producción de citocinas. Éste empieza a ejercer su acción desde que el animal es concebido en el aparato reproductor materno. Así, Tuchscherer *et al.* (2002) demostraron como el estrés aplicado durante la última fase de la gestación de las cerdas es capaz de alterar la respuesta inmune celular y humoral de los lechones. Este estudio también sugiere que el estrés en las madres afecta a la ontogenia del sistema inmune fetal, modificando la respuesta y la susceptibilidad a las enfermedades que los lechones puedan padecer a lo largo de su vida. La exposición temprana a microorganismos en la vida del animal influirá en una correcta regulación del balance  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  (Rook *et al.*, 1998; McGuirk y Kingston, 2002).

### ***2.2.6 Efecto del órgano muestreado***

La sangre es la fuente de más fácil acceso para el estudio del sistema inmune, permitiendo tomar una gran cantidad de muestras de animales diferentes en un corto período de tiempo. Las células del sistema inmune que se hallan presentes en la sangre son las PBMC. Sin embargo, la respuesta inmune se desarrolla en los órganos linfoides secundarios, en los que existe un ambiente celular completamente diferente al que existe

en la sangre. Es por ello que las conclusiones obtenidas en PBMC no pueden extrapolarse completamente a las que ocurren en los órganos linfoides secundarios de del animal vivo. En la actualidad, no se conocen bien los fenómenos que tienen lugar a nivel celular y molecular en los nódulos linfáticos del cerdo cuando se desarrolla la respuesta inmune adaptativa, pudiendo incluso existir variaciones entre los órganos linfoides de un mismo animal (Mulupuri *et al.*, 2008). De hecho, puede haber variaciones importantes frente al mismo antígeno entre la respuesta inmune que se desarrolla en las mucosas y la que tiene lugar a nivel sistémico (Foss *et al.*, 1999).

### **2.3 INMUNIDAD PASIVA POR TRANSFERENCIA DE CITOCINAS, ANTICUERPOS Y CÉLULAS VÍA CALOSTRO**

La supervivencia de los animales recién nacidos depende de la transferencia pasiva de inmunidad que reciben de la madre a través de la placenta, calostro o leche. Entre los elementos transferidos se encuentran lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos y células linfoides y no linfoides. En la especie porcina la placenta es epiteliochorial, lo que impide en gran medida el paso de estos elementos. En la cerda los niveles de IL6, IL12, IFN- $\gamma$ , IL10 e IL4 en el calostro o leche están correlacionados con sus niveles séricos. Usando técnicas ELISA se ha comprobado como lechones recién nacidos que no habían ingerido leche o lechones gnotobioticos presentaban niveles constitutivos de IL12 y TGF- $\beta$ 1, sin embargo no poseían niveles circulantes detectables de TNF- $\alpha$ , IL6, IFN- $\gamma$ , IL10 e IL4. Esto confirma la ausencia de paso de estas citocinas a través de la placenta porcina. La máxima concentración de citocinas circulantes en los lechones se alcanza al día siguiente o a los dos días del parto (Nguyen *et al.*, 2007).

El tipo de placenta también impide el paso de anticuerpos de la madre al feto. Además de esto, debido a que el sistema inmune del neonato es todavía inmaduro, los anticuerpos transferidos vía calostro son de suma importancia para su supervivencia, pues neutralizan los patógenos en las mucosas o inmediatamente después de la invasión. El calostro posee una gran cantidad de IgG, IgA e IgM. El epitelio intestinal es permeable durante pocas horas, permitiendo el paso de las inmunoglobulinas a la sangre. Esta permeabilidad decae a partir de las 24 horas (Porter, 1969; Klobasa *et al.*, 1986; Tizard, 2004). En estudios realizados en ratones y humanos, la producción de anticuerpos en los neonatos se ve afectada por el nivel de anticuerpos maternos circulantes en el momento de la vacunación. Las contradicciones observadas en diferentes estudios en los que algunos demostraron y otros no que los anticuerpos maternos inhiben la síntesis de anticuerpos por el neonato, son debidas a los diferentes niveles de anticuerpos maternos que tienen los neonatos. El desarrollo de la inmunidad adaptativa del lechón está afectado por los anticuerpos maternos, sin embargo, esta interferencia parece que no tiene lugar con la inmunidad pasiva generada por las células transferidas pasivamente en el calostro. Como posible estrategia para evitar que los anticuerpos maternos bloqueen la síntesis de anticuerpos por el neonato, se ha sugerido utilizar vacunas que induzcan inmunidad a nivel de mucosas, donde los anticuerpos maternos se encuentran en menor concentración que en el suero (Siegrist, 2001).

El calostro de las cerdas posee más de 2 millones de células por mililitro, con aproximadamente un 20% de linfocitos. Considerando el volumen de calostro que un lechón ingiere por día, son aproximadamente 500 millones de células las que atraviesan el epitelio cada 24 horas (Evans *et al.*, 1982; Le Jan, 1991). Estudios realizados en

terneros demostraron que cuando se acerca el parto, las células linfoides maternas circulantes en sangre migran a la glándula mamaria, donde sufren modificaciones de su fenotipo y su función, adquiriendo sobre todo marcadores de tráfico celular (Reber *et al.*, 2006). Los lechones sólo son capaces de absorber leucocitos del calostro de la propia madre, siéndoles imposible absorber leucocitos aislados de la sangre materna (Tuboly *et al.*, 1988; Tuboly y Bernath, 2002). Los leucocitos maternos del calostro migran intercelularmente entre las células epiteliales del duodeno y yeyuno hacia la lámina propia y submucosa, para pasar a través de los vasos linfáticos a los nódulos linfáticos mesentéricos y finalmente, al torrente sanguíneo del lechón. A las dos horas de ingestión estas células ya se encuentran en la sangre, presentando su pico entre las 5 y 7 horas postalimentación. A las 24 horas estos leucocitos maternos ya se hallan distribuidos por los órganos del neonato, encontrándose en órganos linfoides como nódulos linfáticos, bazo y otras localizaciones como hígado, pulmón y aparato digestivo. Estos leucocitos maternos tienen un efecto inmunomodulador en los cerdos neonatos. Así, los leucocitos periféricos mononucleares de la sangre de lechones privados de calostro pero alimentados con linfocitos procedentes del calostro materno presentan mayores repuestas proliferativas de células T cuando son estimulados con PHA y Con A, y mayores respuestas proliferativas de células B al ser estimulados con mitógeno pokeweed (Williams, 1993).

De la misma manera, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* la transferencia pasiva de inmunidad celular específica frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*. La respuesta inmune celular específica *in vivo* se demostró al inyectar antígeno de *M. hyopneumoniae* intradérmicamente en lechones procedentes de madres

vacunadas y no vacunadas frente a este patógeno. Aquellos lechones que provenían de madres vacunadas presentaban reacciones de hipersensibilidad retardada mayores que aquellos que procedían de madres no vacunadas. La respuesta específica *in vitro* se demostró al estimular linfocitos sanguíneos de los lechones con antígeno purificado de *M. hyopneumoniae*. Sólo los lechones de madres vacunadas experimentaban proliferación significativa. La sangre de los mismos lechones fue testada con la misma prueba antes de que los lechones se encalostraran, no observándose proliferación de los linfocitos. Estas pruebas de linfoproliferación también se realizaron sobre las células del calostro de las cerdas, obteniéndose en ellas la misma respuesta linfoproliferativa que se observó en los linfocitos circulantes de los lechones (Bandrick *et al.*, 2008).

Investigaciones realizadas en terneros alimentados con calostro natural y calostro al que se le habían eliminado las células demuestran que los leucocitos del calostro afectan al desarrollo de los linfocitos del neonato aumentando la expresión del MHC<sub>I</sub> (con la consiguiente mejora de la capacidad presentadora de antígenos) y de los marcadores de activación CD25 y CD26. Además, los terneros que recibían calostro natural presentaban en la superficie de los linfocitos menos CD11a, que es una molécula de adhesión celular asociada a estados de inflamación sistémica o enfermedad subclínica. Esto significa que los animales privados de calostro natural desarrollan más lentamente su sistema inmunitario, siendo más susceptibles a las enfermedades infecciosas y al estrés ambiental (Reber *et al.*, 2008).

## 2.4 INMUNIDAD ACTIVA FRENTE A LOS VIRUS POR VACUNACIÓN

La inmunidad que se genera frente a los virus es una combinación de respuestas celulares y humorales. Los anticuerpos son importantes en las primeras fases antes de que se establezca la infección y en el momento en el que los virus salen de la célula infectada para infectar nuevas células. Los anticuerpos neutralizantes son capaces de bloquear las proteínas víricas que sirven para la unión a los receptores celulares, impidiendo así la infección celular. Los anticuerpos opsonizantes se unen a los virus favoreciendo la fagocitosis de éstos facilitando su eliminación, a la vez que favorecen la lisis mediada por complemento de los virus con envolturas lipídicas.

El éxito de las vacunas frente a los virus radica en la capacidad de éstas para generar anticuerpos específicos. Los virus, una vez que han infectado la célula y comienzan a replicarse intracelularmente, son inaccesibles a los anticuerpos circulantes. Es por ello fundamental que los anticuerpos estén circulando cuando se produce el primer contacto con el virus. Cuando las infecciones virales ya están establecidas el principal mecanismo inmune lo constituyen los linfocitos T<sub>C</sub>. Los linfocitos T<sub>C</sub> reconocerán a las células infectadas porque éstas presentarán en sus MHC<sub>I</sub> antígenos virales, entrando entonces en acción los mecanismos anteriormente descritos: lisis celular, degradación de los genomas celular y microbiano y finalmente, la secreción de citocinas con actividad de IFN. Así pues, la colaboración de las respuestas humoral y celular es vital para la resolución de las infecciones víricas (Janeway *et al.*, 2001; Nathanson *et al.*, 2007).

La generación de células T y B antígeno específicas se puede conseguir tempranamente en la vida, siendo este hecho de suma importancia para la protección de los neonatos. A pesar de que generalmente la inmunización neonatal no induce respuestas fuertes de anticuerpos, si que sirve para generar las subpoblaciones de células específicas que reaccionaran intensamente en caso de un segundo contacto con el antígeno. Dong *et al.* (1986) demostraron como la vacunación temprana en los neonatos con una vacuna de poliomielitis producía una respuesta primaria muy débil, pero tras la segunda vacunación se observaba un incremento significativo en los niveles de anticuerpos cuando se comparaban con neonatos que no recibieron la primera dosis de vacuna. Las respuestas en la producción de anticuerpos tras la vacunación de neonatos es muy variable. Esto se debe a variaciones individuales en la aparición progresiva de células dendríticas y células T en los órganos linfoides periféricos durante la primera semana de vida (Friedberg y Weissman, 1974; Dijkstra y Dopp, 1983). Adkins y Du (1998) demostraron que en ratones recién nacidos se pueden generar células T específicas 10 días después de la inmunización.

La vacunación es el método más eficiente para controlar las enfermedades infecciosas animales. Además, su relación coste/beneficio la convierte igualmente en el mejor método. El principio básico de la vacunación es administrar a un animal uno o varios antígenos de un agente infeccioso con el fin de que éste desarrolle una respuesta inmune y se encuentre protegido si se produce un contacto real con dicho agente (Tizard, 2004). Los tipos de vacunas más comúnmente utilizados son:

### ***2.4.1 Vacunas vivas atenuadas***

Estas vacunas contienen virus vivos atenuados capaces de infectar las células del hospedador y replicarse, produciendo en el individuo fundamentalmente respuestas  $T_{H1}$  dirigidas por los linfocitos  $T\ CD8^+$ . A pesar de que se utilizan organismos de virulencia reducida, existe el riesgo de que el propio virus vacunal produzca la enfermedad en el animal. La reducción de virulencia de los microorganismos empleados se consigue mediante el proceso de atenuación. El proceso de atenuación generalmente se consigue haciendo crecer los microorganismos en condiciones o tejidos diferentes a las naturales. De esta manera los microorganismos pierden su adaptación al hospedador natural. Como esta forma de atenuar no asegura que se produzca la reversión hacia la patogenicidad, la forma más segura de emplear este tipo de vacunas es mediante la reducción de su virulencia por ingeniería genética. La inmunidad generada con estas vacunas es duradera y efectiva, por lo que el empleo de adyuvantes o revacunaciones no suelen ser tan necesarias como en las inactivadas.

### ***2.4.2 Vacunas inactivadas***

En este tipo de vacunas los microorganismos o sus fracciones purificadas están muertos, por lo que no existe riesgo de replicación y consecuente enfermedad. Estas vacunas generalmente producen respuestas  $T_{H2}$ . Los métodos de inactivación empleados generalmente son el tratamiento por calor o con sustancias químicas como el formaldehído. El tratamiento aplicado debe asegurar que la estructura antigénica no se ve alterada, pues en tal caso la vacuna perdería su efectividad. Como los microorganismos empleados no se replican, la inmunidad generada no es tan potente

como la inducida por las vacunas atenuadas, requiriendo generalmente el uso de adyuvantes y múltiples dosis para conseguir una inmunidad protectora.

#### **2.4.3 Nuevas tecnologías en la producción de vacunas**

✚ Categoría 1: vacunas que contienen organismos inactivados recombinantes o antígenos purificados derivados de organismos recombinantes. Consiste en aislar la secuencia de ADN de interés y clonarla en otra célula, bacteria o levadura capaz de expresar el antígeno en cuestión. Una vez que las células recombinantes expresan el antígeno, se puede realizar la inactivación de dichas células o la purificación del antígeno. En ocasiones ocurre el problema de que estas proteínas purificadas son poco antigénicas. Para solucionar este problema existe la opción de clonar el fragmento de ADN deseado en un organismo vivo atenuado.

✚ Categoría 2: vacunas que contienen organismos vivos con deleciones génicas o marcadores génicos heterólogos. Consiste en modificar genéticamente el microorganismo de manera que quede irreversiblemente atenuado. Un ejemplo de este tipo consiste en la deleción de un gen que codifica proteínas ligadas a la virulencia, sin afectar a la replicación del virus. Otra ventaja que presentan este tipo de vacunas es que permiten eliminar determinadas secuencias de ADN que codifican para antígenos del microorganismo y que no son vitales para él. De esta manera, los microorganismos vacunales carecen de uno varios antígenos que sí que poseen los microorganismos salvajes. Este hecho permite posteriormente diferenciar mediante técnicas ELISA si

el animal fue vacunado o infectado por el virus campo. Esta última característica ofrece grandes oportunidades para la erradicación de enfermedades.

✚ Categoría 3: vacunas que contienen vectores que expresan genes heterólogos para antígenos inmunizantes u otros estimulantes. Estas vacunas se crean al insertar en un organismo el fragmento de genoma codificante para el o los antígenos deseados, de forma que éstos sean expresados. Los organismos que generalmente se usan son los poxvirus dada la longitud de su genoma, la permisividad que ofrecen de incorporar hasta un 10% de material exógeno, la alta expresión de los productos clonados en él y su facilidad de administración vía cutánea u oral.

✚ Categoría 4: vacunas formadas exclusivamente por polinucleótidos. Son vectores de ADN que incluyen un promotor de alta expresión de mamíferos y un fragmento codificante para el o los antígenos deseados. Cuando este vector se inyecta intramuscularmente o mediante una pistola de genes, las células lo toman, lo transcriben a ARN, lo traducen a proteína y es presentado vía  $MHC_I$  en la superficie celular o secretado. Debido al tipo de presentación antigénica que se produce no sólo se inducen respuestas  $T_{H2}$ , sino también  $T_{H1}$ . Para potenciar la respuesta inmune generada se pueden emplear vectores de ADN bacteriano que contengan CpG-ODN. El riesgo de este tipo de vacunas es la posibilidad de, en primer lugar, la incorporación de genes

al genoma del hospedador y, en segundo lugar, la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores.

✚ Categoría 5: péptidos sintéticos. Estas vacunas están formadas por péptidos sintetizados químicamente. Para desarrollarlas es fundamental secuenciar el antígeno e identificar los epítomos clave.

## 2.5 EFECTO DE LOS CpG-ODN

Las secuencias CpG-ODN no metiladas son reconocidas por el sistema inmune como señales de peligro. Estas secuencias sólo se encuentran en el genoma de las bacterias y de algunos virus, no estando presente en el genoma de los mamíferos. No todos los CpG-ODN poseen la misma capacidad inmunoestimuladora, sino que depende de la secuencia de los mismos (Kamstrup *et al.*, 2001; Kline *et al.*, 2001; Krieg *et al.*, 2001). Fueron Hemmi *et al.* (2000) los que descubrieron en sus experimentos con ratones que el TLR9 es el que participa en la captación de los CpG-ODN, hecho que activa las vías de señalización intracelular. Este receptor se encuentra en las células APC como macrófagos y células dendríticas. Van der Stede *et al.* (2002) sugirieron que estos ODN producen una fuerte activación de las APC, lo que lleva a una mejor presentación de antígenos a los linfocitos, teniendo como consecuencia una mayor proliferación de células linfoides específicas.

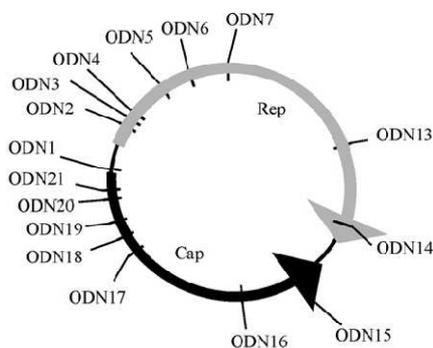
Se ha demostrado como estos CpG son capaces de inducir en APC y células T la producción de diferentes citocinas como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL2, IL6, IL12 e IL18,

activando a las células NK, favoreciendo la evolución de la respuesta inmune adaptativa hacia el subtipo T<sub>H1</sub> y potenciando el desarrollo de células antígeno específicas (Ballas *et al.*, 1996; Stacey *et al.*, 1996; Van der Stede *et al.*, 2002). Otros estudios demostraron que estos CpG también activan a las células B para proliferar y secretar anticuerpos (Krieg *et al.*, 1995). La administración de CpG-ODN contribuye a que el organismo produzca una respuesta inmune protectora contra tumores (Weiner *et al.*, 1997), infecciones por *Leishmania major* (Zimmermann *et al.*, 1998), retrovirus (Olbrich *et al.*, 2002), hepatitis B (Davis *et al.*, 1998), herpesvirus (Pyles *et al.*, 2002) y tuberculosis (Huygen *et al.*, 1996). Esta protección es incluso conseguida cuando los CpG-ODN se aplican 20 días después producir una infección artificial por *L. major* (Zimmermann *et al.*, 1998), o 4 días tras la infección por retrovirus (Olbrich *et al.*, 2002). A pesar de estas características favorables al uso de estos CpG como potenciadores de inmunidad, cabe señalar que Olbrich *et al.*, (2003) demostraron que si los CpG eran suministrados antes de la infección por retrovirus, los ratones se volvían más susceptibles al virus, presentando mayor carga viral en sangre y bazo. Este efecto perjudicial de los CpG es debido a que las células B y precursores eritroides proliferaron tras la inyección de los CpG, dándole al virus un número mayor de células sensibles susceptibles a la infección. Por tanto, el momento de administración de estos CpG es de vital importancia. En ratones se ha visto como la presencia de CpG-ODN en vacunas de ADN contribuye significativamente a la respuesta inmune generada (Sato *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2002). La mayoría de los estudios se han realizado en ratones y humanos, pero existen otros estudios que demuestran que las células porcinas también responden a estos compuestos (Kamstrup *et al.*, 2001; Magnusson *et al.*, 2001, Domeika *et al.*, 2004), potenciando las repuestas a la vacunación con antígenos como ovoalbúmina (Van der Stede *et al.*, 2002), *Pasteurella multocida* (Zhang *et al.*, 2007) y virus de Aujeszky (Linghua *et al.*,

2008). Verfaillie *et al.* (2005) probaron diferentes secuencias de CpG-ODN, observando como algunas de ellas eran capaces de aumentar significativamente la capacidad proliferativa *in vitro* de las PBMC porcinas. Es más, esas secuencias provocaban aumentos heterogéneos en los distintos cerdos en la síntesis de ARNm de IL6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL2.

Wikström *et al.* (2007) hallaron 5 CpG en el genoma de PCV2 y Kekarainen *et al.* (2008) describieron la presencia de 16 CpG-ODNs (figura 3). Estos autores mostraron como la mayoría de los CpG-ODNs de PCV2 actuaban como potentes inductores de la síntesis de IFN- $\alpha$  en las PBMC porcinas, sin embargo, en las células dendríticas algunos de los CpG de PCV2 disminuían la capacidad de producción de IFN- $\alpha$  (Vincent *et al.*, 2007; Kekarainen *et al.*, 2008). Además, en el genoma de PCV2 se ha encontrado una secuencia CpG-ODN capaz de inhibir la producción de IFN- $\alpha$  en las PBMC porcinas (Hasslung *et al.*, 2003).

Figura 3: Posición de los CpG-ODN estudiados por Kekarainen *et al.* (2008) en el genoma del PCV2.



## 2.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE PROTEÍNA

La creación de líneas celulares T CD4<sup>+</sup> porcinas a partir del aislamiento y clonación de linfocitos porcinos para caracterizar el patrón de citocinas producidas no ha sido exitosa (Grimm *et al.*, 1993; de Bruin *et al.*, 1997). La búsqueda de citocinas en la superficie o intracelularmente por medio de análisis FACS tampoco es fácil, pues el porcentaje de células que secretan IL4 es menor que el límite de detección de los citómetros disponibles (Murtaugh *et al.*, 2009). La determinación de los niveles de ARNm mediante retrotranscripción y PCR cuantitativa (Q-QPCR) es una alternativa a la determinación de los niveles de proteínas mediante ELISA, siendo incluso más sensible que ella. La Q-PCR es una técnica muy específica, sensible y ventajosa para cuantificar la expresión génica por ARNm cuando se dispone de poca cantidad de tejido para el estudio (Murphy *et al.*, 1990; Noonan *et al.*, 1990; Horikoshi *et al.*, 1992; Bustin 2002; Rioja *et al.*, 2004; De Boever *et al.*, 2008). Además, esta técnica permite en su variante múltiple-Q-PCR cuantificar la expresión de diferentes ARNm a la vez (Dozois *et al.*, 1997). La sensibilidad de la técnica ELISA en ocasiones no es suficiente para detectar los niveles de citocinas en los sobrenadantes de muestras biológicas (Rioja *et al.*, 2004). Por estos motivos, la PCR se ha convertido en el método más usado para el estudio de los patrones de expresión de ARNm (Orlando *et al.*, 1998).

El uso de poblaciones específicas de células tiene cómo ventaja que el perfil de expresión génica que se obtiene no está enmascarado por la presencia de otras células. Así, la obtención de las PBMC de la sangre o de los nódulos linfáticos mediante gradiente ficoll permite un análisis detallado de lo que ocurre en el sistema inmune sin

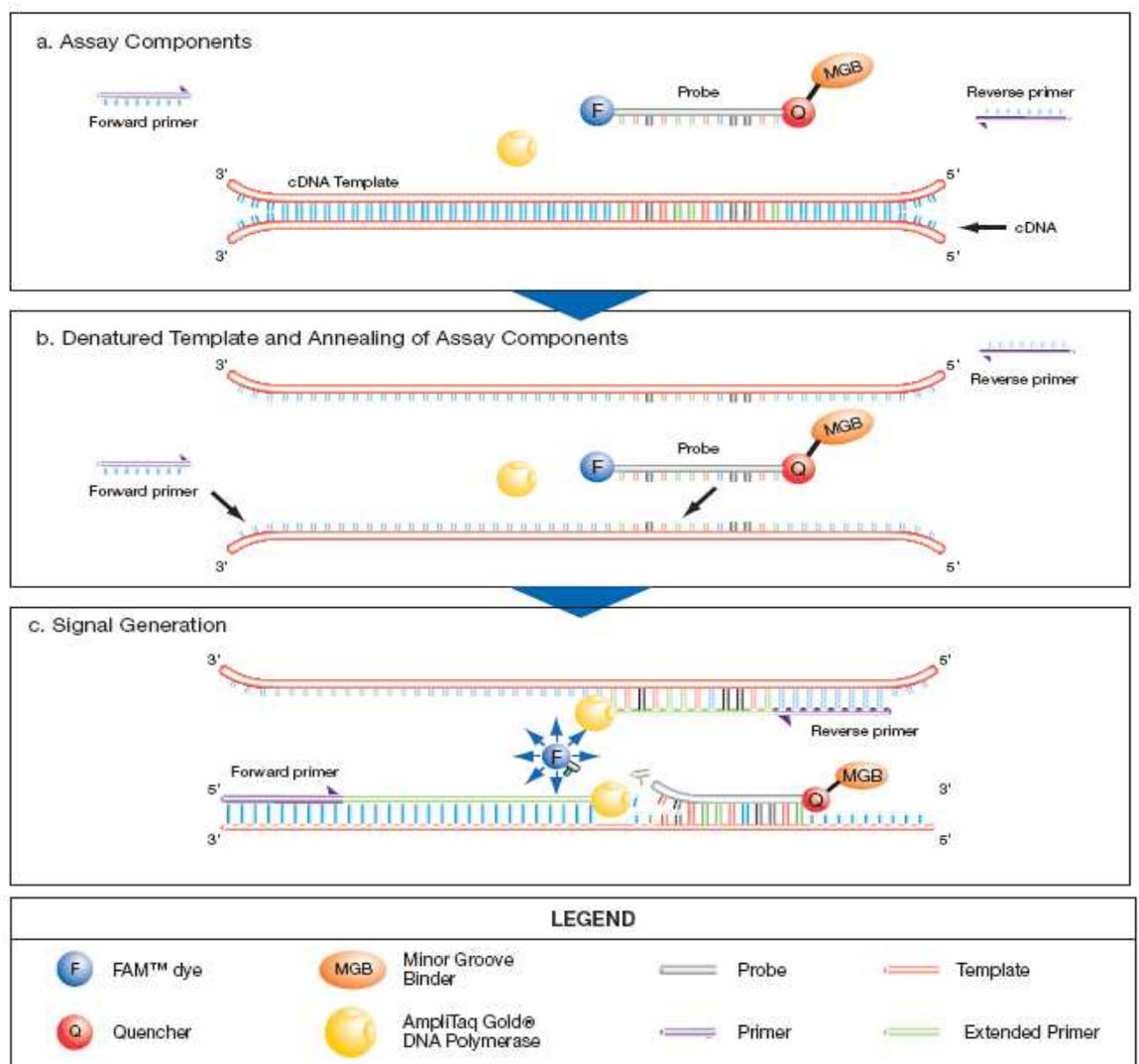
resultar enmascarado por otras células presentes en la sangre o en los nódulos linfáticos. Este hecho es de gran importancia pues se ha comprobado como el perfil obtenido de expresión génica en tumores es diferente si se biopsia por microdissección o tomando todo el tumor entero (Sugiyama *et al.*, 2002).

En la Q-PCR es generalizado el uso de polimerasas termoestables que requieren activación por calor previamente a la reacción de PCR. Esta temperatura elevada de activación favorece la generación de productos de PCR específicos. La Q-PCR monitoriza el progreso de la PCR durante todo el proceso. En la Q-PCR suelen fusionarse los pasos de hibridación y extensión. Por tanto, sólo se describen dos pasos en cada ciclo: desnaturalización de las dobles cadenas y un solo paso de hibridación-extensión. En la Q-PCR cada reacción se caracteriza por el ciclo en el que se alcanza una fluorescencia umbral. Al ciclo de la PCR en el que se alcanza ese umbral, se le denomina ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés cycle threshold). Este valor Ct es el que se usará en las fórmulas matemáticas para el calcular la expresión génica (Bustin, 2002).

Las sondas TAQMAN son oligonucleótidos complementarios de la secuencia que se persigue amplificar. Estas sondas llevan incorporado en el extremo 5' una molécula emisora de fluorescencia y en el extremo 3' una molécula que absorbe la fluorescencia que desprende la emisora. Cuando la polimerasa amplifica el fragmento de ADN debido a su capacidad exonucleasa 5'→3', rompe la sonda dejando separadas a la molécula emisora y a la que absorbía la fluorescencia, de esta manera en cada ciclo que se generan dos nuevas copias del fragmento a amplificar se libera una molécula

fluorescente. El aumento de fluorescencia será detectado por el lector de la máquina de PCR a tiempo real. Estas sondas presentan la ventaja de que aumentan la especificidad de la reacción, pues ya no sólo han de ser complementarios los primers sino también la sonda (figura 4).

Figura 4: Esquema que muestra a nivel molecular la generación de fluorescencia debida a la amplificación del ADN (fuente: Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, Relative Standard Curve and Comparative Ct Experiments Manual).



Existen dos modos de cuantificar la expresión génica mediante Q-PCR: cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La cuantificación absoluta requiere la elaboración de una curva estándar generada por diluciones decimales seriadas de una muestra patrón de concentración conocida. El resultado obtenido por esta técnica se expresa como número de copias del ácido nucleico en un determinado volumen o peso de tejido o medio de cultivo. La elaboración de tal muestra patrón supone en primer lugar clonar el fragmento a amplificar deseado, y una vez obtenidos millones de copias de tal fragmento, transcribirlos a ARN. La cuantificación relativa presenta la ventaja de que no es necesario la creación de la curva estándar, por lo que no hay que generar la muestra patrón de concentración conocida. La cuantificación relativa mide los cambios de la expresión del gen en estudio de forma relativa a un grupo de referencia que podría ser un grupo no tratado o la propia muestra a tiempo cero (previo al tratamiento). De esta forma, empleando fórmulas aritméticas es posible estudiar aumentos o disminuciones en la expresión de un gen bajo dos circunstancias diferentes. Estas circunstancias pueden ser, por ejemplo, animales salvajes frente knock-out, animales vacunados frente a no vacunados, animales tratados frente a no tratado, etc. Existen situaciones en las que no es necesario saber el número absoluto de moléculas de ARNm presentes en la muestra, siendo más interesante saber el cambio relativo en la expresión del gen. Es más relevante saber que tras un tratamiento determinado la expresión de un gen ha aumentado 2,5 veces que saber que el número de moléculas de ARNm ha pasado de 1000 copias a 2500 copias (Livak *et al.*, 2001).

En la cuantificación relativa es necesario definir la muestra calibradora, que es aquella muestra frente a la cual todas las demás son normalizadas. Así, en un

experimento de expresión génica de linfocitos estimulados con un mitógeno, la muestra calibradora es la muestra tomada a tiempo 0 horas. Por tanto, todos los valores de expresión génica se comparan con la expresión a tiempo 0 horas. El nivel de expresión de la muestra en estudio es finalmente referida como x veces más o menos expresión que en la muestra calibradora.

Siempre hay que normalizar la expresión del gen en estudio, empleándose para ello un control endógeno. El control endógeno es un gen que se expresa a un nivel similar en todas las muestras y cuya expresión no se ve modificada en las diferentes condiciones del experimento. El control endógeno sirve para evitar errores en la técnica debidos a la cantidad de muestra incluida en la Q-PCR, a diferencias en la eficacia de la retrotranscripción, a degradaciones ocurridas en los ácidos nucleicos o a la presencia de inhibidores de ARN. Para poder usar este método es imprescindible comprobar anteriormente que el gen en estudio y el control endógeno posean las mismas eficiencias de amplificación en la PCR. Una eficiencia del 100% significa que en cada ciclo de la PCR se crean el doble de fragmentos de amplificación de los que había en el ciclo anterior. De esta manera, en la cuantificación relativa para cada muestra se calcula el Ct para el gen objetivo y el Ct para el control endógeno.

Como control endógeno se han usado tradicionalmente genes guardianes celulares (en inglés housekeeping genes). Entre los más usados se encuentran: 18S ribosomial, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH),  $\beta$ -actina, peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina) y transferasa de fosforibosil hypoxantina (HPRT). Para cada experimento a realizar es necesario siempre comprobar que el control endógeno elegido

no modifica su expresión. Por ello, no existe ningún control endógeno válido para todos los experimentos, sino que hay que elegir siempre el mejor dependiendo de la prueba a realizar (Dheda *et al.*, 2004; Coulson *et al.*, 2008). La ciclofilina ha sido usada como control endógeno en diversos experimentos inmunológicos en el cerdo (Dozois *et al.*, 1997; Fournout *et al.*, 2000; Verfaille *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2003a; Pie *et al.*, 2004; Duvigneau *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2005; Meerts *et al.*, 2005a; Sipos *et al.*, 2005; Verfaille *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2009) y en otras especies como en humano (He *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2008), describiéndose en algunos modelos como el mejor control endógeno disponible (He *et al.*, 2008).

Puesto que la molécula efectora final es la proteína y el ARNm es sólo un paso intermedio, es interesante estudiar las correlaciones existentes entre ambos niveles. Los niveles de ARNm y su producto final tras la traducción, la proteína, no están siempre correlacionados pues existen diversos mecanismos reguladores postranscripcionales, como son el control de la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción (Dozois *et al.*, 1997). De forma general, los niveles de ARNm e interleucina se correlacionan cuando son medidos al mismo tiempo y dentro de las 24 horas de cultivo (Verfaille *et al.*, 2001). De Groot *et al.* (2005) encontraron que esta correlación dependía incluso de la edad del animal. Así, hallaron que para el IFN- $\gamma$  y para la ratio IFN- $\gamma$ /IL10 había una correlación significativa a dos semanas de edad pero no a las cinco u ocho. Los mismos autores no encontraron ninguna relación para la IL10, aunque es importante destacar que estos autores no tomaron a igual tiempo las muestras para la extracción de ARNm y las muestras para la medición de proteínas. Rioja *et al.* (2004) encontraron una correlación significativa entre los niveles de ARNm y proteína para la IL1 $\beta$  e IL6, pero

no para el TNF- $\alpha$  en un modelo de artritis reumatoide en roedores. La falta de correlación en el experimento de estos autores se debía a que los niveles de TNF- $\alpha$  eran menores que el límite inferior de detección de la ELISA, mientras que los niveles de ARNm eran detectables fidedignamente.

## 2.7 GENES DE IL4, IL5 E IL13

El gen de la IL4 en la especie porcina se encuentra en el cromosoma 2, en una región que contiene también la IL13 y, en otras especies, otras citocinas de respuesta T<sub>H2</sub> que podrían haber surgido por mecanismos de duplicación de genes (McKenzie *et al.*, 1993a). La organización génica es bastante similar a la que se observa en el ratón y humano, en el que las IL4, IL5 y IL13 se hallan en una región de 140 kilobases, en el cromosoma 11 y 5, respectivamente (figuras 5 y 6). Los genes de estas citocinas son polimórficos, presentando algunos mecanismos de regulación transcripcional independientes y otros coordinados (Koyano-Nakagawa y Arai 1996; Kelly y Locksley, 2000; Loots *et al.*, 2000; Kishikawa *et al.*, 2001; Murtaugh *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Murtaugh *et al.* (2009) sugieren que en el cerdo sea otra molécula diferente de la IL4, pero integrada en su mismo locus, la que dirija la respuesta T<sub>H2</sub>. En el ratón se conocen diferentes factores de transcripción para los genes implicados en la respuesta T<sub>H2</sub>, entre ellos se encuentran el *stat6*, *GATA-3*, *c-Maf* y *NFATs* (Agnello *et al.*, 2003). El hecho de que estas IL tengan reguladores comunes explica porque estos genes se encuentran coactivados en respuestas T<sub>H2</sub>. Las secuencias reguladoras de estas citocinas son generalmente mayores de 100 pares de bases y altamente conservadas entre los mamíferos, estimándose una identidad mayor o igual al 70% entre ellos (Li *et al.*, 1997). Loots *et al.* (2000) encontraron una secuencia reguladora localizada en la región

intergénica de la IL4 y la IL13 que controla simultáneamente a nivel transcripcional la expresión génica de IL4, IL5 e IL13. Los mismos autores sugieren que estas secuencias reguladoras están muy conservadas entre especies debido a su función biológica. Los genes de las citocinas codifican mensajes de baja abundancia en células T, habiéndose postulado que la rápida degradación observada para los ARNm de estos genes sea debida a determinadas secuencias, como la presencia de regiones ricas en AU dentro de la región 3' del ARNm que no se traduce (Shaw y Kamen 1986; Kelly *et al.*, 2000).

Figura 5: Posición de los genes de la IL13 y de la IL4 en los cromosomas (chr) del cerdo y del ratón. Las líneas gruesas indican las regiones promotoras. Los factores de transcripción en negro marcan los factores de transcripción comunes a los dos genes (Fuente: Murtaugh *et al.*, 2009).

