



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y POTENCIA EN LA ACTIVACIÓN
DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS CON PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA
GP5 DE PRRSV”**

Tesis que presenta:

Fernando Calderón Rico

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Directora de tesis:

Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita

Co-directora de tesis:

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.

Octubre 2024

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	2
I. RESUMEN GENERAL	4
II. ABSTRACT	5
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	6
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS	21
6.1 OBJETIVO GENERAL	21
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
Péptidos	21
Diseño experimental, animales y alojamiento	22
Peso de los lechones	24
Toma de muestras sanguíneas y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	24
Ensayo de detección de citocinas	25
Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos citotóxicos	25
Ensayos <i>in vitro</i>	26
Plásmidos y líneas celulares	26
Transcripción <i>in vitro</i> , propagación de la clona infecciosa y recuperación del virus PRRS	27
Extracción de RNA, retrotranscripción, PCR de punto final y ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del virus PRRS	28
Curva estándar para la cuantificación de PRRRSV	28
Co-cultivos de linfocitos primarios con células PK-15 S10-CD163 infectadas con PRRSV	29
Análisis estadístico	30
VIII. RESULTADOS	31
Ganancia de peso a través de las semanas de experimentación	31

Cuantificación de la concentración de citocinas proinflamatorias	31
Evaluación sérica de citocinas relacionadas con la actividad de la inmunidad celular de linfocitos cooperadores.	32
Citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares de linfocitos citotóxicos CD8+	35
Co-cultivos de linfocitos aislados de los cuatro grupos experimentales con células infectadas por el PRRSV	36
IX. DISCUSIÓN.....	38
X. CONCLUSIÓN.....	43
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	56
ANEXO 1.	56
ANEXO 2.	77
ANEXO 3.	80
ANEXO 4. GP52-PTC1.....	90
ANEXO 5. GP5T3-PTC2.....	91

I. RESUMEN GENERAL

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) afecta a cerdos y causa pérdidas económicas importantes a nivel mundial, tanto en la industria porcícola como a los países productores. El PRRSV se sigue propagando y genera brotes con nuevas cepas que son más agresivas que las anteriores. Además, a la fecha no se cuenta con vacunas eficientes que puedan limitar la infección por el riesgo a la reversión de la virulencia. En el presente trabajo se analizó la respuesta de las células T citotóxicas inducida por epítomos lineales de la proteína GP5 del PRRSV para investigar la protección inmunológica mediada por células citolíticas *in vitro*. El objetivo principal fue evaluar la eficacia y potencia en la activación de linfocitos T citotóxicos de cerdos inmunizados con péptidos de la proteína GP5 de PRRSV. Para ello, se acoplaron péptidos de GP5 a una proteína acarreadora y se utilizaron para inmunizar cerdos de 21 días de edad, los divididos se dividieron en cuatro grupos: control, vehículo, PTC1 (Péptido T Citotóxico 1) y PTC2 (Péptido T Citotóxico 2). Se midieron los niveles de citocinas a los 2 DPI y se cuantificaron los linfocitos T citotóxicos (CTL's, CD8+) a los 42 DPI mediante citometría de flujo. El péptido PTC2 incrementó la concentración sérica de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8) y citocinas que favorecen la inmunidad celular adaptativa (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12). Además, la concentración de CTL's (CD8+) fue significativamente mayor en los grupos inmunizados con los péptidos, lo que sugiere una respuesta proliferativa en esa población celular. Los CTL's estimulados de los cerdos inmunizados mostraron actividad citolítica en células infectadas con PRRSV *in vitro*. Estos resultados indican que los péptidos PTC1 y PTC2 estarían induciendo una respuesta inmunológica mediada por CTL's en cerdos inmunizados contra PRRSV *in vivo*. Esta protección se debe a la presencia de epítomos T en las secuencias de los péptidos, lo que sugiere que la utilización de epítomos lineales de GP5 podría ser una estrategia eficaz en el desarrollo de nuevas vacunas para la prevención del PRRSV.

Palabras clave: CTL, PRRS, inmunidad, vacuna, cerdo.

II. ABSTRACT

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) affects pigs and cause significant economic losses worldwide, PRRSV impact both swine industry and productive countries. PRRSV continues spreading and generates outbreaks with new strains that are more aggressive than previous ones. In this study the cytotoxic T cell response induced by linear epitopes of the GP5 protein of PRRSV was analyzed to investigate the cytolytic cell protection *in vitro*. For that matter, GP5 derived peptides were conjugated to a carrier protein and used for the immunization of 21-day-old pigs, which were divided into four groups: control, vehicle, PTC1 (Cytotoxic T-Peptide 1) and PTC2 (Cytotoxic T-Peptide 2). Cytokine levels were measured at 2 days post-immunization (DPI), and cytotoxic T lymphocytes (CTL's, CD8+) were quantified at 42 DPI using flow cytometry. The PTC2 peptide increased the serum concentration of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-8) and cytokines that trigger adaptive cellular immunity (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12). In addition, the concentration of CTL's (CD8+) was significantly higher in the groups immunized with the peptides, suggesting a proliferative response in that cell population. Primed CTL's from immunized pigs showed cytolytic activity against PRRSV-infected cells *in vitro*. These results indicate that PTC1 and PTC2 peptides could induce a CTL-mediated response in pigs immunized against PRRSV *in vivo*. This protection is attributed to the presence of T epitopes in the peptide sequences, suggesting that the use of linear GP5 epitopes could be an effective strategy in the development of new vaccines for the prevention of PRRSV.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad que se presenta con una variedad de manifestaciones clínicas que afectan tanto a cerdos adultos como en lechones (López-Heydeck *et al.*, 2015).

En cerdos adultos, las manifestaciones del PRRS pueden ser subclínicas o presentar signos respiratorios que incluyen fiebre, letargo, anorexia, y disnea. Los animales infectados suelen mostrar un comportamiento apático y una disminución en la tasa de crecimiento. Las infecciones secundarias, especialmente virales y bacterianas, son comunes debido a la supresión del sistema inmune (Lunney *et al.*, 2016).

En lechones jóvenes de alrededor de 21 días de edad, el cuadro clínico del PRRS, es generalmente más severo. Los síntomas respiratorios pueden incluir tos, estornudos, disnea y cianosis de las extremidades. La infección temprana en lechones puede resultar en un crecimiento retardado, y en casos graves, una alta mortalidad que puede alcanzar el 100% en granjas infectadas. Las coinfecciones con otros patógenos respiratorios y gastrointestinales puede exacerbar los síntomas y aumentar la mortalidad en cerdos de todas las especies (Pileri & Mateu, 2016).

La fase aguda de la infección se caracteriza por síntomas respiratorios graves y una alta tasa de mortalidad, ocurre especialmente en lechones y cerdos jóvenes. En la fase crónica, los signos clínicos son más leves, pero persisten durante un período prolongado, lo que resulta en una disminución de la eficiencia productiva y una recuperación lenta de la producción (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

Estructura y genoma del PRRSV

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) es un virus de RNA monocatenario positivo perteneciente a la familia Arteriviridae. Su estructura viral está caracterizada por una envoltura lipídica que rodea un núcleo central compuesto por el

genoma viral y proteínas de nucleocápside. La envoltura viral está formada por glicoproteínas de superficie, especialmente las glucoproteínas GP2, GP3, GP4 y GP5 (Fang & Snijder, 2010), formando una estructura que se asemeja a una corona. La envoltura desempeña un papel crucial en la interacción con el huésped y la entrada viral en las células hospedera. El PRRSV exhibe una morfología alargada y pleomórfica bajo microscopía electrónica, con un diámetro de aproximadamente entre 45 a 65 nm, lo que lo distingue morfológicamente de otros virus arterivirales (Figura 1) (Mardassi *et al.*, 1994).

El genoma del PRRSV es único en su organización y contenido génico. Se compone de una única molécula (cadena) de RNA de aproximadamente 15 kb de longitud, que codifica al menos diez proteínas estructurales y no estructurales. La cadena de RNA es policistónica, lo que significa que contiene múltiples marcos de lectura abiertos (ORFs) que se superponen y se traducen en diferentes proteínas funcionales. Los ORFs principales se distribuyen a lo largo de la cadena de RNA y codifican proteínas estructurales como la proteína de la envoltura, la nucleocápside (N) y proteínas no estructurales como las proteínas implicadas en la replicación y transcripción viral (Jiang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

El PRRSV exhibe una alta variabilidad genética y se clasifica en varios genotipos y subgenotipos basados en análisis filogenéticos del genoma viral. Los dos genotipos principales son el genotipo 1 (PRRSV-1) y el genotipo 2 (PRRSV-2), que difieren significativamente en su estructura genómica y en su patogenicidad. El PRRSV-1 se encuentra predominantemente en Europa y Asia, mientras que el PRRSV-2 prevalece en América del Norte y algunas partes de Asia. Además de estos genotipos principales, han surgido variantes regionales y subgenotipos del PRRSV con características genéticas y epidemiológicas únicas. Donde, entre estas variantes, el genotipo altamente patógeno del PRRSV (PRRSV -HP) ha generado una gran preocupación en la industria porcina debido a su capacidad para causar brotes severos de la enfermedad con altas tasas de mortalidad en cerdos de todas las edades (Benfield *et al.*, 1992; Kappes & Faaberg, 2015).

Las estrategias de control implementadas para mitigar el impacto del PRRSV incluyen la vacunación, la mejora de las prácticas de bioseguridad y la vigilancia epidemiológica continua (Assavacheep & Thanawongnuwech, 2022; Brockmeier *et al.*, 2002).

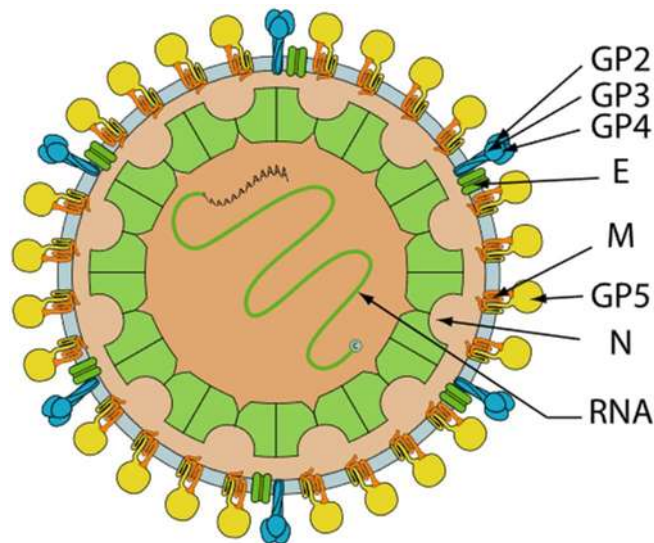


Figura 1. Arterivirus. Imagen representativa del virus PRRS (PRRSV), estructura, genoma y proteínas estructurales del virión (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), 2020).

Transmisión

El virus asociado al PRRS, recibe el mismo nombre, es decir, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). El PRRSV se transmite tanto de manera horizontal como vertical. La transmisión horizontal ocurre principalmente a través del contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. El virus puede estar presente en todas las secreciones y excreciones de los cerdos infectados; incluyendo saliva, orina, semen y heces. La transmisión aérea también es una vía significativa, facilitada por la alta densidad de cerdos en las granjas; donde el aire tiende a dispersar materia fecal infectada hasta por 4 km de distancia, con vientos de más de 4 km/h. Se puede transmitir por fomites como ropa, equipos y vehículos pueden actuar como vectores indirectos de transmisión (Apter, 2021).

Los factores que influyen en la transmisión incluyen la densidad de población, la bioseguridad de la granja, la virulencia de la cepa viral y las prácticas de manejo. La introducción de animales nuevos sin una cuarentena adecuada es una causa común de brotes en granjas previamente libres del virus (Martín-Valls *et al.*, 2023).

Transmisión vertical en la gestación

La transmisión vertical del PRRSV ocurre cuando el virus se transmite desde la cerda gestante hacia el feto. Este tipo de transmisión es más común durante la fase final de la gestación (entre las semanas 72 y 85), ya que el virus puede atravesar la barrera placentaria (Rowland, 2010).