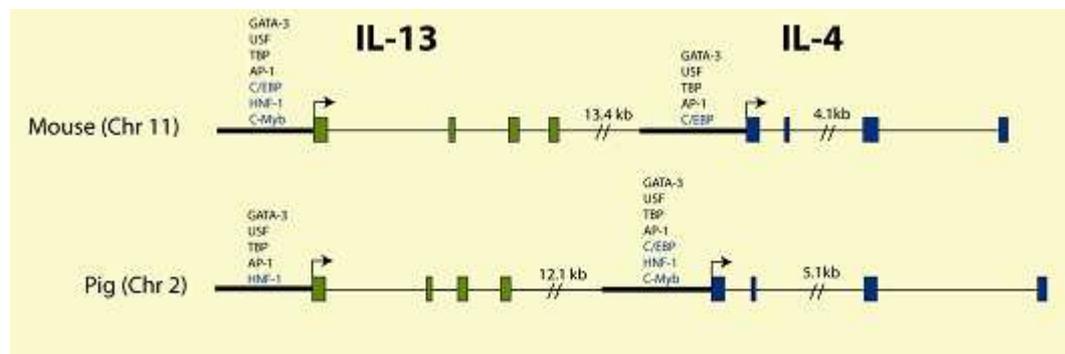
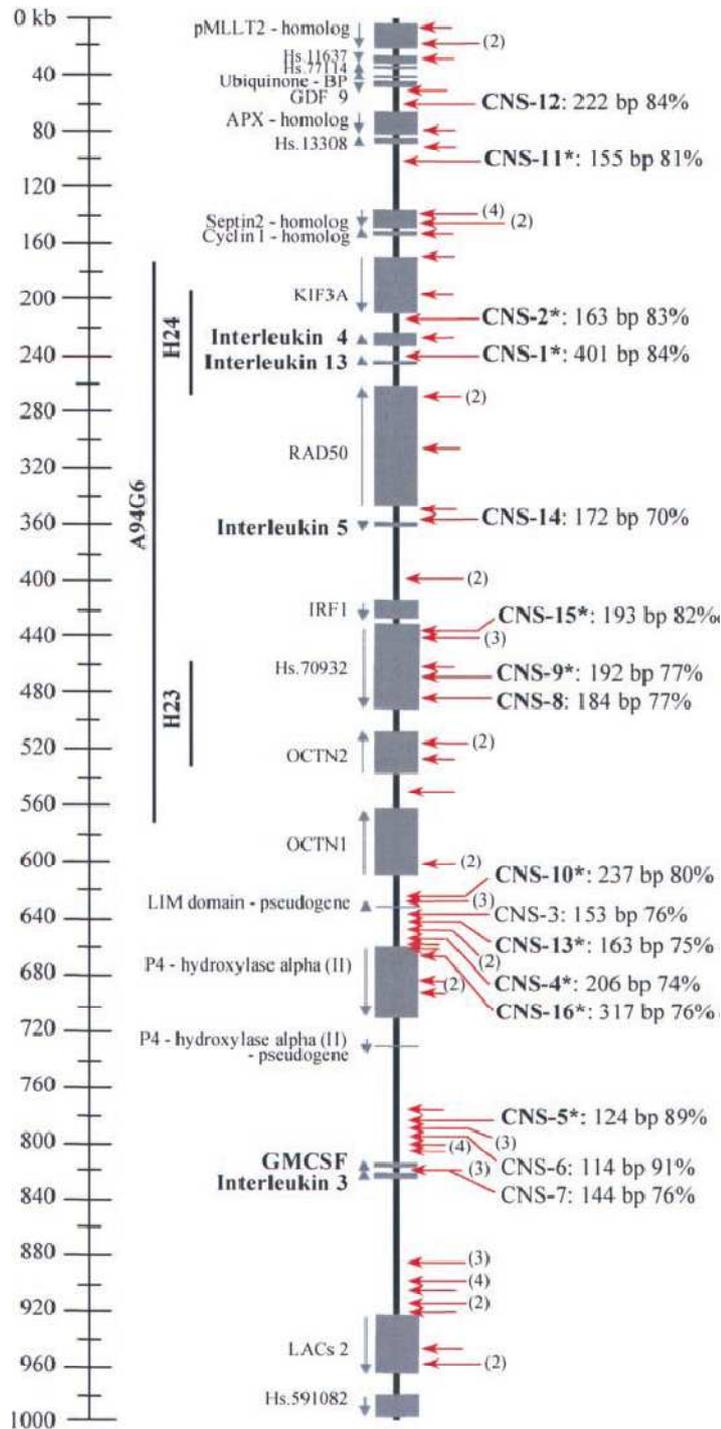


Figura 6: Mapa físico de la región cromosómica humana 5q31. Hay 23 genes representados por cajas grises en el esquema, entre los que se encuentran la IL4, IL5 e IL13. Las flechas rojas indican la posición de secuencias no codificantes conservadas (los numeros adyacentes a las flechas indican el número de estas secuencias) (Fuente: loots *et al.*, 2000).



Las secuencias codificantes de los genes de las IL4, IL5 e IL13 han sido publicadas en el National Center for Biotechnology information (NCBI), siendo sus secuencias:

**IL4:** fue descrita por Black *et al.* (2006). Su número de acceso en NCBI NM\_214123:

```
tcagtcaaa tagagctcta ttcattgggtc tcacctcecca actgatccca accctggctgcttactggc
atgtaccagc aacttcgtcc acggacacaa gtgcgacatc acctacaag

agatcatcaa aacctgaac attctcacag cgagaaagaa ctcgtgcatg gagctgcccg

tgacggacgt ctttgctgcc ccagagaaca cgacggagaa ggaaaccttc tgccgggect

cgactgtgct tcggcacatc tacagacacc acacgtgcat gaagagcctc ctgagcggac

ttgacaggaa cctgagcagc atggcaaaca tgacctgttc tgtgcatgaa gccaaagaaga

gcacttgaa agacttcttg gaaaggctaa agacgattat gaaggagaaa tactcaaagt

gttgaagctg actattttta atttatgatt ttatacact tattttaaaa atatttatat

attataact
```

**IL5:** fue descrita por Sylvin *et al.* (2000). Su número de acceso en NCBI es NM\_214205:

```
atgagaatgc ttctgcattt gagtttgcta ggtcttgag ctcctacgt tagtgccatt

gctgtagaaa ataccatgaa tagactgggtg gcagagacct tgacactgct ctccattcat

cgaactctgc tgataggcga tgggaacttg atgattcaa ctctgtaca tacaatcac

caactatgca ttgaagaagt cttcaggga atagacacgt tgaagaatca aactgcacga
```

ggggatgccg tggaaaaact attccaaaac ttgtctttaa taaaagaata tatabaccgc  
caaaaaaaaa attgtggagg ggaaagatgg agagtaacgc aattcctgga ctacttgcaa  
gttttcttg gtgtgataaa taccgagtg acaatggaaa gttaagacca aactgtcttc  
cgaagcaaaa gatttttgag gaggaaaagg atgttttac ttcaacaaga gtgaaggcaa  
ccaagggggg ggccttaatg tgcagtgtaa ttaaactca aagtcaaag

**IL13:** fue depositada por Johnson y Murtaugh en el NCBI en 2001. Su número de acceso en NCBI es NM\_213803:

ccagcctaca agtctgctcc tcaactctcc tgtgctggct ccaggctcca tggcgtctg  
gttgactctg gtcattgctc tcacctgctt tgggtggcctc gcctccccag gcctgtgcc  
tccccactct acagcctca aggagctcat tgaagagctg gtcaatatca ccagaacca  
gaagacaccc ctatgcaacg gcagcatggt gtggagcgtc aacctgacca ccagcatgca  
gtactgtgcc gcctggaat ccctcatcaa catctccgac tgcagcgcca tccaaaagac  
ccagaggatg ctgagcggcc tctgttctca caagccccca agcgagcaag ttctggcaa  
gcacatccga gacacaaaa ttgaagtggc ccagttcgta aaagacttc tcaaacattt  
aaggatgatt tttgccacg ggtagttcag atgaagcatg aaaaagagca ctgatctttg  
cagaggcagc cctttaccat ctaagatgcg gattcatttt tctccagat gtcaggaact  
cactggggag aaggagagg gggtagggg gggggtaaga tttccttagc ttgacttga  
gcctgtgctg tctgccttga gcctagccga cccagctgc cctgtgctg tgggtgccag

ggctcagctt gggggcctcc tccatccggg gctctgcgct caggggacga ggatggcatc

gccccacacg acctctcctt gccagacatg gtgaggaggc atcggettga cacgggggca

actgaggca

## 2.8 PCV2

PCV2 es un virus perteneciente a la familia *Circoviridae*, género *Circovirus*. Su genoma es ADN de cadena simple circular, posee simetría icosaédrica, no tiene envuelta y es de muy pequeño tamaño. Se han descrito tres ORF en el genoma de PCV2. El ORF1 codifica una proteína necesaria para la replicación del virus (Mankertz *et al.*, 2001), el ORF2 codifica la proteína estructural mayor del virus (Nawagitgul *et al.*, 2000) y el ORF3 codifica una proteína de la que todavía no se conoce su función principal, a pesar que se sabe que influye en la apoptosis producida por este virus (Stevenson *et al.*, 2007). No existe unanimidad entre los diferentes grupos de especialistas para clasificar a este virus al nivel siguiente de especie. Así pues, Opriessnig *et al.* (2007) sugieren que los aislados de este virus podrían dividirse en dos grupos mayores: Grupo 1 y Grupo 2. A su vez el Grupo1 se dividiría en 3 clusters (1A, 1B y 1C) y el Grupo 2 en 5 clusters (2A, 2B, 2C, 2D y 2E). Sin embargo, el Consorcio de la Unión Europea para las enfermedades asociadas a PCV2 propone la clasificación en tres genotipos: PCV-2a, PCV-2b y PCV-2c (Segalés *et al.*, 2008).

Los primeros casos de enfermedades asociadas a PCV2 se denominaron como síndrome de desmedro multisistémico postdestete (PMWS por sus siglas en inglés: postweaning multisystemic wasting syndrome). Este síndrome fue descrito por primera

vez en Canadá (Harding y Clark, 1997) y posteriormente en otros países como España y Estados Unidos (Segalés *et al.*, 1997; Kiupel *et al.*, 1998). Los criterios considerados para el diagnóstico de un caso de desmedro como PMWS están basados en los descritos por Sorden (2000): presencia de los signos clínicos típicos del síndrome (sobre todo desmedro y pérdida de peso, asociado o no a la aparición de disnea o ictericia), presencia de las lesiones microscópicas características (depleción en tejidos y órganos linfoides y/o inflamación desde linfocítica a granulomatosa en pulmón y/o tejidos linfoides y con menos frecuencia en hígado riñón, páncreas o intestino), y la presencia de genoma o antígeno vírico asociado a las lesiones (demostrado mediante hibridación *in situ* o inmunocitoquímica, respectivamente).

Años más tarde la comunidad científica observó que la enfermedad caracterizada como PMWS no cubría todas las enfermedades que PCV2 producía en la realidad clínica de las explotaciones. En 2006 la Asociación Americana de Veterinarios Especialistas en Porcino (AASV por sus siglas en inglés: American Association of Swine Veterinarians) optó por crear el término enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2 (EACP). Así, las EACP engloban los signos clínicos que pueden aparecer de forma individual o combinada: signos respiratorios, digestivos, pérdida de peso, alta mortalidad, abortos y fallos reproductivos, síndrome de dermatitis nefropatía porcino (PDNS por sus siglas en inglés: porcine dermatitis nephropathy syndrome) y epidermitis exudativa. Las EACP se clasifican en: infección sistémica (donde se encontrarían los casos diagnosticados anteriormente como PMWS), neumonía, enteritis, PDNS y fallo reproductivo asociados a PCV2 (Opriessnig *et al.*, 2007).

PCV2 es muy estable lo que facilita que los lechones se infecten en las granjas de forma temprana. La patogenia de las EACP pueden estar influenciada por diversos factores como los dependientes del virus, los dependientes del hospedador, la existencia de coinfecciones o el efecto de la modulación inmunitaria. En cuanto a los factores dependientes del virus, Fenaux *et al.* (2004) demostraron como los cambios aminoacídicos ocurridos tras realizar 120 pases del virus en cultivos celulares producían la atenuación de la virulencia en la infección *in vivo*. También se ha demostrado como cepas que comparten el 98.9% de la secuencia genética tienen diferente virulencia al considerar la carga viral en sangre y tejidos o el grado de las lesiones histológicas (Opriessnig *et al.*, 2006a). Por el contrario, hay estudios que han fallado al intentar buscar diferencias en la secuencia genética de diferentes aislados víricos que poseían diferente patogenicidad, llegando a la conclusión de que las diferencias en las manifestaciones clínicas estarían inducidas por otros factores diferentes al virus (Grierson *et al.*, 2004). Asimismo, hay experiencias que demuestran cómo una cepa que circuló durante 10 años por Suecia sin causar enfermedad era capaz de inducir cuadros de infección sistémica cuando se coinfectaba con parvovirus porcino (Hasslung *et al.*, 2005).

En cuanto a los factores dependientes de hospedador se ha estudiado el efecto de la raza sobre la susceptibilidad a la enfermedad aunque con resultados confusos pues no todos los estudios llegan a la misma conclusión. Un estudio realizado *in vitro* por Meerts *et al.* (2005b) demostró como existen claras diferencias en la susceptibilidad a la infección por PCV2 de los macrófagos alveolares de cerdos híbridos convencionales. En los estudios realizados *in vivo* los resultados son dispares: ciertos estudios concluyen

que hay razas más sensibles a la infección de PCV2 como los cruces Large White/Duroc (Lopez-Soria *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2006b) mientras otros no encuentran diferencia alguna (Rose *et al.*, 2004).

La presencia de PCV2 es indispensable para el desarrollo de los signos clínicos de las EACP. Existen estudios que concluyen que para el desarrollo de la sintomatología clínica y de las lesiones asociadas a estos procesos sería necesaria la infección por PCV2 y la existencia de otros cofactores como coinfecciones con otros patógenos como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) (Harms *et al.*, 2001), parvovirus porcino (Allan *et al.*, 1999; 2000a; Krakowka *et al.*, 2000) o una estimulación del sistema inmune (Krakowka *et al.*, 2001). Contradictoriamente a los estudios anteriores, existen experiencias científicas en las que los signos de la enfermedad han podido ser reproducidos en cerdos infectados solamente con PCV2 sin la presencia de otros microorganismos patogénicos (Albina *et al.*, 2001; Bolin *et al.*, 2001) o sin la presencia de sustancias inmunoestimulantes (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002). En estos últimos estudios se testaron los animales en busca de otros importantes patógenos porcinos que fueran capaces de detonar la enfermedad sistémica asociada a PCV2, pero no se pudo encontrar ninguno. El hecho de que en los estudios donde se conseguía reproducir la enfermedad sólo con PCV2 no se encontraran otros patógenos actuando como potenciadores de la enfermedad no significa que no estuvieran presentes, pudiendo ser agentes desconocidos hasta el momento o que no se hubiesen testado. En las condiciones normales de las explotaciones porcinas la enfermedad sistémica por PCV2 suele aparecer complicada

con infecciones secundarias provocadas por patógenos oportunistas (Carrasco *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2003).

Se considera que hay un problema de EACP si se diagnostica el proceso en el 50% o más de los cerdos de una muestra representativa de una granja, junto con un aumento de la mortalidad con respecto al historial medio de la explotación. Se considera un problema esporádico de EACP si se diagnostica en menos del 50% de una muestra representativa de la granja con un aumento de la mortalidad o si las enfermedades asociadas al virus aparecen en más del 50% de la muestra sin un aumento concurrente de la mortalidad en la explotación (Opriessnig *et al.*, 2007). La infección por PCV2 no implica necesariamente el desarrollo de EACP (Opriessnig *et al.*, 2004), apareciendo las que se denominan infecciones subclínicas.

Los signos clínicos dependen del tipo de enfermedad asociada a circovirus que se presente en cada caso. Los síntomas asociados a la enfermedad sistémica engloban adelgazamiento progresivo o disminución de la ganancia media diaria, acompañado de síntomas respiratorios como tos, disnea y taquipnea en animales en la última fase de la transición y en principio o incluso a mitad de cebo (entre 5-18 semanas de vida). Otros signos son ictericia, palidez y a veces, aparición de diarrea oscura. La morbilidad puede variar desde el 5 al 50% dentro de un mismo grupo y la mortalidad puede llegar en algunos casos a ser muy elevada. Las lesiones macroscópicas se caracterizan sobre todo por un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, en pulmón aparece edema, no se colapsa al sacarlo de la cavidad torácica y algunas veces presenta áreas multifocales color marrón-rojizo bien demarcadas. También se ha descrito enteritis, aumento de

tamaño de los riñones y hepatomegalia. Las lesiones microscópicas se caracterizan por una depleción de los folículos linfoides y una inflamación granulomatosa de los tejidos linfoides (nódulos linfáticos, timo, bazo, placas de Peyer y tonsilas), hígado, bazo, páncreas y algunos otros órganos como corazón, timo, cerebro y testículo. Ocasionalmente pueden verse sincitios en los tejidos linfoides y los macrófagos de áreas B-dependientes pueden contener cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de tamaño variable. Las lesiones en pulmón se caracterizan por una neumonía intersticial linfohistiocítica y una infiltración de macrófagos en el tejido linfoide asociado a los bronquios que varía de multifocal a difusa. Otras lesiones asociadas son infiltrados linfocíticos o linfohistiocíticos a nivel del intersticio renal, hepatitis periportal con células mononucleares y atrofia de vellosidades intestinales (Rosell *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2000).

En los casos de neumonía asociada a PCV2, el virus entra a formar parte de los patógenos implicados en el complejo respiratorio porcino (CRP). El CRP es la manifestación clínica resultante de la acción conjunta de varios agentes patógenos, asociada a deficiencias en las condiciones ambientales y estrategias de manejo inadecuadas. La etiología del proceso varía en el tiempo y dentro de cada sistema de producción. En la mayoría de ocasiones, suelen estar implicados uno o dos virus, *M. hyopneumoniae* y varias especies de bacterias oportunistas (Halbur, 1998).

Las afecciones entéricas asociadas a PCV2 ocurren generalmente durante la fase de engorde. Los síntomas diarreicos que se observan son consecuencia de una ileítis subaguda o crónica. Las coinfecciones que acompañan al PCV2 a nivel intestinal son

variadas: *Chlamydia* (Carrasco *et al.*, 2000), *Lawsonia intracellularis* (Segalés *et al.*, 2001), *Cryptosporidium parvum* (Nuñez *et al.*, 2003) y virus de la diarrea epidémica porcina (Jung *et al.*, 2006).

Los animales afectados de PDNS presentan fiebre, letargia, lesiones renales caracterizadas por un aumento de tamaño del órgano junto con la presencia de hemorragias petequiales y lesiones cutáneas de color rojo-púrpura en flancos, abdomen y extremidades que van confluyendo. Los animales enfermos generalmente acaban muriendo. Se ha demostrado que los cerdos con PDNS presentan títulos de anticuerpos frente a PCV2 mucho mayores que los cerdos no afectados (Wellenberg *et al.*, 2004). Las lesiones microscópicas características de vasculitis necrotizante en piel y glomerulonefritis fibrinosa en riñón son sugestivas de una reacción inmune de hipersensibilidad tipo 3 con depósito de complejos antígeno-anticuerpo en los diferentes tejidos. Además de PCV2, otros virus como el virus PRRS (Thibault *et al.*, 1998; Choi y Chae, 2001) y bacterias como *P. multocida* (Lainson *et al.*, 2002) se han propuesto como posibles causas del PDNS.

El fallo reproductivo asociado a PCV2 se caracteriza por el aumento de abortos, nacidos muertos, momificados y de la mortalidad predestete. Los lechones muertos presentan miocarditis asociada a una gran cantidad de antígeno de PCV2, lo que demuestra la transmisión vertical del virus. También se ha encontrado antígeno de PCV2 en el hígado, pulmones y riñones de los fetos abortados (West *et al.*, 1999; O'Connor, 2001). Las cerdas afectadas por este tipo de problema suelen ser cerdas

jóvenes o integradas en granjas relativamente jóvenes y por tanto, no estabilizadas inmunitariamente.

A PCV2 también se le considera como agente etiológico de temblores congénitos en lechones que se manifiestan como contracciones clónicas de los músculos esqueléticos que suelen resolverse a la edad de cuatro semanas de vida (Stevenson *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002).

### ***2.8.1 Efecto inmunomodulador de PCV2***

Los animales infectados por PCV2 y que padecen PMWS sufren una alteración del sistema inmune, caracterizada por disminución de células dendríticas foliculares, células interdigitantes, linfocitos B, linfocitos T (afectando principalmente a los linfocitos CD4<sup>+</sup>) y aumento de macrófagos en tejidos linfoides (Rosell *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2000; Sarli *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2003). Existe relación directa entre la cantidad de antígeno o genoma viral en el tejido y la gravedad de la depleción linfoide producida (Darwich *et al.*, 2002). Los animales afectados, a pesar de que tienen un número total de leucocitos en sangre normal, presentan linfopenia, monocitosis y neutrofilia (Segalés *et al.*, 2000). La linfopenia afecta a las subpoblaciones de células plasmáticas, linfocitos CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y a las células doble positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Hay que señalar que la disminución de las células CD4<sup>+</sup> también se observa en animales en animales desmedrados por otras causas, por lo que no se puede atribuir a la acción exclusiva de PCV2 (Darwich *et al.*, 2002). Esta alteración de los tejidos linfoides junto al hecho de que los animales afectados de PMWS suelen

padecer infecciones secundarias, indican que los animales que padecen la enfermedad tienen seriamente dañado el sistema inmune (Darwich *et al.*, 2004). Vincent *et al.* (2005; 2007) demostraron que la infección de las células dendríticas por PCV2 ni inhibe su diferenciación ni afecta a su capacidad de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T. Sin embargo, si es capaz de inhibir la síntesis de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por parte de las células dendríticas ante señales de peligro como son los CpG-ODN. Este hecho afecta a la capacidad de reconocer y dar respuesta ante las señales de peligro por presencia de virus y bacterias, favoreciendo las infecciones secundarias.

Los animales afectados de PMWS tienen un patrón de expresión de citocinas modificado. En el timo se produce una sobreexpresión de ARNm de IL10 y en las tonsilas la molecula sobreexpresada es IFN- $\gamma$ . La sobreexpresión de IL10 se ha asociado a depleción linfoide y atrofia del timo. Asimismo, los animales desmedrados poseen una expresión reducida de ARNm de IL2 en el bazo, IL4 en las tonsilas y de IFN- $\gamma$ , IL10 e IL4 en los nódulos linfáticos inguinales superficiales (Darwich *et al.*, 2003a). Además, el virus es capaz de alterar *in vitro* la funcionalidad de las PBMC tanto en animales sanos como afectados de PMWS. Este virus altera el patrón de producción de citocinas de las PBMC, así los animales afectados de PMWS presentan una capacidad reducida, llegando incluso a estar inhibida, para producir IL4, IL2 o IFN- $\gamma$  (Darwich *et al.*, 2003b).

Kekarainen *et al.* (2008) estudiaron el efecto de los diferentes componentes de PCV2 en la modulación de la respuesta inmune ejercida por el virus sobre las PBMC y las células dendríticas derivadas de la médula ósea. Para ello, se evaluó por separado el

efecto ejercido por el propio virus, por partículas semejantes a virus (VLP del inglés viral like particles) y por CpG-ODN. Los resultados indicaron que los distintos elementos virales alteran de diferente manera la síntesis de citocinas dependiendo de la población celular. Así, el virus era capaz de estimular a las PBMC a producir IL10, sin embargo este efecto no era producido por los CpG-ODNs o las VLP. La síntesis de IFN- $\gamma$  e IL2 tras la estimulación por rellamada de antígenos estaba reducida por el virus y los CpG-ODN, no viéndose afectada por las VLP. El virus y los CpG-ODN eran capaces de inhibir en las células dendríticas la secreción de IFN- $\alpha$ , no teniendo el mismo efecto las VLP. Finalmente, también detectaron que el virus y las VLP estimulaban la producción de IL12. Por tanto, este virus es capaz de afectar la producción de citocinas propias de las respuestas inmunes innata y adquirida.

### ***2.8.2 Situación actual respecto a PCV2***

La situación inicial del PCV2 en Europa fue epidémica, registrándose mortalidades del 30 al 40%. En la actualidad se trata de una infección endémica, habiendo aumentado los niveles de mortalidad media un 3-4% con respecto a la situación anterior a la aparición de las EACV. Esto deja en las explotaciones porcinas actuales el margen superior de mortalidad en torno al 10%. La estabilización de las granjas de madres ha favorecido la transmisión de inmunidad a sus lechones, los cuales quedan protegidos en las fases tempranas de vida. Esto ha hecho que la edad de infección de los cerdos se haya retrasado, lo que ha llevado a una disminución de la mortalidad probablemente asociada a un efecto de la edad (Burch, 2008). Las pérdidas producidas por estas enfermedades en Europa se calculan entre 562 y 900 millones de € cada año (Tucker y Donadeu, 2006). Pero no cabe descartar la posibilidad de que la

enfermedad vuelva a reemerger como epidemia al introducirse nuevas cepas en las explotaciones.

### ***2.8.3 Estrategias de lucha frente a PCV2***

Existen dos estrategias para la lucha frente a las EACP: la vacunación de las madres con la consiguiente transferencia de inmunidad pasiva a los neonatos y la vacunación de los lechones a una edad temprana antes de que se produzca la infección. Existen en Europa cuatro vacunas comerciales frente a PCV2, siendo la vacuna de Merial: Circovac<sup>®</sup> la primera en aprobarse su uso (septiembre de 2007). Esta vacuna está diseñada para ser usada madres y su composición es de virus inactivados adyuvantados por aceite mineral. Las otras tres vacunas existentes se basan en el hallazgo de que la inmunidad generada frente al ORF2 del virus es protectora (Fan *et al.*, 2007). Así, las vacunas Ingelvac CircoFlex<sup>®</sup> (Boehringer Ingelheim, Alemania) y Porcilis<sup>®</sup> PCV2 (Intervet/Schering-Plough, Holanda) son antígenos del ORF2 de la cápside vírica. Para su producción se ha insertado el gen del ORF2 en un baculovirus de plantas. La vacuna Suvaxyn<sup>®</sup> PCV2 One Dose (Fort Dodge, EEUU) es una vacuna quimérica, creada insertando en el genoma de PCV1 (que no es patogénico) el ORF2 de PCV2. Posteriormente este virus recombinante es inactivado.

La tabla 1 refleja las ventajas e inconvenientes que supone la vacunación de las madres o de los lechones.

Tabla 1: Ventajas y desventajas de la vacunación de cerdas o lechones (adaptado de Ramis y Joisel, 2008)

Vacunación cerdas		Vacunación lechones	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Homogeneización de inmunidad en colectivo reproductor	Necesidad de encalostramiento adecuado	Acción directa sobre los lechones	Mayor mano de obra
Estabilización de la granja	Retraso en la aparición de efectos beneficiosos hasta el nacimiento de las camadas de cerdas vacunadas y revacunadas	Rapidez de actuación	Estrés de los lechones
Reducción de la mano de obra		La vacunación funciona aunque el sistema inmune esté ligeramente dañado	A veces no es lo suficientemente precoz
Reducción de los costes			
Protección muy precoz			

En Europa, las pruebas de campo de vacunación realizadas concluyen que se produce descenso de la mortalidad en los distintos períodos productivos: lactación, transición y cebo. Además de esta disminución en la mortalidad, los animales enviados a matadero eran más homogéneos, tenían mayor ganancia media diaria y requerían de menos gastos de medicamentos (Ramis y Joisel 2008).

Las limitaciones observadas en las respuestas inmunes de los neonatos se deben a deficiencias intrínsecas de los linfocitos B y T jóvenes, además de las APC (Siegrist,

2001). Es por ello que la vacunación de las madres se plantea como una estrategia útil para la generación de inmunidad humoral y celular pasiva en los recién nacidos.

Los neonatos son más sensibles que los animales adultos a las enfermedades infecciosas. Este hecho es debido a la falta de madurez y capacidad funcional del sistema inmune, unido a su susceptibilidad a las señales tolerogénicas de los neonatos (Barrios *et al.*, 1996; Siegrist, 2001; Holt y Rowe, 2003). Esto implica que el período posterior al nacimiento sea crítico para la supervivencia del neonato. La falta de eficacia del sistema inmune del neonato junto al hecho de que la vacunación de los lechones puede detonar un brote de PMWS (krakowka *et al.*, 2001; Grasland *et al.*, 2005), plantean la vacunación de las madres como el tipo de vacunación más aconsejada para evitar los problemas de PMWS (Pravieux *et al.*, 2007). Este planteamiento se comprobó vacunando a las madres y evaluando el efecto de la inmunidad pasiva transferida a los lechones. Los lechones nacidos de madres vacunadas tenían menor carga viral en los nódulos linfáticos, suero y heces, menos lesiones, menor sintomatología clínica y menor mortalidad que los lechones nacidos de madres sin vacunar. Incluso la mortalidad en cebadero fue menor para los animales que provenían de madres vacunadas, indicando que la inmunidad pasiva transferida frente al PCV2 es de larga duración (Pravieux *et al.*, 2007).



# ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***



### 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL: ANIMALES Y PROTOCOLOS VACUNALES

#### *3.1.1 Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2*

Se utilizaron 10 cerdos de raza Large White de 10 semanas de edad libres de patógenos específicos (SPF). Los cerdos se asignaron aleatoriamente a dos grupos: vacunado (n=5) y control no vacunado (n=5). Los animales del primer grupo se vacunaron el día 0 del experimento con Circovac<sup>®</sup> (Merial, Francia). Cada vacunación se realizó con una dosis de 2 ml vía intramuscular en la región del cuello. Estos 2 ml contenían PCV2 inactivado  $\geq 2,1 \log_{10}$  unidades ELISA, 0.20 mg de tiomersal como excipiente y de 494 a 501 mg de parafina líquida como adyuvante. Los animales se revacunaron el día 21 del experimento. Se tomaron dos tipos de muestras: sangre y nódulos linfáticos retrofaríngeos. La sangre fue obtenida de la vena yugular mediante tubos con heparina sódica y agujas desechables 1,2 x 38 mm (Vacutainer, Becton, Dickinson & Co., RU) los días 0, 21 y 28 del experimento. Los animales del grupo vacunado se sacrificaron el día 29 del experimento mediante una sobredosis de pentobarbital en el seno oftálmico previa sedación con ketamina i.v (5 mg/kg). Posteriormente se exanguinaron mediante corte del plexo braquial. Se obtuvieron los nódulos linfáticos retrofaríngeos porque son los que drenan la región del cuello, zona donde se inyectó la vacuna. Los cerdos del grupo control no se sacrificaron porque estaban siendo empleados simultáneamente como controles de otro experimento

**3.1.2 Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a PCV2**

Se emplearon tres grupos de cerdos de la raza Large White. Cada grupo estaba constituido por cinco lechones de un mes de edad procedentes de diferentes madres para evitar en la medida de lo posible el efecto camada.

El protocolo de vacunación de madres fue el recomendado por el fabricante: dos dosis de Circovac<sup>®</sup> a las primíparas y una dosis a las multíparas al menos dos semanas antes del parto. A los lechones se les vacunó a las dos semanas de edad con 2 ml de Circovac<sup>®</sup>.

A cada uno de los cerdos se les tomó a las cuatro semanas de edad una muestra de sangre de la vena yugular mediante tubos con heparina sódica y agujas desechables 1,2 x 38 mm (Vacutainer, Becton, Dickinson & Co., RU). La constitución de los grupos fue como aparece en la tabla 2.

Tabla 2. Características de vacunación de los grupos de animales del segundo experimento.

	Nº de lechones y edad	Madre vacunada	Lechones vacunados
<b>Grupo 1</b>	5 lechones de un mes	Sí	Sí
<b>Grupo 2</b>	5 lechones de un mes	Sí	No
<b>Grupo 3</b>	5 lechones de un mes	No	No

### **3.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE LA SANGRE Y NÓDULOS LINFÁTICOS**

La sangre recogida en tubos heparinizados se transportó al laboratorio la misma mañana de la extracción. Trabajando siempre en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar, se depositaron 8 ml de sangre sobre 5 ml de ficoll (Pancoll density 1,077 g/ml; Panbiotech GmbH; Alemania) y se procedió a la centrifugación a 1100 g durante 30 min a 20°C sin freno. El anillo celular que se formó sobre la capa de ficoll se recogió por aspiración y se depositó en un nuevo tubo. Se realizaron tres lavados con PBS. Se contaron las células mediante una cámara de Neubauer y se cultivaron en RPMI completo (compuesto por RPMI 1640, penicilina a 50 unidades/ml, estreptomicina a 50µg/ml, β-mercaptoethanol al 0.01% y suero fetal de ternero al 10%) a 37° C en atmosfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. La cantidad de células establecida por pocillo fue de 2,5 millones y el volumen por pocillo de 1 ml.

Para la obtención de las células mononucleares de los nódulos linfáticos de los animales vacunados y revacunados frente a PCV2, se retiró la grasa de los mismos, se cortaron en fragmentos más pequeños y se introdujeron en bolsas de plástico estériles con filtro que sólo permitían el paso de células. El contenido de las bolsas se homogeneizó en un Stomacker (Lab-Blender, Italia) en dos sesiones consecutivas, empleando en cada una de ellas 7 ml de PBS estéril. El PBS con las células se transfirió a tubos de 15 ml para ser centrifugado a 400g durante 10 min a una temperatura de 20°C. Las células se contaron mediante una cámara de Neubauer y se cultivaron en

placas en RPMI completo a una concentración de 2,5 millones por pocillo en un volumen total de 1 ml.

Las células de cada animal se cultivaron bajo tres circunstancias diferentes:

1- Estimulación con péptidos antigénicos del ORF2 de PCV2 a una concentración de 1 µg/ml.

2- Estimulación con péptidos del gen temprano inmediato del Herpes Virus Equino (EHV) a una concentración de 1 µg/ml.

3- Condición de no activación: el medio de cultivo estaba compuesto únicamente por RPMI completo.

En el experimento en que se midió la expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2, se realizó una cinética de expresión, de manera que se recogieron las células a diferentes puntos de tiempo. La muestra a 0 horas fue tomada siempre y utilizada como calibradora para la expresión génica. Para la estimulación con PCV2 se tomaron, además del día 0, muestras a las 2 y 24 horas, del día 21 a las 2, 12 y 24 horas y del día 28 a las 2, 12, 24 y 48 horas. Para la estimulación con EHV se tomaron muestras los días 0, 21 y 28 a las 24 horas y para las

células cultivadas sin sustancias estimulantes se tomaron muestras el día 28 a las 24 horas.

En el experimento en que se midió la expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a PCV2 se recogieron las células a diferentes puntos de tiempo. Para los cultivos que se estimularon con PCV2 o aquellos a los que no se les añadió ninguna sustancia estimulante, se tomaron las células a las 12 y 24 horas. Para las células cultivadas con EHV se recogieron las células a las 24 horas.

Para la obtención de las células se homogeneizaron los pocillos por pipeteo, se transfirió todo el volumen a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 1400 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a -80° C para posteriores estudios sobre la correlación de la expresión génica y el nivel de proteína por ELISA. El pellet de células se lavó en PBS y centrifugó a 1400 rpm durante 5 min. El PBS se eliminó y el pellet de células se guardó a -80° C hasta el momento de la extracción del ARN.

### **3.3 EXTRACCIÓN ARN**

Se empleó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, EEUU) que permite extraer hasta 100 µg de ARN. La tecnología de este kit utiliza columnas con membranas basadas en sílica y la fuerza de la centrifugación, extrayendo las moléculas de ARN mayores a 200 nucleótidos. Con este procedimiento se consigue purificar los ARNm pues se excluyen muchos de los ARN menores a 200 nucleótidos que engloban a los ARN ribosómico (ARNr) 5,8 S, ARNr 5 S y a los ARN de transferencia, que en total suponen un 15-20 %

del total del ARN. Los tampones con alta concentración de sales empleados permiten que el ARN mayor de 200 nucleótidos se adhiera a la membrana de sílica. El tampón RLT empleado contiene guanidina-tiocianato que facilita la lisis de la muestra, su homogeneización y la inactivación de las RNAsas. La temperatura a la que se realizó la extracción fue de 20 a 25° C. La utilidad de este kit para la extracción de ARNm se ha demostrado previamente por otros investigadores (Bureau *et al.*, 2008; Taglinger *et al.*, 2008). El protocolo que se empleó fue el siguiente:

- Descongelación del pellet de células en hielo.
  
- Adición de 350 µl de tampón RLT suplementado con β-mercaptoetanol al 1 %. Homogeneizado con vórtice y centrifugado.
  