Los factores que afectan la transmisión vertical incluyen la inmadurez del sistema inmune fetal, la carga viral de la madre, el incremento de la permeabilidad de la placenta a medida que se acerca el parto y los macrófagos alveolares y otras células inmunitarias del feto como las células dendríticas, que son los principales blancos del PRRSV, los cuales comienzan la expresión de receptores virales hacia el final de la gestación convirtiéndose en reservorio viral (Rowland, 2010).

Las cerdas infectadas durante la gestación tardía tienen una mayor probabilidad de transmitir el virus a sus fetos, lo que puede resultar en abortos, nacimientos prematuros y fetos nacidos muertos o débiles (Rowland, 2010). Sin embargo, algunas cepas pueden ser más eficientes en esta transmisión debido a sus características genéticas y virulencia. La más eficiente es PRRSV de tipo 2. Para que esto ocurra, la carga viral en la sangre de la cerda debe ser significativamente alta para permitir que el virus atravesase la barrera placentaria. Estudios han mostrado que cargas virales de alrededor de 1×10^2 a 1×10^3 partículas/ml en la sangre de la cerda son suficientes para causar infección fetal.

Los fetos momificados son un hallazgo común en cerdas preñadas e infectadas con PRRSV de cualquier cepa, la incidencia puede variar significativamente dependiendo de la virulencia del virus y la salud general de la granja productora. (Mulligan *et al.*, 2022).

El impacto en la salud reproductiva de las cerdas gestantes puede ser significativo, con efectos que incluyen una disminución en la tasa de partos exitosos, aumento en la mortalidad fetal y una reducción en el tamaño de las camadas (Rowland, 2010).

Mecanismos de respuesta inmune antiviral

La respuesta inmune forja la defensa del huésped contra la infección viral. Entre los distintos elementos del sistema inmunitario, las células citotóxicas, en particular las células T citotóxicas (CD8+ o CTL), desempeñan un papel fundamental en la eliminación de las células infectadas y en la restricción de la diseminación viral (Westmeier *et al.*, 2020).

Las células T citotóxicas son activadas después de la presentación de péptidos virales por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I); también llamadas SLA-I en cerdos, éstas se encuentran sobre la superficie de las células infectadas. Estos complejos activan a las células CTL y una vez activadas, las células T citotóxicas se dirigen específicamente a las células infectadas por el PRRSV y las eliminan mediante la liberación de INF- γ , granzimas y perforinas, que inducen la apoptosis o muerte celular programada de las células objetivo. Debido a esto, a este fenómeno de interacción entre dos células inmunológicas y su posterior liberación de proteínas citolíticas se le conoce como “El beso de la muerte” o sinápsis inmunológica (Calderon-Rico *et al.*, 2024; Westmeier *et al.*, 2020).

Por su parte, las células T citotóxicas reconocen fragmentos de los antígenos virales presentados en las MHC-I o SLA-I por las células presentadoras de antígeno que pueden ser PAM, macrófagos o células dendríticas. Dicho reconocimiento ocurre a través de la unión al receptor de células T (TCR) con coactivadores como CD28, ICOS, PD-1, CD40 que refuerzan la unión y amplifican la señal. La cual desencadena la activación y proliferación de más células T a través de la secreción de citocinas y el aumento de la generación de gránulos citotóxicos (Crisci *et al.*, 2019). Estos gránulos están formados por perforinas y granzimas, por una parte, las perforinas son proteínas que se insertan en la membrana de la célula objetivo, formando poros que permiten la entrada de granzimas en el citoplasma. Una vez dentro, las granzimas, que son serina proteasas, desencadenan una cascada de eventos que lleva a la apoptosis de la célula infectada.

Las células T citotóxicas también producen una variedad de citocinas y factores citotóxicos que contribuyen a la eliminación del virus y a la regulación de la respuesta

inmune. Entre estas citocinas se incluye al interferón-gamma (IFN- γ), que activa a las células fagocíticas y promueve la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que tiene propiedades proinflamatorias y citotóxicas. Todo esto ayuda en el proceso del enfrentamiento de la infección o el estado antiviral para eliminar células infectadas y activar a más células del sistema inmune (Janeway *et al.*, 2001).

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del virus PRRSV

A pesar de la función protectora de la respuesta inmune, el PRRSV ha desarrollado varios mecanismos para evadir y alterar los procesos inmunitarios del huésped. Entre estos mecanismos se incluyen la expresión de proteínas no estructurales que interfieren con la presentación de antígenos y la activación de las células T como la replicasa NSP2 viral, así como la desregulación de la expresión de interferones y citocinas proinflamatorias como la supresión de la secreción de interferones tipo uno (IFN- α , IFN- β), IL-12, IFN- γ , IL-6 e IL-1 β . Estos, son mecanismos de silenciamiento para evitar que células como los macrófagos o células CTL no reconozcan a células infectadas (Rout *et al.*, 2023).

Las proteínas no estructurales del PRRSV, como la proteína NSP1, han sido implicadas en la inhibición de la expresión de moléculas de SLA-I en la superficie de las células infectadas, lo que reduce la capacidad del sistema inmune para reconocer y eliminar las células infectadas. Además, el PRRSV puede modular la producción de interferones y citocinas proinflamatorias mediante la inhibición de la vía de señalización de interferón, la supresión de la activación de las células T y los macrófagos (Zhou *et al.*, 2011).

Además, los anticuerpos generados durante la infección por PRRSV pueden contribuir a la evasión del sistema inmune, esto al dirigirse a regiones no neutralizantes del virus y facilitar la entrada viral en las células hospedadoras (PAM). Estos anticuerpos no neutralizantes pueden promover la replicación viral y la diseminación del virus en el huésped, exacerbando así la gravedad de la enfermedad (Murtaugh, 2012; Petrini *et al.*, 2013).

En conjunto, estos mecanismos de evasión permiten al PRRSV evitar la respuesta inmune del huésped y establecer una infección persistente, lo que representa un brote de la infección, una infección a gran escala y en última instancia la muerte del animal infectado. Por tanto, conocer los mecanismos y activar la respuesta inmune antes de que el virus module negativamente la respuesta en individuos infectados, puede servir como un recurso significativo para el control y la prevención de la infección viral (Renukaradhya *et al.*, 2015).

Equilibrio de la respuesta inmune del huésped ante una infección viral

Como ya se mencionó, las células CTL son un componente esencial de la respuesta inmune antiviral. Estas células reconocen fragmentos virales por la interacción del TCR con el SLA-I. Una vez activadas, las células T citotóxicas participan en la eliminación de las células infectadas mediante la liberación de proteínas citolíticas que inducen apoptosis, pero la acción debe ser regulada (Spetz *et al.*, 2019).

Existe otro componente que fisiológicamente actúa inhibiendo las respuestas exacerbadas del sistema inmune como la autoinmunidad y permiten mantener la tolerancia inmunológica, son las células supresoras inducidas (iTregs). Estas iTregs inhiben la respuesta de CTLs por medio de secreción de citocinas inmunosupresoras, contacto célula a célula, donde la unión de PD-1 a su receptor suprimen la activación y función de las CTLs o las iTregs pueden inducir apoptosis en las CTLs activadas a través de la expresión de moléculas como FasL (Fas ligando); estos son algunos de los mecanismos más relevantes. En la fisiopatología, dichas células son aprovechadas por los patógenos (virus) para inhibir la respuesta inmunitaria (Hosseinalizadeh *et al.*, 2023).

En la infección por PRRSV, las células supresoras pueden limitar la activación y la proliferación de las células T citotóxicas, lo que puede resultar en una respuesta inmune subóptima, una supresión y una mayor susceptibilidad a la infección por el PRRSV. Por otro lado, un equilibrio adecuado entre las células T citotóxicas y las células supresoras es crucial para evitar la autoinmunidad y mantener la tolerancia inmunológica (Sakowska *et al.*, 2022). Por esto, la importancia de mantener un equilibrio adecuado entre la

respuesta inmune y la tolerancia inmunológica se refleja en la contribución de los linfocitos T citotóxicos a la inmunidad protectora. Si bien las células T citotóxicas son esenciales para la eliminación del virus y la protección contra la infección, una respuesta inmune exagerada puede conducir a la inflamación excesiva y el daño tisular exacerbado, aumentando así la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, es crucial mantener un equilibrio entre la activación y la supresión de la respuesta inmune para garantizar una protección efectiva contra la infección por PRRSV sin causar daño innecesario al huésped (Tondini *et al.*, 2022).

Debido a esto, la contribución de los linfocitos T citotóxicos a la inmunidad protectora se extiende más allá de su capacidad para eliminar las células infectadas, porque este proceso debe ser regulado en todo momento. Más aún, las CTL pueden producir citocinas, como el interferón-gamma (IFN- γ) para la respuesta antiviral, confiriendo sensibilidad a las células del sistema inmune de la periferia ante cualquier cambio. Si la regulación de citocinas se sale de control se induce una tormenta de citocinas que puede asociarse la muerte del individuo. Por el contrario, en un contexto regulado y altamente dirigido, las CTL promueven la activación de otras células del sistema inmune y la eliminación del virus sin desencadenar una respuesta hiperreactiva.

Además, se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos específicos para proteínas virales, ejemplo de una proteína viral es GP5 del PRRSV, juegan un papel crucial en la protección contra la infección y la enfermedad por PRRSV, lo que destaca su importancia como dianas potenciales para las estrategias vacunales (Cao *et al.*, 2019) .

Por todo esto, se busca destacar que la regulación de la respuesta inmune antiviral es un proceso complejo que involucra una interacción dinámica entre las células T citotóxicas, las células supresoras y otros componentes del sistema inmune (Nuñez-Anita *et al.*, 2023). Mantener un equilibrio adecuado entre la activación y la supresión de la respuesta inmune es indispensable para garantizar una protección efectiva contra la infección por PRRSV sin causar daño innecesario al hospedero.

Correlatos de protección

Los correlatos de protección son marcadores inmunológicos que se asocian con la defensa contra la infección o la enfermedad. En el contexto de la infección por el PRRSV, los títulos de anticuerpos y la respuesta celular mediada por linfocitos T, especialmente los linfocitos T citotóxicos, han sido identificados como correlatos potenciales de protección (Li. C., *et al.*, 2022).

La presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes frecuentemente se había asociado con la mayor protección contra la infección y la enfermedad por PRRSV. Esto porque los anticuerpos pueden bloquear la entrada del virus en la célula hospedadora y prevenir la replicación viral, lo que se asocia indirectamente con la reducción de la carga viral y la gravedad de la enfermedad (Abebe & Dejenie, 2023).

Sin embargo, en virus como el SARS-Cov-2 y PRRSV la presencia de anticuerpos neutralizantes son insuficientes para determinar la eliminación viral. Se ha discutido en la literatura que los anticuerpos neutralizantes no están correlacionados con el pronóstico de la resolución de la enfermedad. Por eso, es necesario evaluar la inmunidad celular para evaluar su potencial en la relación entre activación de células capaces de inducir citólisis sobre células infectadas y relacionarlo como una correlación de protección (Li & Murtaugh, 2012; Petrini *et al.*, 2013).

La evaluación de la respuesta inmune protectora mediada por la inmunidad celular, es un parámetro que no se utiliza habitualmente como correlato de la protección. Por lo tanto, la eficacia de la inmunidad celular mediada por linfocitos citotóxicos (CTL) es poco conocida. Sin embargo, en años recientes se ha comenzado a estudiar la inmunidad celular relacionada a la protección en vacunas candidatas contra el SARS-CoV-2 y el virus de la gripe (Goldblatt *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que la respuesta celular mediada por linfocitos T, en particular la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos para proteínas virales como GP5, puede contribuir a la eliminación del virus y a la protección contra la reinfección (Vanhee *et al.*, 2011).

Los péptidos derivados de GP5 (una de las proteínas estructurales del PRRSV) han surgido como posibles inductores de respuesta inmune celular y candidatos para el desarrollo de vacunas contra el PRRSV (Calderon-Rico *et al.*, 2024). Estos péptidos pueden ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos y desencadenar una respuesta inmune específica para el virus, lo que puede conferir protección contra la infección y la enfermedad. La contribución de los linfocitos T citotóxicos a la inmunidad protectora inducida por péptidos GP5 sugiere su potencial como componentes clave de las estrategias vacunales contra el PRRSV (Vanhee *et al.*, 2011).