- Pipeteado del lisado en una columna QIAshredder (Qiagen, EEUU) colocada en tubo de recolección. Centrifugación a velocidad máxima durante dos minutos.
  
- Adición de 350 µl de etanol al 70 %. Mezclado por pipeteo y transferencia a las columnas RNeasy insertadas en tubos de recolección de 2 ml. Centrifugación a 10000 g durante 15 seg y eliminación del líquido que atraviesa la membrana.
  
- Adición de 700 µl de tampón RW1. Centrifugación a 10000 g durante 15 seg y eliminación del líquido que atraviesa la membrana.

- Adición de 500  $\mu$ l de tampón RPE. Centrifugación a 10000 g durante 15 seg y eliminación del líquido que atraviesa la membrana.
  
- Adición de 500  $\mu$ l de tampón RPE. Centrifugación a 10000 g durante 2 min y eliminación del líquido que atraviesa la membrana.
  
- Colocación de la columna RNeasy en un nuevo tubo de recolección y centrifugación durante un minuto a la velocidad máxima para eliminar todo el etanol que pudiera quedar.
  
- Colocación de la columna RNeasy en un nuevo tubo de 1,5 ml y adición de 50  $\mu$ l de agua de grado biología molecular libre de ARNasas. Centrifugación durante 1 min a 10000 g y eliminación de la columna.

Para comprobar que la extracción de ARN era homogénea dentro de la misma sesión y entre diferentes sesiones se cuantificaron los extraídos de ARN mediante tecnología de fluorescencia usando el Qubit Quantitation Platform (Invitrogen, RU).

### **3.4 DESTRUCCIÓN DEL ADN GENÓMICO**

Para eliminar todo el ADN genómico (ADNg) presente en la muestra de ARN extraído se utilizó el kit Turbo DNA Free (Ambion, EEUU). Este kit elimina tanto el ADN presente como los cationes divalentes como calcio y magnesio que catalizan la degradación del ARN cuando la muestra es calentada. Este paso fue empleado ya que a

pesar de que el kit empleado para la retrotranscripción incluía un reactivo para eliminar el ADN, éste no era eliminado completamente. El protocolo empleado fue:

- Adición de 50 µl de tampón de la Turbo ADNasa.
- Homogeneizado mediante vórtice y centrifugado rápido.
- Adición de 1 µl de ADNasa.
- Homogeneizado mediante vórtice y centrifugado rápido.
- Incubación a 37° C durante 30 min.
- Adición de 5 µl de reactivo de inactivación de ADNasa.

Incubación durante 2 minutos homogeneizando mediante vórtice cada 20 segundos.

- Centrifugación a 10000 g durante 2 minutos.
- Recolección de 45 µl del ARN libre de ADNg sin tocar el pellet formado en el fondo.

En primer lugar se probó a realizar la PCR a tiempo real sin emplear el kit Turbo DNA Free ya que el kit empleado en la retrotranscripción ya incluye un tampón de destrucción de ADNg. Para asegurar que la señal de fluorescencia detectada en el termociclador de tiempo real se originaba por la amplificación del ARN mensajero y no

por la del ADN genómico residual que pudiera haber sido extraído, se incluyó un control de retrotranscripción negativo. Este control de retrotranscripción negativo contenía todos los elementos de retrotranscripción a excepción de la enzima retrotranscriptasa.

### **3.5 RETROTRANSCRIPCIÓN**

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se empleó el Kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Alemania). El paso de la retrotranscripción es crítico para conseguir una cuantificación sensible y precisa de la expresión génica (Bustin, 2002). El kit empleado incluye:

- Tampón de destrucción de ADNg: elimina el ADNg.
- Transcriptasa inversa “quantiscript”: es una mezcla optimizada de enzimas retrotranscriptasas y un inhibidor de ARNasas. Estas enzimas están optimizadas para la síntesis sensible y eficiente de ADNc a partir de 10 pg hasta 1 µg de ARN.
- Tampón RT “quantiscript”: es un tampón optimizado para la retrotranscripción que ya contiene desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).
- Mezcla de primers RT: es una mezcla de oligo-dT y de primers aleatorios disueltos en agua.

El empleo del kit consta de dos pasos, en primer lugar tiene lugar la eliminación del ADNg y finalmente la transcripción inversa.

**Eliminación del ADN.** Se empleó el siguiente protocolo:

- Adición a un tubo de 0,2 ml de 3  $\mu$ l de tampón de destrucción de ADNg y de 9  $\mu$ l de agua de grado biología molecular.
  
- Homogeneizado mediante vórtice y centrifugado breve.
  
- Adición de 9  $\mu$ l de ARN (ya tratado previamente con el kit Ambion turbo DNA Free) al tubo de 0,2 ml.
  
- Homogeneizado mediante vórtice y centrifugado breve.
  
- Incubación a 42° C durante 2 min. Las muestras eran mantenidas en hielo inmediatamente después de esta incubación.

**Transcripción inversa.** Se siguió el siguiente protocolo:

- Adición al tubo de 0.2 ml de:
  - o 1,5  $\mu$ l de transcriptasa inversa “quantiscript”.
  - o 6  $\mu$ l tampón RT “quantiscript”.
  - o 1,5  $\mu$ l mezcla de primers RT.
  
- Homogeneizado mediante vórtice y centrifugado breve.

- Incubación a 42° C durante 15 min.
- Incubación a 95° C durante 3 min.
- Almacenamiento del ADNc a -20° C.

Para optimizar la eficiencia de la PCR se probaron tres cantidades diferentes de ARN a incluir en la retrotranscripción: 18 µl, 9 µl y 4,5 µl.

### **3.6 Q-PCR Y EXPRESIÓN GÉNICA**

Los primers y sondas empleados para la amplificación de la IL4, IL5, IL13 y ciclofilina fueron los publicados por el Servicio de Investigación de Agricultura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (<http://199.133.11.115/fmi/iwp/cgi?-db=PINdb&-loadframes>) y validados por Dawson *et al.* (2005) y Flores-Mendoza *et al.* (2008). Los primers estaban diseñados en la región de empalme de dos exones para amplificar sólo el ARNm y no el ADNg (figura 7). Sus secuencias se muestran en la tabla 3. Se probaron diferentes concentraciones de primers y sondas para optimizar las eficiencias de las distintas Q-PCR. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Tib-molbiol (Alemania). Todas las sondas fueron marcadas con el fluorocromo FAM.

Figura 7: Esquema que muestra como los primers diseñados en la unión de dos exones no amplificarían el ADN cuando todavía existen intrones (fuente: Qiagen® PCR and RT-PCR Application Guide).

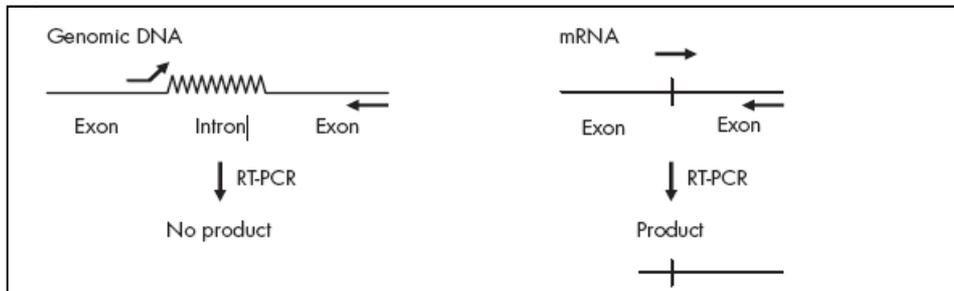


Tabla 3. Secuencias de los primers y sondas empleadas.

	Primer 1	Primer 2	Sonda	Tamaño del amplicón y situación en el gen (pdb)	Número de acceso
<b>IL 4</b>	GCCGGGCTCGACTGT	TCCGCTCAGGAGGCTCTTC	CTTCGGCACATCTACAGACACCACAG	68 (del 232 al 300)	NM_214123
<b>IL 5</b>	GACTGGTGCCAGAGACCTTGAC	CTTCAATGCATAGTTGGTGATTGT	CTGCTCTCCATTCATCGAACTCTGCTGAT	114 (del 83 al 197)	NM_214205
<b>IL 13</b>	CTGACCACCAGCATGCAGTACT	GCTGCAGTCGGAGATGTTGA	TGCCGCCCTGGAATCCCTCA	63 (del 224 al 287)	NM_213803
<b>Ciclofilina</b>	GCCATGGAGCGCTTTGG	TTATTAGATTGTCCACAGTCAGCAAT	TGATCTTCTGCTGGTCTTGCCATTCT	78 (del 425 al 503)	NM_214353

La Q-PCR se realizó con el kit Taqman gene expression master mix (Applied Biosystems, EEUU) y un termociclador a tiempo real ABI Prism<sup>®</sup> 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EEUU) en el primer experimento y un termociclador a tiempo real Lightcycler 480 (Roche, Suiza) en el segundo. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50° C 2 min, 95° C 10 min, 40 ciclos de 95° C durante 15 seg y 60° C durante 1 min. La fluorescencia se midió al final de cada ciclo. Cada muestra se analizó por duplicado para después calcular la media de los dos Ct obtenidos y hacer el cálculo de la expresión génica normalizada con un control endógeno y relativizada a la muestra calibradora mediante la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001).

El valor  $\Delta\Delta Ct$  muestra la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra en estudio (por ejemplo células estimuladas con mitógeno) y el  $\Delta Ct$  del calibrador (células no estimuladas con el mitógeno).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$$

El promedio  $\Delta Ct$  de las muestras se calcula normalizándolas frente al control endógeno. Igualmente el  $\Delta Ct$  del calibrador se calcula restándole al Ct del gen de interés (por ejemplo una citocina) el Ct del control endógeno (por ejemplo ciclofilina).

$$\Delta Ct \text{ (muestra)} = Ct \text{ gen interés (muestra)} - Ct \text{ control endógeno (muestra)}$$

$$\Delta Ct (\text{calibrador}) = Ct \text{ gen interés (calibrador)} - Ct \text{ control endógeno (calibrador)}$$

Al tratarse de una cuantificación relativa de la expresión génica es importante considerar que una expresión génica de 1 supone que dicha expresión no cambia respecto de la situación tomada como calibradora (tiempo 0 horas). Si la expresión es mayor o menor de 1, implica que hay mayor o menor expresión que a tiempo 0 horas, respectivamente. Si los resultados de expresión génica tras aplicar la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  son menores a 1, la expresión génica real se calcula haciendo la inversa de ese mismo número. Al analizar estos resultados hay que considerar que los cambios de expresión génica aquí reflejados son relativos al tiempo 0 horas de cultivo, lo que quiere decir que no reflejan la cantidad absoluta de ARNm.

Para emplear la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en la cuantificación relativa es necesario comprobar que la eficiencia de amplificación sea la misma para el gen objetivo y el control endógeno. Para comprobar la eficiencia de la PCR a tiempo real, se construyeron plásmidos para la IL4, IL5, IL13 y ciclofilina empleando el kit pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega EEUU). La eficiencia de la Q-PCR se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Eficacia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

La cuantificación relativa con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se ha usado previamente para determinar los cambios en los niveles de expresión de citocinas (Coussens *et al.*, 2004; Shirkey *et al.*, 2006; Karcher *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2009).

Una misma muestra tomada como control positivo se analizó siempre en todas las placas para comprobar el rendimiento de la Q-PCR. Esta muestra provenía de PBMC porcinas estimuladas durante 24 h con Con A. Igualmente en todas las placas se incluyó un control negativo compuesto por la master mix y agua pura como muestra. Los genes de interés (IL4, IL5 e IL13) se analizaron junto con el calibrador en la misma placa de PCR. Como gen endógeno se seleccionó la ciclofilina porque ésta ya se ha empleado previamente en diversos estudios que evaluaron la expresión génica de IL en el cerdo (Dozois *et al.*, 1997; Fournout *et al.*, 2000; Verfaille *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2003a; Pie *et al.*, 2004; Girard *et al.*, 2005; Meerts *et al.*, 2005a; Sipos *et al.*, 2005; Verfaille *et al.*, 2005) y en otras especies, describiéndose en algunos casos como el mejor control endógeno (He *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2008).

### **3.7 PCR CLÁSICA DE PCV2**

Todos los animales empleados para este estudio fueron testados para PCV2 por PCR clásica. La extracción de ADN se realizó a partir de sangre con el kit High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica de PCR se realizó según el protocolo de Harms *et al.* (2001). Los componentes y cantidades para la PCR fueron los que aparecen en la Tabla 4.

Los primers específicos para PCV2 usados fueron:

✚ Primer 1: 5'-TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTC-3'.

✚ Primer 2: 5'-ATGACGTATCCAAGGAGGCG-3'.

La región amplificada contenía 702 pares de bases.

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

✚ 94° C 5 min.

✚ 35 ciclos: 94° C 20 seg, 56° C 20 seg, 72° C 40 seg.

✚ 72° C 7 min.

Tabla 4: Componentes y cantidades utilizados para la realización de la técnica de PCR para detección de genoma de PCV2.

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua	18,875 µl
Tampón (10x, Roche Applied Science, Alemania)	2,5 µl
Desoxinucleótidos trifosfato (10 mM)	0,5 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl
Taq DNA Polimerasa (5 U/µl, Roche Applied Science, Alemania)	0,125 µl
ADN	1 µl

Volumen final por reacción 25 µl.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % teñido con bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador ETX-20 (Consort, Bélgica). Se obtuvieron imágenes mediante un sistema de fotografía digital E2051 (Consort, Bélgica).

### **3.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO**

Para estudiar si los niveles de expresión génica de las tres interleucinas seguían o no una distribución normal se utilizó un test de Kolmogorov-Smirnov. Para estudiar el efecto de la reestimulación con PCV2 en la producción de interleucinas se emplearon pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney, agrupando los datos de la siguiente manera:

#### ***3.8.1 Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2***

- Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente a grupo control a distintos días postvacunación independientemente de las horas.
- Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente a grupo control en cada hora de cada día.
- Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente a sí mismo y grupo control frente a sí mismo en cada hora de cada día.

**3.8.2 Expresión génica relativa para IL4, IL5 e IL13 en lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a PCV2**

- Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas en cada hora.
  
- Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a sí mismos en cada hora.

Los resultados se representan en cajas cuyo diagrama se construye a partir de los percentiles 25%, 50% (mediana) y 75 %. La media se representa con una cruz roja y la mediana es la línea central de la caja. Se han considerado valores atípicos aquellos que quedan fuera de los segmentos de longitud de 1,5 veces el rango intercuartílico (percentil 75% - percentil 25%). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para  $P < 0,05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.15 (SPSS Inc., EEUU).

**3.8.3 Correlaciones entre los niveles de expresión génica relativa de IL4, IL5 e IL13**

La relación entre los niveles de las distintas interleucinas se analizó mediante una correlación de Pearson. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para  $P < 0,05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.15 (SPSS Inc., EEUU).



## ***4. RESULTADOS***



#### 4.1 PCR PERFIL DE PCV2

Todos los animales utilizados en el estudio fueron negativos en suero a PCV2 por PCR clásica (figura 8).

Figura 8: Electroforesis en gel mostrando los fragmentos amplificados específicos de PCV2 de los controles positivos empleados.



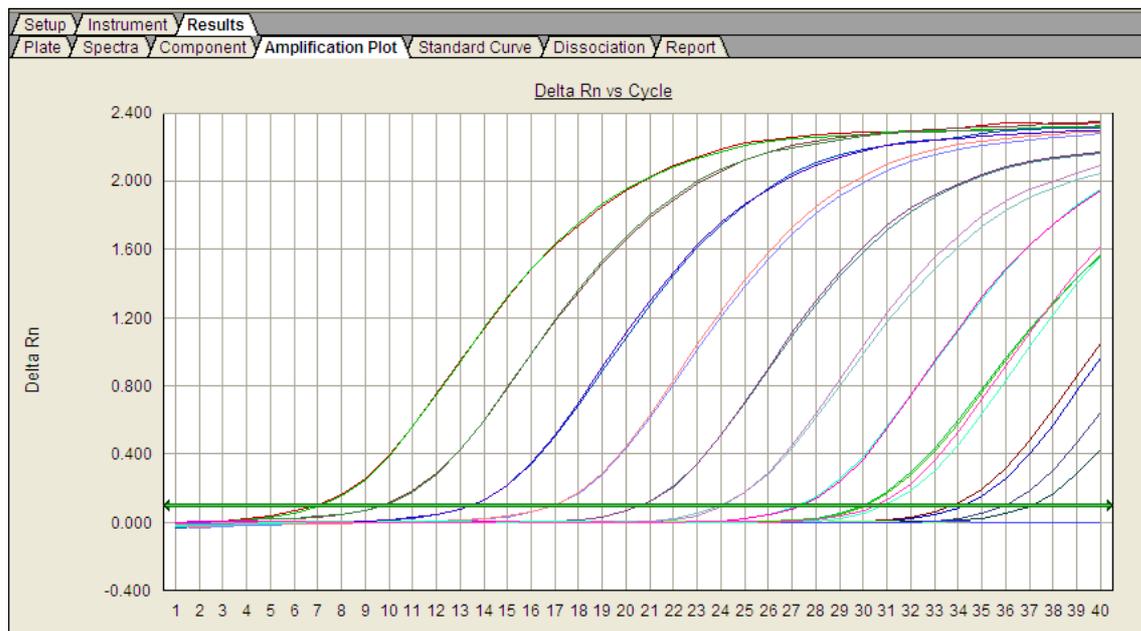
#### 4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR A TIEMPO REAL

Para la IL4, IL5 e IL13 las concentraciones de primers y sondas óptimas que rendían eficiencias mayores del 95% fueron de 300 nM para los primers y de 200 nM para la sonda. Para la ciclofilina la concentración óptima de los primers fue de 900 nM y para la sonda de 200 nM.

Las pruebas realizadas para estudiar qué cantidad de ARN incluida en la retrotranscripción rendía mejor eficiencia en la Q-PCR mostraron que la inclusión de 9  $\mu$ l produjo las mejores eficiencias para todos los amplicones. La eficiencia de amplificación se testó empleando diluciones decimales de los plásmidos construidos,

obteniendo eficiencias de amplificación del 95% (IL4 e IL13), 97% (IL5) y 96% (ciclofilina, figura 9).

Figura 9: PCR a tiempo real de diluciones decimales del plásmido que lleva insertado el fragmento del gen de ciclofilina.



Los resultados mostraron que tras la extracción del ARN, existía ADNg que interfería en la cuantificación de la expresión génica (figura 10), por lo que se decidió el empleo sistemático del kit Turbo DNA Free (figura 11).

Figura 10: Resultado de la PCR a tiempo real para la ciclofilina en la que se realizó extracción de ARN sin posterior digestión del ADN con el kit Turbo DNA Free. La línea azul es una muestra a la que se le realizó la retrotranscripción completa y la línea verde es una muestra control de retrotranscripción negativa.

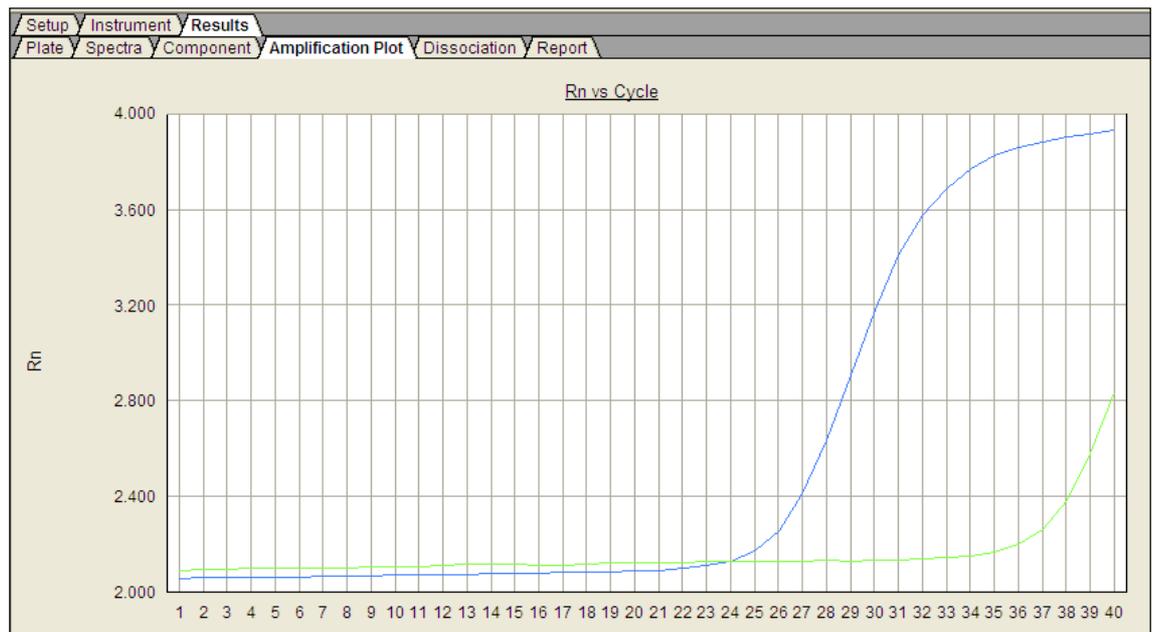
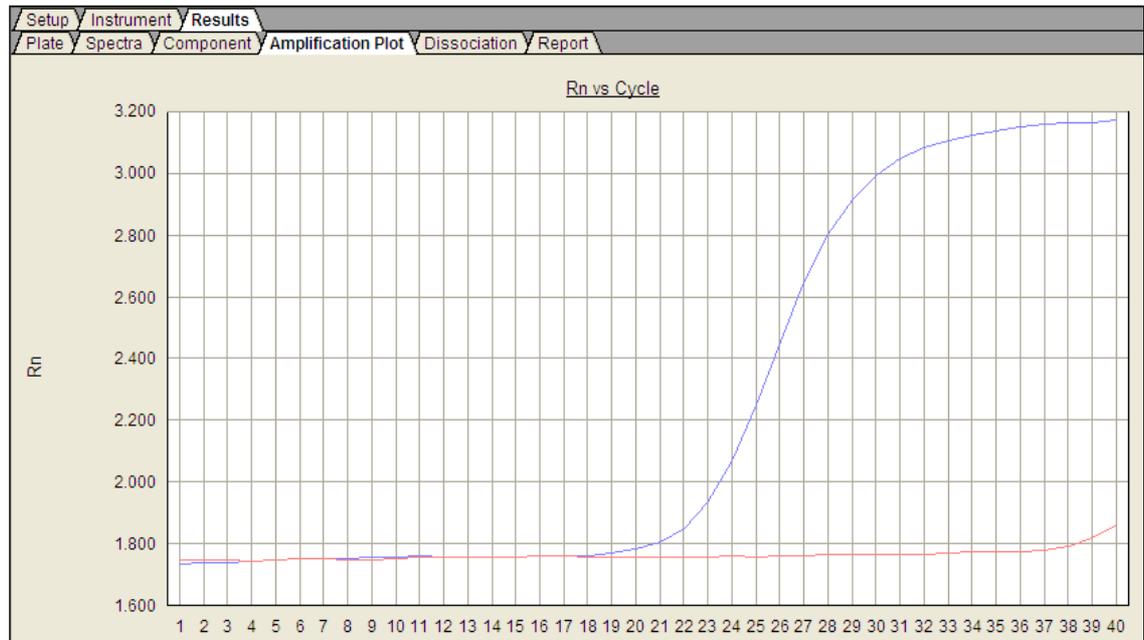


Figura 11: Resultado de la PCR a tiempo real para la ciclofilina en la que se realizó extracción de ARN con posterior digestión del ADN con el kit Turbo DNA Free. La línea azul es una muestra a la que se le realizó la retrotranscripción completa y la línea roja es una muestra control de retrotranscripción negativa.



La expresión de la ciclofilina fue siempre constante en las distintas condiciones experimentales empleadas. Todos los controles negativos de reacción y de retrotranscripción no produjeron fluorescencia en ninguna de las reacciones.

### **4.3 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA PARA IL4, IL5 E IL13 EN ANIMALES VACUNADOS CONTRA PCV2 FRENTE A ANIMALES NO VACUNADOS**

Los datos obtenidos de expresión génica de las distintas interleucinas no se ajustaron a una distribución normal. En las gráficas se representa mediante la sigla “V” al grupo de animales vacunados y revacunados frente a PCV2 y mediante la sigla “C” al grupo de animales no vacunados.

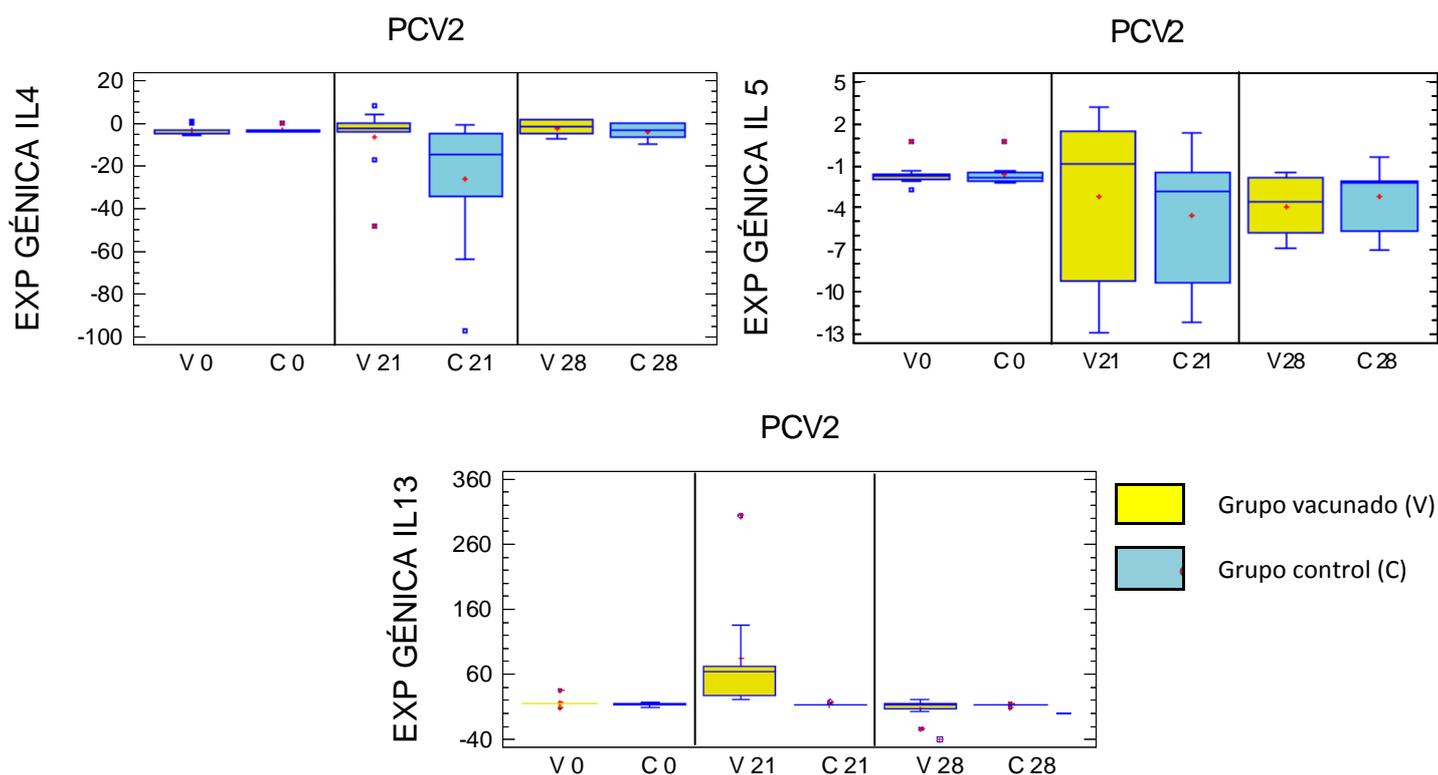
#### ***4.3.1 Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente al grupo control a distintos días postvacunación independientemente de las horas***

##### ***4.3.1.1 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4, IL5 e IL13 estimuladas con antígeno de PCV2***

La expresión de ARNm de IL4 fue similar en el día 0 para los grupos vacunado y control, sin embargo a partir del día 21 hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, teniendo mayor expresión el grupo vacunado (día 21:  $-3,19 \pm 3,47$  frente a  $-19,45 \pm 7,47$ ;  $P = 0.01$  y día 28:  $1,41 \pm 0,73$  frente a  $-1,37 \pm 0,78$ ;  $P = 0.013$ ).

Para la IL5 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para ninguno de los días, observándose una mayor dispersión de los valores de expresión los días 21 y 28.

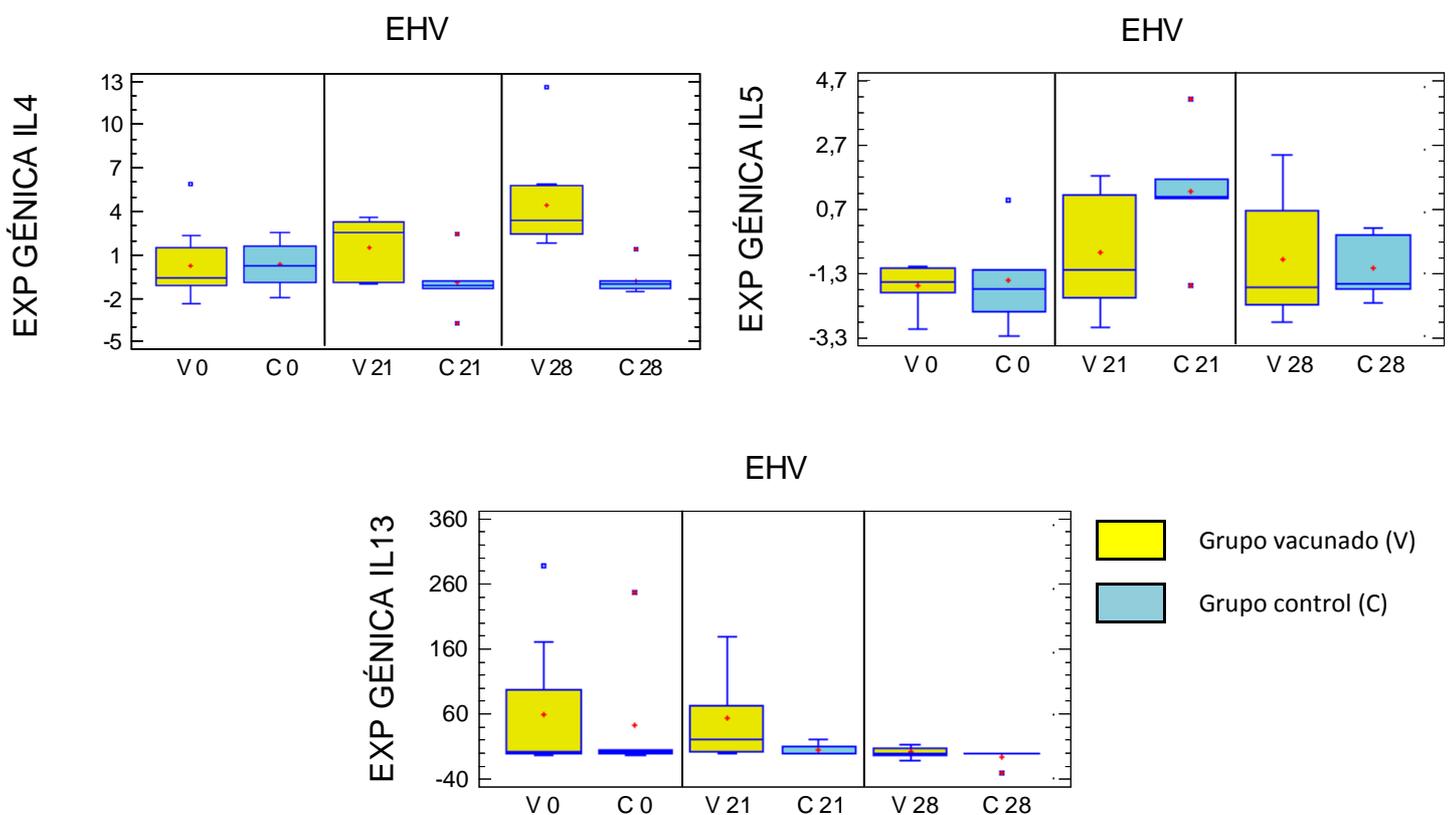
La expresión de ARNm de IL13 fue similar en ambos grupos el día 0 del experimento. El día 21 el grupo vacunado presentó mayor expresión de esta interleucina, existiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control ( $72,44 \pm 29,20$  frente a  $0,73 \pm 0,57$ ;  $P = 0.00$ ), y en el día 28 ambos grupos presentaron una leve disminución de la expresión, no apreciándose diferencias entre ambos grupos.



**4.3.1.2 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4, IL5 e IL13 estimuladas con antígeno de EHV**

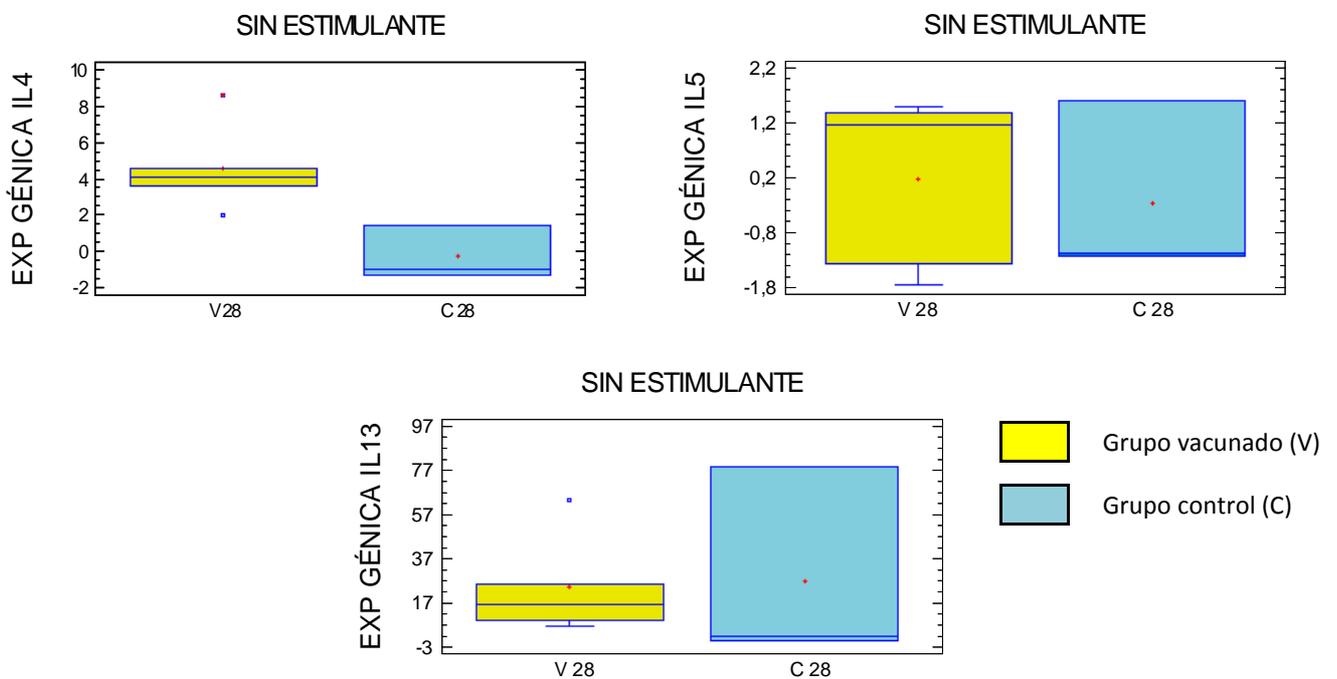
Para la IL4 no se observaron diferencias en los días 0 y 21 entre los dos grupos, a pesar de que en el día 21 la media del grupo vacunado fue mayor que la del control. En el día 28 el grupo vacunado presentó mayor expresión de esta interleucina que el grupo control, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $4,36 \pm 1,03$  frente a  $-1,07 \pm 0,39$ ;  $P = 0,00$ ).

Para las IL5 e IL13 no hubo diferencias de expresión ninguno de los días, a pesar de que los días 0 y 21 se observó que la media de expresión de IL13 del grupo vacunado fue mayor que la del control, no ocurriendo así el día 28.



**4.3.1.3 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4, IL5 e IL13 no estimuladas con ningún antígeno**

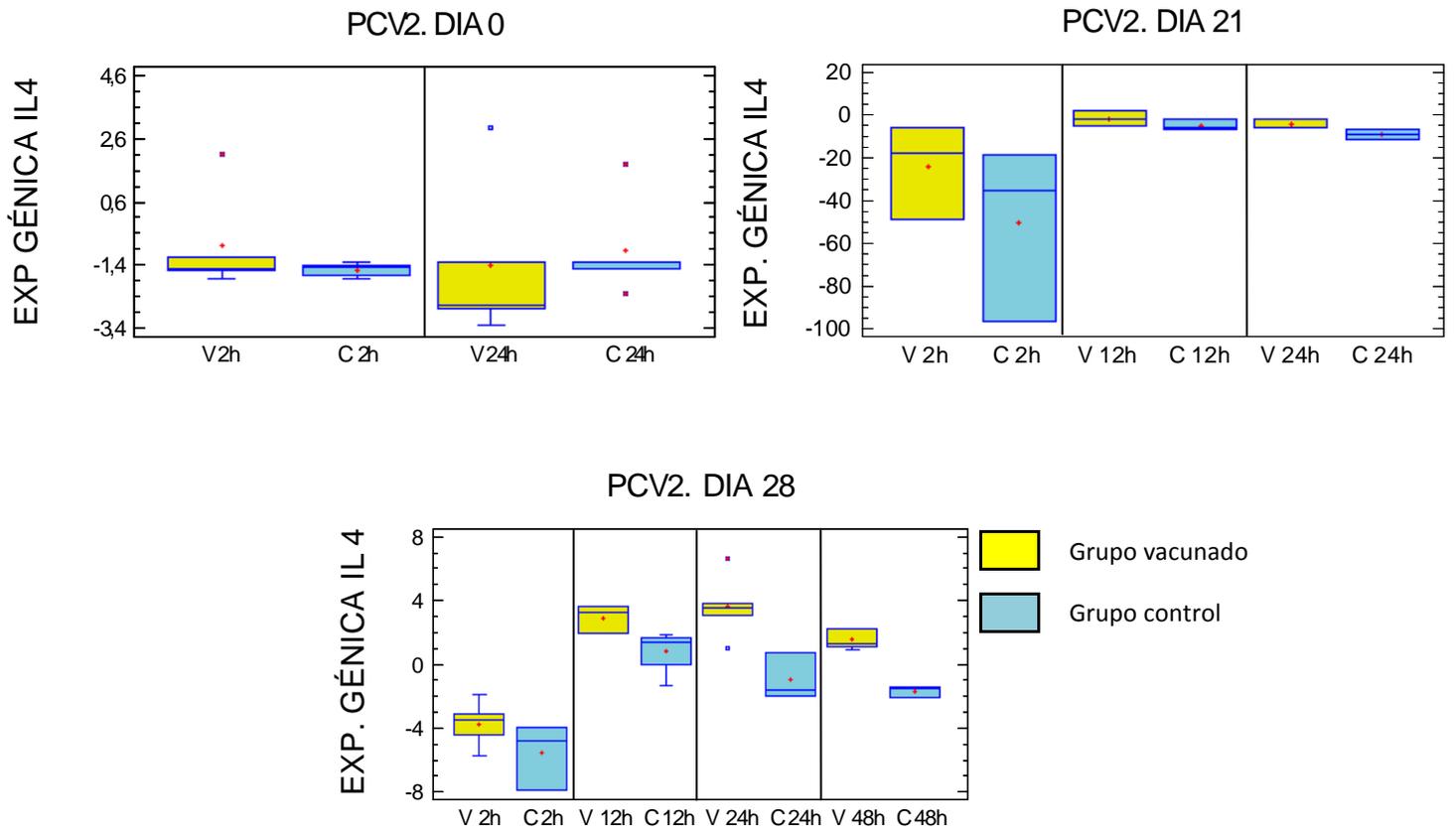
En las PBMC cultivadas sin antígenos estimulantes se observó como el grupo vacunado expresó más IL4, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control para el día 28 ( $4,54 \pm 1,14$  frente a  $-0,47 \pm 0,90$ ;  $P = 0,036$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para IL5 e IL13 entre ambos grupos.



### ***4.3.2 Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente al grupo control en cada hora de cada día***

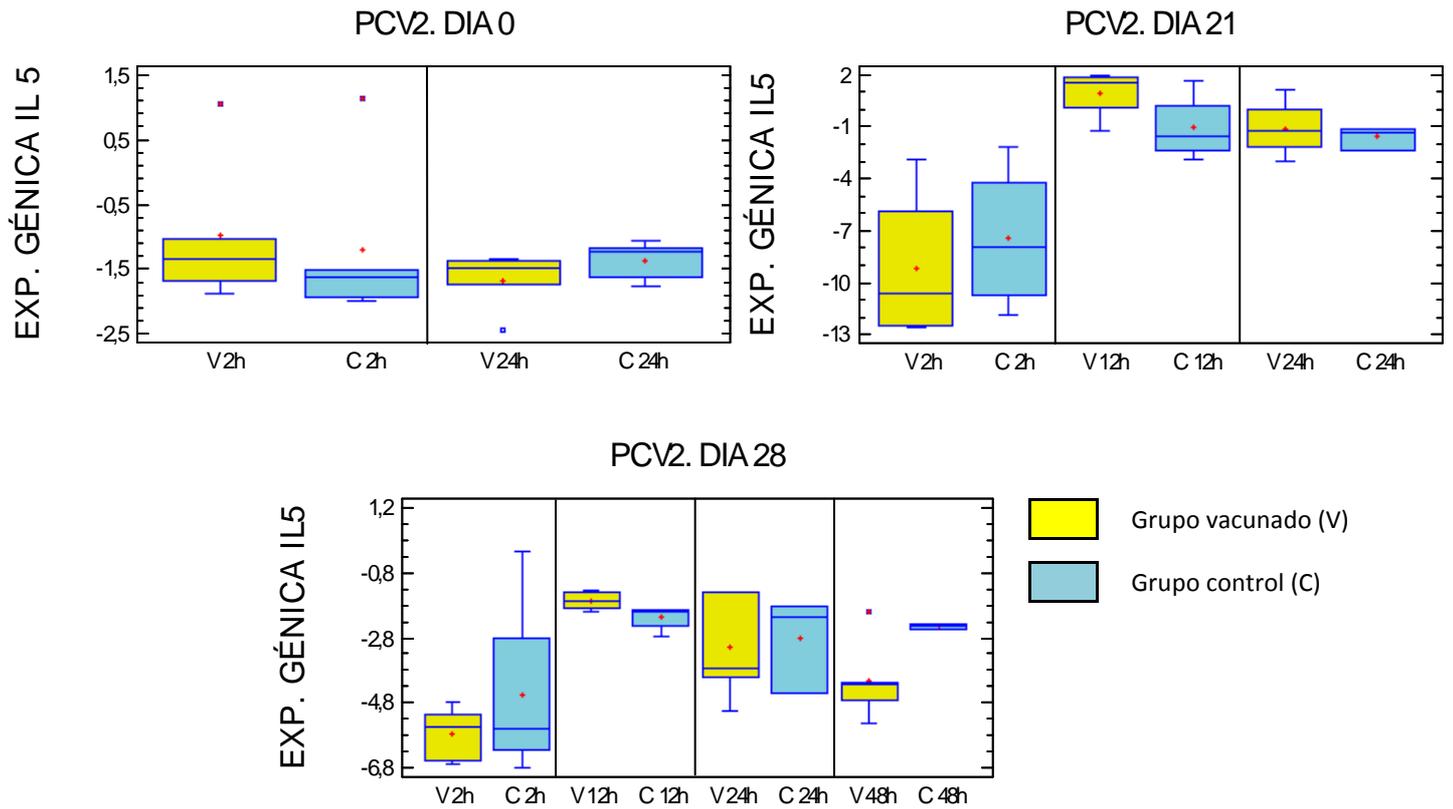
#### ***4.3.2.1 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4 estimuladas con antígeno de PCV2***

En el día 0 los niveles de expresión de IL4 fueron similares en los dos grupos, no ocurriendo así el día 21. Apesar de que en este día hubo disminución de la expresión en los dos grupos, el vacunado presentó una caída menor en los niveles de expresión para la IL4, existiendo diferencias estadísticamente significativas a las 2 horas ( $-13,02 \pm 9,07$  frente a  $-45,33 \pm 15,44$ ;  $P = 0,047$ ), 12 horas ( $3,91 \pm 2,13$  frente a  $-3,06 \pm 1,7$ ;  $P = 0,028$ ) y 24 horas ( $-0,46 \pm 1,22$  frente a  $-7,60 \pm 2,42$ ;  $P = 0,014$ ). En el día 28 la caída en la expresión observada en los días anteriores cambió a aumento de la expresión a partir de las 12 horas, habiendo también mayores niveles de expresión de IL4 en el grupo vacunado que en el control, con diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas ( $3,26 \pm 0,40$  frente a  $1,14 \pm 0,74$ ;  $P = 0,016$ ), 24 horas ( $4,01 \pm 0,93$  frente a  $-0,68 \pm 0,85$ ;  $P = 0,036$ ), y 48 horas ( $1,89 \pm 0,29$  frente a  $-1,39 \pm 0,19$ ;  $P = 0,025$ ).



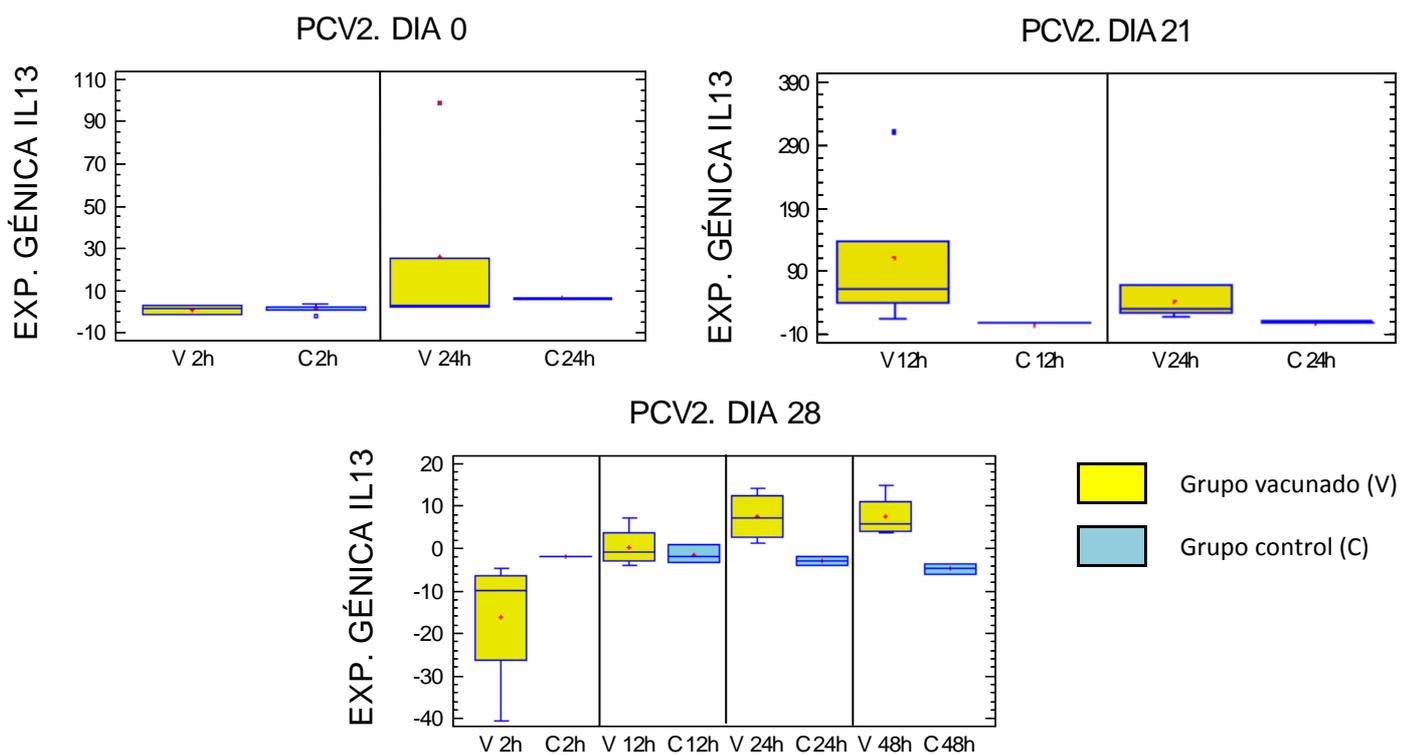
**4.3.2.2 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL5 estimuladas con antígeno de PCV2**

Para la IL5 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y control para ninguna de las horas de los diferentes días de estudio, observándose en todas ellas disminución de la expresión de esta interleucina.



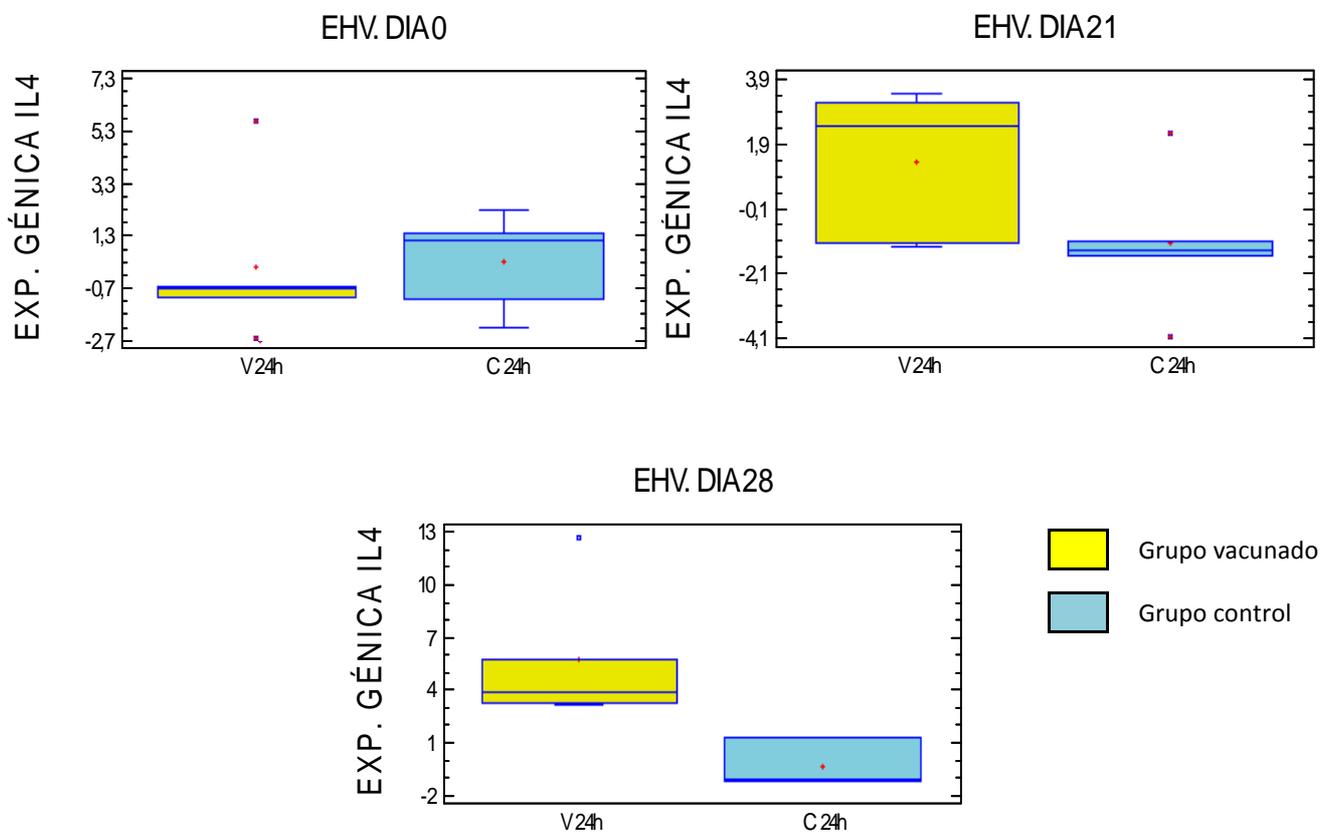
**4.3.2.3 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL13 estimuladas con antígeno de PCV2**

En el día 0 no se observaron diferencias de expresión para la IL13 entre ambos grupos. El día 21 el grupo vacunado expresó más que el control a las 12 horas ( $109,08 \pm 55,08$  frente a  $-0,04 \pm 0,02$ ;  $P = 0,008$ ) y 24 horas ( $35,79 \pm 11,51$  frente a  $1,71 \pm 1,18$ ;  $P = 0,014$ ). El grupo vacunado también expresó mas IL13 que el control en el día 28, existiendo diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ( $13,55 \pm 4,51$  frente a  $-0,66 \pm 0,66$ ;  $P = 0,036$ ).



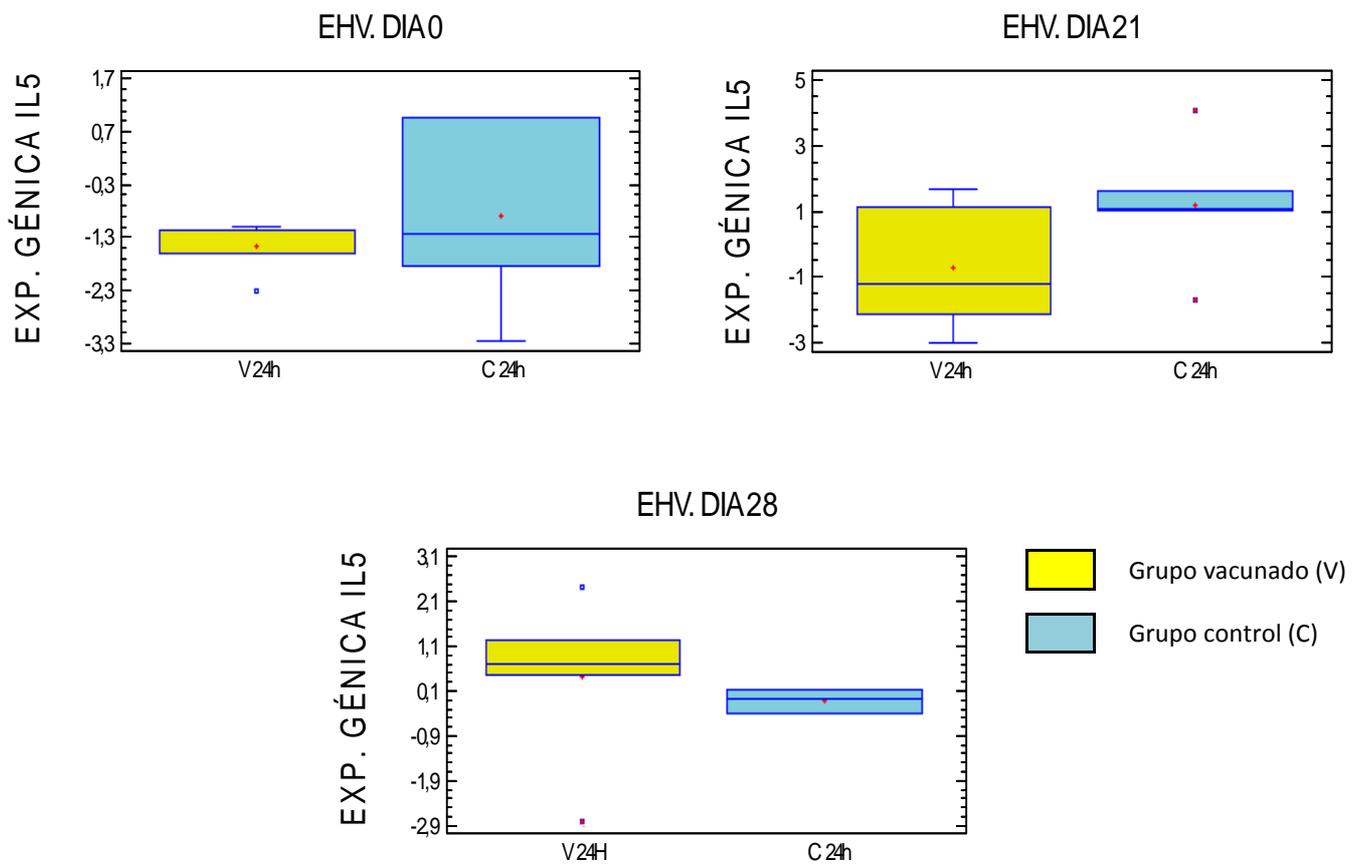
**4.3.2.4 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4 estimuladas con antígeno de EHV**

En los días 0 y 21 no se observaron diferencias en la expresión de IL4. En el día 28 el grupo vacunado presentó mayor expresión de IL4, existiendo diferencias estadísticamente significativas con el control para las 24 horas ( $5,73 \pm 1,81$  frente a  $-0,43 \pm 0,80$ ;  $P = 0,025$ ).



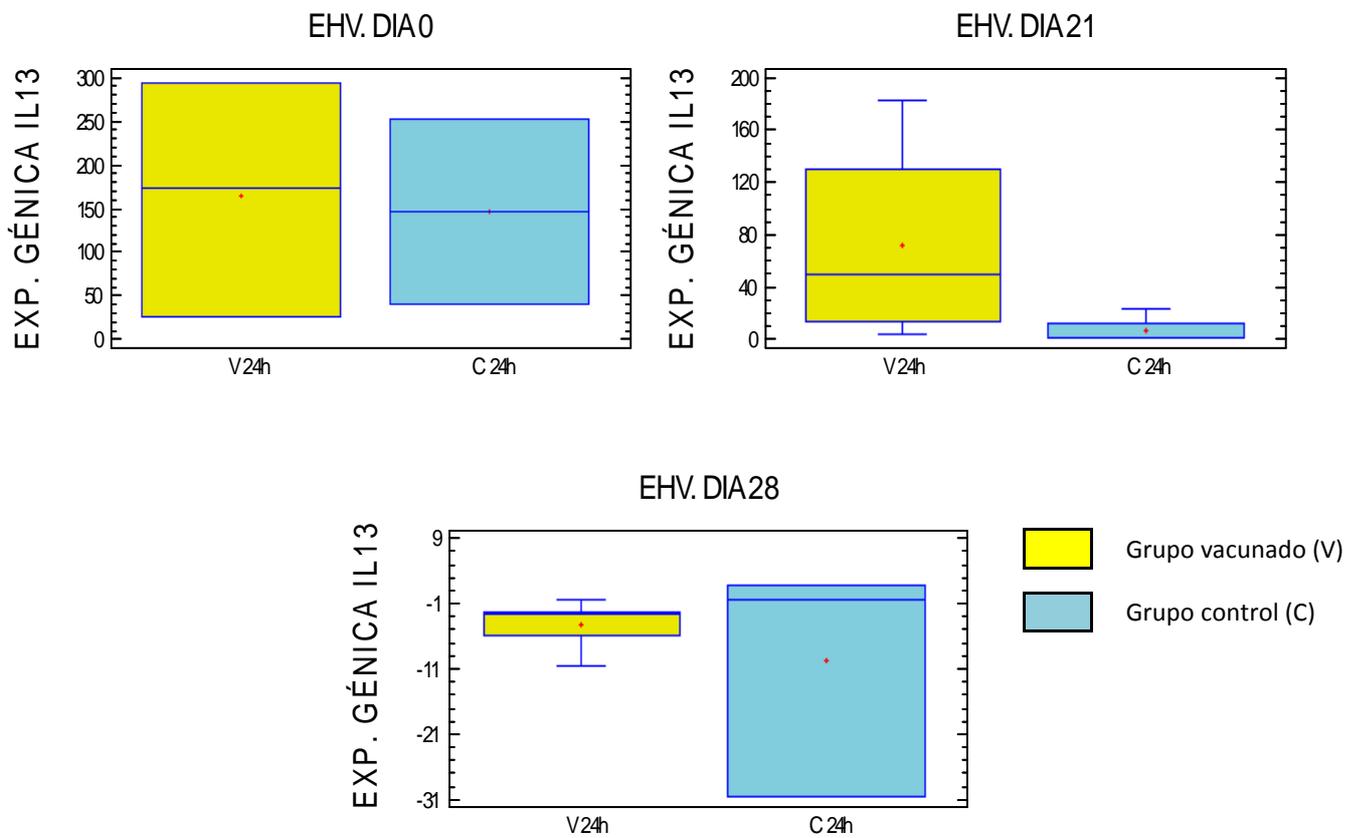
**4.3.2.5 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL5 estimuladas con antígeno de EHV**

Para la IL5 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y control ninguno de los días de estudio.



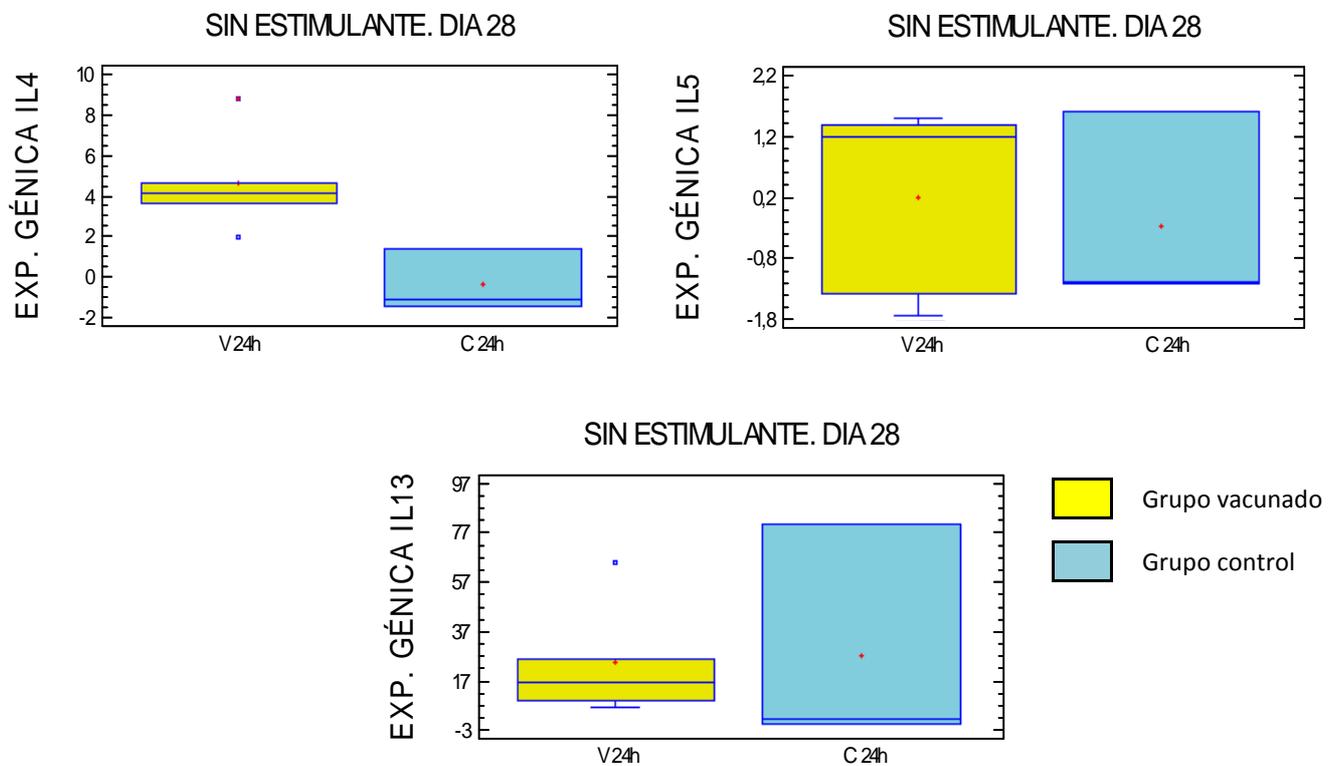
**4.3.2.6 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL13 estimuladas con antígeno de EHV**

La estimulación con EHV produjo mayor expresión en la expresión de IL13 en los dos grupos, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y control para ninguno de los días de estudio.



**4.3.2.7 Expresión génica en PBMC de los grupos vacunados y control para IL4, IL5 e IL13 cultivadas sin estimulantes antigénicos**

El grupo vacunado presentó mayor expresión de IL4 a las 24 horas del día 28, habiendo diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control ( $4,54 \pm 1,14$  frente a  $-0,47 \pm 0,90$ ;  $P = 0,036$ ). Para la IL5 e IL13 no se detectaron diferencias entre ambos grupos, a pesar de que para la IL13 la media del grupo vacunado fue superior a la del control.

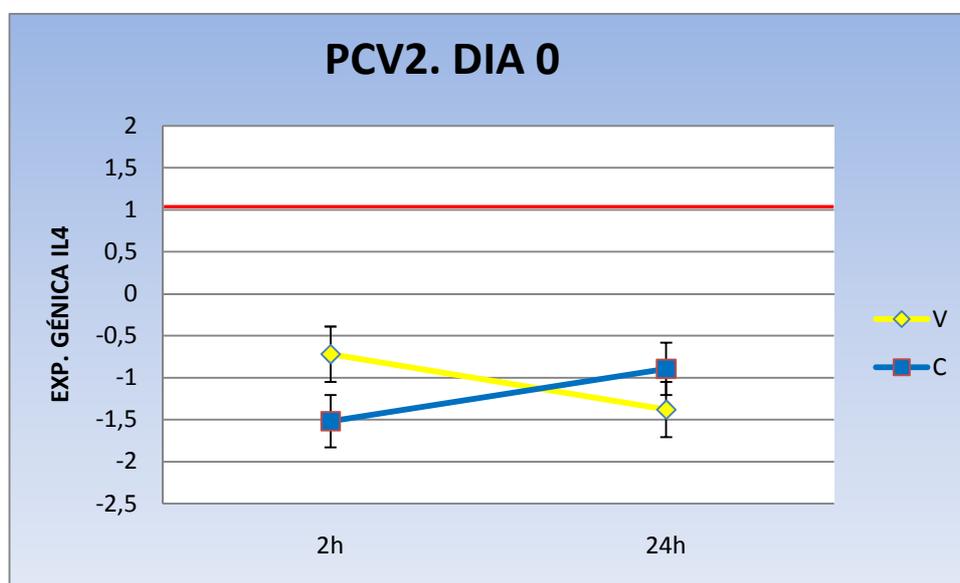


### 4.3.3 Expresión génica relativa para el grupo vacunado frente a sí mismo y grupo control frente a sí mismo en cada hora de cada día

Los resultados de la expresión génica relativa al tiempo 0 horas se muestran mediante gráficas que indican la media de cada grupo, acompañada del error típico.

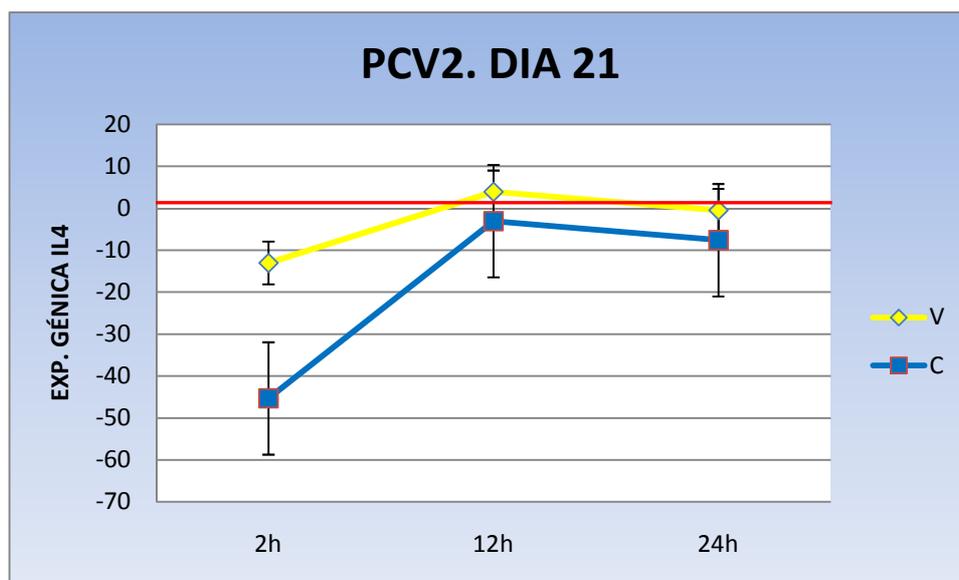
#### 4.3.3.1. Expresión génica en PBMC y células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados y control para IL4 estimuladas con antígeno de PCV2

La expresión génica de la IL4 tras la estimulación con PCV2 el día 0 del experimento apenas sufrió cambios relevantes, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 24 para ninguno de los grupos (vacunado y control).



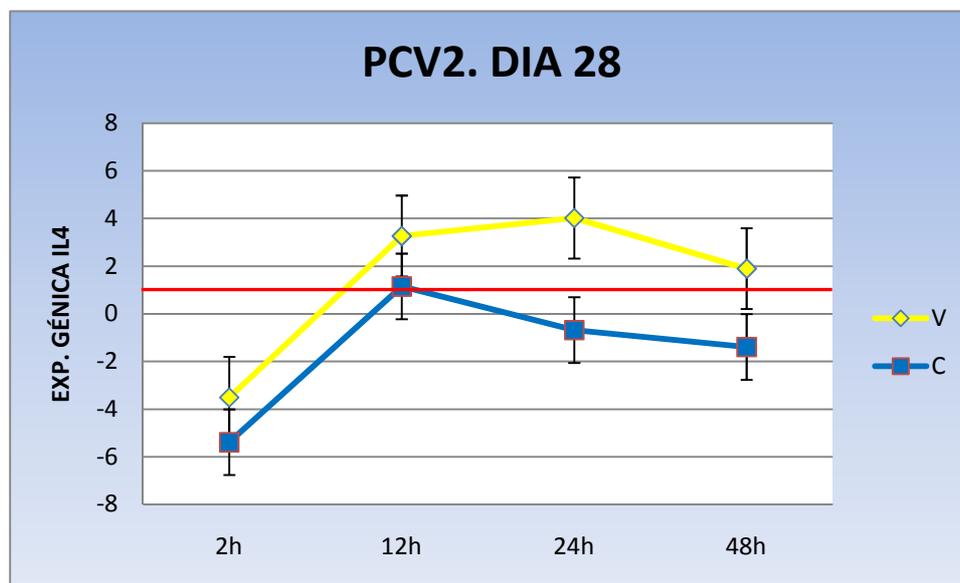
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

En el día 21 del experimento se observó que al separar las PBMC de la sangre, la expresión de IL4 se redujo considerablemente, pero que al estimularlas con PCV2 la expresión de esta interleucina se incrementó de nuevo. A las 12 horas postestimulación con PCV2 se produjo un pico de expresión de ARNm de IL4 tanto para el grupo vacunado como control, a pesar que los niveles de expresión de esta interleucina fueron mayores en el grupo vacunado. Entre las 2 y 12 horas se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo vacunado ( $-13,02 \pm 9,07$  frente a  $3,91 \pm 2,13$ ;  $P = 0,032$ ) y en el grupo control entre la hora 2 y 12 ( $-45,33 \pm 15,44$  frente a  $-3,06 \pm 1,78$ ;  $P = 0,008$ ) y las horas 2 y 24 ( $-45,33 \pm 15,44$  frente a  $-7,60 \pm 2,42$ ;  $P = 0,016$ ).



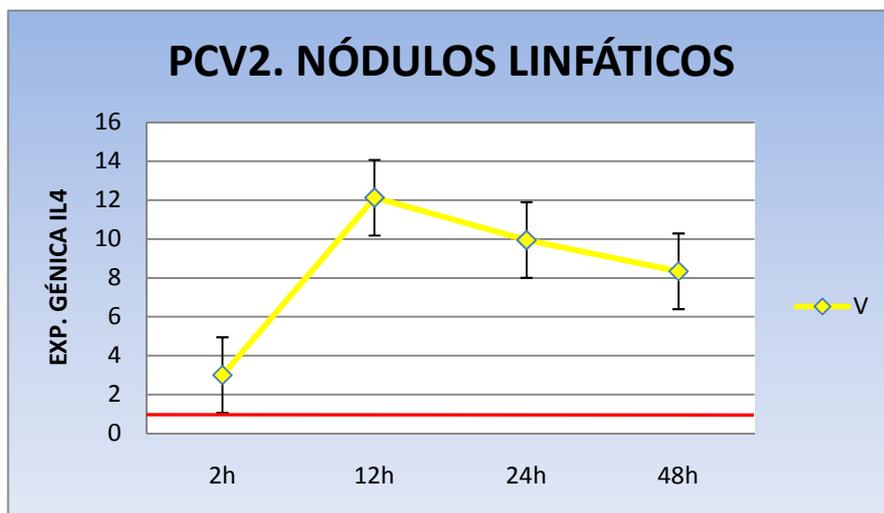
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

Aunque la expresión de IL4 se redujo considerablemente al separar las PBMC de la sangre en el día 28, la estimulación con PCV2 hizo que la expresión de esta interleucina se incrementara de nuevo. El grupo vacunado presentó mayor expresión que el control, llegando a expresar cuatro veces más ARNm de IL4 que los niveles basales a tiempo 0, con el pico de máxima expresión a las 24 h. Para el grupo vacunado hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $-3,50 \pm 0,65$  frente a  $3,26 \pm 0,40$ ;  $P = 0,009$ ), 2 y 24 ( $-3,50 \pm 0,65$  frente a  $4,01 \pm 0,93$ ;  $P = 0,009$ ), 2 y 48 ( $-3,50 \pm 0,65$  frente a  $1,89 \pm 0,29$ ;  $P = 0,008$ ). Sin embargo, el grupo control presentó su pico de expresión a las 12 horas, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $-5,39 \pm 1,23$  frente a  $1,14 \pm 0,74$ ;  $P = 0,034$ ), 2 y 24 ( $-5,39 \pm 1,23$  frente a  $-0,68 \pm 0,85$ ;  $P = 0,050$ ), 2 y 48 ( $-5,39 \pm 1,23$  frente a  $-1,39 \pm 0,19$ ;  $P = 0,050$ ), y 12 y 48 ( $1,14 \pm 0,74$  frente a  $-1,39 \pm 0,19$ ;  $P = 0,034$ ).