Por tanto, la comprensión de los correlatos de protección en el contexto de la infección por PRRSV es crucial para el desarrollo de vacunas efectivas y el diseño de estrategias de control de la enfermedad.

Además, la identificación de correlatos inmunológicos puede facilitar la evaluación de la eficacia de las vacunas y guiar la selección de antígenos para la formulación de vacunas más eficaces contra el PRRSV. Comparaciones con estudios similares en otros virus como en el caso del SARS-Cov-2 pueden proporcionar información y entrecruzar el conocimiento sobre los mecanismos de protección inmunológica y ayudar en el desarrollo de vacunas contra el PRRSV (Cox, 2013; McMahan *et al.*, 2021; Rimmelzwaan *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, las vacunas de nueva generación que se fundamentan en péptidos virales han sido objeto de un intenso escrutinio y continúan siendo candidatas en fase experimental para combatir virus en cerdos. Bajo este enfoque, se encuentran las vacunas dirigidas contra parásitos y virus, las cuales han demostrado un potencial considerable. Han sido llevados a cabo meta-análisis recopilatorios, donde se analizan datos provenientes de numerosos estudios, con el fin de discernir si el empleo de péptidos como candidatos vacunales ofrece una protección significativa, la siguiente tabla hace una breve síntesis de dichos artículos (Tabla 1).

Tabla 1. Péptidos utilizados contra virus y parásitos en cerdos. Diversos estudios que se encuentran en fase de experimentación han usado péptidos como candidatos para favorecer la activación de la respuesta inmune (Autoría propia).

Diana	Modelo experimental	Tipo de vacuna de péptidos	Resultados principales	Conclusiones	Autor
Parásito	Cisticercosis (<i>Taenia solium</i>)	Cerdo	Mezcla de tres péptidos sintéticos	Anti parasitario	reducción de la carga parasitaria, de los cisticercos (de Aluja <i>et al.</i> , 2005)
Virus	Fiebre aftosa porcina (FMDV)	Meta-análisis Incluyendo artículos de cerdo y ratón	VLP que expresa epítomos (mezcla de péptidos) en su cubierta	Protección contra cepas virulentas	Dependiendo de la dosis de observa un efecto protector (97% comparable a la vacuna comercial con 2 mg) (Jiao & Wu, 2024)
	peste porcina clásica (PPCV)	Cerdo	(FlagDIVA) con tres péptidos unidos	Protección contra cepas virulentas	La vacuna tiene una efectividad del 82% (Bohórquez <i>et al.</i> , 2021)
	Circovirus porcino (PCV2)	Cerdo	4 péptidos sintéticos unidos a liposomas o nanopartículas de poliestireno	Aumento de títulos de anticuerpos	Vacuna en experimentación (Duong <i>et al.</i> , 2023)
	Influenza porcina A (SwIAV) H1N1	Cerdo	Liposomas con 10 péptidos sintéticos	Protección contra la gripe clínica	Reducción de la excreción viral nasal y la carga viral (Dhakai <i>et al.</i> , 2018)
	PRRSV	Cerdo	9 péptidos sintéticos	Aumento de IFN-γ	Aumento de citocinas proinflamatorias (Chen <i>et al.</i> , 2013)

Vacunas actuales y la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias

La gestión efectiva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) en la industria porcina ha sido un desafío continuo. En este contexto, la vacunación ha surgido como una herramienta clave en el control de la enfermedad. Sin embargo, su eficacia ha estado acompañada de ciertas limitaciones, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para combatir esta infección viral (Renukaradhya *et al.*, 2015).

La vacunación se ha utilizado ampliamente en la industria porcina como una medida preventiva para reducir la carga viral y proteger a los cerdos contra la infección por PRRSV. Las vacunas están diseñadas para inducir una respuesta inmune protectora que puede limitar la replicación del virus y prevenir el desarrollo de la enfermedad clínica. Sin embargo, la efectividad de las vacunas contra el PRRSV puede ser variable y está influenciada por diversos factores, incluida la cepa viral utilizada en la vacuna, el estado inmune del hospedador y las condiciones de manejo en la granja (Assavacheep & Thanawongnuwech, 2022; Brockmeier *et al.*, 2002).

Las vacunas contra el PRRSV han demostrado ser eficaces en la reducción de la carga viral y la prevención de la enfermedad en cerdos. Sin embargo, su eficacia puede ser limitada debido a varias razones. Por ejemplo, las vacunas de virus activo-atenuados pueden revertir a una forma virulenta y causar la enfermedad en cerdos vacunados o susceptibles. Por otro lado, las vacunas de virus inactivado pueden no proporcionar una protección completa contra la infección, especialmente contra cepas heterólogas del virus (Renukaradhya *et al.*, 2015).

Limitaciones de las vacunas actuales

A pesar de los avances en el desarrollo de vacunas contra el PRRSV, existen varias limitaciones que deben abordarse. Uno de los desafíos principales es la falta de protección cruzada entre diferentes cepas del virus (Health & States, 2016). Esto significa que las vacunas pueden ser efectivas solo contra la cepa específica utilizada en la vacuna, lo que limita su utilidad en entornos donde circulan múltiples variantes del virus. Además, la duración de la inmunidad inducida por las vacunas puede ser variable y puede requerir dosis de refuerzo periódicas para mantener la protección (Brinton S. 2008; Kvisgaard K. *et al.*, 2020; C. Li, Liu, *et al.*, 2022).

Ante estas limitaciones, se ha intensificado la investigación en el desarrollo de nuevas estrategias vacunales. Esto incluye enfoques como vacunas basadas en vectores virales, vacunas de ADN, vacunas recombinantes y vacunas de subunidades o péptidos que pueden ofrecer una protección más amplia contra múltiples cepas del PRRSV. Además,

se están explorando nuevas formulaciones de vacunas para mejorar la respuesta inmune y prolongar la duración de la protección (Rezaei & Nazari, 2022).

En resumen, las vacunas siguen siendo una herramienta importante en el control de la infección por PRRSV, pero su eficacia puede ser limitada debido a las restricciones mencionadas previamente. El desarrollo de nuevas estrategias vacunales y ofrece esperanzas para mejorar la protección contra el PRRSV y reducir su impacto en la industria porcina.

Desarrollo biotecnológico de vacunas de péptidos como candidatos vacunales contra PRRSV

El desarrollo de vacunas de péptidos representa una estrategia prometedora en la lucha contra el virus PRRS. Estas vacunas se basan en la identificación y síntesis de péptidos específicos que contienen epítomos inmunogénicos capaces de activar la respuesta inmune celular, especialmente de los linfocitos citotóxicos CD8+ (Hilchie *et al.*, 2019).

La investigación ha demostrado que los péptidos derivados de cepas del PRRSV pueden ser altamente inmunoestimuladores, mejorando la respuesta celular mediada por linfocitos T auxiliares CD4+ y linfocitos CTL. Estos péptidos conservan su capacidad para estimular las células citotóxicas entre diferentes cepas del PRRSV, lo que sugiere que podrían ser candidatos efectivos para nuevas vacunas contra este virus (Welner *et al.*, 2017).

En particular, se ha observado que los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV contienen epítomos T que tienen el potencial de inducir una respuesta de células citotóxicas contra el virus. Las CTL son células efectoras clave en la respuesta inmune antiviral, ya que tienen la capacidad de reconocer y eliminar selectivamente las células infectadas por el PRRSV, lo que limita la replicación viral y previene la progresión de la enfermedad (Vashisht *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, la identificación y caracterización de péptidos derivados de GP5, que tienen la capacidad de activar la respuesta de CTL, abre nuevas oportunidades para el desarrollo de vacunas de péptidos contra el PRRSV. Estas vacunas podrían ofrecer una protección más amplia y duradera contra la infección viral, ya que se basan

en componentes específicos del virus que son conservados entre diferentes cepas (Liang *et al.*, 2021; Mokhtar *et al.*, 2016).

Diversos trabajos en la academia han utilizado péptidos derivados de GP5 en distintos modelos relevantes como cultivo celular, el modelo murino y porcino para conocer la respuesta de péptidos derivados de GP5 con respecto a la activación de la inmunidad humoral y celular. Donde, los trabajos han sido satisfactorios puesto que se ha observado que péptidos derivados de PRRSV del genotipo 2 y derivados de GP5 pueden activar células secretoras de IFN- γ (CTL's) e inducir proliferación de células inmunes que potencialmente son las principales mediadoras de la inmunidad protectora celular (Chen *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2009; Vashisht *et al.*, 2008).

Además, las vacunas de péptidos ofrecen ventajas potenciales en términos de seguridad y especificidad, ya que los péptidos pueden ser diseñados para ser altamente específicos para cada tipo viral y no contener componentes de virus activos o atenuados que puedan revertir a una forma virulenta (TopuzoĞullari *et al.*, 2020).

En nuestro grupo de trabajo se ha trabajado con algunos péptidos descritos en la literatura y también se han caracterizado algunos péptidos derivados de GP5 que podrían estar involucrados en la respuesta humoral y/o celular, que se han evaluado en proyectos anteriores. En este trabajo se exploró la participación de dos péptidos que contienen epítomos T derivados de la proteína GP5, denominados PTC1 y PTC2, en la regulación de la respuesta inmune adaptativa mediada por CTL's en lechones. La respuesta inmune mediada por CTL's, es un eje importante para la protección contra el virus que no se mide comúnmente y esta información no se conoce en relación con el PRRSV. El objetivo principal del trabajo fue investigar la eficacia y potencia en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL's), en cerdos inmunizados con péptidos derivados de la proteína GP5 de PRRSV.

En resumen, las vacunas de péptidos representan una estrategia promisorio en el desarrollo de vacunas contra el PRRSV (Renukaradhya *et al.*, 2015). La capacidad de estos péptidos para activar específicamente la respuesta de células T citotóxicas sugiere que podrían ser candidatos efectivos para vacunas duraderas contra este virus,

ofreciendo nuevas esperanzas en la lucha contra esta enfermedad devastadora en la industria porcina (Cox, 2013; McMahan *et al.*, 2021; Rimmelzwaan *et al.*, 2007). Al avanzar en nuestro conocimiento en el entendimiento de estos aspectos, podemos trabajar hacia un futuro donde el PRRS sea controlado de manera más efectiva, beneficiando tanto a los productores porcinos como a los consumidores.

IV. JUSTIFICACIÓN

El Virus Del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) representa un desafío significativo para la industria porcícola, con una persistencia que afecta entre el 20% y el 70% de las explotaciones tanto a nivel nacional como internacional. En México, el PRRSV ha sido clasificado como un patógeno de alta prioridad, lo que ha generado una demanda urgente para el desarrollo de biológicos para prevenir esta enfermedad.

La glicoproteína 5 (GP5) del PRRSV juega un papel crucial en la interacción del virus con la célula huésped. GP5 contiene epítomos de reconocimiento para linfocitos T, lo que podría favorecer la respuesta adaptativa protectora mediada por la activación de células T citotóxicas (CTLs).

Por ello, es fundamental analizar la capacidad de los péptidos derivados de la proteína GP5 para inducir una respuesta inmune adaptativa protectora, evaluando su eficacia en la activación de linfocitos citotóxicos específicos. Los resultados de este estudio contribuirán a la toma de decisiones fundamentadas en el diseño de inmunógenos efectivos para la prevención del PRRSV.

V. HIPÓTESIS

Péptidos con epítomos T derivados de la proteína GP5 son capaces de activar a los CTL's y propiciar la eliminación de células infectadas con PRRSV.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia y potencia en la activación de linfocitos T citotóxicos de cerdos inmunizados con péptidos de la proteína GP5 de PRRSV.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las poblaciones celulares de linfocitos citotóxicos CD8+, en lechones inmunizados con péptidos derivados de la proteína GP5, a través de inmunotipificación.
2. Evaluar el perfil de citocinas en respuesta a la inmunización con péptidos derivados de la proteína GP5.
3. Evaluar la potencia de la activación de linfocitos T citotóxicos en células de cerdo, a través de ensayos directos de citólisis en co-cultivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Péptidos

Los péptidos utilizados para el presente trabajo derivan de la secuencia GP5 del PRRSV tipo 2 y se denominaron péptido T citotóxico número 1 y péptido T citotóxico número 2 (PTC1 y PTC2, respectivamente).

El péptido PTC1 fue identificado previamente en nuestro grupo de trabajo (Perez-Duran, 2020a). Su antigenicidad se determinó mediante análisis bioinformáticos (Immunoepitope

Data base IEDB y CCL Main Workbench 20.0, datos no publicados). PTC1 corresponde a la región del endodominio y presenta un alto grado de conservación (encima de 80% de homología) entre los diferentes genotipos reportados en la base de datos.

En cambio, el péptido PTC2 contiene dos epítomos reportados conjuntamente por Vashit y colaboradores (2008). Estos corresponden a la identificación del autor como epítomos blanco de células T inmunodominantes. Nuestro equipo de trabajo realizó análisis por bioinformática (Immunoepitope Data base IEDB and CCL Main Workbench 20.0, datos no publicados) que identificaron a PTC2 como un probable epítomo de células T (Piña Díaz, 2021).

Ambas secuencias peptídicas coinciden con el endodominio de GP5, correspondiente a los residuos 117 a 163. Los péptidos fueron sintetizados químicamente mediante síntesis en fase sólida por GenScript (Piscataway, NJ, EE.UU.):

- a) PTC1, **RLYRWRSPVIGHLIDLKRVRSVAEQWGRPC** (30 aa), pureza de 95%.
- b) PTC2, **KGRLYRWRSPVIVEKLAALICFVIRLAKNC** (29 aa), pureza del 98%.

Para unir ambos péptidos en la formula vacunal se incluyó una cisteína en el extremo carboxilo terminal de su secuencia, para poder unirlos covalentemente a una proteína acarreadora. Ambos péptidos se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL de una solución madre. Posteriormente, se utilizaron 100 µl de cada péptido para las inmunizaciones de cada animal y ensayos de inmunorreactividad.

Se realizó un análisis *in silico* utilizando las secuencias de PTC1 y PTC2 con las secuencias reportadas para PRRSV tipo 1, 2 y cepas de alta patogenicidad en el programa Protein BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Los resultados muestran una cobertura de búsqueda para PTC1 del 100% en PRRSV tipo 1, 96-100% para PRRSV tipo 2, y 93-100% para HP-PRRSV. PTC2 mostró una similitud entre secuencias del 100% para los tres genotipos. Estos resultados sugieren que las secuencias se conservan entre genotipos (Perez-Duran, 2020a).

Diseño experimental, animales y alojamiento

Se utilizaron veintiocho animales que procedían de la explotación porcícola certificada (Buenas Prácticas Ganaderas o BPP) de fines comerciales, la empresa Agroalimentos “La Concepción”, en la que periódicamente se verificaba que los animales fueran negativos a PCV2 y PRRSV (Datos no mostrados). De esta granja se seleccionaron aleatoriamente lechones destetados de 21 días de edad (el día final del periodo de lactancia) para el presente estudio, sexo indistinto, provenientes de seis camadas diferentes; cerdos mestizos cruce de las razas Large White y Pietrain. Todos los lechones fueron sometidos a un plan estándar y rutinario de medicina preventiva que incluía suplementación de Hierro/Zinc y vacunaciones. Las vacunaciones incluyeron: Coccidia (Coxizuril 5%, 20 mg/Kg vía oral, Lapisa, México) a los 3 días del nacimiento, Mycoplasma hyopneumoniae y Circovirus porcino tipo 2 (Comboflex 2,0 mL vía IM) a los 3 y 19 días del nacimiento, e Influenza porcina (Por-cimune influenza 2,0 mL vía IM Lapisa, México) a los 21 días de edad.

A los 21 días de edad, 28 lechones fueron separados al corral (galera) experimental de $>33,6 \text{ m}^2$ (conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana vigente NOM-62-ZOO-1999). La granja de experimentación fue la Unidad de Fomento Ganadero de La Carreta del gobierno del estado de Michoacán, ubicada en la comunidad del calvario, C.P. 58928 con ubicación 19°48'09.9"N 101°03'47.1"W.

Se utilizó la herramienta en línea GraphPad-Random number generator (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/randomN1/>) para asignar aleatoriamente cada animal a uno de los cuatro grupos de siete individuos cada uno. Se marcaron con número individual las orejas de los cerdos con tatuajes y aretes. Se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 7 individuos en los cuatro corrales experimentales.

El día cero del experimento, se inoculó a los animales según el grupo al que pertenecían. El grupo control se inoculó con 800 μL de PBS (N=7), el grupo vehículo se inoculó con la preparación de 400 μL de PBS y 400 μL de hidróxido de aluminio (adyuvante) (N=7), el grupo PTC1 se inoculó con una preparación que contenía PTC1 (N=7), y el grupo PTC2 se inoculó con una preparación con PTC2 (N=7). La preparación de inoculación para los péptidos fue: 200 μg de péptido PTC1 o PTC2 (1 mg/mL), 200 μg de BSA-maleimida [1 mg/mL] (Thermofisher Maleide Activated BSA), conjugada según las especificaciones del

fabricante y 400 µl de adyuvante alhidrogel (InvivoGen San Diego, CA) con un volumen final de 800 µl. Los lechones se inmunizaron por vía intramuscular en la zona del glúteo mayor. En lo sucesivo, los grupos Control y Vehículo se referirán como controles.

Las camas se limpiaron diariamente. Los lechones tuvieron acceso permanente a agua potable *ad libitum* y fueron alimentados con una dieta comercial (Folechon fase 1, Vitalechón fase 1, fase 2, fase 3 y Vitalechon iniciador Valles) (Sagarpa A-6436-004) siguiendo las dosis recomendadas por el fabricante, utilizando un dispositivo semiautomático (comedero para lechones de 9 libras). Además, los corrales se enriquecieron con material para jugar (cadena suspendida) y acariciar (botellas de plástico en suspensión). Los animales tuvieron un periodo de adaptación de siete días (Día -7 del experimento), antes del inicio del experimento (Día 0). El mapa de inmunización y muestreo sanguíneo se muestra en.

El alojamiento, manejo, cuidado y muestreo de los animales se realizó de acuerdo con los lineamientos internacionales del Animal Care and Use Program (NIH, EUA) y nacionales, la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 vigente. El protocolo de estudio CICUMSNH-A101-FMVZ fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación (Comité de Investigación y Ética Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) previo al inicio del plan de desarrollo del proyecto.

Peso de los lechones

Se determinó la ganancia de peso de los animales en cada semana de experimentación. Se utilizó una báscula de piso con un rango de peso de 1 kg hasta 100 Kg.

Toma de muestras sanguíneas y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se recogieron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular, a los 0, 2, 21 y 42 DPI. La sangre se extrajo con y sin EDTA (15 ml por animal) en tubos de tapa color morado (para recolección de sangre total) y oro/amarillo (para recolección de suero) comerciales (Vacutainer, BD, N.J., EE.UU.) y se procesaron dentro de las 3 h siguientes a la extracción.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre completa mediante separación en gradiente de densidad utilizando Lymphoprep® (StemCell Technologies, Vancouver, Columbia Británica, Canadá), se modificó el protocolo para optimizar la obtención de células monoclonales (PBMC). Siendo necesaria la recolección de 15 mL de sangre periférica, los 15 mL de muestras de sangre completa se diluyeron cuidadosamente 1:1 (volumen:volumen) con el reactivo Lymphoprep; después, se centrifugaron a $464 \times g$ durante 25 min sin pausa (no brake). Se recogió la interfase y se transfirió a un tubo cónico, se lavó dos veces con 2 mL de PBS para eliminar detritos (restos celulares); después, se centrifugó a $694 \times g$ durante 15 min. Se añadió el reactivo amortiguador de lisis de glóbulos rojos 1X (Milltenyi Biotec) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para eliminar restos celulares que pudieran intervenir con el aislamiento de linfocitos. Después, se lavaron dos veces con 2 mL de PBS, y se centrifugaron a $573 \times g$ durante 5 min. Todos los reactivos utilizados para la separación se llevaron a temperatura ambiente previo a su utilización. El pellet/botón celular se resuspendió en 2 400 μ L de FBS/DMSO al 10% y se dividió en cuatro criotubos. Esta técnica es ampliamente utilizada para la criopreservación de células (BD Technical Protocol, 2015). Las muestras se mantuvieron ultracongeladas a -80°C hasta su uso para análisis posteriores.

Ensayo de detección de citocinas

La concentración de citocinas se cuantificó utilizando el kit comercial preconfigurado de inmunoensayo multiplex Cytokine & Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex® panel (Invitrogen, Viena, Austria, No. de cat. EPX090-60829-901), siguiendo los protocolos del fabricante (ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay user guide). Para ello, se utilizó el equipo Luminex 200 (Austin, TX, EE.UU.). La concentración se evaluó en muestras de suero obtenidas 2 DPI. Las citocinas evaluadas fueron: IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p40. Cuando el instrumento Luminex notificó una concentración "por debajo del límite de detección", los valores se notificaron como cero.

Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos citotóxicos

La citometría se realizó utilizando aproximadamente 1×10^6 células/mL de PBS por cada muestra de cada individuo. Las células se tiñeron y luego se evaluaron en el citómetro de flujo (Attune NxT acoustic fo-cusing cytometer, Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.). El citómetro está configurado con dos láseres, uno azul (488 nm) y otro violeta (405 nm).

El análisis incluyó tres subpoblaciones de células T de interés: CD3+/CD8+/CD44+, CD8+/CD44- y CD8-/CD44+. Los anticuerpos utilizados fueron anti-pig-CD3 ϵ PE-CyTM7 (Becton Dickinson, cat: 561477), anti-pig-CD8 α (76-2-11) FITC (Invitrogen, cat: MA5-28714) y anti-pig-CD44 (marca, cat: MEM-263) PE (Invitrogen, cat: MA1-19781).

Se recogieron al menos 10 000 eventos en cada corrida de cada muestra para analizar los paquetes de eventos individuales. Se realizó un diagrama de puntos con la comparación de la dispersión frontal-A frente a la dispersión frontal-H, donde se descartaron los dobles (células dúplex que pudieran interferir en la medición). Se aplicó un diagrama de puntos de dispersión lateral contra dispersión frontal lineal de singletes para delimitar la población de linfocitos. Con el gráfico de población de linfocitos, se realizó una estrategia de *gating* de subconjuntos para comparar las células BL1-CD3+ contra la dispersión lateral lineal. A continuación, se realizó otro *gating* de cuadrante de subconjunto para seleccionar 4 subpoblaciones de linfocitos T: CD8-/CD44- (Q4), CD8+/CD44+ (Q2), CD8+/CD44- (Q3) y CD8-/CD44+ (Q1). Los resultados obtenidos de cada subpoblación se muestran como porcentaje de células positivas.

Ensayos *in vitro*

Plásmidos y líneas celulares

La clona infecciosa de PRRSV norteamericano de tipo 2 (cepa NVSL 97-78950) clonado en el plásmido pFL-12 fue un generoso regalo del Dr. Asit K. Pattnaik de la Universidad de Nebraska. La línea celular PK-15 Siglec-10+ CD163+ (PK-15 S10-CD163) fue donada generosamente por el Dr. Hans J. Nauwynck de la Universidad de Gante. Las células PK-15 S10-CD163 y MARC-145 (ATCC CRL-2378.1) se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de

penicilina/estreptomicina (P/S; 10.000 U/mL; 10 mg/mL; Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.) y 0,5% de gentamicina (10000 U/mL; Thermo Fisher Scientific).