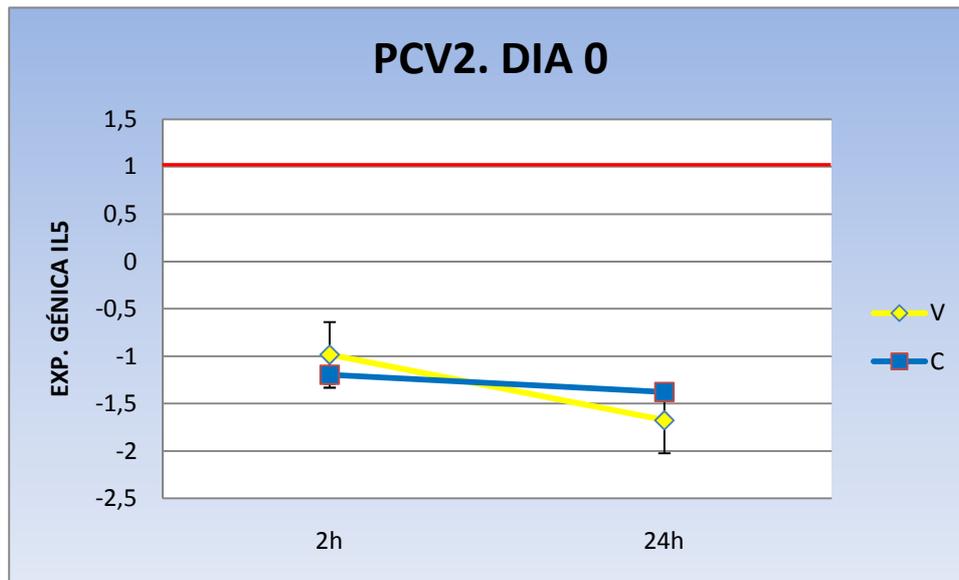
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

En las células mononucleares de los nódulos linfáticos se observó una respuesta más rápida que las PBMC en la síntesis de ARNm de IL4 tras la estimulación con PCV2. El pico de expresión se alcanzó a las 12 horas, llegando a producir en este punto 12 veces más IL4 que en el tiempo 0 horas. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $3,00 \pm 1,02$  frente a  $12,13 \pm 4,73$ ;  $P = 0,032$ ), 2 y 24 ( $3,00 \pm 1,02$  frente a  $9,95 \pm 3,12$ ;  $P = 0,047$ ) y 2 y 48 ( $3,00 \pm 1,02$  frente a  $8,34 \pm 1,85$ ;  $P = 0,028$ ).



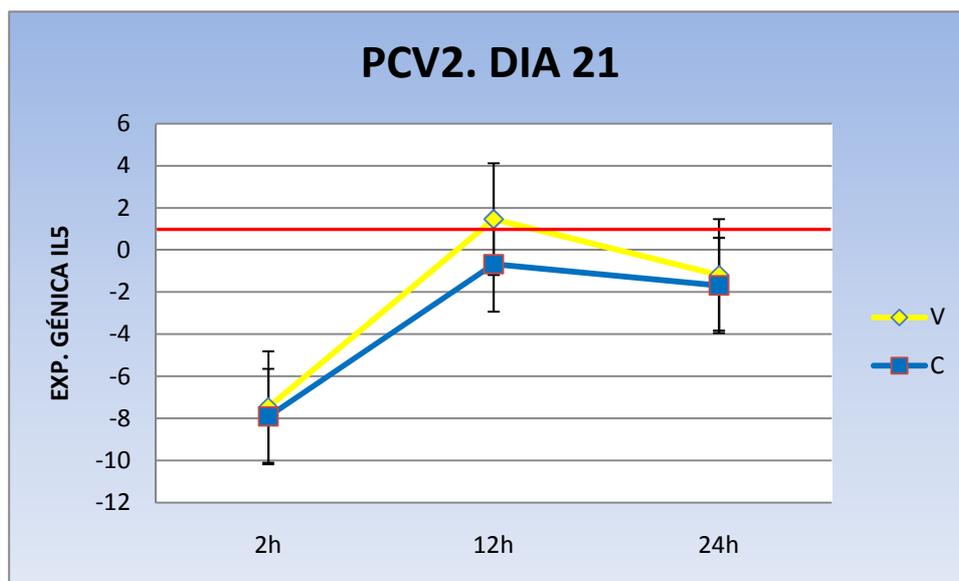
**4.3.3.2. Expresión génica en PBMC y células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados y control para IL5 estimuladas con antígeno de PCV2**

Al comparar la expresión entre las horas 2 y 24 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos grupos en el día 0.



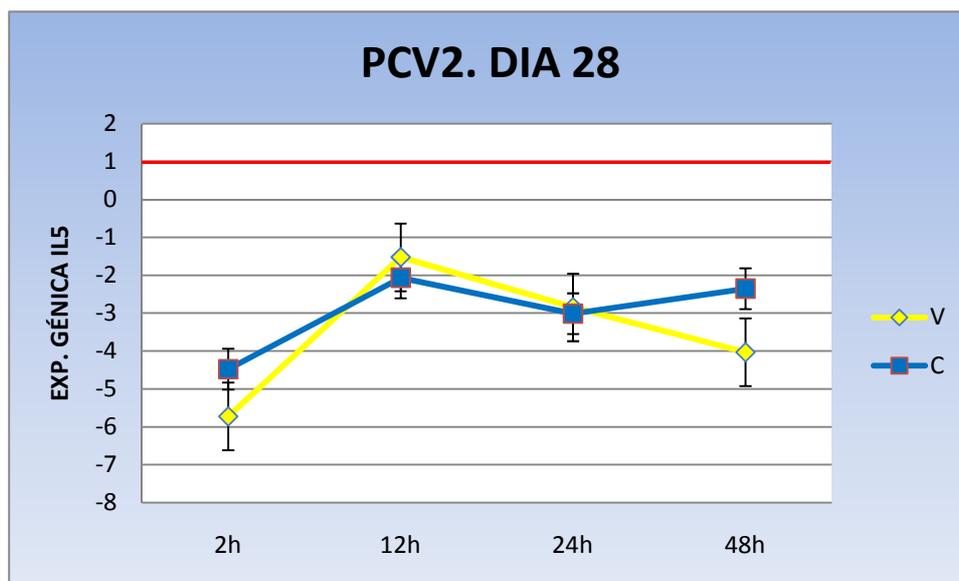
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

El día 21 las PBMC del grupo vacunado y del control sufrieron una fuerte disminución de la expresión de ARNm de IL5 cuando son separadas de la sangre y cultivadas en medio que contiene antígeno de EHV. En ambos grupos hubo un pico de expresión a las 12 horas para posteriormente detectarse un descenso en la síntesis de ARNm de esta interleucina. En el grupo vacunado hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $-7,45 \pm 2,57$  frente a  $1,46 \pm 0,77$ ;  $P = 0,016$ ) y las horas 12 y 24 ( $1,46 \pm 0,77$  frente a  $-1,18 \pm 0,66$ ;  $P = 0,032$ ). Para el grupo control hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $-7,90 \pm 1,68$  frente a  $0,67 \pm 0,88$ ;  $P = 0,016$ ).



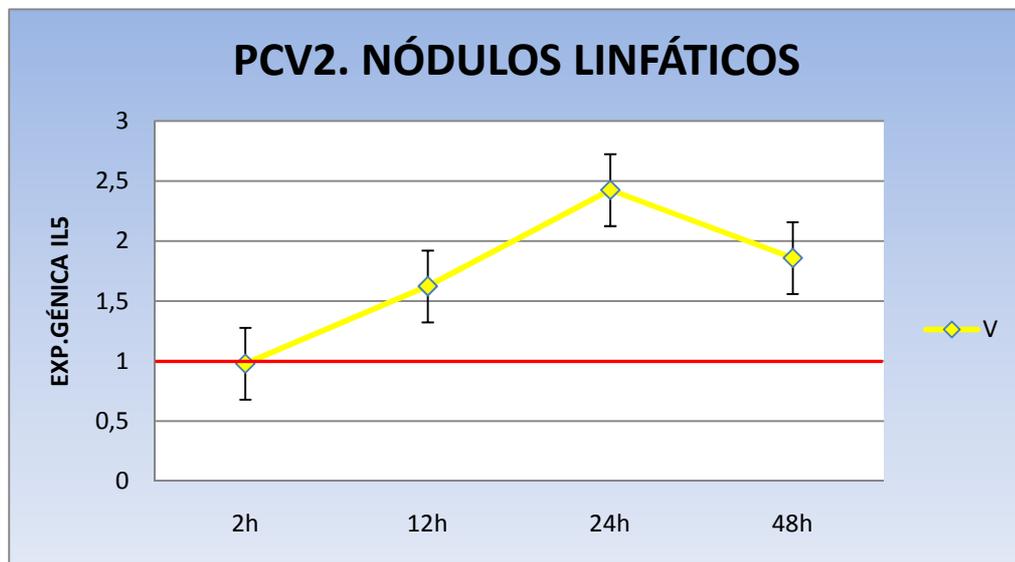
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

En el día 28 la expresión de IL5 en los dos grupos sufrió una disminución a pesar de que a las 12 horas se recuperó para empezar de nuevo a caer, siendo más reducida esta caída en el grupo control. Hubo diferencias estadísticamente significativas en el grupo vacunado entre las horas 2 y 12 ( $-5,72 \pm 0,39$  frente a  $-1,52 \pm 0,13$ ;  $P = 0,09$ ), 2 y 24 ( $-5,72 \pm 0,39$  frente a  $-2,84 \pm 0,20$ ;  $P = 0,009$ ), 2 y 48 ( $-5,72 \pm 0,39$  frente a  $-4,03 \pm 0,58$ ;  $P = 0,032$ ), 12 y 24 ( $-1,52 \pm 0,13$  frente a  $-2,84 \pm 0,20$ ;  $P = 0,009$ ) y 12 y 48 ( $-1,52 \pm 0,13$  frente a  $4,03 \pm 0,58$ ;  $P = 0,009$ ). Para el grupo control se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las horas 12 y 24 ( $-2,06 \pm 0,20$  frente a  $-3,01 \pm 0,12$ ;  $P = 0,034$ ) y 24 y 48 ( $-3,01 \pm 0,12$  frente a  $-2,35 \pm 0,05$ ;  $P = 0,050$ ).



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

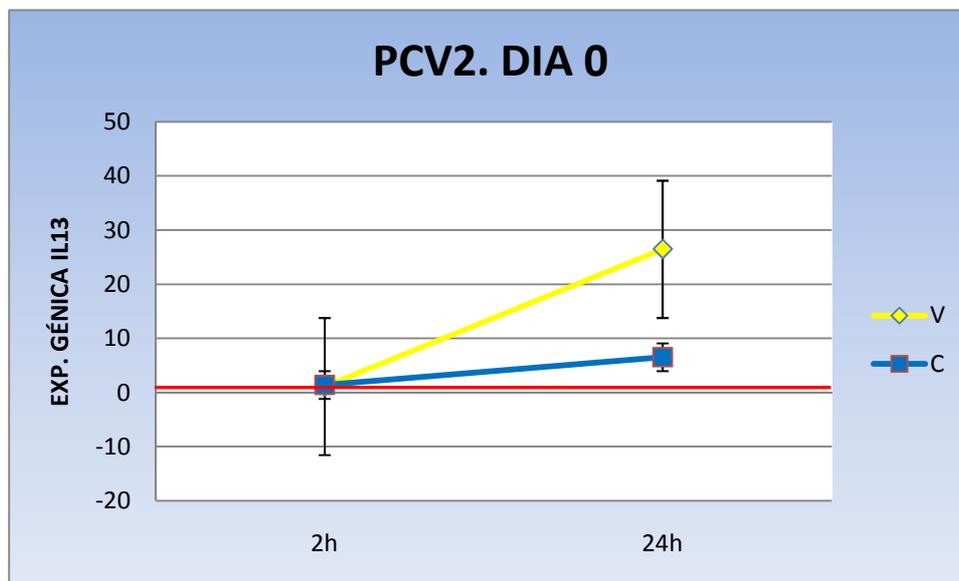
A diferencia de lo observado en las PBMC, en las células mononucleares de los nódulos linfáticos se produjo mayor expresión de ARNm de IL5 cuando fueron estimuladas con antígeno de PCV2. El mayor punto de expresión se produjo a las 24, comenzando a disminuir a las 48. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 24 ( $0,97 \pm 0,51$  frente a  $2,42 \pm 0,15$ ;  $P = 0,009$ ) y las horas 12 y 24 ( $1,62 \pm 0,10$  frente a  $2,42 \pm 0,15$ ;  $P = 0,016$ ).



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

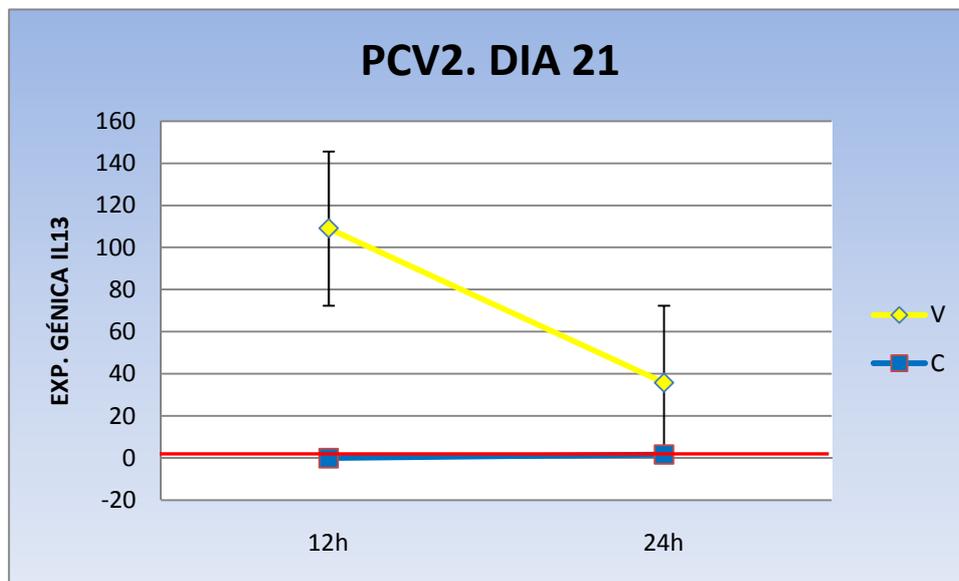
**4.3.3.3. Expresión génica en PBMC y células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados y control para IL13 estimuladas con antígeno de PCV2**

En el día 0 la producción de ARNm de IL13 en las PBMC a las 2 horas de la estimulación con antígeno de PCV2 se mantuvo a los niveles de referencia del tiempo 0 en los dos grupos. A las 24 horas se incrementó la producción de esta interleucina, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las horas para ninguno de los dos grupos.



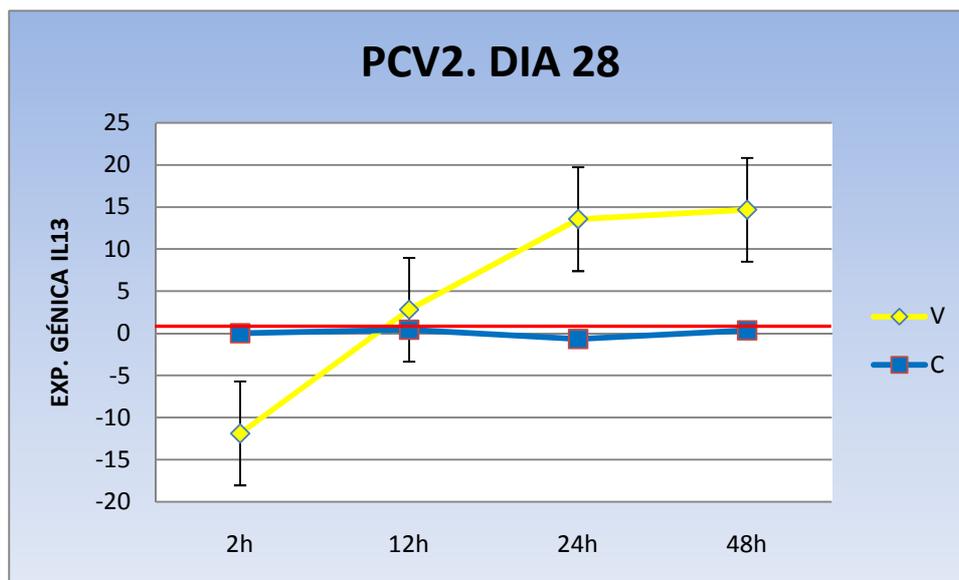
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

Las PBMC del grupo vacunado expresaron mayores niveles de IL13 a las 12 y 24 horas, a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas horas. Las PBMC del grupo control mantuvieron una expresión cercana a la basal del tiempo 0 horas, no describiéndose por tanto diferencias entre las dos horas monitorizadas.



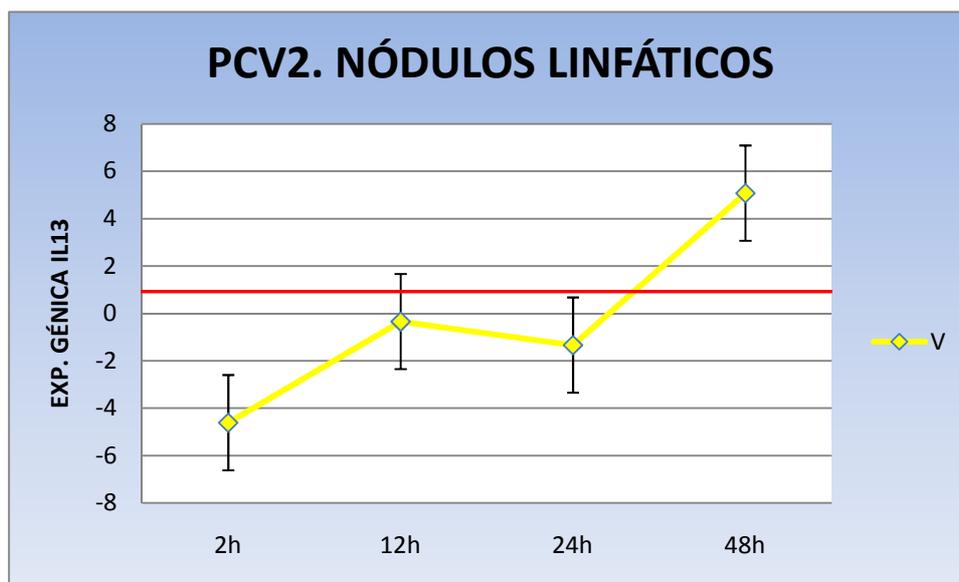
La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

Las PBMC del grupo control mantuvieron su expresión basal a lo largo de las 48 horas que se monitorizó la expresión de IL13. Por el contrario, el grupo vacunado remontó la caída en la expresión con la que comenzó a las 2 horas, llegando a expresar a las 48 horas hasta 15 veces más IL13 de la que tenía a las 0 horas. Para el grupo vacunado hubo diferencias entre las horas 2 y 12 ( $-11,87 \pm 7,21$  frente a  $2,81 \pm 2,01$ ;  $P = 0,021$ ), 2 y 24 ( $-11,87 \pm 7,21$  frente a  $13,55 \pm 4,51$ ;  $P = 0,009$ ), 2 y 48 ( $-11,87 \pm 7,21$  frente a  $14,66 \pm 5,28$ ;  $P = 0,008$ ) y entre las 12 y 48 ( $2,81 \pm 2,01$  frente a  $14,66 \pm 5,28$ ;  $P = 0,047$ ).



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

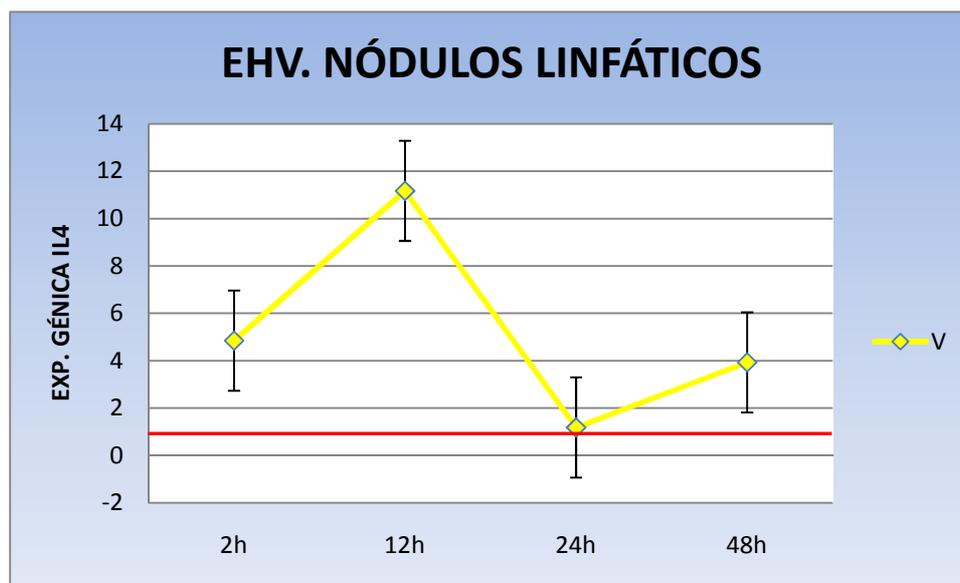
En la primera medición realizada en las células mononucleares de los nódulos linfáticos hubo una menor expresión de IL13 a las 2 horas para acercarse a los niveles basales de expresión a las 12 y 24 horas. Finalmente, a las 48 horas experimentaron un aumento de expresión de cinco veces la cantidad que había a tiempo 0 horas. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 2 y 12 ( $-4,61 \pm 1,37$  frente a  $-0,34 \pm 1,09$ ;  $P = 0,032$ ), 2 y 24 ( $-4,61 \pm 1,37$  frente a  $-1,33 \pm 0,69$ ;  $P = 0,047$ ), 2 y 48 ( $-4,61 \pm 1,37$  frente a  $5,07 \pm 3,12$ ;  $P = 0,009$ ) y entre las 24 y 48 ( $-1,33 \pm 0,69$  frente a  $5,07 \pm 3,12$ ;  $P = 0,024$ ).



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

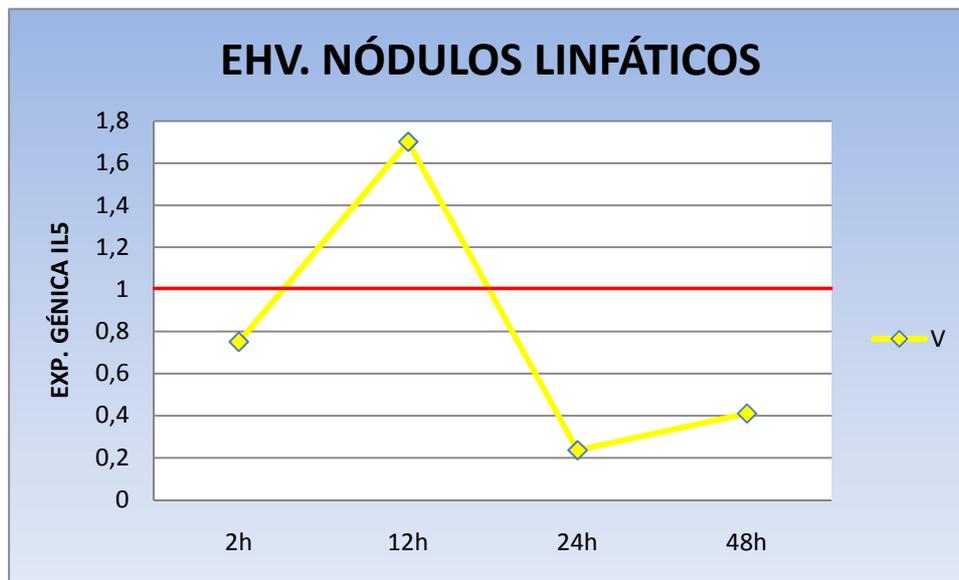
**4.3.3.4. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados para IL4 estimuladas con antígeno de EHV**

La expresión génica de IL4 en las células mononucleares de los nódulos linfáticos tras la estimulación con antígeno de EHV presentó un pico de expresión a las 12 horas, incrementado 11 veces sus niveles respecto del tiempo 0 horas. A las 24 horas sus niveles comenzaron a reducirse a pesar de que a las 48 horas se observó un ligero incremento de la síntesis de ARNm, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las horas 12 y 24 ( $11,16 \pm 3,33$  frente a  $1,18 \pm 0,54$ ;  $P = 0,009$ ).



**4.3.3.5. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados para IL5 estimuladas con antígeno de EHV**

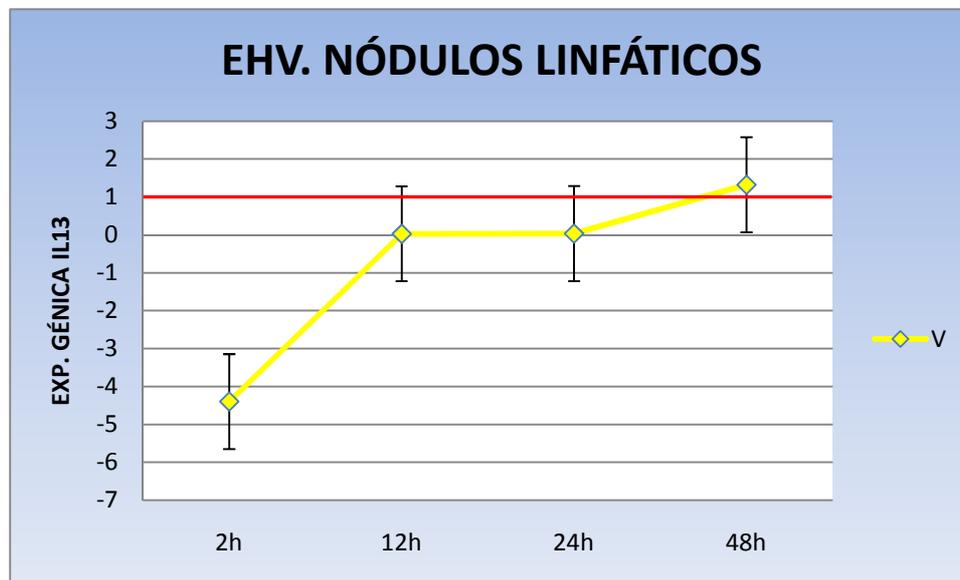
Las células mononucleares de los nódulos linfáticos mantuvieron a las 2 horas el nivel de expresión que poseían a las 0 horas. A las 12 horas se observó una mayor síntesis de ARNm, seguido en las horas 24 y 48 por un descenso moderado. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las horas 12 y 24 ( $1,70 \pm 0,11$  frente a  $0,23 \pm 0,88$ ;  $P = 0,009$ ).



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.3.3.6. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos de los grupos vacunados para IL13 estimuladas con antígeno de EHV**

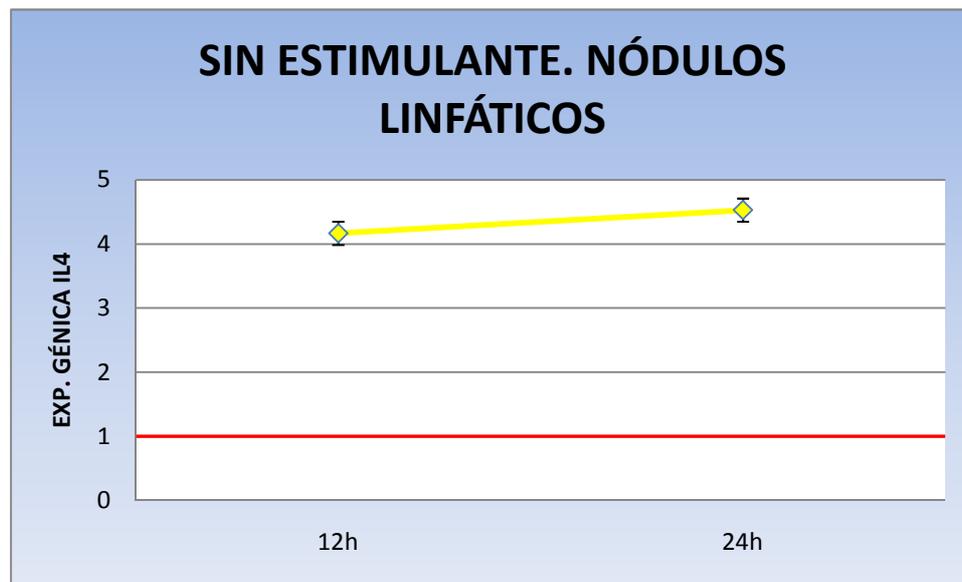
A las 2 horas hubo una disminución en la expresión de la IL13 de las células mononucleares de los nódulos linfáticos del grupo vacunado para finalmente recuperar a las 48 horas los niveles de expresión basal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las horas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.3.3.7. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos del grupo vacunado para IL4 cultivadas sin estimulantes antigénicos**

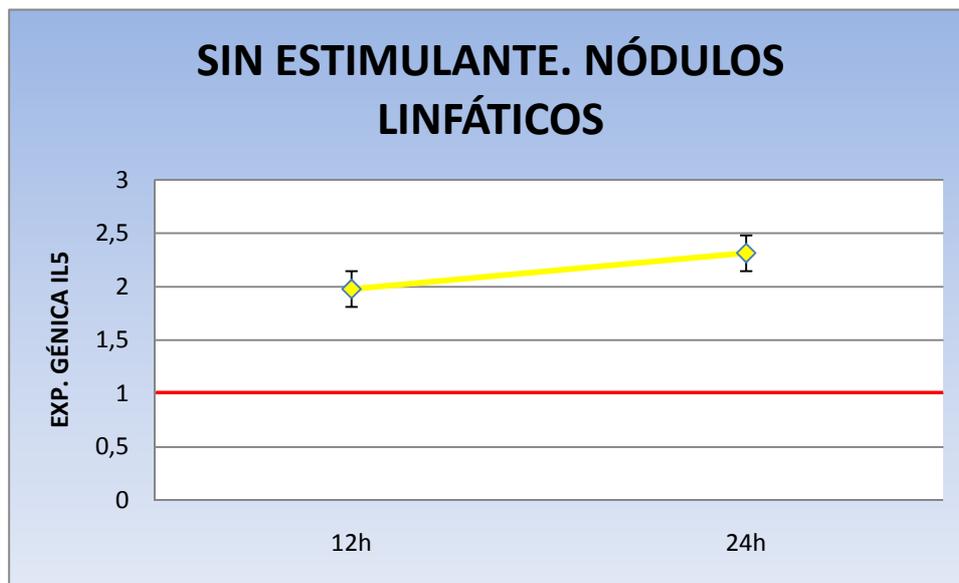
La expresión génica en ambas horas fue muy similar, no habiendo diferencias estadísticamente significativas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.3.3.8. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos del grupo vacunado para IL5 cultivadas sin estimulantes antigénicos**

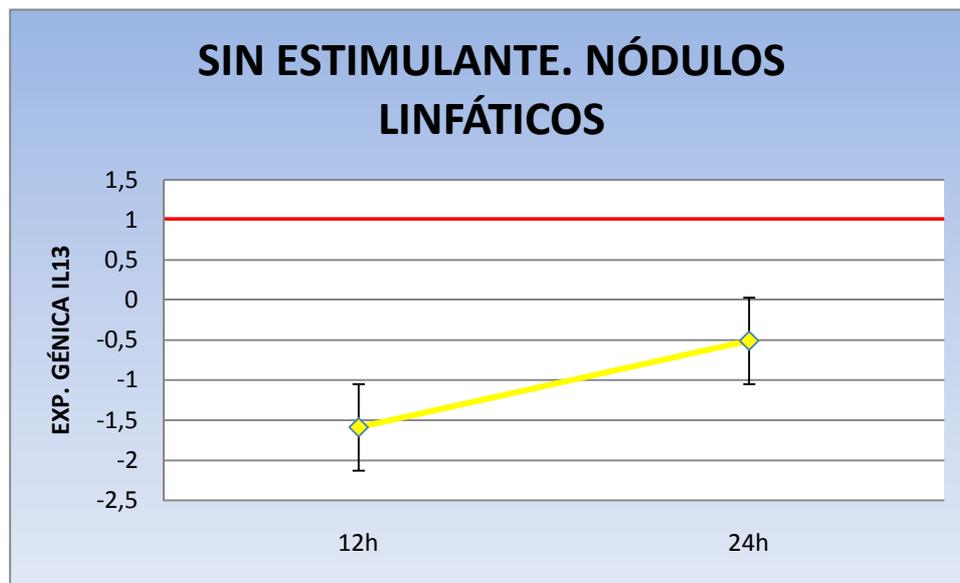
La expresión génica en ambas horas fue muy similar, no habiendo diferencias estadísticamente significativas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.3.3.9. Expresión génica en células mononucleares de los nódulos linfáticos del grupo vacunado para IL13 cultivadas sin estimulantes antigénicos**

La expresión génica en ambas horas fue muy similar, no habiendo diferencias estadísticamente significativas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

#### **4.4 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA PARA IL4, IL5 E IL13 EN LECHONES VACUNADOS Y NO VACUNADOS PROCEDENTES DE MADRES VACUNADAS Y NO VACUNADAS**

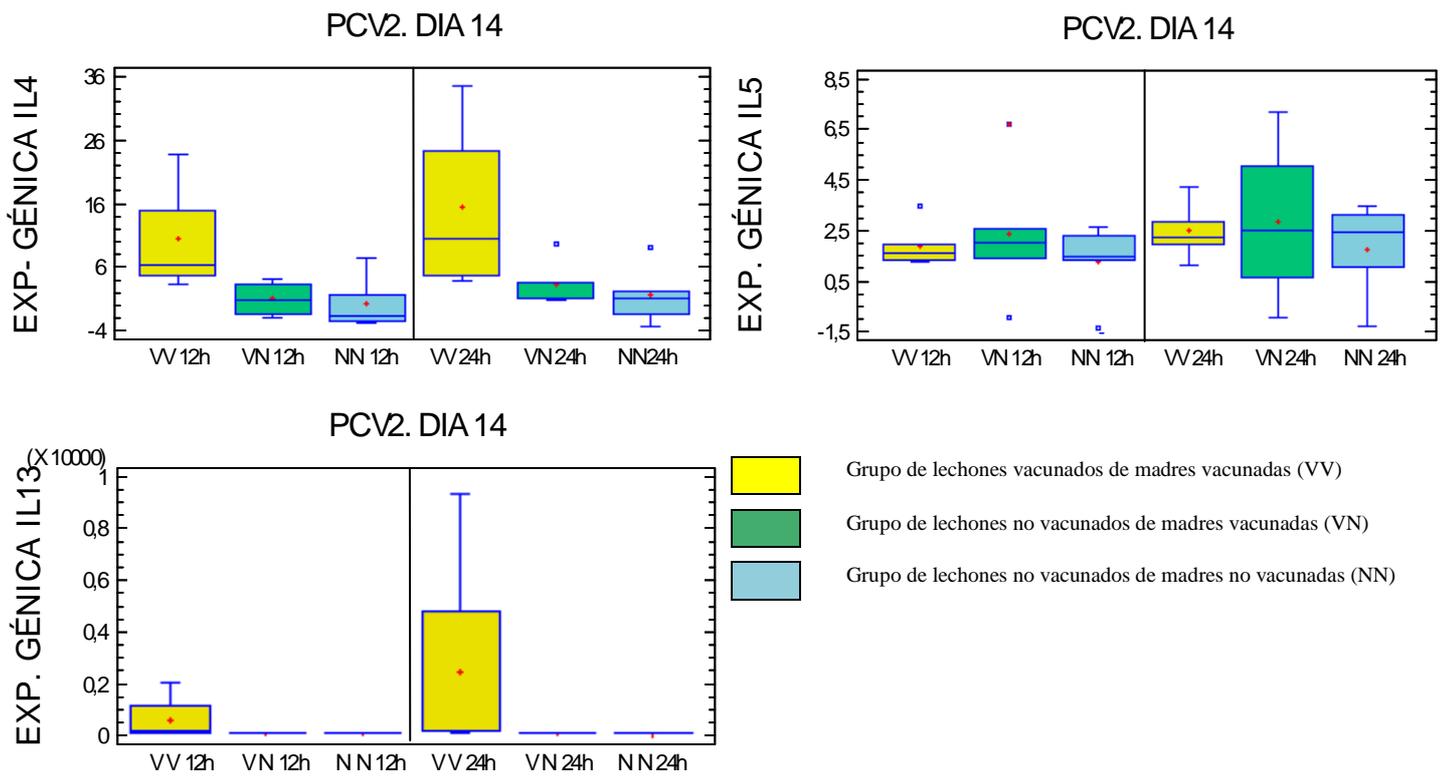
En las gráficas se representa como “VV” al grupo de lechones que fueron vacunados y que nacieron y se enalostraron de madres vacunadas, como “VN” a los lechones que no se vacunaron y nacieron y se enalostraron de madres vacunadas. Finalmente se designa como “NN” al grupo de lechones que no fueron vacunados y nacieron y se enalostraron de madres no vacunadas.