Transcripción *in vitro*, propagación de la clona infecciosa y recuperación del virus PRRS

La propagación de la clona infectiva se llevó a cabo utilizando el plásmido FL-12 que contiene el genoma completo de PRRSV tipo II (variedad NVSL 97-78950, tipo americano) fue donado por el Dr. Asit K. Pattnaik de la Universidad de Nebraska. El plásmido fue reconstituido en agua ultrapura (Tipo I) Milli-Q® para su utilización. El plásmido pFL-12 que contiene el genoma completo del PRRSV tipo 2 se cuantificó con el NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.). La PCR de punto final para corroborar los ORF's clonados en el plásmido se realizó utilizando los cebadores descritos por nuestro grupo de trabajo: ORF3 5-3': forward: GGATGTACCGCACCATGGAA, reverso: CCTGTCATGCGCAGATTGTG (pb: 187); ORF4 5-3': forward: AAGGCCACTTGACCAGTGTT, inversa ATGCTGCGGTAG-TGTTGGTT: (pb: 368); ORF5 5-3': adelante: TGCTCGCGATTGCTTTCTTT, inversa: ATGAGAGCTGCTGTTGCTGT (pb: 84); ORF6 5-3': forward: CCTTGACACAGTCGGTCTGG, inversa: AGGACATGCAGTTCTTCGCA (pb: 140) y ORF7 5-3': adelante: GTTGGGTGGCAGAAAAGCTG, inversa: GGGCTTCTCCGGGTTTAA (pb: 210). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel con el plásmido completo y las amplificaciones de los ORF para corroborar la presencia e integridad del plásmido y del genoma del PRRSV (datos no mostrados).

A continuación, el plásmido se linealizó con la enzima AclI (New England Biolabs, MA, EE.UU.) para realizar una transcripción de ARN *in vitro* utilizando el kit TranscriptAid T7 High Yield (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.), tal como se describe por el fabricante, esto para generar un RNA mensajero de polaridad positiva, el cual se traduce cuando es transfectado a la célula blanco. Se transfectaron 5µg de RNA viral en células MARC-145 (las cuales son permisivas al virus.) utilizando Lipofectamina 3 000® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.) como se describió anteriormente (Ansari *et al.*, 2006). Las células MARC-145 infectadas se incubaron durante dos días (48 h). Después, se lisaron las células junto con el sobrenadante. A

continuación, se realizó un pasaje a un nuevo cultivo MARC-145 con medio DMEM 10% FBS sin antibiótico y se incubó durante 48 h para permitir la amplificación y replicación viral. Posteriormente, las células y el sobrenadante fueron lisados, alicuotados y almacenados a - 80°C con el medio original DMEM suplementado con 20% FBS.

Extracción de RNA, retrotranscripción, PCR de punto final y ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del virus PRRS

El ARN viral se obtuvo a partir de 500 µl de células infectadas con MARC-145 -PRRSV (obtenidas como se ha descrito anteriormente). La extracción del ARN se llevó a cabo utilizando 500 µL del reactivo TRIzol® (Invitrogen Thermo Scientific, CA, EE.UU.), de acuerdo con la guía del usuario para el aislamiento del RNA. A continuación, el precipitado de RNA se resuspendió en 15 µl de agua ultrapura libre de RNasas. Las muestras se conservaron en hielo. La transcripción inversa (retrotranscripción) se llevó a cabo con el kit comercial Re-vertAid H Minus Reverse Transcriptase® (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las copias virales se cuantificaron por qPCR utilizando 11 µl de DNAC y el reactivo Syber green® (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante para la mezcla, se utilizaron 0,5 µl del primer ORF7 forward 5'-3': GTTGGGTGGCAGAAAAGCTG y reverso 5'-3': GGGCTTCTCCGGGTTTTA primer a [10 µM] para la amplificación de una banda de peso de 210 pb que corresponde al ORF7.

Curva estándar para la cuantificación de PRRSV

La curva estándar de qPCR se realizó utilizando el plásmido pFL-12 PRRSV (tipo-2). La concentración del plásmido se correlacionó con un número estimado de copias virales (Woźniakowski *et al.*, 2012). Las diluciones seriadas séxtuples oscilaron entre $6,4 \times 10^9$ y $2,0 \times 10^6$ de número de copias virales, este conjunto de datos se utilizó para la construcción de la curva estándar y medir las copias virales en muestras de suero y sobrenadante de la amplificación viral del PRRSV en células infectadas MARC-145.

El cálculo de los parámetros de la curva estándar mostró un coeficiente de correlación $R^2=0.996$ con una pendiente = -3,159, intercepción = 21,55 y eficacia E = 107,279%. Utilizando una fórmula estándar para el cálculo del análisis de regresión lineal $Y = -3$

159X+21,55 fue posible cuantificar el número de copias virales en las muestras examinadas.

Co-cultivos de linfocitos primarios con células PK-15 S10-CD163 infectadas con PRRSV

El ensayo de citotoxicidad se realizó en un co-cultivo de células PK-15 S10-CD163, como las células diana, y con linfocitos porcinos primarios aislados de los cuatro grupos experimentales, como las células cebadas (CTL's).

Primeramente, se sembraron células PK-15 S10-CD163 a una concentración de 10 000 células/pocillo en placa negra de 96 pocillos con fondo plano transparente (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) con medio DMEM 2% FBS (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las células se incubaron durante 24h a 37°C y 5% CO₂. A continuación, las células se infectaron con PRRSV a una MOI de 0.2 en DMEM 10% FBS inactivado y se sembraron al mismo tiempo que los linfocitos en la placa.

Tras la descongelación, se realizó una normalización de los linfocitos viables antes del experimento como control de viabilidad. La viabilidad se midió mediante un ensayo con bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Las células se cultivaron a 1×10^4 células/pocillo en medio basal RPMI y se incubaron a 37°C en placas de 96 pocillos con un 5% de CO₂. A continuación, se añadieron 20 µl de MTT (5 mg/mL en PBS) a cada pocillo, y las células se incubaron durante 4 h a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 830 x g durante 5 min y se eliminaron inmediatamente los sobrenadantes. Se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se determinó la absorbancia (595 nm) mediante un lector de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La viabilidad celular se expresó como porcentaje (%) de viabilidad, en comparación con linfocitos frescos como control. El porcentaje de viabilidad se calculó como se muestra: [(densidad óptica de las muestras) / (densidad óptica del control)] x 100. Las muestras se analizaron por triplicado. Todos los grupos mostraron un rango alrededor de ≈ 40% de viabilidad tras la descongelación de los crioviales a -80°C.

Los PBMC criopreservados a partir de 42 DPI se descongelaron a temperatura ambiente y se sembraron en placas de cultivo de 100 mm (Corning, NY, EE.UU.) por 2h en

condiciones de cultivo estándar con RPMI (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) 10% FBS. Esto, para el aislamiento de linfocitos primarios porque los macrófagos tienen la propiedad de ser adherentes. Posteriormente se retiró el sobrenadante, el cual contenía el enriquecido de linfocitos aislados.

Tras la incubación, se recogieron los linfocitos no adheridos y se identificaron como linfocitos aislados. Estos linfocitos se separaron en dos muestras, una se cultivó con RPMI 10% FBS y la otra se incubó con RPMI 10% FBS suplementado con 10 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA Aldrich). Las células se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

Para los ensayos de co-cultivo, se añadieron aislados de linfocitos a las células PK-15 infectadas. En detalle, se añadieron linfocitos primarios a una concentración de 8 000 células/50 µl/pocillo para alcanzar una proporción 8:1 (linfocito:PK-15), utilizando RPMI 10% FBS sin rojo fenol (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.). Además, cada pocillo recibió 50 µl de reactivo Green celltox (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los co-cultivos se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂. La fluorescencia se cuantificó a las 12 h y 24 h en un equipo Varioskan LUX (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) medido a 485/520 nm.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos infectados y no infectados se evaluaron en primer lugar mediante pruebas de normalidad y log-normalidad para todos los ensayos, a continuación, se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías y seguidamente mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis o las pruebas post hoc de Brown-Forsythe y Welch, según se detalla en las leyendas de las figuras. Los valores p de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó el software GraphPad Prism (versión 8.0.1, GraphPad Software, San Diego).

VIII. RESULTADOS

Ganancia de peso a través de las semanas de experimentación

La ganancia de peso semanal aumentó de forma constante a lo largo del experimento en los cuatro grupos. No hubo diferencias significativas en los grupos PBS y vehículo en comparación con los grupos PTC1 y PTC2 (Figura 2).

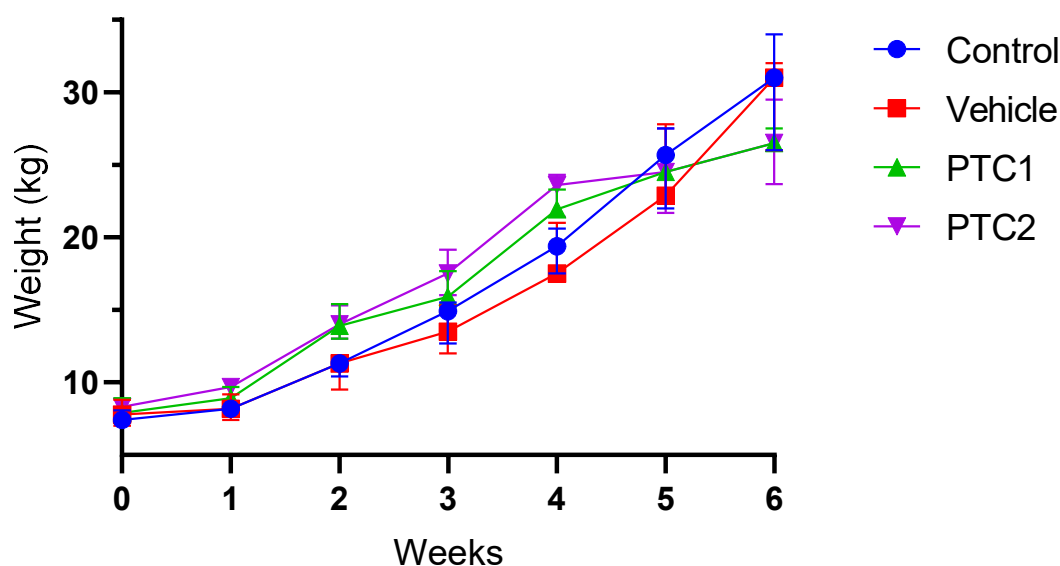


Figura 2: Ganancia de peso. Peso de los cerdos en experimentación en las distintas semanas de crecimiento (N=28) divididos en 4 grupos (n=7). Las curvas indican la mediana de 7 sujetos individuales, y las barras de error representan el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y prueba pos hoc de Tukey. Se observaron diferencias no significativas.

Cuantificación de la concentración de citocinas proinflamatorias

Se cuantificó la concentración de citocinas en muestras de suero provenientes de cada animal de los cuatro grupos experimentales obtenidas 2 DPI después de la primera inmunización, para determinar el estado proinflamatorio. Los cerdos inmunizados con PTC2 mostraron una mayor concentración sérica de TNF- α e IL-1 β en comparación con los grupos de control y vehículo (Figura 3 A y B). Por el contrario, en el grupo PTC2, la IL-8 y el IFN- α no mostraron diferencias significativas en las concentraciones séricas, en comparación con los grupos de control (Figura 3 C y D). El grupo PTC1 no mostró diferencias en las concentraciones séricas de citocinas en comparación con los controles.

Estos resultados sugieren que el péptido PTC2 puede inducir una condición proinflamatoria tras la inmunización. Se cuantificó 48 horas después de la primera inmunización para observar el efecto inmunomodulador en la primera etapa de procesamiento y presentación del antígeno.