##### ***4.4.1 Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas en cada hora***

###### ***4.4.1.1 Expresión génica en PBMC de los distintos grupos para IL4, IL5 e IL13 estimuladas con antígeno de PCV2***

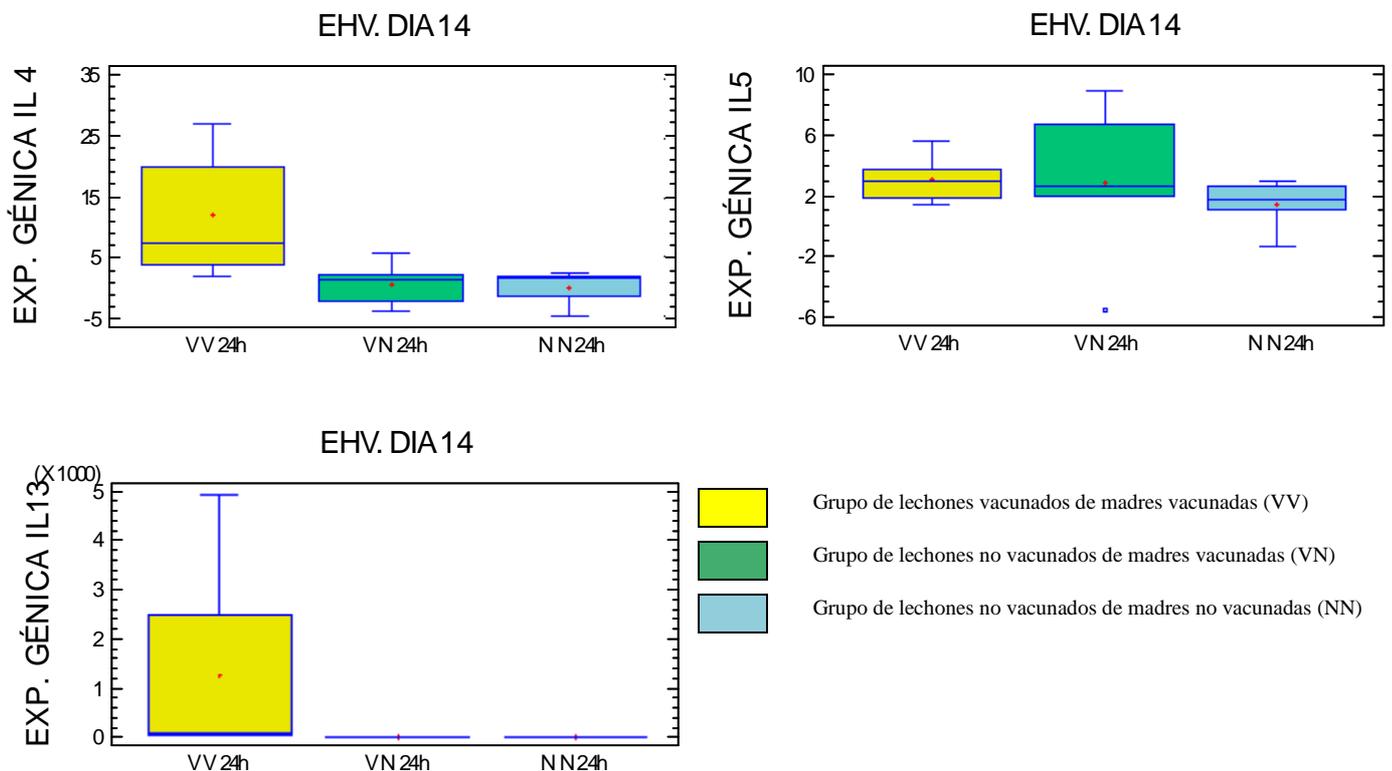
En el día 14 postvacunación el grupo VV fue el que más IL4 expresó, existiendo diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas entre los grupos VV y VN ( $10,81 \pm 3,92$  frente a  $1,16 \pm 1,24$ ;  $P = 0,028$ ) y los grupos VV y NN ( $10,81 \pm 3,92$  frente a  $0,50 \pm 1,93$ ;  $P = 0,047$ ). A las 24 horas también hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VV y VN ( $15,83 \pm 6,03$  frente a  $3,43 \pm 1,68$ ;  $P = 0,028$ ) y los grupos VV y NN ( $15,83 \pm 6,03$  frente a  $1,64 \pm 2,12$ ;  $P = 0,028$ ). Para la IL5 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ARNm tras la estimulación con antígeno de PCV2. Para la IL13 el grupo VV a las 24 horas presentó mayor síntesis de ARNm que los grupos restantes, habiendo diferencias

estadísticamente significativas a las 24 horas entre los grupos VV y VN ( $2433,04 \pm 2325,90$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,009$ ) y los grupos VV y NN ( $2433,04 \pm 2325,90$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,016$ ).



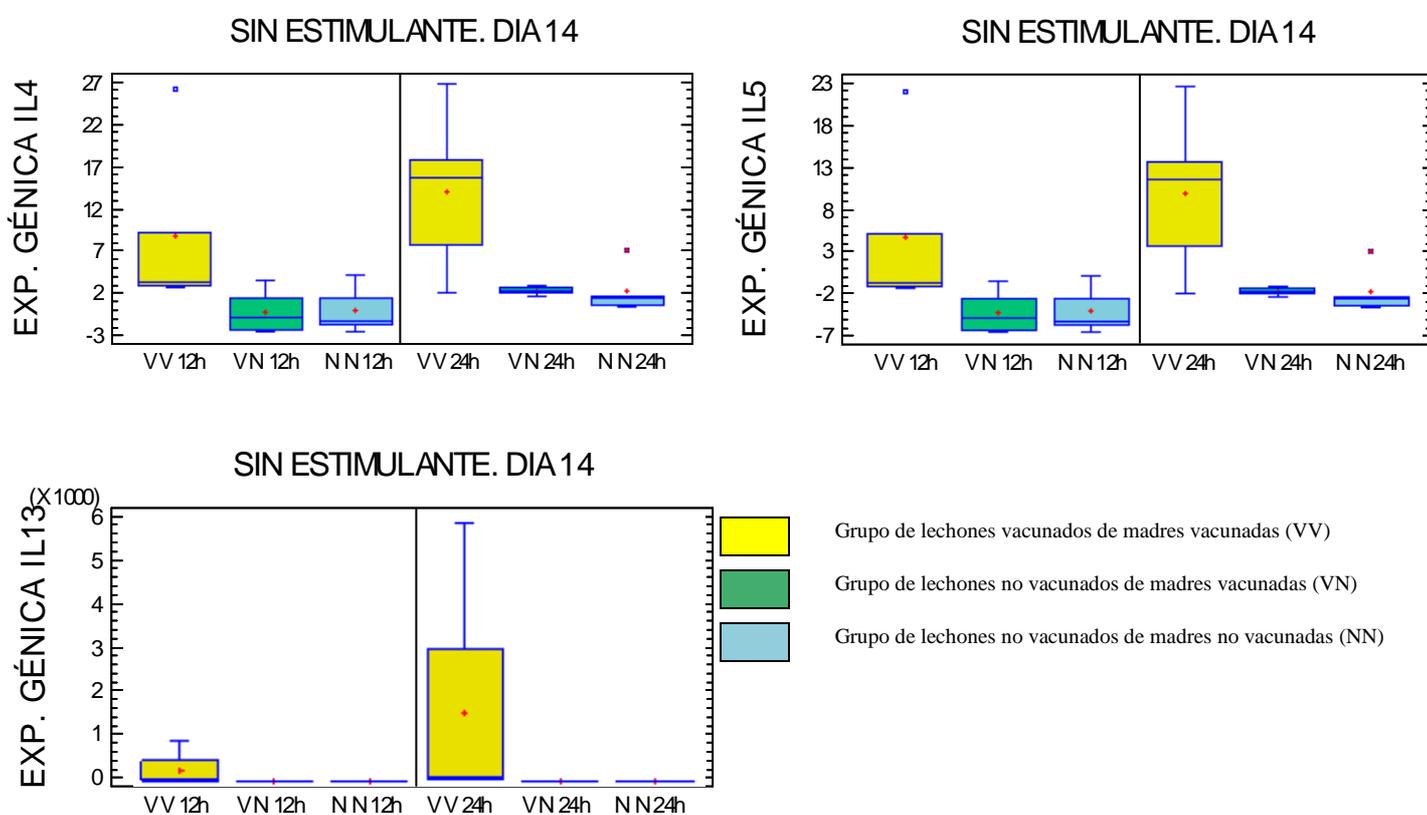
**4.4.1.2 Expresión génica en PBMC de los distintos grupos para IL4, IL5 e IL13 estimuladas con antígeno de EHV**

Tras la estimulación con EHV, el grupo VV alcanzó mayores niveles de síntesis de ARNm de IL4, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VV y VN ( $12,05 \pm 4,97$  frente a  $1,88 \pm 0,97$ ;  $P = 0,047$ ) y los grupos VV y NN ( $12,05 \pm 4,97$  frente a  $1,32 \pm 0,40$ ;  $P = 0,032$ ). Para la IL5 no hubo diferencias entre los niveles de ARNm entre los grupos. Los niveles de ARN de la IL13 fueron de nuevo mayores en el grupo VV, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VV y VN ( $1269,55 \pm 1211,81$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,009$ ) y los grupos VV y NN ( $1269,55 \pm 1211,81$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,008$ ).



#### 4.4.1.3 Expresión génica en PBMC de los distintos grupos para IL4, IL5 e IL13 cultivadas sin estimulante

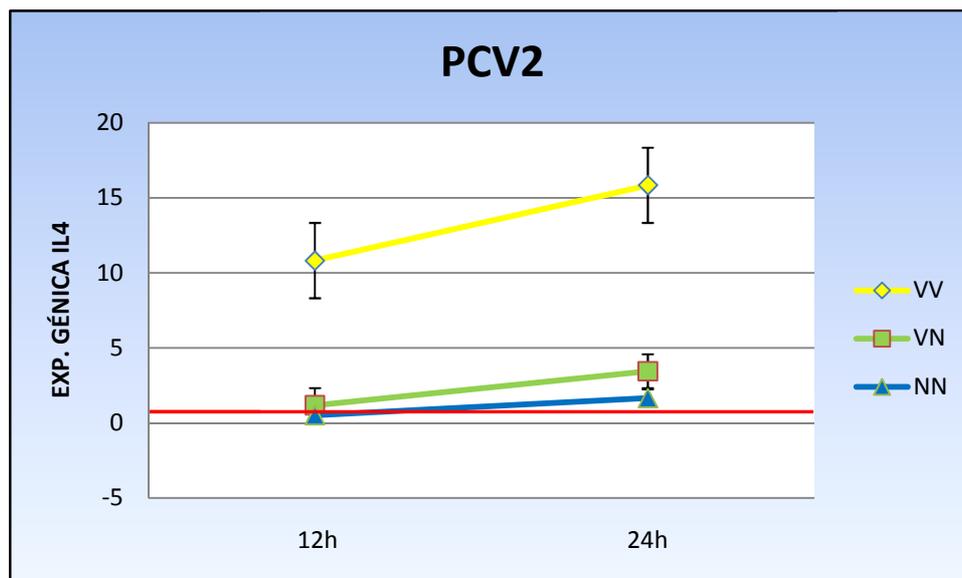
Los niveles de IL4 fueron mayores en el grupo VV en las dos horas en que se realizaron mediciones, existiendo diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas entre los grupos VV y VN ( $8,72 \pm 4,49$  frente a  $-0,24 \pm 1,16$ ;  $P = 0,047$ ) y los grupos VV y NN ( $8,72 \pm 4,49$  frente a  $-0,12 \pm 1,24$ ;  $P = 0,047$ ), y a las 24 horas entre los grupos VV y VN ( $13,85 \pm 4,25$  frente a  $2,22 \pm 0,24$ ;  $P = 0,047$ ) y los grupos VV y NN ( $13,85 \pm 4,25$  frente a  $0,69 \pm 1,98$ ;  $P = 0,016$ ). Los niveles de IL5 fueron similares en todos los grupos en las dos horas de medición. El grupo VV es el que mayores niveles de IL13 expresó, presentando diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas entre los grupos VV y VN ( $254,78 \pm 227,24$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,016$ ), y a las 24 horas entre los grupos VV y VN ( $1457,53 \pm 1455,67$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,009$ ) y los grupos VV y NN ( $1457,53 \pm 1455,67$  frente a  $1,00 \pm 0,00$ ;  $P = 0,028$ ).



**4.4.2 Expresión génica relativa para los lechones vacunados y no vacunados procedentes de madres vacunadas y no vacunadas frente a sí mismos en cada hora**

**4.4.2.1. Expresión génica de IL4 en PBMC de los distintos grupos estimuladas con antígeno de PCV2**

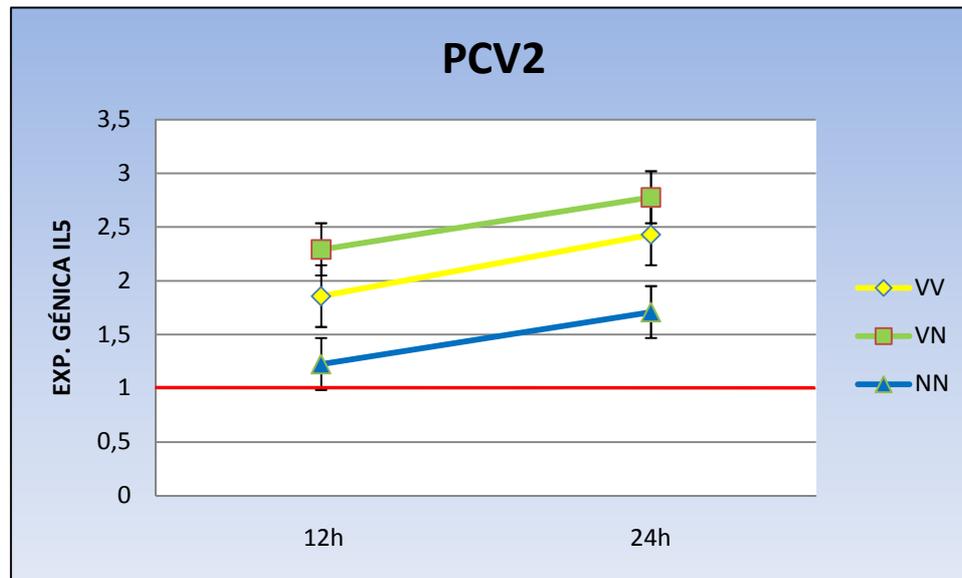
Las PBMC de todos los grupos estimuladas con PCV2 produjeron más IL4 a las 24 horas, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a las 12 horas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.4.2.2. Expresión génica de IL5 en PBMC de los distintos grupos estimulados con antígeno de PCV2**

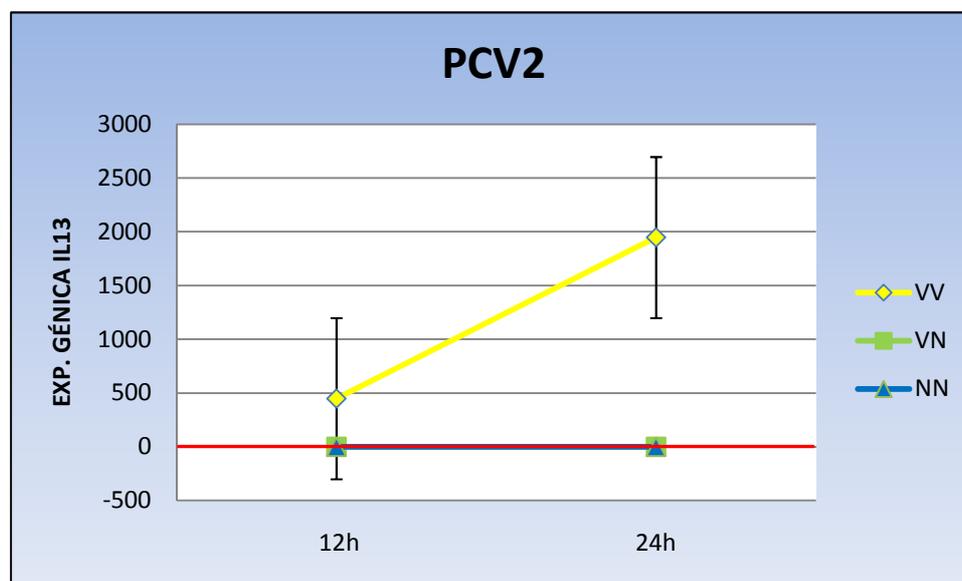
Las PBMC de todos los grupos estimulados con PCV2 produjeron más IL5 a las 24 horas, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos horas medidas.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.4.2.3. Expresión génica de IL13 en PBMC de los distintos grupos estimuladas con antígeno de PCV2**

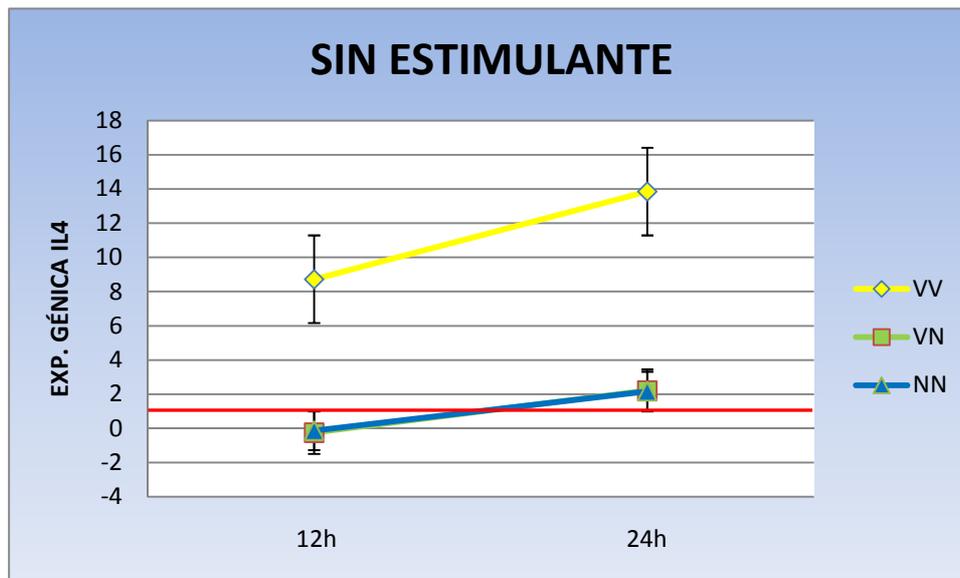
Apesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas, en el grupo VV hubo más síntesis a las 24 que a las 12 horas, no ocurriendo así para los grupos VN ni NN.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.4.2.4. Expresión génica de IL4 en PBMC de los distintos grupos cultivadas sin sustancias estimulantes**

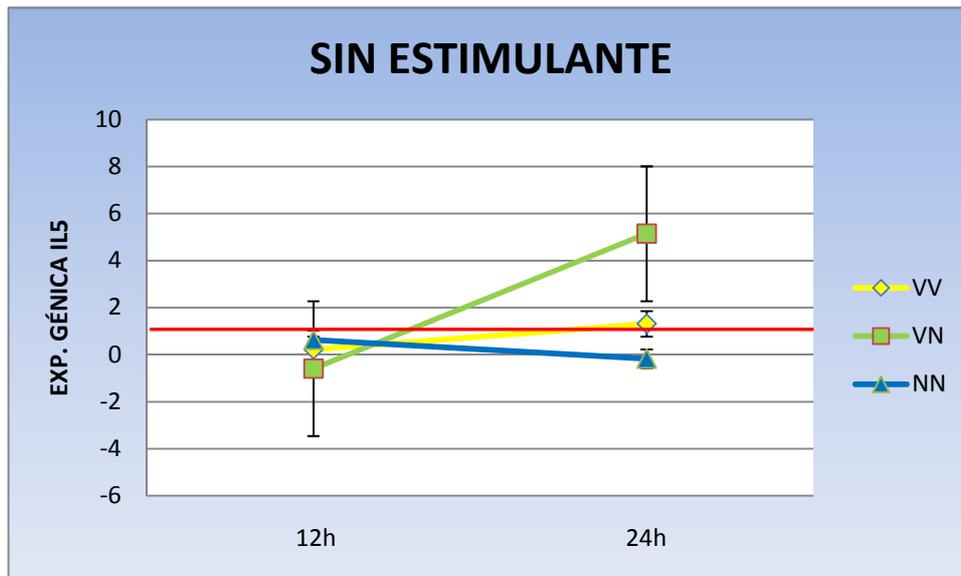
No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las 12 y 24 horas para la IL4.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.4.2.5. Expresión génica de IL5 en PBMC de los distintos grupos cultivadas sin sustancias estimulantes**

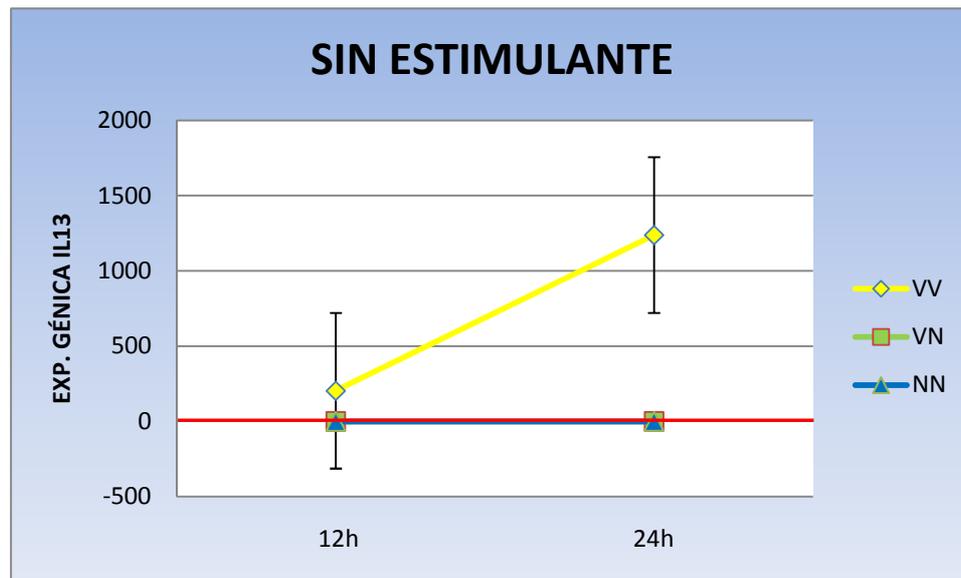
No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las 12 y 24 horas para la IL5.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

**4.4.2.6. Expresión génica de IL13 en PBMC de los distintos grupos cultivadas sin sustancias estimulantes**

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las 12 y 24 horas para la IL13.



La línea roja indica el nivel de expresión a la hora 0

## 4.5 CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE IL4, IL5 E IL13

En el estudio que empleó animales vacunados y revacunados frente a PCV2 y cerdos control, se encontraron correlaciones en el grupo de cerdos vacunados entre IL4 e IL5 cuando las PBMC se estimularon con antígeno de PCV2 durante 12 horas el día 21 ( $R^2 = 0,908$ ;  $P = 0,033$ ) y en nódulos linfáticos con EHV durante 24 horas el día 29 ( $R^2 = 0,927$ ;  $P = 0,024$ ). Entre IL4 e IL13 hubo correlaciones para el grupo de cerdos vacunados y revacunados cuando las células de los nódulos linfáticos se cultivaron con antígenos de PCV2 durante 24 horas el día 29 ( $R^2 = 0,934$ ;  $P = 0,020$ ) y cuando se cultivaron sin ninguna sustancia estimulante el día 28 en el caso de las PBMC ( $R^2 = 0,930$ ;  $P = 0,022$ ) o el día 29 las células de los nódulos linfáticos ( $R^2 = -0,0982$ ;  $P = 0,003$ ).

En el segundo grupo experimental se encontraron correlaciones entre IL4 e IL13 cuando las células mononucleares de los lechones vacunados procedentes de madres vacunadas se cultivaron con antígeno de PCV2 durante 12 ( $R^2 = 0,987$ ;  $P = 0,013$ ) y 24 horas ( $R^2 = 0,976$ ;  $P = 0,024$ ), con EHV durante 24 horas ( $R^2 = 0,957$ ;  $P = 0,043$ ) o cuando se cultivaron sin ninguna sustancia estimulante durante 12 horas ( $R^2 = 0,994$ ;  $P = 0,006$ ). Igualmente, se obtuvieron correlaciones entre IL4 e IL5 para el grupo de lechones no vacunados procedentes de madres no vacunadas cuando sus células mononucleares se estimularon con EHV durante 24 horas ( $R^2 = 0,900$ ;  $P = 0,038$ ).



## ***5. DISCUSIÓN***



Las interleucinas controlan el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T y B y células hematopoyéticas. El uso de las PBMC en los estudios sobre el sistema inmune tiene la ventaja de que estas células son de fácil acceso y se pueden obtener en cualquier momento de la vida del animal, permitiendo además analizar las citocinas producidas por múltiples tipos celulares, incluyendo todos los mediadores que intervienen en su regulación autocrina y paracrina (Esnault *et al.*, 1996). El estudio a nivel proteico de las interleucinas entraña el problema de que las cantidades de estas moléculas son tan bajas, que las técnicas disponibles (como el ELISA) no son lo suficiente sensibles para detectarlas (Rioja *et al.*, 2004). A este hecho hay que sumar que la frecuencia en sangre de células productoras de interleucinas es muy baja, lo que dificulta aún más su detección por ELISA (Esnault *et al.*, 1996). La mayoría de interleucinas están reguladas a nivel transcripcional, mostrando una correlación directa entre los niveles de ARNm y de proteína (Brorson *et al.*, 1991; Esnault 1996; Verfaillie *et al.*, 2001) al menos durante las primeras 24 horas del cultivo. Por estos motivos la PCR se presenta como una técnica idónea para estudiar los mecanismos regulatorios del sistema inmune. Algunos autores llegan a afirmar que incluso la PCR en tiempo real no es suficientemente sensible para detectar los bajos niveles de expresión que tienen la IL4 e IL5, siendo mejor detectarlas mediante un array de oligonucleótidos (Hamalainen *et al.*, 2001). También hay que considerar que la mezcla de las poblaciones de células T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> existente en las PBMC empleadas en este estudio podrían, a través de las interleucinas secretadas por cada grupo, suprimir la expresión mutua de interleucinas o inhibir sus funciones, todo ello sin olvidar la posible presencia de células T supresoras entre las PBMC cultivadas (Katagiri *et al.*, 1997). A pesar de que se ha descrito previamente que los niveles normales de IL4, IL5 e IL13 son bajos (Darwich *et al.*, 2003a y 2003b; De Groot *et al.*, 2005), en nuestro trabajo se consiguió cuantificar la expresión de las tres

interleucinas estudiadas a excepción de algunas horas en las que su expresión fue indetectable en los 40 ciclos de la PCR en tiempo real. En trabajos posteriores sería interesante aumentar el número de células cultivadas por pocillo o prolongar los ciclos de PCR con el objetivo de intentar amplificar aquellas muestras que poseen niveles bajos de ARNm de las interleucinas buscadas. Al analizar los resultados de un estudio sobre el sistema inmune hay que considerar que las observaciones obtenidas de estudios *in vitro* representan una simplificación de lo que realmente ocurre en la realidad más compleja de los tejidos o sistemas vivos. De hecho, se ha demostrado que las interleucinas establecidas como  $T_{H2}$  pueden ser también producidas por otras células como las  $T_{H1}$ , monocitos, linfocitos B, basófilos o eosinófilos (Esnault, 1996). Asimismo, las respuestas inmunes suelen estar en un equilibrio entre las  $T_{H1}$  y las  $T_{H2}$ , siendo clasificadas la mayoría de células como  $T_{H0}$  capaces de producir interleucinas propias de las respuestas  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  (Coussens *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos muestran que se produce amplificación en los controles de retrotranscripción negativa para la ciclofilina e IL4. Debido a que los primers empleados están diseñados en la unión de dos exones, las amplificaciones detectadas indicarían la existencia de pseudogenes en el genoma del cerdo (Gibson, 1994; Ho *et al.*, 2006). Los pseudogenes están generalmente compuestos por ADN no funcional que carece de intrones. Estos resultados indican que siempre que se desee realizar una cuantificación de la expresión génica de la ciclofilina o de IL4 en la especie porcina hay que realizar una digestión del ADNg, ya que la presencia de pseudogenes es un elemento a tener en cuenta para la optimización de la precisión en estas técnicas. Para nuestro

conocimiento esta es la primera vez que se detectan pseudogenes para la ciclofilina e IL4 en la especie porcina.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que, a diferencia de lo publicado por Reddy et al. (2000) y Raymond y Wilkie (2004), en la raza Large White sí que existe transcripción de IL4. El hecho de que los mencionados autores no detectaran niveles de ARNm de esta interleucina podría ser debido a la falta de sensibilidad de la técnica empleada o a que existan diferencias en la capacidad de síntesis de interleucinas en las distintas líneas genéticas de una misma raza.

La cinética de expresión génica realizada a las horas 2, 12, 24 y 48 muestran que la expresión máxima de IL4 e IL5 se produce entre las 12 y 24 horas postestimulación, y de IL13 entre las 24 y 48 horas, independientemente del estimulante. Estos resultados cinéticos están en concordancia con los publicados por Verfaille *et al.* (2001) los cuales describen que tras la estimulación de PBMC porcinas con Con A se produce un aumento de la expresión de IL4 a las 2 horas, presentando el pico de estimulación en el intervalo de las 8 a las 16 horas. La secuencia temporal de producción de interleucinas de nuestro estudio hace pensar que podría existir algún mecanismo de interacción entre la IL4 y la IL13 en el cerdo, siendo posible que el incremento en los niveles de IL4 potenciara la síntesis de IL13.

La variabilidad en la expresión génica observada dentro de cada grupo experimental está en concordancia con las publicadas previamente (Edfors-Lilja *et al.*,

1991; Scamurra *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2003; De Groot *et al.*, 2005), y podría ser debida a la diferencias por polimorfismos en las regiones promotoras o codificantes de los genes que influyen en la capacidad de la producción de interleucinas (Jensen y Christensen 1981; Kelm *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2003), o a que es posible que en el momento de la extracción no todos los animales tuvieran en la sangre el mismo número de linfocitos TCD4+ y TCD8+ circulantes (Cheevers *et al.*, 1997). La magnitud del cambio detectado en la expresión relativa de las interleucinas en estudio ha sido diferente en los animales vacunados y revacunados frente a PCV2 respecto a los lechones vacunados o no que procedían de madres vacunadas o no. Estas diferentes magnitudes de cambio pueden ser debidas al efecto de la revacunación sucesiva de las cerdas, hecho que podría estimular linfocitos específicos que cruzarían la glándula mamaria para llegar al intestino del neonato y pasar finalmente a su sangre (Bandrick *et al.*, 2008). Estos linfocitos que han sido reestimulados en cada vacunación frente a PCV2 podrían estar predispuestos a sintetizar interleucinas como muestran nuestros resultados. A esta hipótesis para explicar las diferentes magnitudes de cambio de la expresión génica detectadas hay que añadir la variabilidad individual, la diferencia de edad entre los animales, o el hecho de que los genes de las citocinas están sujetos a regulación epigenética. Se ha descrito que la metilación génica de los CpG en los linfocitos T<sub>H</sub> y T<sub>C</sub> los hace menos accesibles a la transcripción (Kelly *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007).

Las correlaciones encontradas entre la expresión de la IL4 e IL5 y la IL4 e IL13 en diferentes días y bajo distintas sustancias estimulantes, concordaría con los autores que describen la activación transcripcional simultánea de estas tres interleucinas

(Hamalainen *et al.*, 2001). Ahora bien, las correlaciones que se encontraron en el presente trabajo no se repitieron todos los días del estudio y en todos los grupos experimentales, lo cual concuerda con lo encontrado por otros autores como Esnault *et al.* (1996) que observaron como la expresión de IL4 e IL13 no iban siempre paralelas en sus niveles en las PBMC de pacientes humanos con atopia, o con Dawson *et al.* (2005) que obtuvieron diferentes niveles de cambio de expresión génica relativa para las IL4, IL5 e IL13 en cerdos infectados con *Toxoplasma gondii* y *Ascaris suum*. Zhang *et al.* (1998) describen como el factor de transcripción GATA-3 es suficiente para inducir la síntesis de ARNm de IL5 pero no de IL4, la cual necesita más mediadores. Por tanto, a pesar de que las interleucinas analizadas en nuestro estudio están en el mismo locus, nuestros resultados sugieren que existen mecanismos de regulación independientes para cada una de ellas que explicarían las diferencias en los resultados aquí obtenidos.

Las diferencias de expresión génica existentes entre el grupo vacunado frente a PCV2 y el control son mayores para IL13 que para IL4. A pesar de que las diferencias existentes en la cantidad de ARNm de IL4 entre los grupos vacunados y no vacunados fueron pequeñas, pueden ser importantes en el establecimiento de la respuesta inmune. Estudios previos muestran que a pesar de que las diferencias en los niveles basales de transcripción génica sean extremadamente pequeñas, pueden indicar diferencias funcionales importantes (Hamalainen *et al.*, 2001). Además, no sólo son importantes las pequeñas diferencias en la expresión de las interleucinas individuales, sino la expresión conjunta de todas ellas simultáneamente y de la expresión de los receptores adecuados en las células adyacentes (Hamalainen *et al.*, 2001), teniendo además en cuenta que los efectos de las mismas interleucinas pueden variar dependiendo de la localización

anatómica (Abel *et al.*, 2003). A pesar de que la cuantificación de la expresión génica realizada en nuestro estudio es relativa a la expresión obtenida en el momento inmediatamente previo al inicio de las estimulaciones *in vitro* (0 horas), los mayores cambios detectados en la expresión de IL13 en las PBMC podrían concordar con trabajos previos que han propuesto que debido a los bajos niveles de IL4 y a los altos de IL13 en las PBMC del cerdo (de la Fuente *et al.*, 2009), la IL13 podría desempeñar las mismas funciones que la IL4 tiene en otras especies (Raymond y Wilkie 2004; 2006; Bautista *et al.*, 2007). A pesar de esto hay autores como Murtaugh *et al.* (2009) que detectaron niveles muy bajos de IL13 en PBMC porcinas cultivadas *in vitro* y estimuladas con diversos mitógenos. Los resultados de Murtaugh *et al.* (2009) deben ser interpretados con cuidado porque su criterio para afirmar que la IL13 se expresaba a un nivel bajo era exclusivamente la intensidad de las bandas de los productos de PCR clásica. Esta controversia hace necesario llevar a cabo más estudios para comprender que mecanismos moleculares están operando para producir estas diferencias de expresión detectadas de las interleucinas porcinas.