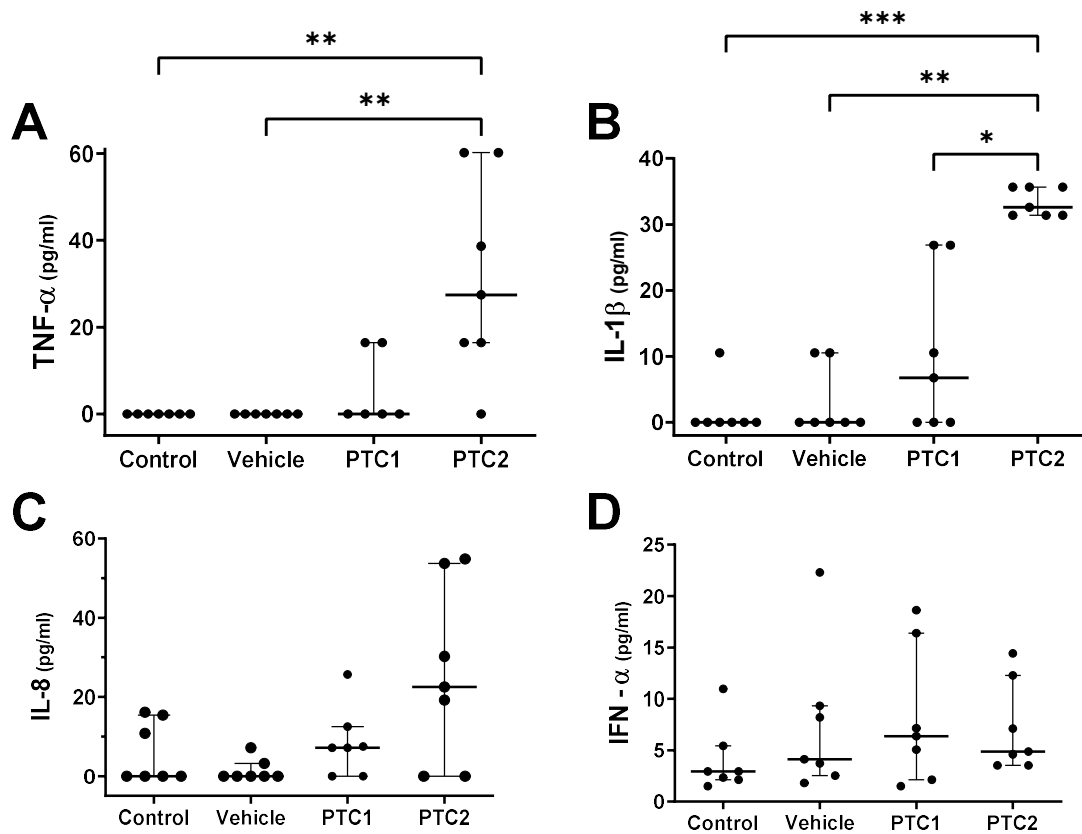


Figura 3. Análisis de citocinas proinflamatorias en suero de cerdos inmunizados con PTC1, PTC2 y los grupos control. Las muestras de suero se recogieron 48 h después de la inoculación. Las citocinas se midieron mediante un inmunoensayo multiplex de citocinas utilizando un equipo Luminex. A) TNF- α . B) IL-1 β . C) IL-8. D) IFN- α . Las barras indican la mediana de 7 sujetos individuales y las barras de error representan el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA y la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis.

Evaluación sérica de citocinas relacionadas con la actividad de la inmunidad celular de linfocitos cooperadores.

Se cuantificó la concentración de citocinas en muestras de suero provenientes de cada animal de los grupos experimentales obtenidas 2 DPI después de la primera

inmunización, para determinar las citocinas que pudieran estar relacionadas con la activación de linfocitos cooperadores de tipo Th1 y Th2. Donde, los cerdos del grupo PTC2 mostraron un aumento de la concentración sérica de IL-4, IL-10 e IL-6, en comparación con los grupos control y vehículo (Figuras 4A, B, D y E). En el caso de la IL-12, la concentración aumentó en los grupos vehículo, PTC1 y PTC2 en comparación con el control (Figura 4C). Por lo tanto, es posible que el vehículo pudiera influir en la concentración de IL-12 en esta configuración experimental.

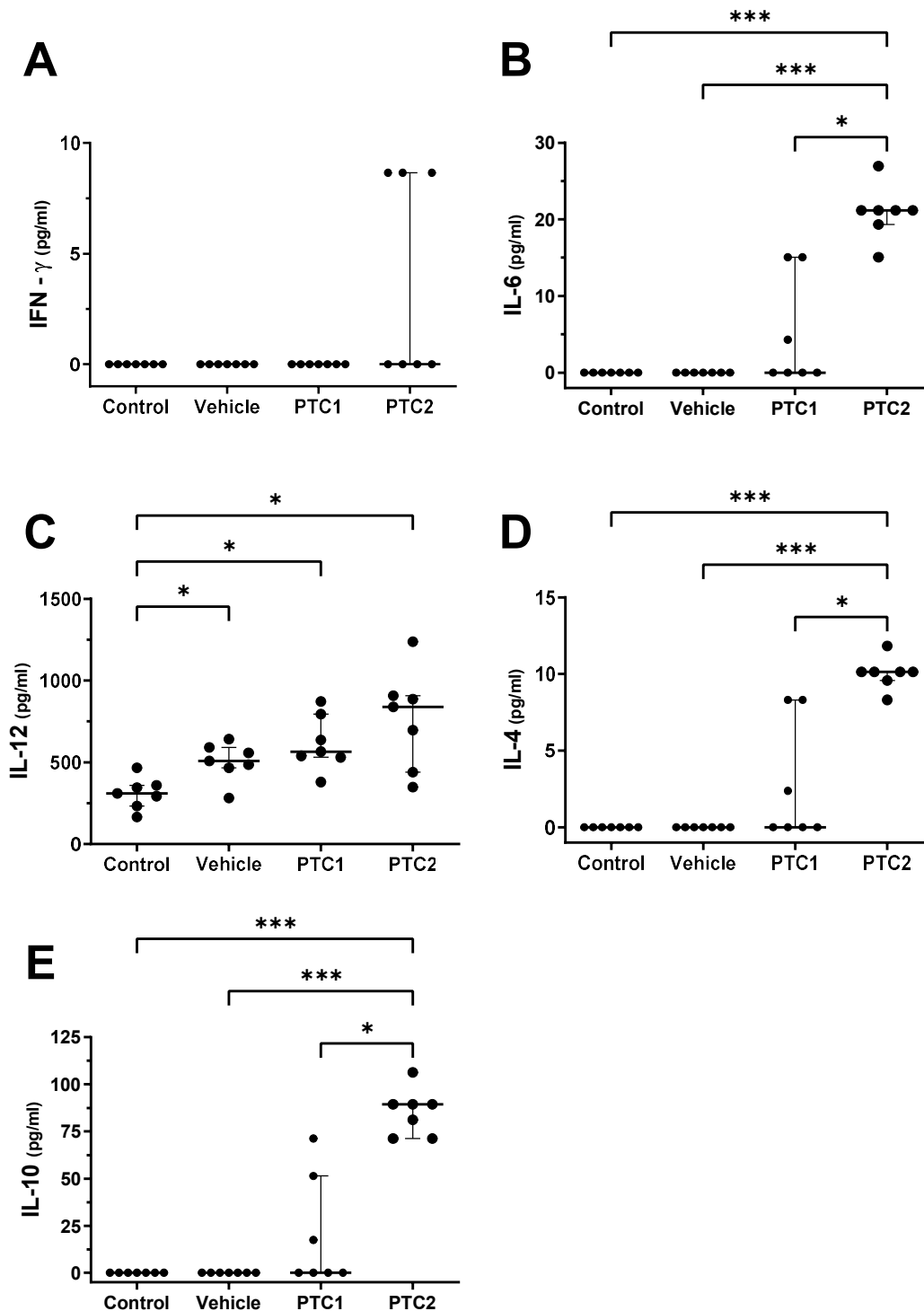


Figura 4. Cuantificación de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-4 e IL-10 en suero porcino. El suero de los cerdos fue colectado a 48 h después de la inoculación. Las citocinas se midieron mediante un inmunoensayo de citocinas multiplex utilizando un equipo Luminex. Las barras indican la mediana de 7 sujetos individuales, y las barras de error representan el rango intercuartílico. Las diferencias

estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA, prueba pos hoc de Kruskal-Wallis.

Citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares de linfocitos citotóxicos CD8+

La población de linfocitos citotóxicos (CD8+) en sangre periférica se cuantificó a los 42 DPI. La población de células CD8+ aumentó en los cerdos inmunizados con PTC1 y PTC2, en comparación con los grupos PBS y vehículo (Figura 5A). El grupo inmunizado solamente con el vehículo mostró un recuento de células CD8+ superior en comparación con el grupo control, pero seguía siendo inferior al de los cerdos inmunizados con ambos péptidos. Estos datos sugieren que los péptidos podrían tener un efecto directo sobre la producción y diferenciación de linfocitos citotóxicos.

Para determinar si los péptidos podían influir en el estado de activación de los linfocitos citotóxicos, cuantificamos las células CD8+/CD44+ doblemente positivas que pueden corresponder a la población de CTL's activados (Yang & M. Binns, 1993) mediante citometría de flujo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el recuento de CD8+/CD44+ en los grupos inmunizados con péptidos en comparación con los controles (Figura 5B).

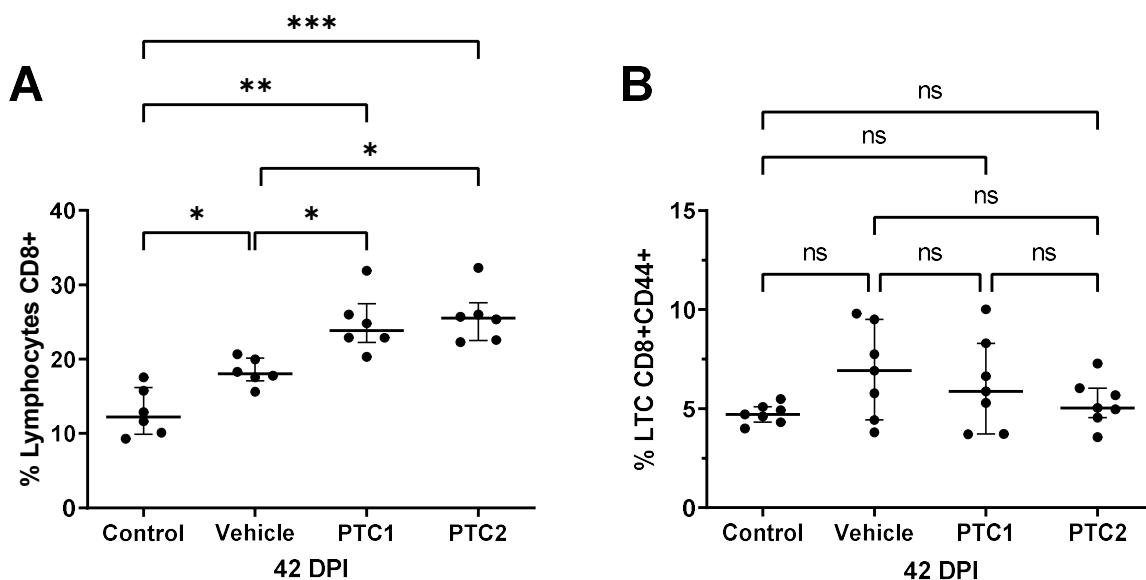


Figura 5. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos T, poblaciones de células CD8+ y CD8+CD44+ de cerdos a los 42 DPI. A) Porcentaje de población total de células citotóxicas CD8+. B) Porcentaje de células citotóxicas activadas totales CD8+CD44+. Las barras indican la mediana de 7 sujetos individuales y las barras de error representan el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA y pruebas pos hoc de Brown-Forsythe y Welch.

Co-cultivos de linfocitos aislados de los cuatro grupos experimentales con células infectadas por el PRRSV

Los linfocitos cebados con PTC1 y PTC2 reconocen y eliminan las células infectadas por el virus PRRS. Los linfocitos aislados de 42 DPI, de todos los grupos experimentales, se co-cultivaron con células infectadas por el PRRSV para evaluar su actividad citotóxica. La actividad citotóxica se estimó a partir de las unidades de fluorescencia relativa (RFU), esto es equivalente a las células no viables. Como control de viabilidad se utilizaron células PK-15 infectadas únicamente con el virus.

Tras 12 h de co-incubación, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las células viables de ningún grupo de tratamiento, es decir, se presentó el mismo nivel de células muertas independientemente del esquema de inmunización (Figura 6A). Por el contrario, cuando los linfocitos fueron estimulados con PHA 24 h previo al co-cultivo, la diferencia en la viabilidad celular fue significativamente mayor en el grupo inmunizado con PTC1 (Figura 6B).

Tras 24 h de co-incubación, el efecto de PTC1 sobre la viabilidad celular fue claramente superior al de PTC2 y al de los grupos de control, así como con y sin estimulación con PHA (Figura 6C y D).

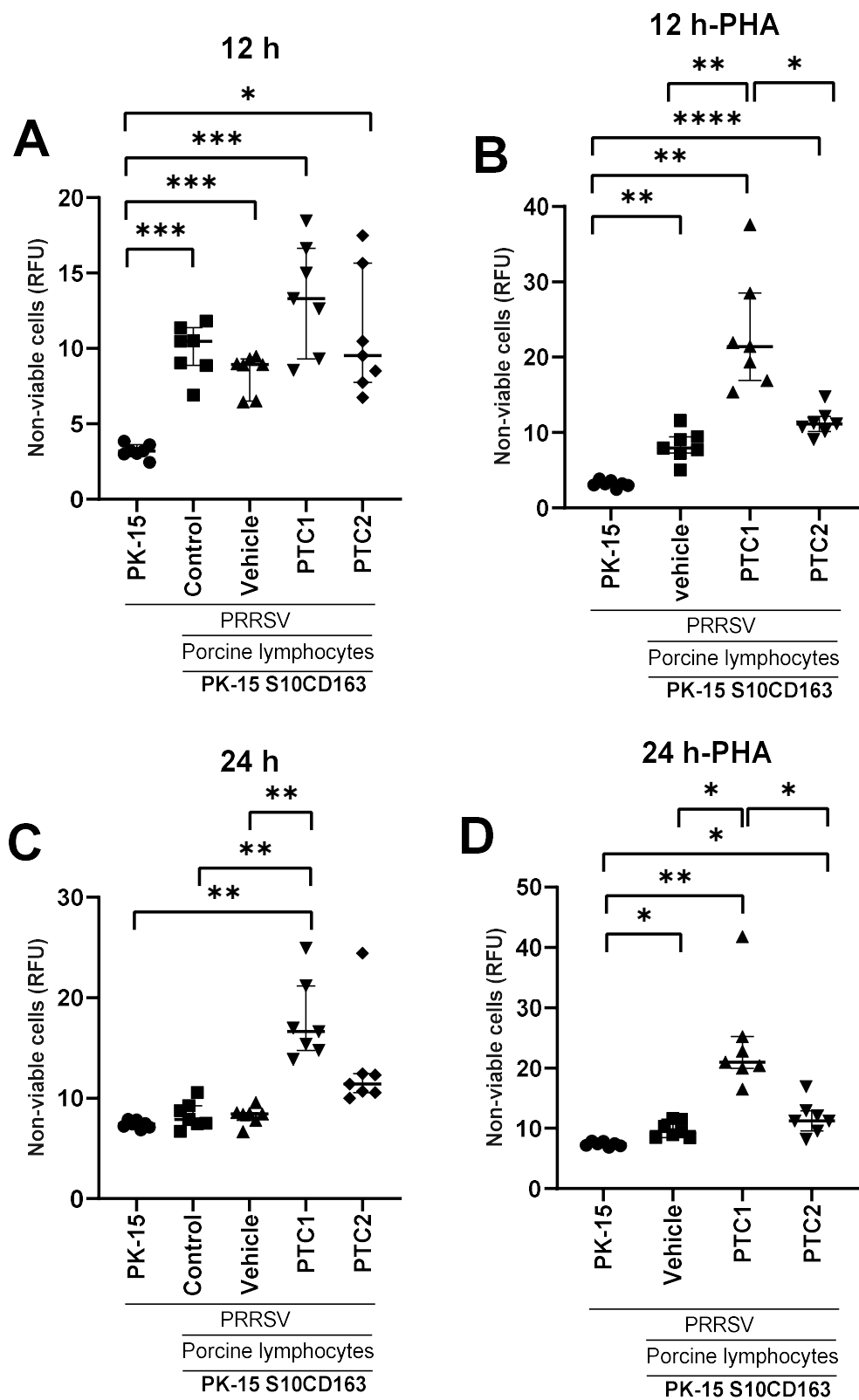


Figura 6. Respuestas de células CTL's específicas de los péptidos derivados del PRRSV *in vitro*. Se sembraron células PK-15 S10-CD163 en una proporción (radio) de 1:8 con linfocitos

aislados de cerdos inmunizados según los grupos experimentales: Control, Vehículo, PTC1 y PTC2. Además, los linfocitos de los grupos: vehículo, PTC1 y PTC2 fueron pre-activados *in vitro* con PHA durante 24 h antes del co-cultivo. A) Medición de la RFU a las 12 h de co-cultivo. B) Medición a las 12 h del co-cultivo con linfocitos pretratados con PHA. C) Medición de la RFU a las 24 h del co-cultivo. D) Medición a las 12 h de co-cultivo con linfocitos pretratados con PHA. Las barras indican la mediana de 7 sujetos individuales y las barras de error representan el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA y pruebas pos hoc de Brown-Forsythe y Welch.

IX. DISCUSIÓN

Las vacunas candidatas contra el PRRSV basadas en subunidades peptídicas se han estudiado desde hace más de 25 años. Sin embargo, la eficacia protectora de estas vacunas es variable entre cepas y la mayoría no confiere protección contra cepas heterólogas. Además, la respuesta de este tipo de inmunización puede ser comparable a la de las vacunas con virus inactivados (Renukaradhya *et al.*, 2015).

Las vacunas de virus vivo modificado (atenuado) o MLV son actualmente las más utilizadas, pero no ofrecen una protección completa y esterilizante frente al PRRSV. Las vacunas de nueva generación como las que utilizan la proteína GP5 completa, tampoco promueven una respuesta adecuada. Por lo tanto, todavía se precisan vacunas eficaces y seguras como candidatos para combatir la infección contra el PRRSV. Por ejemplo, los péptidos derivados de plantas (extractos) y sintéticos han demostrado una sólida inducción de la inmunidad mediada por células T (Hilchie *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que los péptidos son prometedores para la investigación y el desarrollo de nuevas vacunas.

En el presente estudio informamos de las características inmunogénicas de dos novedosos péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV tipo 2 como candidatos a una formulación vacunal, haciendo hincapié en su potencial para inducir inmunidad mediada por células T. A esto, PTC1 abarca los residuos de amino ácidos 148-161 (Seq. Ref. UJD73100.1) y PTC2 corresponde a los residuos de amino ácidos 116-130 y 148-163 (Seq. Ref. UOA04012.1) integrados en el péptido. También, PTC1 comparte un 76%

de similitud con la secuencia previamente reportada por el grupo de Chen, C. y colaboradores (2013). En este trabajo fue reportado que la secuencia denominada GP5-149T contiene un epítipo de células T y fue capaz de inducir una respuesta inmune de células T (Chen *et al.*, 2013). Por otra parte, PTC2 contiene dos secuencias integradas en el epítipo, la primera corresponde a un epítipo inmunodominante de células T reportado por Vashisht, K. y colaboradores (2008). La segunda secuencia se sobrelapa con la secuencia PTC1. Se han identificado epítopos de células T en GP5 que apoyan el uso de esta proteína para inducir una respuesta mediada por células T (Chen *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2009; Marsman *et al.*, 2020; Vashisht *et al.*, 2008). Se ha encontrado que péptidos similares a PTC1 y PTC2 promueven la activación de células secretoras de IFN- γ (como los CTL's); así como, la proliferación de PBMCs de ratones y cerdos; además, están relacionados con la actividad secretora de las células T, analizando la secreción de IFN- γ (Chen *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2009; Vashisht *et al.*, 2008).

El diseño experimental no afectó a la salud ni a la tasa de crecimiento de los cerdos. En nuestro estudio, el aumento de peso fue independiente del protocolo de inmunización (Fig. 2), lo que indica que los cerdos tuvieron una tasa de crecimiento normal. A esto, con frecuencia, se menciona que el control del aumento de peso es indicativo del estado de salud y bienestar de los animales de producción (He *et al.*, 2015), por lo que sustenta la idea de que los animales crecieron saludablemente durante todo el periodo de experimentación. Además, todos los lechones utilizados para el experimento fueron negativos al PRRSV, dato que fue confirmado por PCR.

Para los experimentos, se utilizó la formulación candidata a vacuna que contenía uno de los dos péptidos derivados de GP5 llamados PTC1 y PTC2, los cuales se dividieron en dos grupos diferentes, donde, mostraron diferentes patrones de estimulación en lo que respecta a las citocinas proinflamatorias, las citocinas relacionadas con la activación de la inmunidad celular y la actividad citotóxica relacionada con los linfocitos cebados.

Primero se analizó el perfil proinflamatorio de los cerdos inmunizados con los péptidos. Se evaluó por medio de la concentración de TNF- α , IL1- β , IL-8 e IFN- α (Fig. 3). El resultado mostró un aumento del TNF- α y la IL1- β (Fig. 3, A y B), lo que sugiere que el PTC2 induce un estado proinflamatorio a los 2 DPI. Respecto a esto último, estudios

similares en los que se utilizaron péptidos derivados del PRRSV y proteínas transportadoras como vehículo, mostraron un aumento del TNF- α , que es una citocina relacionada con una potenciación de la respuesta inmunitaria Th1 (Chen *et al.*, 2013). También se ha reportado que la adición de proteínas transportadoras a los péptidos como las proteínas de mayor peso molecular son una estrategia eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria a los antígenos de la vacuna (Chen *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se realizó la medición de citocinas a las 48 h porque informes reportados previamente por otros autores muestran un aumento que durante las 24 y 48 h postratamiento, esto es una ventana de exposición donde se puede observar el pico del incremento de citocinas. Se observó un aumento de citocinas proinflamatorias y vías de señalización relacionadas con la activación de células T (Marsman *et al.*, 2020; Somasundaram *et al.*, 1999). Transcurrido este tiempo, en los reportes se observa que disminuyen paulatinamente las vías de señalización como lo es la vía STAT, relacionada con el fenotipo Th1 (Marsman *et al.*, 2020). El grupo de Arunachalam *et al.* (2023) ha descrito que después de 7 días de vacunación con la vacuna BNT162b2 de Pfizer-BioNTech, las quimiocinas y citocinas como CXCL10, IL-6, IFN- α e IFN- γ , volvieron a niveles normales (Arunachalam *et al.*, 2021; C. Li, Lee, *et al.*, 2022).

Relacionado con lo anterior, la inmunización con PTC2 tras 2 DPI se correlacionó con una mayor concentración sérica de citocinas relacionadas con la respuesta inmunológica celular Th1 y Th2 (Fig. 4). Concretamente, la mayor concentración de IFN- γ e IL-12 está relacionada con la activación de linfocitos ayudantes de linaje Th1 (Mountford *et al.*, 1999); mientras que la mayor concentración de IL-4 e IL-6 sugiere la estimulación de linfocitos Th2 (Heijink *et al.*, n.d.; Rincón *et al.*, 1997).

En el presente estudio se muestra que se promovió la activación de la inmunidad celular relacionada con los linfocitos de tipo Th1 y Th2. Esta misma respuesta se ha observado en la inmunización con SARS-CoV-2 en un modelo murino (Chung *et al.*, 2022). Las respuestas inmunitarias relacionadas con Th1/Th2 a través de la secreción de sus citocinas predominantes como IFN- γ e IL-4 que pudieran conferir protección porque inducen potentemente la actividad citolítica de los CD8+ y activa células B (Chung *et al.*, 2022). La activación de la diferenciación de los linfocitos Th1/Th2 podría favorecer la

reducción de la carga viral y también podría prevenir significativamente la pérdida de peso corporal, como se observó previamente con las vacunas de SARS-CoV-2. Además, la posible secreción de anticuerpos neutralizantes se vería favorecida con la activación de Th1 y Th2 (Chung *et al.*, 2022). En nuestro trabajo no se analizó el papel de los anticuerpos neutralizantes, pero en el futuro se investigará para determinar su capacidad de reconocer y neutralizar el virus del PRRSV.