En la parte del primer estudio en que se midió la expresión de las interleucinas T<sub>H2</sub> en animales vacunados y revacunados frente a PCV2 comparados con animales no vacunados se observó que en el día 0 no existían diferencias en la expresión entre los dos grupos de animales para ninguna de las interleucinas estudiadas tras la estimulación con diversas sustancias estimulantes. Esto indicaría que previamente a la vacunación no existían células defensivas de memoria con receptores específicos de los antígenos empleados en la vacuna. A los 21 y 28 días de recibir la primera vacunación, las PBMC de los animales vacunados estimuladas con PCV2 expresaron más IL13 que las PBMC

de los animales no vacunados, lo que señalaría la presencia de linfocitos específicos de antígeno o linfocitos de memoria que produjeron una respuesta  $T_{H2}$  mayor comparada con la del grupo control. La síntesis de IL4 como respuesta inespecífica de linfocitos  $T_{H2}$  observada en el grupo de cerdos vacunado y revacunado tras el cultivo en RPMI completo suplementado con antígeno de PCV2, EHV o ninguna sustancia estimulante, nos indicaría que estas células están transcribiendo de manera inespecífica este gen. Estudios previos que monitorizaban PBMC cultivadas con diferentes sustancias ya hallaron que las células sin adición de ninguna sustancia estimulante eran capaces de sintetizar ARNm de distintas interleucinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL6, IL4, IL12, IL8, IL10, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ ), pudiendo en algunos llegar a producir la misma cantidad o incluso más que aquellas PBMC cultivadas con Con A, fimbrias F4 o PHA (Covert y Splitter, 1995; Benveniste *et al.*, 1996; Dozois *et al.*, 1997; Verfaillie *et al.*, 2001).

En las células mononucleares obtenidas de los nódulos linfáticos de animales vacunados y revacunados frente a PCV2 los niveles de expresión génica de IL4 tras la estimulación con PCV2 y EHV se incrementaron hasta 12 y 11 veces, respectivamente, al compararlos con los niveles existentes a tiempo 0 horas. Sin embargo, estas células sólo incrementaron 4 veces la síntesis de IL4 al cultivarlas sin ninguna sustancia estimulante. Para la IL5 los niveles de expresión fueron similares independientemente de las condiciones estimulantes del cultivo (con antígenos de PCV2, EHV o cultivo sin ninguna sustancia estimulante). A diferencia de la IL4 e IL5, los cambios en la producción de IL13 en nódulos linfáticos fueron específicos en respuesta a la estimulación de PCV2. Entre las células mononucleares de los nódulos linfáticos y de la sangre no sólo se observaron diferencias en sus respuestas ante los antígenos

empleados, sino también en la magnitud del cambio detectado para cada interleucina. Así, en las células mononucleares de la sangre se producen mayores cambios en la transcripción de IL13 que en las células mononucleares de los nódulos linfáticos, ocurriendo lo contrario para IL4. La IL5 mostró niveles bajos de cambio de la expresión génica tanto en las las PBMC como en las células mononucleares de la sangre, lo que indicaría que no es una interleucina importante en el cerdo. Las diferencias observadas en la respuesta de síntesis de interleucinas en las células mononucleares obtenidas de los nódulos linfáticos y de la sangre podrían ser debidas a dos causas, en primer lugar habría que considerar que fueran dos poblaciones celulares diferentes, tal y como plantean Coussens *et al.* (2004). La segunda explicación sería que dichas diferencias de expresión fueran debidas a las influencias de microambientes tisulares diferentes en los que se encuentran los linfocitos de la sangre y de los nódulos linfáticos. Estas influencias ejercidas por cada microambiente serían llevadas a cabo mediante distintas hormonas esteroideas actuando de forma paracrina (Daynes *et al.*, 1990; Dudda y Martin, 2004). Estas diferencias en las respuestas de las PBMC y las células mononucleares de los nódulos linfáticos muestran que los resultados obtenidos al analizar las células sanguíneas no reflejan la respuesta completa del organismo cuando este se enfrenta a un determinado antígeno. Por tanto, si se pretende comprender de una manera objetiva la respuesta inmune de un organismo es necesario no sólo estudiar las PBMC, sino también algún órgano linfoide.

En el estudio en que se emplearon lechones vacunados y no vacunados frente a PCV2 procedentes de madres vacunadas o no vacunadas frente a PCV2, se observó como los lechones que recibieron la vacuna y que nacieron y se enalostaron de madres

vacunadas presentan mayores niveles de IL4 e IL13 que los lechones que no se vacunaron y se enalostraron de madres vacunadas y que los lechones que no se vacunaron y se enalostraron de madres no vacunadas. Esta mayor producción de IL4 e IL13 se produjo cuando se cultivaron las PBMC en presencia de PCV2, EHV o ninguna sustancia estimulante, lo que indica que la expresión de estos genes no es específica de la estimulación con PCV2. Existen tres posibles causas para explicar el origen del aumento en la síntesis inespecífica de interleucinas en el grupo que fue vacunado y revacunado y los lechones que se vacunaron y se enalostraron de madres vacunadas. La primera explicación a considerar sería la posibilidad de que la síntesis inespecífica de interleucinas se produjera como consecuencia de la adhesión de las células a la placa de cultivo o en respuesta a los componentes del suero, tal y como sugieren Covert y Splitter (1995). Esta hipótesis no llega a explicar nuestros resultados, pues la transcripción inespecífica sólo se observa en las PBMC de los animales vacunados frente a PCV2 y no en los no vacunados. La segunda posibilidad sería que en el momento en que se tomó la muestra de sangre todavía existieran APC circulantes cargadas con antígenos vacunales de PCV2 y que, por tanto, en las PBMC cultivadas en ausencia de sustancias estimulantes se estuviera produciendo la presentación activa de antígenos de PCV2 y como consecuencia, la activación de los linfocitos T<sub>H</sub> específicos (Van den Bosch *et al.*, 2005). La tercera explicación implicaría el desarrollo de un mecanismo de parainmunidad tras la vacunación. Esta parainmunidad podría generarse bien a partir del adyuvante empleado en la vacuna o bien a partir de las secuencias CpG no metiladas presentes en el genoma de PCV2. Diferentes estudios han demostrado la capacidad de estos CpG para potenciar la actividad de células NK, T<sub>H1</sub> y células B (Ballas *et al.*, 1996; Stacey *et al.*, 1996; Van der Stede *et al.*, 2002), protegiendo al organismo frente a tumores, infecciones por *L. major*, retrovirus, hepatitis B,

herpesvirus y tuberculosis (Huygen *et al.*, 1996; Weiner *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1998; Olbrich *et al.*, 2002; Pyles *et al.*, 2002), aumentando las repuestas a la vacunación con antígenos como ovoalbúmina, *P. multocida* y virus de la enfermedad de Aujeszky y estimulando la síntesis de ARNm de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL6 e IL2 (Klinman *et al.*, 1996; Van der Stede *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Linghua *et al.*, 2008).

Una observación a tener en cuenta es que para que se produzca esta síntesis inespecífica de interleucinas en las PBMC de los animales empleados en nuestro estudio haría falta una estimulación en doble etapa de las células. Observando los datos de expresión génica se comprueba como el día 21 del primer estudio (cuando los animales sólo habían recibido una dosis de vacuna frente a PCV2) sólo se producen diferencias de expresión génica para la estimulación con PCV2. Sin embargo, el día 28, tras recibir la revacunación frente a PCV2, existen diferencias de expresión para las interleucinas cuando son cultivadas en presencia de PCV2, EHV y ninguna sustancia estimulante. Las células obtenidas de lechones vacunados procedentes de madres vacunadas son también células que han recibido una doble estimulación: en primer lugar cuando se encontraban circulando en la madre de la cual se encastraron los lechones, y en segundo lugar después de pasar a través del calostro y cruzar el intestino del neonato fueron estimuladas en el propio lechón cuando éste recibió la vacuna frente a PCV2. Sea cual fuere el mecanismo que potencie la síntesis de interleucinas T<sub>H2</sub> en las células de los animales vacunados frente a PCV2, la vacunación y revacunación de los cerdos o la vacunación de los lechones encastrados de madres vacunadas estimularía la producción de mediadores de la rama T<sub>H2</sub> del sistema inmune. Esta síntesis potenciada

de interleucinas  $T_{H2}$  podría estimular a las células B a proliferar y diferenciarse, produciendo diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgE y algunas clases de IgG (Croft y Swain, 1991; Lohoff *et al.*, 1992; McKenzie *et al.*, 1993b; Punnonen *et al.* 1993; Alberts *et al.*, 2002) contribuyendo a superar infecciones virales (Janeway *et al.*, 2001; Nathanson *et al.*, 2007). Por tanto, a la vista de nuestros resultados, parece recomendable desde un punto de vista protector frente a PCV2 de los cerdos en las explotaciones comerciales, la aplicación de una segunda dosis de vacuna a los animales vacunados o la vacunación de lechones nacidos de madres ya vacunadas. La vacunación frente a PCV2 disminuye la infección por este virus, reduciendo la modulación vírica de las células dendríticas de los cerdos, lo que contribuye a un mejor establecimiento de la respuesta inmune de los animales (Ovesen y Kunstmann, 2008). Los datos de nuestro estudio sobre la capacidad de síntesis de interleucinas de los animales vacunados aportan nuevos datos para explicar porque la vacunación frente a PCV2 produce efectos beneficiosos no sólo en el control de las EACV (Joisel *et al.*, 2008), sino también frente a otros patógenos como virus PRRS o *Mycoplasma hyorhinis*, (Mette *et al.*, 2008) o en la mejora de la ganancia media diaria de los cerdos de madres vacunadas (Delisle *et al.*, 2008).

Las diferencias encontradas en la capacidad de síntesis de interleucinas por parte de las células mononucleares de animales vacunados frente a PCV2 generan nueva información para comprender mejor el mecanismo molecular por el que esta vacuna protege a los animales. La importancia de los datos obtenidos en este estudio radican en que todos los avances que se realicen en la comprensión de la síntesis de interleucinas como parte de la respuesta inmune tras la vacunación, ayudarán a un mejor

entendimiento de los mecanismos de patogenicidad y de la inmunidad, llevando finalmente al desarrollo de vacunas más eficaces.

## ***6. CONCLUSIONES***



- 1- En el genoma de la especie porcina existen pseudogenes de ciclofilina e IL4 que interfieren en la cuantificación de la expresión génica de sus ARNm.
- 2- En el ganado porcino la IL4 y la IL13 expresan mayor cambio en sus niveles de expresión génica que la IL5.
- 3- El pico de expresión de ARNm de IL4 e IL5 en las células mononucleares porcinas se produce entre las 12 y 24 horas postestimulación, y de ARNm de IL13 entre las 24 y 48 horas.
- 4- Apesar de que la transcripción de IL4, IL5 e IL13 en las células mononucleares porcinas está correlacionada en determinadas ocasiones, deben existir otros mecanismos de regulación independientes para cada una de ellas.
- 5- Las PBMC de los cerdos vacunados y revacunados frente a PCV2 expresan mayores niveles de IL4 que las PBMC de los animales no vacunados cuando son cultivadas con péptidos del ORF2 de PCV2, con péptidos de EHV o en ausencia de sustancias potencialmente estimulantes.
- 6- Las PBMC de los cerdos vacunados y revacunados frente a PCV2 expresan mayores niveles de IL13 que las PBMC de los animales no vacunados cuando son reestimuladas con péptidos antigénicos del ORF2 de PCV2.
- 7- En las PBMC porcinas se producen mayores cambios postestimulación en la transcripción de IL13 que en las células de mononucleares de los nódulos linfáticos, dándose el fenómeno opuesto para la IL4 e IL5.

- 8- Las PBMC de los lechones vacunados que nacieron y se enalostraron de madres vacunadas presentan mayores niveles de IL4 e IL13 que los lechones que no se vacunaron y se enalostraron de madres vacunadas y que los lechones que no se vacunaron y se enalostraron de madres no vacunadas, cuando son cultivadas con antígeno de PCV2, EHV o en ausencia de sustancias potencialmente estimulantes.
  
- 9- La vacunación y revacunación de cerdos frente a PCV2 y la vacunación frente a PCV2 de lechones nacidos y enalostrados de cerdas vacunadas frente a PCV2 potenciaría la síntesis de interleucinas  $T_{H2}$ , lo que contribuiría al establecimiento de la respuesta inmune y a la mejora del estado sanitario de las explotaciones.

## ***7. RESUMEN***



El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) genera en el ganado porcino diversas enfermedades que se conocen con el nombre de enfermedades asociadas a PCV2 (EACP). Dentro de estas EACP encontramos la infección sistémica (donde se incluyen los casos diagnosticados en el pasado como PMWS), neumonías asociadas a PCV2, enteritis asociadas a PCV2, PDNS asociado a PCV2 y fallo reproductivo asociado a PCV2. La infección sistémica provoca graves consecuencias sanitarias que llevan a pérdidas económicas importantes en las explotaciones porcinas.

En nuestro estudio hemos valorado la expresión génica de las interleucinas (IL) de respuesta  $T_{H2}$  (IL4, IL5 e IL13) en animales vacunados y no vacunados frente a PCV2, para comprender mejor las respuestas inmunológicas  $T_{H2}$  desarrolladas tras la vacunación, así como estudiar la variabilidad individual en la respuesta inmune  $T_{H2}$  generada. Para ello, se realizaron dos estudios, en el primero de ellos se emplearon 10 cerdos de 10 semanas de edad vacunados y revacunados frente a PCV2 de los que se obtuvieron células mononucleares periféricas de la sangre (PBMC) los días 0, 21 y 28 tras la primera vacunación y de los nódulos linfáticos el día 29 tras la primera vacunación. En el segundo estudio se emplearon PBMC de 15 lechones de 4 semanas de edad distribuidos en tres grupos: lechones vacunados nacidos de madres vacunadas, lechones no vacunados nacidos de madres vacunadas y lechones no vacunados procedentes de madres no vacunadas. Las células mononucleares de los animales de ambos estudios se cultivaron en presencia de péptidos antigénicos del ORF2 de PCV2, péptidos del gen temprano inmediato del Herpes Virus Equino (EHV) y en presencia sólo de medio de cultivo como control negativo. Se realizó una cinética de expresión extrayendo el ARN a diferentes puntos de tiempo: 0, 2, 12, 24 y 48 horas tras la

estimulación con los antígenos. La expresión génica fue calculada mediante cuantificación relativa empleando PCR a tiempo real con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y utilizando como gen endógeno la ciclofilina.

Nuestros resultados mostraron que en el genoma de la especie porcina existen pseudogenes de ciclofilina e IL4 que podrían interferir en la cuantificación de su expresión a nivel del ARNm. Se observó que la IL4 y la IL13 presentan mayores niveles de cambio de expresión génica que la IL5, teniendo su pico de expresión de ARNm entre las 12 y 24 horas postestimulación para las IL4 e IL5 y entre las 24 y 48 horas para la IL13. En las PBMC porcinas se detectaron mayores niveles de cambios postestimulación en la transcripción de IL13 que en las células de mononucleares de los nódulos linfáticos, dándose el fenómeno contrario para la IL4 e IL5. Los datos de expresión génica mostraron que a pesar de que en ocasiones las células mononucleares porcinas tengan correlaciones significativas en la transcripción de IL4, IL5 e IL13, deben existir otros mecanismos que regulen independientemente la transcripción de cada una de ellas. Respecto a los efectos de la vacunación, nuestros resultados mostraron que las PBMC de los cerdos vacunados y revacunados frente a PCV2 expresaron mayores niveles de IL4 que las PBMC de los animales no vacunados en todas las condiciones de cultivo ensayadas. Asimismo, las PBMC de los cerdos vacunados y revacunados frente a PCV2 expresaron mayores niveles de IL13 que las PBMC de los animales no vacunados cuando fueron reestimuladas con péptidos antigénicos del ORF2 de PCV2.

Las PBMC de los lechones vacunados nacidos de madres vacunadas presentaron mayores niveles de IL4 e IL13 que el resto de lechones de los otros dos grupos en todas las situaciones de cultivo probadas.

Podemos concluir tras este estudio que la vacunación y revacunación de cerdos frente a PCV2 y la vacunación frente a PCV2 de lechones nacidos y encalostrados de cerdas vacunadas frente a PCV2 potenciaría la síntesis de interleucinas  $T_{H2}$ , que al contribuir en el establecimiento de la respuesta inmune, favorecería el estado sanitario de los animales.



## ***8. SUMMARY***



## 8.1 INTRODUCTION

Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome caused by porcine circovirus type 2 (PCV2) produces in pigs serious sanitary and economic consequences. At present, this virus infects endemically worldwide farms. This has taken as a consequence the increase of the levels of mortality in 3-4 % above the previous situation. The losses generated by the infection of PCV2 in Europe are calculated between 562 and 900 million € every year. This situation made necessary the development of strategies to fight against the virus as for example vaccines which have showed their aptitude to reduce the productive losses associated with the infection of PCV2. Several studies have demonstrated that these vaccines increase the level of antibodies in the animals and reduce the severity of the injuries associated to PCV2, as well as the number of virus excreted, which finally leads to a decrease in the mortality and the expense in medicines, and to an increase in the average profit. Available commercial vaccines are authorized for the application in sows or in piglets. Poor development of the immune system of the piglets, along with the vaccination of the newborn can favor the systemic infection for PCV2. This fact has done that the vaccination of the sows is used widely (Pravieux *et al.*, 2007). The immune response can be classified from a functional point of view in cellular or  $T_{H1}$  and humoral or  $T_{H2}$ . The  $T_{H2}$  response is regulated by the interleukins (IL) IL4, IL5, IL10 and IL13. The regulative mechanisms of the immune response of the pig seem to be very similar to the mechanisms described in other species more studied such as mouse or human (Raymond and Wilkie, 2004; Nguyen *et al.*, 2007; De la Fuente *et al.*, 2009). Contrary to this affirmation, Murtaugh *et al.* (2009) do not describe the same functions for IL4 in pig than in human or mouse. This controversy makes that some authors propose that in swine, IL13 develops the same functions than IL4 in other species (Bautista *et al.*, 2007). The sensibility of the ELISA

technique is sometimes not sufficient to detect the levels of interleukins in the supernatants of biological samples (Rioja *et al.*, 2004). Quantitative PCR (Q-PCR) is a very specific, sensitive and profitable technology to quantify the gene expression of mRNA (Bustin 2002; Rioja *et al.*, 2004; De Boever *et al.*, 2008). The levels of mRNA and protein are correlated when they are measured at the same time and during the first 24 hours of culture (Verfaille *et al.*, 2001).

The aims of the present study were:

- 1- To evaluate the T<sub>H2</sub> immune response of the PCV2-vaccinated and re-vaccinated pigs when their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are stimulated with antigenic peptides of the open reading frame 2 (ORF2) of PCV2.
- 2- To study the effect of the PCV2-vaccination of piglets born from PCV2-vaccinated sows on the response of their PBMC after the stimulation with peptides of the ORF2 of PCV2.
- 3- To increase the knowledge on the kinetic and the type of important interleukins in the T<sub>H2</sub> response of the pig, verifying if some type of correlation exists between them.

## **8.2 MATERIALS AND METHODS**

### ***8.2.1 Experimental design: animals and vaccine protocols***

#### ***8.2.1.1 PCV2- vaccinated and unvaccinated pigs***

Ten SPF 10 weeks old Large White pigs were divided in two groups: vaccinated (n=5) and control (unvaccinated, n=5). Animals in the first group were vaccinated the day 0 of the experiment with Circovac ® (Merial, France). These animals were revaccinated the day 21 of the experiment. Two types of samples were obtained: blood and retropharyngeal lymph nodes. Whole blood was obtained by venipuncture of the jugular vein in sodium heparin tubes the days 0, 21 and 28 of the experiment. The day 29 of the experiment the vaccinated animals were euthanized by an intravenous injection of pentobarbital, complete necropsies were performed and lymph nodes were obtained.

#### ***8.2.1.2 PCV2-vaccinated and unvaccinated piglets born from PCV2- vaccinated and unvaccinated sows***

Three groups of one month old Large White pigs were used. Each group was constituted by 5 piglets from different sows to avoid litter effect. The vaccination protocol for sows was the recommended by the manufacturer: two doses to gilts and one dose to sows two weeks before the farrow. Piglets were vaccinated at two weeks of age. Whole blood was obtained from 4 week old piglets by venipuncture of the jugular vein in sodium heparin tubes. The groups were formed as indicated in table 1.

Table 1. Group vaccination features of the second study.

	N° of piglets	Vaccinated sow	Vaccinated piglets	Piglets age at vaccination	Piglets age at blood sampling
<b>Group 1</b>	5	Yes	Yes	2 weeks old	4 weeks old
<b>Group 2</b>	5	Yes	No	No	4 weeks old
<b>Group 3</b>	5	No	No	No	4 weeks old

### *8.2.2 Isolation of mononuclear cells and culture conditions*

PBMC were isolated by density gradient centrifugation by using ficoll (Pancoll density 1.077 g/ml; Panbiotech GmbH; Germany). The isolated cells were washed three times with PBS. Cells were counted on a Neubauer chamber and finally were cultured in complete RPMI (RPMI 1640, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 0.01% β-mercaptoethanol and 10% fetal calf serum) at 37° C in humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>). Two and a half million cells were cultured per well in a total volume of 1 ml.

To obtain the mononuclear cells from the retropharyngeal lymph nodes, these were cut and fat was removed. They were introduced in sterile plastic bags and homogenized in a Stomacher (Lab-Blender, Italy) in two consecutive sessions using 7 ml of sterile PBS. Cells were transferred to 15 ml tubes and centrifugated at 400g during 10 min at 20°C. Cells were counted on a Neubauer chamber and cultured in

complete RPMI. Two and a half million cells were cultured per well in a total volume of 1 ml.

Cells from each animal were cultured under three different conditions:

4- Stimulation with PCV2 ORF2 antigenic peptides at a final concentration of 1 µg/ml.

5- Stimulation with peptides of the gene immediate early (IE) from the Equine Herpes Virus (EHV) at a final concentration of 1 µg/ml.

6- Non activation condition: the culture media was composed exclusively by complete RPMI.

### ***8.2.3 RNA extraction and cDNA synthesis***

Cells were collected at 0 h (this sample was the calibrator for gene expression), 2, 12, 24 and 48 h after stimulation. Harvested cells were washed in PBS and the RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, United States). The extracted RNA was resuspended in 50 µl of ultrapure water. The total RNA was quantified using the Qubit Quantitation Platform (Invitrogen, UK). As the negative control for retrotranscription included in the Q-PCR showed amplification for IL4 and cyclophilin, all RNA samples were treated with Turbo DNA Free (AMBION, United

States). Total RNA was converted into cDNA using the Quantitect Reverse Transcription kit (QIAGEN, Germany).

#### 8.2.4 Oligonucleotide primers

The oligonucleotide primers and probes used for the detection of IL4, IL5, IL13 and cyclophilin by Q-PCR were derived from published sequences (Dawson *et al.*, 2005; Flores-Mendoza *et al.*, 2008) and they are shown in table 2. Primers were designed in the exon-exon junction to avoid genomic DNA amplification. All the probes were labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM). All the oligonucleotides were synthesized commercially (TIB-MOLBIOL, Germany). In order to optimize PCR efficiency, different concentrations of primers and probe were tested.

Table 2. Primers and probes used in this experiment

	Primer 1	Primer 2	Probe	Product	Accession #
<b>IL 4</b>	GCCGGGCCT CGACTGT	TCCGCTCAGGA GGCTCTTC	CTTCGGCACATCTA CAGACACCACACG	68 (from 232 to 300)	NM_214123
<b>IL 5</b>	GACTGGTGG CAGAGACCT TGAC	CTTCAATGCAT AGTTGGTGATT TGT	CTGCTCTCCATTCA TCGAACTCTGCTGA T	114 (from 83 to 197)	NM_214205
<b>IL 13</b>	CTGACCACC AGCATGCAG TACT	GCTGCAGTCGG AGATGTTGA	TGCCGCCCTGGAAT CCCTCA	63 (from 224 to 287)	NM_213803
<b>Cyclophilin</b>	GCCATGGAG CGCTTTGG	TTATTAGATT GTCCACAGTCA GCAAT	TGATCTTCTTGCTG GTCTTGCCATTCTCT	78 (from 425 to 503)	NM_214353

### **8.2.5 Real-time Q-PCR**

Real time Q-PCR reactions were performed with a Taqman gene expression master mix (Applied Biosystems, United States) by using an ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, United States) in the first study (PCV2-vaccinated and unvaccinated pigs) and a Lightcycler 480 (Roche, Switzerland) in the second one (PCV2-vaccinated and unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated and unvaccinated sows). The amplification conditions were as follows: 50° C for 2 min, 95° C for 10 min, and 40 cycles of 95° C for 15 sec and 60° C for 1 min. Fluorescence signals were measured at the end of each cycle. All reactions were performed in duplicate, and results were analyzed by using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method as previously reported (Livak *et al.*, 2001; Coussens *et al.*, 2004; Shirkey *et al.*, 2006; Karcher *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2009). To study the effect of stimulation of PCV2 and EHV antigens on interleukin expression in porcine mononuclear cells, the cyclophilin gene was employed as endogenous control gene (for calculation of  $\Delta C_t$ ) and samples at time 0 h for each animal as calibrator (for calculation of  $\Delta\Delta C_t$ ). Cyclophilin was chosen because it was previously used as housekeeping gene in the pig (Dozois *et al.*, 1997; Fournout *et al.*, 2000; Verfaille *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2003; Pie *et al.*, 2004; Girard *et al.*, 2005; Meerts *et al.*, 2005; Sipos *et al.*, 2005; Verfaille *et al.*, 2005) and in other species (He *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2008).

### **8.2.6 PCV2 classic PCR**

All the experimental animals were tested for PCV2 by classic PCR. DNA extraction was performed from blood using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Germany) following the instructions of the manufacturer. The

PCR protocol was the referred by Harms *et al.* (2001). PCR products were analyzed with 1.2 % agarose gel electrophoresis.

### ***8.2.7 Statistical study***

To study if the IL4, IL5 and IL13 gene expression levels followed a normal distribution, a Kolmogorov-Smirnov's test was used. To study the possible effect of the stimulation with PCV2 in the interleukin production, U of Mann-Whitney non parametric tests were used, grouping the information as follows:

#### ***8.2.7.1 Relative gene expression for IL4, IL5 and IL13 in PCV2-vaccinated and unvaccinated pigs***

- Relative gene expression for the vaccinated animal group versus control group for different postvaccination days independently of the hours.
  
- Relative gene expression for the vaccinated animal group versus control group at every hour of every day.
  
- Relative gene expression for each group comparing different times poststimulation.

**8.2.7.2 Relative gene expression for IL4, IL5 and IL13 in PCV2-vaccinated and unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated and unvaccinated sows**

- Relative gene expression for vaccinated and unvaccinated piglets born from vaccinated and unvaccinated sows at every hour.

- Relative gene expression for each group comparing different times poststimulation.

The results were represented in boxes constructed from the percentiles 25 % to 75%. Atypical values have been considered to be those that stay out of the segments of length of 1.5 times the interquartile range (percentile 75 % - percentile 25 %). The possible correlation between the interleukin levels was analyzed by means of Pearson's correlation. Statistically significant differences were considered for  $P < 0.05$ . The program SPSS v.15 (SPSS Inc., the USA) was used for statistical analysis.

### **8.3 RESULTS AND DISCUSSION**

The obtained results showed amplification for the cyclophilin and IL4 negative controls of retrotranscription. As the used primers are designed in the exon-exon junction, these amplifications indicate the existence of pseudogenes in the pig genome. The presence of pseudogenes is described in the literature as an element to consider for the optimization of the precision in the quantification of gene expression (Gibson 1994; Ho *et al.*, 2006). These pseudogenes are generally composed by not functional DNA that lacks introns.

In the first part of the study in which we studied T<sub>H2</sub> interleukin expression in PCV2-vaccinated and re-vaccinated animals, no difference for interleukin synthesis at day 0 for PBMC in both groups was observed. This would indicate that before the vaccination did not exist specific lymphocytes against the vaccine antigens. At days 21 and 28 after vaccination, a greater response in the IL4 synthesis in the vaccinated group whatever the stimulant (PCV2, EHV or no stimulant substance) was detected, this may indicate that unspecific transcription of the IL4 gene is taking place. Previous studies that monitored PBMCs cultured with different substances found that the cells cultured with no stimulant substance were capable of synthesizing mRNA of different interleukins (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL6, IL4, IL12, IL8, IL10, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ ), producing the same quantity or even more than those PBMC cultured with concanavalin A, F4 fimbriae or phytohemagglutinin (Covert y Splitter 1995; Benveniste *et al.*, 1996; Dozois *et al.*, 1997; Verfaillie *et al.*, 2001).

The levels of gene expression of IL4 after the stimulation with PCV2 and EHV increased up to 12 and 11- folds, respectively, in the mononuclear cells of lymph nodes coming from vaccinated animals. Unlike PBMC, mononuclear cells of lymph nodes coming from vaccinated animals only increased 4-folds the synthesis of IL4 when they were cultured with no stimulant substance. For the IL5 the levels of expression were similar regardless of the stimulant conditions (antigens of PCV2, EHV or no stimulant substances). Unlike the IL4 and IL5, the changes in the IL13 production in lymph nodes were specific in response to the stimulation of PCV2. Comparing the response of the mononuclear cells coming from the lymph nodes or the blood, differences were not only observed in their answers depending on the used antigens, but also in the magnitude of

the change for interleukin synthesis. In PBMC major changes are observed for transcription of IL13 compared to mononuclear cells of the lymph nodes, but for IL4 and IL5 the major changes in gene expression are detected in the mononuclear cells of lymph nodes. The differences observed in the synthesis of interleukins in the mononuclear cells obtained from lymph nodules or from blood could be due to the different microtissular environments where the cells are (Daynes *et al.*, 1990; Dudda y Martin, 2004). A second explanation could be that they are two cellular different populations, as proposed previously by Coussens *et al.* (2004).

In the second study, it was observed that the PCV2-vaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows presented higher levels of IL4 and IL13 than unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated or unvaccinated sows. This enhanced IL4 and IL13 secretion was observed when the PBMC were cultured in presence of PCV2, EHV or no stimulant substance. These results may indicate that the expression of these genes is not specific of the stimulation with PCV2.

Three possible reasons exist to explain the origin of the increase in the unspecific synthesis of interleukins detected in the PCV2-vaccinated and re-vaccinated pigs and the PCV2-vaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows. The first explanation to consider is that the unspecific interleukin synthesis could be caused by the adhesion of the cells to the plate surface or in response to some components of the culture media, as Covert and Splitter (1995) suggested. This hypothesis does not explain our results, since the unspecific transcription is only observed in the PBMC of the PCV2-vaccinated animals. The second possibility assumes that the obtained blood

samples had circulating antigen presenting cells loaded with vaccine antigens, taking place an active presentation of antigen to specific lymphocytes (Van den Bosch *et al.*, 2005). The third possible explanation may involve the development of a mechanism of paraimmunity after the vaccination. This parainmunity could be generated because of the adjuvant employed in the vaccine or from the cytosine guanine dinucleotide sequences (CpG) present in the PCV2 genome. Different studies have demonstrated the ability of these CpG to promote the activity of NK, T<sub>H1</sub> and B cells (Ballas *et al.*, 1996; Stacey *et al.*, 1996; Van der Stede *et al.*, 2002), protecting the organism against tumors, *Leishmania major*, retrovirus, hepatitis B virus, herpesvirus and tuberculosis infections (Huygen *et al.*, 1996; Weiner *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1998; Olbrich *et al.*, 2002; Pyles *et al.*, 2002), enhancing the immune response against ovoalbumin antigen, *Pasteurella multocida* and Aujeszky disease virus, and stimulating mRNA synthesis of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL6 and IL2 (Klinman *et al.*, 1996; Van der Stede *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Linghua *et al.*, 2008). Anyhow, the higher synthesis of T<sub>H2</sub> interleukins detected in the cells from the PCV2-vaccinated animals might suppose an immunological advantage compared to the unvaccinated animals. This enhanced synthesis of T<sub>H2</sub> interleukins could stimulate B cells to proliferate and differentiate, producing most classes of antibodies, including IgE and some subclasses of IgG antibodies (Croft y Swain, 1991; Lohoff *et al.*, 1992; McKenzie *et al.*, 1993b; Punnonen *et al.* 1993; Alberts *et al.*, 2002) contributing to overcome viral infections (Janeway *et al.*, 2001; Nathanson *et al.*, 2007). Our results support the PCV2-revaccination of pigs or the PCV2-vaccination of piglets born from PCV2-vaccinated sows in order to boost the immune response of pigs.

It is important to consider that this non-specific synthesis of interleukins by PBMC only was produced after double stage stimulation in the animals. Data from the blood obtained the day 21 of the first study (when the animals only had received one dose of the PCV2-vaccine) showed that there were only differences of gene expression for the stimulation with PCV2. Nevertheless, on the day 28, after receiving the PCV2-revaccination, differences of interleukin expression were detected when cells were cultivated in presence of PCV2, EHV and no stimulant substance. PBMC from PCV2-vaccinated piglets born from vaccinated sows were also double stage stimulated cells. The cells were firstly stimulated when they were circulating in the sows blood. After farrowing, these specific cells were transferred through the colostrums to the piglets, crossing the intestine and accumulating in lymphoid tissues. The second stimulation of these cells took place when the piglets were vaccinated against PCV2.

The magnitude of the change detected in the relative expression of the interleukins was different in the animals of the first study (PCV2-vaccinated pigs) and the second one (PCV2-vaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows). In the first study the higher difference detected between PCV2-vaccinated and control group was a 16-fold increase for IL4 and 109-fold increase for IL13 in the vaccinated group compared to the control group. PCV2-vaccinated piglets born from PCV2 vaccinated sows produced 9-fold more IL4 than unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows and 21-fold more expression than unvaccinated piglets born from unvaccinated sows. Regarding IL13, PCV2-vaccinated piglets born from PCV2 vaccinated sows produced 2400-fold more ARN than unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows or unvaccinated piglets born from unvaccinated sows. These differences could be

due to the effect of repeated PCV2-vaccination of sows that could stimulate the specific lymphocytes that eventually will cross the mammary gland to achieve the neonate intestine (Bandrick *et al.*, 2008). These continuously stimulated lymphocytes could be overstimulated to synthesize interleukins as shown in our experiment, apparently giving an immunological advantage to those animals under double PCV2 stimulation. The differences observed could also be determined by individual variability, the difference of age between the animals used, or to the epigenetic regulation of the interleukins genes (Kelly *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007).

The gene expression differences detected between the vaccinated and control groups are higher for IL13 than for IL4. In spite of the differences in mRNA quantity of IL4 between groups were small, they can be important in the establishment of the immune response in field conditions. Previous studies showed that despite the differences on the base levels of gene transcription are extremely small, it can indicate functional important differences (Hamalainen *et al.*, 2001). In addition, not only the small differences are important in the expression of the individual interleukins, because it is also important the combined expression of all of them simultaneously and the expression of the receptors in the adjacent cells (Hamalainen *et al.*, 2001).

Regardless of the quantification of the gene expression made in our study is relative to the expression obtained in the immediately previous moment to the beginning of the *in vitro* stimulations (0 hours), the major changes detected in the expression of IL13 in the PBMC agreed with previous studies that proposed that IL13 replaces to IL4 in its functions in the pig, due to the higher levels of expression of IL13

(Raymond and Wilkie 2004; Raymond *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2009). Further research need to be done since certain controversy exists because some authors as Murtaugh *et al.* (2009) found low levels of IL13 in porcine PBMC stimulated with phytohemagglutinin. The results of Murtaugh *et al.* (2009) should be interpreted carefully since their criteria to affirm a low expression of this interleukin was just the band intensity of the classic PCR products.

The genes for IL4, IL5 and IL13 are in the same locus in the chromosome 2 of the pig, sharing regulatory mechanisms of expression. The kinetic of gene expression made at 2, 12, 24 and 48 hours showed that the maximum expression of IL4 and IL5 was produced between 12 and 24 hours poststimulation, and for IL13 between 24 and 48 hours. These kinetic results are in concordance with the referred by Verfaillie *et al.* (2001). Significant correlations between IL4-IL5, and IL4-IL13 expression were found in different days and under different stimulant substances. In the first study, we found correlations in the PCV2-vaccinated group for IL4 and IL5 at 12 hours in the day 21 when the PBMC were stimulated with PCV2 antigen ( $R^2 = 0.908$ ;  $P = 0.033$ ) and at 24 hours in the mononuclear cells of the lymph node when they were stimulated with EHV in the day 29 ( $R^2 = 0.927$ ;  $P = 0.024$ ). Correlations for IL4 and IL13 were detected for the PCV2 vaccinated group when the mononuclear cells of the lymph nodes were cultured with PCV2 antigens during 24 hours in the day 29 ( $R^2 = 0.934$ ;  $P = 0.020$ ) and when PBMC were cultured during 24 hours without any stimulating substance in the day 28 ( $R^2 = 0.930$ ;  $P = 0.022$ ). Eventually, a correlation between IL4 and IL13 was detected the day 29 when the mononuclear cells of lymph nodes were stimulated during 24 hours without any stimulant substance ( $R^2 = -0.0982$ ;  $P = 0.003$ ).

In the PBMC from PCV2-vaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows we detected correlations between IL4 and IL13 when they were stimulated with PCV2 antigen during 12 hours ( $R^2 = 0.987$ ;  $P = 0.013$ ) and 24 hours ( $R^2 = 0.976$ ;  $P = 0.024$ ), with EHV during 24 hours ( $R^2 = 0.957$ ;  $P = 0.043$ ) and when they were cultured without any stimulant substance during 12 hours ( $R^2 = 0.994$ ;  $P = 0.006$ ). In the unvaccinated piglets born from unvaccinated sows group a correlation between IL4 and IL5 when the PBMC were stimulated with EHV during 24 hours ( $R^2 = 0.900$ ;  $P = 0.038$ ) was detected. These results agree with Hamalainen et al. (2001) who described the simultaneous transcriptional activation of these three interleukins. The correlations detected in the present study did not repeat every day of the study and in all the experimental groups, which agrees with the observed by other authors who described that the expression of these interleukins was not always correlated (Esnault *et al.*, 1996; Dawson *et al.*, 2005). Our results support the idea of synergic and complementary activity of the IL4, IL5 and IL13 in the immune response although independent regulatory mechanisms seems to exist for each one (Raymond and Wilkie 2004; Raymond *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2009), being possible that the increased levels of IL4 enhance the synthesis of IL13.

The variability observed in the gene expression of the experimental groups is in conformity with the data published before (Edfors-Lilja *et al.*, 1991; Scamurra *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1999; De Groot *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2003). This variability could be due to polymorphic differences in the promotor regions of the genes (Jensen and Christensen 1981; Kelm *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2003).

## 8.4 CONCLUSIONS

- 1- There are pseudogenes of cyclophilin and IL4 in the pig genome, these pseudogenes can interfere in the quantification of the mRNA gene expression.
  
- 2- IL4 and IL13 present higher gene expression changes than IL5 in the pig.
  
- 3- The peak of expression of mRNA of IL4 and IL5 in the mononuclear porcine cells is produced between 12 and 24 hours poststimulation, and the peak for mRNA of IL13 is produced between 24 and 48 hours.
  
- 4- Although IL4, IL5 and IL13 gene expression levels in the mononuclear porcine cells is correlated in certain occasions, independent regulatory mechanisms seem to regulate each one of them.
  
- 5- PBMC from PCV2-vaccinated pigs express higher levels of IL4 than PBMC from unvaccinated animals when they are cultured with peptides of the ORF2 of PCV2, peptides of EHV or in absence of potentially stimulant substances.

- 6- PBMC from PCV2-vaccinated pigs express higher levels of IL13 than PBMC from unvaccinated animals when they are stimulated with antigenic peptides of the ORF2 of PCV2.
  
- 7- Higher changes in the expression of IL13 than in the expression of IL4 and IL5 occur in porcine PBMC when they are stimulated with antigens. However, higher changes in the expression levels of IL4 and IL5 than in the levels of IL13 are observed in mononuclear cells from lymph nodes, suggesting that PBMC and mononuclear cells from lymph nodes are two different populations.
  
- 8- PBMC from PCV2-vaccinated piglets born from PCV2-vaccinated sows produce higher levels of IL4 and IL13 than PBMC from unvaccinated piglets born from PCV2-vaccinated or unvaccinated sows when they are cultured with antigen of PCV2, EHV or in absence of potentially stimulant substances.
  
- 9- PCV2-revaccination of pigs or PCV2-vaccination of piglets born from PCV2-vaccinated sows seem to boost the synthesis of T<sub>H2</sub> interleukins, contributing to the establishment of the immune response.

## ***9. AGRADECIMIENTOS***



A mi familia por su apoyo constante, sin vosotros nada habría sido posible. Sois el ejemplo a seguir.

A mis directores Guillermo Ramis Vidal y Francisco José Pallarés Martínez por su trabajo y estímulo para hacer esta tesis. Porque me habeis demostrado que no hay nada imposible.

A Antonio Muñoz Luna por su confianza depositada en mí y por ser ejemplo de superación constante.

A todo el equipo de los Laboratorios Merial de Lyon por la financiación de este proyecto y por la inestimable ayuda prestada en el laboratorio. Igualmente agradecer al equipo de Gordon Allan del Agri-Food and Biosciences Institute (Belfast) su colaboración en los estudios realizados.

A Juan Manuel Herrero Medrano, por su extraordinario compañerismo, amistad y valía.

A Roberto Carlos del Valle Cordero por su amistad y alegría a cada llegada a casa.

A mis amigos por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos.



# ***10. BIBLIOGRAFÍA***



Abel K, Compton L, Rourke T, Montefiori D, Lu D, Rothausler K, Fritts L, Bost K, Miller CJ (2003) Simian-Human immunodeficiency virus SHIV89.6-induced protection against intravaginal challenge with pathogenic SIV mac 239 is independent of the route of immunization and is associated with a combination of cytotoxic T-lymphocyte and alpha interferon responses. *J Virol* 77: 3099-3118.

Adkins B, Du RQ (1998) Newborn mice develop balanced TH1/TH2 primary effector responses in vivo but are biased to TH2 secondary responses. *J Immunol* 160: 4217-4224.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23: 147-161.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science.

Albina E, Truong C, Hutet E, Blanchard P, Cariolet R, L'Hospitalier R, Mahé D, Allée C, Morvan H, Amenna N, Le Dimna M, Madec F, Jestin A (2001) An experimental model for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol* 125:292-303.

Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM (1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121:1-11.

Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S (2000A) Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145: 2421-2429.

Allan GM, Ellis JA (2000B) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12:3-14.

Bautista EM, Nfon C, Ferman GS, Golde WT (2007) IL-13 replaces IL-4 in development of monocyte derived dendritic cells (MoDC) of swine. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 56-67.

Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157:1840-1845.

Bandrick M, Pieters M, Pijoan C, Molitor TW (2008) Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin Vaccine Immunol* 15: 540-543.

Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert PH, Siegrist CA (1996) Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol*. 26:1489-1496.

Belardelli F, Ferrantini M (2002) Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 23: 201-208. doi:10.1016/S1471-4906(02)02195-6.

Benveniste O, Vaslin B, Villinger F, Le Grand R, Ansari AA, Dormont D (1996) Cytokine mRNA levels in unmanipulated (*ex vivo*) and in vitro stimulated monkey PBMCs using a semi-quantitative RT-PCR and high sensitivity fluorescence-based detection strategy. *Cytokine* 8: 32-41.

Black SM, Grehan JF, Rivard AL, Benson BA, Wahner AE, Koch AE, Levay-Young BK, Dalmaso AP (2006) Porcine endothelial cells and iliac arteries transduced with AdenoIL-4 are intrinsically protected, through Akt activation, against immediate injury caused by human complement. *J Immunol* 177: 7355-7363.

Binns RM (1982) Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 3: 95-146.

Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GP, Hamel AL (2001) Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13:185-194.

Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A (2003) Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197:101-109.

Brorson KA, Beverly B, Kang SM, Lenardo M, Schwartz RH (1991) Transcriptional regulation of cytokine genes in nontransformed T cells. Apparent constitutive signals in run-on assays can be caused by repeat sequences. *J Immunol* 147: 3601-3609.

Burch D (2008) Porcine circovirus vaccines –where are we?. *Pig progress* 6: 7-9.

Bureau C, Péron JM, Bouisson M, Danjoux M, Selves J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Torrisani J, Cordelier P, Buscail L, Vinel JP (2008) Expression of the

transcription factor Klf6 in cirrhosis, macronodules, and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 78-86.

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39.

Carrasco L, Segalés J, Bautista MJ, Gómez-Villamandos JC, Rosell C, Ruiz-Villamor E, Sierra MA (2000) Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet Rec* 146: 21-23.

Chen L, He W, Kim ST, Tao J, Gao Y, Chi H, Intlekofer AM, Harvey B, Reiner SL, Yin Z, Flavell RA, Craft J (2007) Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN- $\gamma$  production by  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 178: 2730-2736.

Cheevers WP, Beyer JC, Knowles DP (1997) Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp 135 surface protein-activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. *J Virol* 71: 6259-6263.

Choi C, Chae C (2001) Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 38:436-441.

Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK (2002) Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 66:217-224.

Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, Johnston JA (2008) Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Mol Biol* 9:46. (2008).

Coussens PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM (2004) Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun* 72: 1409-1422.

Covert J, Splitter G (1995) Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4<sup>+</sup> lymphocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 49: 39-50.

Croft M, Swain SL (1991) B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J Immunol* 146: 4055-4064.

Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E (2002) Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 236-242.

Darwich L, Pié S, Rovira A, Segalés J, Domingo M, Oswald IP, Mateu E (2003a) Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84: 2117-2125.

Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, Segalés J, Domingo M, Mateu E (2003b) Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 84: 3453-3457.

Darwich L, Segalés J, Mateu E (2004) Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149: 857-874.

Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM (1998) CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160: 870-876.

Dawson HD, Beshah E, Nishi S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, Madden KB, Ledbetter TK, Dubey JP, Shea-Donohue T, Lunney JK, Urban JF Jr (2005) Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect Immun* 73: 1116-1128.

Dawson H, Solano-Aguilar G, Beal M, Beshah E, Vangimalla V, Jones E, Botero S, Urban JF Jr (2009) Localized Th1-, Th2-, T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in *Ascaris suum*-infected swine are increased by retinoic acid. *Infect Immun* 77: 2576-2587.

Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D (1990) Regulation of murine lymphokine production in vivo. *J Exp Med* 171: 979-996.

Delisle C, Delisle G, Bridoux N, Thibault JC, Longo S, Joisel F (2008) PCV2 vaccination of sows with Circovac<sup>®</sup> (Merial) in France: improvement of the weaning-to-slaughter performance of their progeny. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress* pp. 77.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37: 112-119.

de Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU (2008) Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 122: 312-317.

de Bruin MG, van Rooij EM, Voermans JJ, de Visser YE, Bianchi AT, Kimman TG (1997) Establishment and characterization of porcine cytolytic cell lines and clones. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 337-347.

de Groot J, Kruijt L, Scholten JW, Boersma WJ, Buist WG, Engel B, van Reenen CG (2005) Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* 115: 495-505.

de la Fuente AJ, Ferri EF, Tejerina F, Frandoloso R, Martínez SM, Martín CB (2009) Cytokine expression in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Res Vet Sci* 87: 47-52.

Dijkstra CD, Döpp EA (1983) Ontogenetic development of T- and B-lymphocytes and non-lymphoid cells in the white pulp of the rat spleen. *Cell Tissue Res* 229: 351-363.

Domeika K, Magnusson M, Eloranta ML, Fuxler L, Alm GV, Fossum C (2004) Characteristics of oligodeoxyribonucleotides that induce interferon (IFN)-alpha in the pig and the phenotype of the IFN-alpha producing cells. *Vet Immunol Immunopathol* 101:87-102.

Dong DX, Hu XM, Liu WJ (1986) Immunization of neonates with trivalent oral poliomyelitis vaccine (Sabin). *Bull WHO* 64: 853-860.

Dozois CM, Oswald E, Gautier N, Serthelon JP, Fairbrother JM, Oswald IP (1997) A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 58: 5287-300.

Dudda J, Martin SF (2004) Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments. *Trends in immulogy* 25: 417-421.

Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M (2005) Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 30:16-27.

Eckersall PD, Saini PK, McComb (1996) The acute phase response of acid-soluble glycoprotein, alpha(1)-Acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and c-reactive protein, in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 51: 377-385.

Edfors-Lilja I, Bergström M, Gustafsson U, Magnusson U, Fossum C (1991) Genetic variation in Con A-induced production of interleukin 2 by porcine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 27:351-363.

Esnault S, Bebbernou N, Lavaud F, Shin HC, Potron G, Guenounou M (1996) Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma(IFN- $\gamma$ ) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin Exp Immunol* 103: 111-118.

Evans PA, Newby TJ, Stokes CR, Bourne FJ (1982) A study of cells in the mammary secretions of sows. *Vet Immunol Immunopathol* 3: 515-527.

Fan H, Ju C, Tong T, Huang H, Lv J, Chen H (2007) Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun* 31: 487-496.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ (2004) Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *J Virol* 78:13440-13446.

Flores-Mendoza L, Silva-Campa E, Reséndiz M, Osorio FA, Hernández J (2008) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infects Mature Porcine Dendritic Cells and Up-Regulates Interleukin-10 Production. *Clin Vaccine Immunol* 15: 720–725.

Foss DL, Murtaugh MP (1999) Mucosal immunogenicity and adjuvanticity of cholera toxin in swine. *Vaccine* 17: 788-801.

Fournout S, Dozois CM, Yerle M, Pinton P, Fairbrother JM, Oswald E, Oswald IP (2000) Cloning, chromosomal location, and tissue expression of the gene for pig interleukin-18. *Immunogenetics* 51: 358-365.

Friedberg SH, Weissman IL (1974) Lymphoid tissue architecture. II. Ontogeny of peripheral T and B cells in mice: evidence against Peyer's patches as the site of generation of B cells. *J Immunol* 113: 1477-1492.

Gibson L J (1994) Pseudogenes and Origins. *Origins* 21: 91-108.

Girard F, Oswald IP, Taranu I, Hélie P, Appleyard GD, Harel J, Fairbrother JM (2005) Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. *Infect Immun* 73: 5514-5523.

Gómez-Lucía Duato E (2007) El complejo mayor de histocompatibilidad. En “Manual de Inmunología Veterinaria”. Gómez-Lucía E, Blanco MM y Doménech A (eds.). Pearson-Prentice Hall. Madrid. Pp. 117-136.

Grasland B, Loizel C, Blanchard P, Oger A, Nignol AC, Bigarré L, Morvan H, Cariolet R, Jestin A (2005) Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res* 36: 685-697.

Grierson SS, King DP, Wellenberg GJ, Banks M (2004) Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci* 77:265-268.

Grimm DR, Richerson JT, Theiss PM, LeGrand RD, Misfeldt ML (1993) Isolation and characterization of gamma delta T lymphocyte cell lines from Sinclair swine peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol* 38:1-20.

Halbur PG (1998) Porcine viral respiratory diseases. Proceedings of 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, England.

Hamalainen H, Zhou H, Chou W, Hashizume H, Heller R, Lahesmaa R (2001) Distinct gene expression profiles of human type 1 and type 2 T helper cells. *Genome biology* 7: research0022.1–0022.11.

Harding JCS, Clark EG (1997) Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod* 5: 201-203.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS (2001) Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38: 528-539.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.

Hasslung FC, Berg M, Allan GM, Meehan BM, McNeilly F, Fossum C (2003) Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs. *J Gen Virol* 84: 2937-2945.

Hasslung F, Wallgren P, Ladekjaer-Hansen AS, Bøtner A, Nielsen J, Watrang E, Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Timmusk S, Belák K, Segall T, Melin L, Berg M, Fossum C (2005) Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 106:49-60.

He JQ, Sandford AJ, Wang IM, Stepaniants S, Knight DA, Kicic A, Stick SM, Paré PD (2008) Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 32: 755-762.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.

Ho CS, Rochelle ES, Martens GW, Schook LB, Smith DM (2006) Characterization of swine leukocyte antigen polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Meishan pigs. *Immunogenetics* 58: 873–882.

Holt PG, Rowe J (2003) *The developing immune system and allergy*. Mosby. Missouri. pp. 69–79.

Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, Gustavsson B, Leichman L, Frösing R, Ray M (1992) Quantitation of thymidylate

synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 52: 108-116.

Huang H, Potter AA, Campos M, Leighton FA, Willson PJ, Haines DM, Yates WD (1999) Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Can J Vet Res* 63:69-78.

Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB (1996) Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 2: 893-898.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) *Immunobiology*. Garland Science. New York and London.

Jensen PT, Christensen K (1981) Genetic studies on the in vitro PHA-transformation of porcine blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2: 133-143.

Joisel F, Brune A, Schade A, Longo S, Charreyre C (2008) Improvement of reproduction performance induced by PCV2 vaccination of sows and gilts with Circovac<sup>®</sup> in 277 german sow farms. Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress pp. 72.

Joling P, Wever PJM, Oskam JPH, Henken AM (1993) Lymphocyte stimulation by phytohaemagglutinin and concanavalin A in different swine breeds. *Livestock Production Science* 35: 341-350.

Jung K, Ha Y, Ha SK, Kim J, Choi C, Park HK, Kim SH, Chae C (2006) Identification of porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet J* 171:166-168.

Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 123: 326-338.

Kamstrup S, Verthelyi D, Klinman DM (2001) Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Vet Microbiol* 78: 353-362.

Karcher EL, Beitz DC, Stabel JR (2008) Modulation of cytokine gene expression and secretion during the periparturient period in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 123: 277-88.

Katagiri K, Itami S, Hatano Y, Yamaguchi T, Takayasu S (1997) *In vivo* expression of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  mRNAs in peripheral blood mononuclear cells and effect of cyclosporine A in a patient with Kimura's disease. *Br J Dermatol* 137: 972-977.

Kelly BL, Locksley RM (2000) Coordinate regulation of the IL-4, IL-13, and IL-5 cytokine cluster in Th2 clones revealed by allelic expression patterns. *J Immunol* 165: 2982-2986.

Kelm SC, Freeman AE, Kehrl ME Jr (2001) Genetic control of disease resistance and immunoresponsiveness. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17: 477-493.

Kekarainen T, Montoya M, Dominguez J, Mateu E, Segalés J (2008) Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol* 124: 41-49.

Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM (2000) Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122: 9-24.

Kishikawa H, Sun J, Choi A, Miaw SC, Ho IC (2001) The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *J Immunol* 167: 4414-4420.

Kiupel M, Stevenson GW, Mittal SK, Clark EG, Haines DM (1998) Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *J Vet Diagn Inv* 35: 303-307.

Kline JN, Krieg AM (2001) CpG Oligodeoxynucleotides. *Prog Respir Res* 31: 229-232.

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2879-2883.

Klobasa F, Butler JE, Werhahn E, Habe F (1986) Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 11: 149-159.

Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G (1993) Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362: 245-248.

Koyano-Nakagawa N, Arai K (1996) Specific versus cooperative regulatory mechanisms of the cytokine genes that are clustered on the same chromosome. *J Allergy Clin Immunol* 98: 174-182.

Krakovka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G (2000) Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37:254-263.

Krakovka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G (2001) Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38:31-42.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.

Krieg M (2001) Now I know my CpGs. Trends in Microbiology 9: 249-252.

Kringel H, Iburg T, Dawson H, Aasted B, Roepstorff A (2006) A time course study of immunological responses in *Trichuris suis* infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden. Int J Parasitol. 36:915-924.

Kühn R, Rajewsky K, Müller W (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science 254: 707-710.

Ladekjaer-Mikkelsen AS, Nielsen J, Stadejek T, Storgaard T, Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Allan G, Bøtner A (2002) Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). Vet Microbiol 89:97-114.

Lainson FA, Aitchison KD, Donachie W, Thomson JR (2002) Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. J Clin Microbiol 40:588-593.

Le Jan C (1991) A study by flow cytometry of lymphocytes in sow colostrum. Res Vet Sci 57: 300-304.

Li Q, Harju S, Peterson KR (1997) Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet* 15: 403-408.

Linghua Z, Xingshan T, Fengzhen Z (2008) In vivo oral administration effects of various oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to pseudorabies attenuated virus vaccine in newborn piglets. *Vaccine* 26: 224-233.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

Lohoff M, Koch A, Röllinghoff M (1992) Two signals are involved in polyclonal B cell stimulation by T helper type 2 cells: a role for LFA-1 molecules and interleukin 4. *Eur J Immunol* 22: 599-602.

Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, Frazer KA (2000) Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288: 136-140.

López-Soria S, Segalés J, Nofrarias M, Calsamiglia M, Ramírez H, Mínguez A, Serrano IM, Marín O, Callén A (2004) Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec* 155:504.

Ma X, Forns X, Gutierrez R, Mushahwar IK, Wu T, Payette PJ, Bukh J, Purcell RH, Davis HL (2002) DNA-based vaccination against hepatitis C virus (HCV): effect of expressing different forms of HCV E2 protein and use of CpG-optimized vectors in mice. *Vaccine* 20: 3263-3271.

Magnusson M, Johansson E, Berg M, Eloranta ML, Fuxler L, Fossum C (2001) The plasmid pcDNA3 differentially induces production of interferon-alpha and interleukin-6 in cultures of porcine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 78: 45-56.

Mankertz A, Hillenbrand B (2001) Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279: 429-438.

Maron JL, Arya MA, Seefeld KJ, Peter I, Bianchi DW, Johnson KL (2008) pH but not hypoxia affects neonatal gene expression: relevance for housekeeping gene selection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21: 443-447.

McGuirk P, Kingston HG (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 23: 450-455.

McKenzie AN, Li X, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, Doyle EL, Milatovich A, Francke U (1993a) Copeland NG Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Biol Chem* 268: 5436-5444.

McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Brière F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S (1993b) Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3735-3739.

Meerts P, Van Gucht S, Cox E, Vandebosch A, Nauwynck HJ (2005a) Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18: 333-341.

Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, Nauwynck HJ (2005B) Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol* 150:427-441.

Mette A, Ritzman M, Palzer A, Majzoub M, Heinritzi K (2008) Effect of PCV2 vaccination on co-infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis*. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress* pp. 61.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993) Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190.

Müller G, Köhler H, Diller R, Rassbach A, Berndt A, Schimmel D (2003) Influences of naturally occurring and experimentally induced porcine pneumonia on blood parameters. *Res Vet Sci* 74: 23-30.

Mulupuri P, Zimmerman JJ, Hermann J, Johnson CR, Cano JP, Yu W, Dee SA, Murtaugh MP (2008) Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol* 82: 358-370.

Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE (1990) Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 29: 10351-10356.

Murtaugh MP, Johnson CR, Xiao Z, Scamurra RW, Zhou Y (2009) Species specialization in cytokine biology: Is interleukin-4 central to the T(H)1-T(H)2 paradigm in swine? *Dev Comp Immunol* 33: 344-352.

Nathanson N, Ahmed R, Biron CA, Brinton MA, Gonzalez-Scarano F, Griffin DE, Holmes KV, Murphy FA, Overbaugh J, Richman DD, Robertson ES, Robinson HL (2007) *Viral Pathogenesis and Immunity*. Elsevier. London. pp 72-88.

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS (2000) Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81: 2281-2287.

Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong KI, Gonzalez AM, Saif LJ (2007) Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 236-248.

Nielsen J, Vincent IE, Bøtner A, Ladekaer-Mikkelsen AS, Allan G, Summerfield A, McCullough KC (2003) Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 97-111.

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, Robinson IB (1990) Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7160-7164.

Núñez A, McNeilly F, Perea A, Sánchez-Cordón PJ, Huerta B, Allan G, Carrasco L (2003) Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50:255-258.

O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan G, Ellis JA (2001) Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 42:551-553.

Olbrich AR, Schimmer S, Heeg K, Schepers K, Schumacher TN, Dittmer U (2002) Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J Virol* 76: 11397-11404.

O'Garra A (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8: 275-283.

Olbrich AR, Schimmer S, Dittmer U (2003) Preinfection treatment of resistant mice with CpG oligodeoxynucleotides renders them susceptible to friend retrovirus-induced leukemia. *J Virol* 77: 10658-10662.

O'Neill LA (2004) After the toll rush. *Science* 303:1481-1482.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG (2004) Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41:624-640.

Opriessnig T, McKeown NE, Zhou EM, Meng XJ, Halbur PG (2006a) Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J Gen Virol* 87:2923-2932.

Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, Hoogland MJ, Rothschild MF, Meng XJ, Halbur PG (2006b) Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol* 43:281-293.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M (1998) Developments in quantitative PCR *Clin Chem Lab Med* 36: 255-269.

Ovesen A y Kunstmann L (2008) PCV2 vaccination of sows with Circovac<sup>®</sup> against PMWS in pigs: effect of antimicrobial use in 3 danish herds. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress* pp. 107.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.

Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134: 641-647.

Porter P (1969) Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet. *Biochim Biophys Acta* 181: 381-392.

Pravieux JJ, Poulet H, Charreyre C, Juillard V (2007) Protection of newborn animals through maternal immunization. *J Comp Pathol Suppl* 1: S32-34.

Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3730-3734.

Pyles RB, Higgins D, Chalk C, Zalar A, Eiden J, Brown C, Van Nest G, Stanberry LR (2002) Use of Immunostimulatory Sequence-Containing Oligonucleotides as Topical Therapy for Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection. *J Virol* 76: 11387–11396.

Ramis G, Joisel F (2008) Base científica y resultados de campo con vacunas frente a PCV2. Ponencia IV Foro Internacional de Suinicultura- Pork Expo 2008.

Raymond CR, Wilkie BN (2004) Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine* 22: 1016-1023.

Raymond CR, Sidahmed AM, Wilkie BN (2006) Effects of antigen and recombinant porcine cytokines on pig dendritic cell cytokine expression in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 175-185.

Reber AJ, Lockwood A, Hippen AR, Hurley DJ (2006) Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet Immunol Immunopathol* 109: 139-150.

Reber AJ, Donovan DC, Gabbard J, Galland K, Aceves-Avila M, Holbert KA, Marshall L, Hurley DJ (2008) Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 123: 305-313.

Reddy NR, Borgs P, Wilkie BN (2000) Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 74: 31-46.

Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of

mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65-73.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1124-1125.

Rook GA, Stanford JL (1998) Give us this day our daily germs. *Immunol Today* 19: 113-116.

Rose N, Abherve-Gueguen A, Le Diguerher G (2004) Effet de la génétique Piétrain sur l'expression clinique de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP). Etude dans 4 élevages naisseurs-engraisseurs. *Journées Recherche en Porcine France*.

Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M (1999) Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120: 59-78.

Salmon H, Charley B, Labonnardiere C, Olivier M, Kelley K, Paraf A (1989) Natural killer (NK) activity and interferon (IFN) production by a fraction of spleen and blood lymphocytes in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 23: 113-128.

Sarli G, Mandrioli L, Laurenti M, Sidoli L, Cerati C, Rolla G, Marcato PS (2001) Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 83: 53-67.

Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273: 352-354.

Scamurra R, Arriaga C, Sprunger L, Baarsch MJ, Murtaugh MP (1996) Regulation of interleukin-6 expression in porcine immune cells. *J Interferon Cytokine Res* 16: 289-296.

Segalés J, Sitjar M, Domingo M, Dee S, Del Pozo M, Noval R, Sacristan C, De Las Heras A, Ferro A, Latimer KS (1997) First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601.

Segalés J, Pastor J, Cuenca R, Domingo M (2000) Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Vet Rec* 146: 675-676.

Segalés J, Fernández-Salguero JM, Fructuoso G, Quintana J, Rosell C, Pozo J, De Arriba ML, Rubio P, Domingo M (2001) Granulomatous enteritis and lymphadenitis in Iberian pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Pathol* 38:343-346.

Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G (2008) PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162: 867-868.

Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667.

Shirkey TW, Siggers RH, Goldade BG, Marshall JK, Drew MD, Laarveld B, Van Kessel AG (2006) Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med* 231: 1333-1345.

Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2: 151-161.

Siegrist CA (2001) Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 19: 3331-3346.

Sipos W, Duvigneau JC, Pietschmann P, Schilcher F, Hofbauer G, Hartl RT, Schmoll F (2005) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) is associated with a systemic cytokine expression profile indicative of proinflammation and a Th1 bias. *Vet Immunol Immunopathol* 107: 303-313.

Sorden SD (2000) Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Swine Health Prod* 8: 133–136.

Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 157: 2116-2122.

Stear MJ, Bishop SC, Mallard BA, Raadsma H (2001) The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res Vet Sci* 71: 1-7.

Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL (2001) Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 13: 57-62.

Stevenson LS, Gilpin DF, Douglas A, McNeilly F, McNair I, Adair BM, Allan GM (2007) T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunol* 20: 389-398.

Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C (2003) Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 75: 711-717.

Sugiyama Y, Sugiyama K, Hirai Y, Akiyama F, Hasumi K (2002) Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am J Clin Path* 117: 109-116.

Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Schaub A, Carrasco CP, Tâche V, Charley B, McCullough KC (2003) Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110: 440-449.

Summerfield A, McCullough KC (2009) The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol* 33: 299-309.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145: 3796-3806.

Sylvin H, Matvienko O, Leonchiks A, Alving K, van der Ploeg I (2000) Molecular cloning, expression, and purification of pig interleukin-5. *Immunogenetics* 51: 59-64.

Taglinger K, Van Nguyen N, Helps CR, Day MJ, Foster AP (2008) Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. *Vet Immunol Immunopathol* 122: 216-230.

Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Larochelle R, Magar R (1998) Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 35:108-116.

Tizard IR (2004) *Veterinary Immunology, An Introduction*. Seven Edition. Elsevier, USA.

Tuboly S, Bernáth S, Glávits R, Medveczky I (1988) Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 20: 75-85.

Tuboly S, Bernáth S (2002) Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn animals. *Adv Exp Med Biol* 503: 107-114.

Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, Tuchscherer A (2002) Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 86:195-203.

Tucker AW, Donadeu M (2006) Porcine multi-systemic wasting syndrome (PMWS): a review. *The pig Journal*. <http://www.thepigsite.com/pigjournal/>

Van den Bosch GA, Ponsaerts P, Nijs G, Lenjou M, Vanham G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN and Van Tendeloo VFI (2005) Ex vivo induction of viral antigen-specific CD8+T cell responses using mRNA electroporated CD 40-activated B cells. *Clin Exp Immunol* 139:458–467.

Van der Stede Y, Verdonck F, Vancaeneghem S, Cox E, Goddeeris BM (2002) CpG-oligodinucleotides as an effective adjuvant in pigs for intramuscular immunizations. *Vet Immunol Immunopathol* 86: 31-41.

Verfaillie T, Cox E, To LT, Vanrompay D, Bouchaut H, Buys N, Goddeeris BM (2001) Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Vet Immunol Immunopathol* 81: 97-112.

Verfaillie T, Cox E, Goddeeris BM (2005) Immunostimulatory capacity of DNA vaccine vectors in porcine PBMC: a specific role for CpG-motifs? *Vet Immunol Immunopathol* 103: 141-151.

Vincent IE, Carrasco CP, Guzylack-Piriou L, Herrmann B, McNeilly F, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC (2005) Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115: 388-398.

Vincent IE, Balmelli C, Meehan B, Allan G, Summerfield A, McCullough KC (2007) Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120: 47-56.

Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJ, Elbers AR (2004) Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol* 99:203-214.

Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM (1997) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 10833-10837.

West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA (1999) Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11:530-532.

Wikström FH, Meehan BM, Berg M, Timmusk S, Elving J, Fuxler L, Magnusson M, Allan GM, McNeilly F, Fossum C (2007). Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 81: 4919-4927.

Williams PP (1993) Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs. *Can J Vet Res* 57: 1-8.

Wu J, Lu Y, Ding YB, Ke Q, Hu ZB, Yan ZG, Xue Y, Zhou Y, Hua ZL, Shu YQ, Liu P, Shen J, Xu YC, Shen HB (2009 ) Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol Carcinog* 48: 626-632.

Xu-Amano J, Jackson RJ, Fujihashi K, Kiyono H, Staats HF, McGhee JR (1994) Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine* 12: 903-911.

Zhang DH, Yang L, Ray A (1998) Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *The American Association of Immunologists* 3817-3821.

Zhang L, Tian X, Zhou F (2007) CpG oligodeoxynucleotides augment the immune responses of piglets to swine *Pasteurella multocida* living vaccine in vivo. Res Vet Sci 83: 171-181.

Zhou Y, Lin G, Baarsch MJ, Scamurra RW, Murtaugh MP (1994) Interleukin-4 suppresses inflammatory cytokine gene transcription in porcine macrophages. J Leukoc Biol 56: 507-513.

Zhou Y, Lin G, Murtaugh MP (1995) Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADPH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox). Biochim Biophys Acta 1265: 40-48.

Zhuang Y, Huang Z, Nishida J, Zhang L, Huang H (2009) Signaling pathways that lead to the silencing of the interleukin-4-producing potential in Th1 cells. J Interferon Cytokine Res 29: 399-406.

Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K (1998) CpG Oligodeoxynucleotides Trigger Protective and Curative Th1 Responses in Lethal Murine Leishmaniasis. J Immunol 160: 3627-363

## XI RESTOS

Cerdos vacunados y revacuados frente a no vacunados

IL	Estimulante	Día	Hora		Magnitud	Significancia
IL4	PCV2	0	2	NS		
			24	NS		
		21	2	V>NV	3,48	0,047
			12	V>NV	6,97	0,028
			24	V>NV	16,52	0,014
		28	2	NS		
			12	V>NV	2,85	0,016
			24	V>NV	4,69	0,036
			48	V>NV	3,28	0,025
IL5	PCV2	0	2	NS		
			24	NS		
		21	2	NS		
			12	NS		
			24	NS		
		28	2	NS		
			12	NS		
			24	NS		
			48	NS		
IL13	PCV2	0	2	NS		
			24	NS		
		21	12	V>NV	109,12	0,008
			24	V>NV	20,92	0,014
		28	2	NS		
			12	NS		
			24	V>NV	14,21	0,036
			48	NS		
IL4	EHV	0	2	NS		
			24	NS		
		21	12	NS		
		28	12	V>NV	4,55	0,014
			24	V>NV	6,16	0,025
IL5	EHV	0	2	NS		
			24	NS		
		21	2	NS		

		28	12	NS		
			24	NS		
IL13	EHV	0	24	NS		
		21	12	NS		
		28	12	NS		
			24	NS		
IL4	No estimuladas	28	24	V>NV	5,01	0,036
IL5	No estimuladas	28	24	NS		
IL13	No estimuladas	28	24	NS		

## Lechones vacunados o no, nacidos y encalostrados de madres vacunadas o no

IL	Estimulante	Día	Hora		Magnitud	Significancia
IL4	PCV2	14	12	VV>VN	9,31	0,028
IL4	PCV2	14	12	VV>NN	21,62	0,047
IL4	PCV2	14	24	VV>VN	4,61	0,028
IL4	PCV2	14	24	VV>NN	9,65	0,028
IL5	PCV2	14	12	NS		
IL5	PCV2	14	24	NS		
IL13	PCV2	14	12	NS		
IL13	PCV2	14	24	VV>VN	2433	0,009
IL13	PCV2	14	24	VV>NN	2433	0,016
IL4	EHV	14	24	VV>VN	6,40	0,047
IL4	EHV	14	24	VV>NN	9,12	0,032
IL5	EHV	14	24	NS		
IL13	EHV	14	24	VV>VN	1269	0,009
IL13	EHV	14	24	VV>NN	1269	0,008
IL4	NA	14	12	VV>VN	8,96	0,047
IL4	NA	14	12	VV>NN	8,84	0,047
IL4	NA	14	24	VV>VN	6,23	0,047
IL4	NA	14	24	VV>NN	20,07	0,016
IL5	NA	14	12	NS		
IL5	NA	14	24	NS		
IL13	NA	14	12	VV>VN	254	0,016
IL13	NA	14	24	VV>VN	1457	0,009
IL13	NA	14	24	VV>NN	1457	0,028

Al comparar la expresión génica de estas interleucinas en los nódulos linfáticos y en las PBMC de los animales vacunados y revacunados frente a PCV2, se observó que los niveles del cambio de la expresión detectados eran diferentes. Para la IL4 e IL5 se describieron mayores cambios de expresión en las células mononucleares de los nódulos linfáticos que en las PBMC, mientras que para la IL13 ocurrió lo contrario. En las PBMC el mayor cambio relativo de expresión de IL4 que se encontró fue de una magnitud de 4,01 a las 24 horas postestimulación con PCV2 el día 28 del experimento, y en los nódulos linfáticos el mayor valor detectado fue de 12,13 a las 12 horas postestimulación con PCV2. Para la IL5 generalmente los valores del cambio relativo de expresión en las PBMC eran negativos, siendo el mayor valor registrado 1,46, que se alcanzó tras la estimulación con PCV2 el día 21 postvacunación en el grupo de animales vacunados y revacunados con circovac. En los nódulos linfáticos, se observó que desde las dos horas postestimulación con PCV2 el cambio relativo de expresión de IL5 siempre fue mayor a 1, siendo su valor más alto 2,42. Opuestamente a la IL4 e IL5, la IL13 presenta mayores cambios de expresión relativos en las PBMC que en los nódulos linfáticos. Así, a las 12 horas postestimulación de las PBMC con PCV2 en el día 21, se observó un aumento en la síntesis de 109,08 veces la cantidad inicial de IL13. Sin embargo el mayor cambio de expresión relativa detectado en los nódulos linfáticos fue de 5,07 a las 48 horas postestimulación con PCV2.