En general, por parte de la respuesta de secreción de citocinas se puede mencionar que PTC2 induce un perfil inmunomodulador de citocinas proinflamatorias T cooperadores Th1/Th2, mientras que PTC1 ceba linfocitos (probablemente CTL) con un efecto citotóxico sobre las células infectadas por el PRRSV.

La respuesta de las células CTL se ha estudiado previamente por otros autores utilizando péptidos derivados del PRRSV tipo 1 y altamente patógeno (HP) (Liang *et al.*, 2021; Mokhtar *et al.*, 2016). En estos trabajos, los cerdos inmunizados con péptidos de las proteínas NSP2 y M aumentan la actividad de los CTL's que particularmente producen IFN- γ (Liang *et al.*, 2021) y sugieren que esta respuesta podría ser suficiente para proteger frente a la enfermedad por PRRSV, incluso en ausencia de anticuerpos neutralizantes (Mokhtar *et al.*, 2016). Además, se ha sugerido que los péptidos capaces de inducir CTL's podrían ser necesarios para una inmunidad óptima contra el PRRSV (Liao *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2011)

En el presente trabajo, se evaluó la población de linfocitos citotóxicos (CTL's) en cerdos inmunizados con los péptidos PTC1 y PTC2 a los 42 DPI. Donde se observó que ambos péptidos indujeron un aumento significativo de células CD8+. Anteriormente, en un modelo de ratón, observamos un aumento de la población de CTL (CD8+) tras la inmunización con PTC1 (datos no publicados) (Perez-Duran, 2020b). Este resultado se confirma en el presente estudio, en el que observamos un aumento de la población de linfocitos citotóxicos totales (CD8+) con ambos grupos, PTC1 y PTC2, en comparación con el grupo control y vehículo (Fig. 5). El aumento de linfocitos citotóxicos totales en el grupo vehículo (BSA proteína) está bien caracterizado para el adyuvante hidróxido de aluminio (alhidrogel), ya que este puede modular la respuesta de los linfocitos T mediante el aumento del receptor del inflammasoma (NLRP3); así como, por otras vías

independientes de la proteína 3 del inflamasoma. Estas vías promueven la secreción de altos niveles de factores proinflamatorios a través de las células presentadoras de antígenos que actúan directa o indirectamente sobre las células B y T (He *et al.*, 2015). Además, las sales de aluminio aumentan la población de células citotóxicas activadas (Sheikh *et al.*, 1999), promueven la presentación cruzada de antígenos de células dendríticas (DC) *in vitro* y mejoran la actividad citolítica de los CTL (Sheikh *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2020).

Respecto a esto, se evaluó el fenotipo de activación de las células T CD8+ (CD8+/CD44+) a los 42 DPI. No hubo diferencias significativas en los perfiles de activación de la población CD8+, a pesar de la mayor población observada en los grupos inmunizados.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Franzoni *et al.* (2013), donde, se evidencia que es necesario un desafío viral para observar una diferencia en la activación de células CD8+ activadas (CD8+/CD44+). También se reportó en el mismo estudio que solo el grupo inmunizado con una vacuna atenuada contra el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y desafiado con una cepa virulenta mostró un perfil de activación CD8+ y mostró el pico más alto más alto de células activadas tras 56 días de inmunización (Franzoni *et al.*, 2013). Este resultado sugiere que los CD8+ cebados podrían activarse por la presencia del antígeno vírico *in vitro* o *in vivo* tras una correcta estimulación en los cerdos inmunizados.

La población de células CD8+ mostró un aumento significativamente mayor en los cerdos inmunizados con los péptidos PTC1 y PTC2; por lo tanto, se decidió explorar su actividad citotóxica *in vitro* para confirmar que los péptidos podían cebar linfocitos en condiciones aisladas de experimentación. Para esto, los ensayos de co-cultivo de citólisis *in vitro* se realizaron basándose en un ensayo previamente descrito (Mendieta *et al.*, 2018). Los linfocitos aislados de cerdos inmunizados mostraron una mayor actividad citotóxica cuando se co-cultivaron con células infectadas por el PRRSV y se estimularon previamente con PHA (Figura 5), lo que indica que PTC1 y PTC2 pueden cebar a las células CD8+ tras la inmunización. Es bien sabido que la PHA puede inducir la activación y proliferación de linfocitos a través de la reticulación de glicoproteínas en la superficie celular (Chilson *et al.*, 1984; Siedlik *et al.*, 2017). La PHA puede activar los linfocitos T

porque se une al complejo TCR/CD3 imitando todos los eventos de activación intracelular, de forma similar al mecanismo desencadenado por los anticuerpos anti-CD3 (Movafagh *et al.*, 2011).

La actividad relacionada con las células CTL específicas se ha catalogado como un correlato prometedor de la protección vacunal. Por ejemplo, Y. Li *et al.* (2023) demostraron que los CTL cebados mejoran la protección frente al PRRSV tipo 1 en un contexto de infección transplacentaria, reduciendo la carga viral en los animales infectados.

En conjunto, los datos mostrados en el presente trabajo, sugieren que ambos péptidos pueden ser eficaces para inducir una respuesta inmunitaria de tipo celular. Por una parte, el péptido PTC2 desencadenó una reacción de citocinas característica de una respuesta coordinada Th1/Th2, mientras que el péptido PTC1 promovió la actividad citolítica. Quedan por dilucidar los mecanismos por los que PTC1 y PTC2 inducen dicha respuesta inmune celular.

X. CONCLUSIÓN

Los péptidos PTC1 y PTC2 inducen una respuesta de células T y un perfil proinflamatorio en cerdos inmunizados contra el PRRSV, lo que sugiere una respuesta inmune robusta y eficiente debido a la presencia de epítomos T en sus secuencias.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, E. C., & Dejenie, T. A. (2023). Protective roles and protective mechanisms of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 infection and their potential clinical implications. *Frontiers in Immunology*, 14, 1055457.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1055457>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, Alejandro A. Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). “*Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*” (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 80(8), 3994–4004. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3994-4004.2006>
- Apter, C. H. (2021). P O R C I N E R E P R O D U C T I V E A N D R E S P I R A T O R Y SYNDROME (I N F E C T I O N W I T H P O R C I N E R E P R O D U C T I V E A N D R E S P I R A T O R Y SYNDROME VIRUS). *WOAH Terrestrial Manual*, 1–21.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.06_PRRS.pdf
- Arunachalam, P. S., Scott, M. K. D., Hagan, T., Li, C., Feng, Y., Wimmers, F., Grigoryan, L., Trisal, M., Edara, V. V., & Lai, L. (2021). Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans. *Nature*, 596(7872), 410–416.
- Assavacheep, P., & Thanawongnuwech, R. (2022). Porcine respiratory disease complex: Dynamics of polymicrobial infections and management strategies after the introduction of the African swine fever . In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 9).
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.1048861>
- BD Technical Protoco. (2015). Freezing and Thawing of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Preparation of Working Reagents. *BD Biosciences*, October.
- Benfield, D. A., Nelson, E., Collins, J. E., Harris, L., Goyal, S. M., Robison, D.,

- Christianson, W. T., Morrison, R. B., Gorcyca, D., & Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 127–133.
- Bohórquez, J. A., Defaus, S., Rosell, R., Pérez-Simó, M., Alberch, M., Gladue, D. P., Borca, M. V, Andreu, D., & Ganges, L. (2021). Development of a Dendrimeric Peptide-Based Approach for the Differentiation of Animals Vaccinated with FlagT4G against Classical Swine Fever from Infected Pigs. *Viruses*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/v13101980>
- Brinton, M. A., & Snijder, E. J. (2008). Arteriviruses. In B. W. J. Mahy & M. H. V Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (Third Edit, pp. 176–186). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00537-9](https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00537-9)
- Brockmeier, S., Halbur, P., & Thacker, E. (2002). Porcine Respiratory Disease Complex. In E. Brogden KA, Guthmiller JM (Ed.), *Polymicrobial Diseases*. ASM Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>
- Calderon-Rico, F., Bravo-Patiño, A., Mendieta, I., Perez-Duran, F., Zamora-Aviles, A. G., Franco-Correa, L. E., Ortega-Flores, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2024). Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/v16010014>
- Cao, Q. M., Tian, D., Heffron, C. L., Subramaniam, S., Opriessnig, T., Foss, D. L., Calvert, J. G., & Meng, X.-J. (2019). Cytotoxic T lymphocyte epitopes identified from a contemporary strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhance CD4+CD8+ T, CD8+ T, and $\gamma\delta$ T cell responses. *Virology*, 538, 35–44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.09.006](https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.09.006)
- Chen, C., Li, J., Bi, Y., Yang, L., Meng, S., Zhou, Y., Jia, X., Meng, S., Sun, L., & Liu, W. (2013). Synthetic B- and T-cell epitope peptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with Gp96 as adjuvant induced humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 31(14), 1838–1847.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.049>

Chilson, O. P., Boylston, A. W., & Crumpton, M. J. (1984). Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *The EMBO Journal*, 3(13), 3239–3245. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02285.x>

Chung, N. H., Chen, Y. C., Yang, S. J., Lin, Y. C., Dou, H. Y., Hui-Ching Wang, L., Liao, C. L., & Chow, Y. H. (2022). Induction of Th1 and Th2 in the protection against SARS-CoV-2 through mucosal delivery of an adenovirus vaccine expressing an engineered spike protein. *Vaccine*, 40(4), 574–586. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.12.024>

Cox, R. (2013). Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(2), 405–408. <https://doi.org/10.4161/hv.22908>

Crisci, E., Fraile, L., & Montoya, M. (2019). Cellular innate immunity against PRRSV and swine influenza viruses. *Veterinary Sciences*, 6(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/VETSCI6010026>

de Aluja, A. S., Villalobos, N. M., Nava, G., Toledo, A., Martínez, J. J., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Fragoso, G., & Sciutto, E. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*, 23(31), 4062–4069. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.076>

Dhakal, S., Cheng, X., Salcido, J., Renu, S., Bondra, K., Lakshmanappa, Y. S., Misch, C., Ghimire, S., Feliciano-Ruiz, N., Hogshead, B., Krakowka, S., Carson, K., McDonough, J., Lee, C. W., & Renukaradhya, G. J. (2018). Liposomal nanoparticle-based conserved peptide influenza vaccine and monosodium urate crystal adjuvant elicit protective immune response in pigs. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6699–6715. <https://doi.org/10.2147/IJN.S178809>

Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., & Mateu, E.

- (2009). In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 27(41), 5603–5611. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.029>
- Duong, V. T., Koirala, P., Chen, S.-P. R., Monteiro, M. J., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2023). Multiepitope Subunit Peptide-Based Nanovaccine against Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Elicited High Antibody Titers in Vaccinated Mice. *Molecules*, 28(5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052248>
- Fang, Y., & Snijder, E. J. (2010). The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Research*, 154(1–2), 61–76.
- Franzoni, G., Kurkure, N. V., Edgar, D. S., Everett, H. E., Gerner, W., Bodman-Smith, K. B., Crooke, H. R., & Grahama, S. P. (2013). Assessment of the phenotype and functionality of porcine cd8 t cell responses following vaccination with live attenuated classical swine fever virus (CSFV) and virulent CSFV challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1604–1616. <https://doi.org/10.1128/CVI.00415-13>
- Goldblatt, D., Alter, G., Crotty, S., & Plotkin, S. A. (2022). Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunological Reviews*, 310(1), 6–26. <https://doi.org/10.1111/imr.13091>
- He, P., Zou, Y., & Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 11, Issue 2, pp. 477–488). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
- Health, S., & States, U. (2016). Swine Health Information Center - Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*.
- Heijink, I. H., Vellenga, E., Borger, P., Postma, D. S., De Monchy, J. G. R., & Kauffman, H. F. (n.d.). *Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5*

by interleukin-2-dependent and-independent mechanisms in freshly isolated human T cells.

Hilchie, A. L., Hoskin, D. W., & Power Coombs, M. R. (2019). Anticancer activities of natural and synthetic peptides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117, 131–147. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_9

Hosseinalizadeh, H., Rabiee, F., Eghbalifard, N., Rajabi, H., Klionsky, D. J., & Rezaee, A. (2023). Regulating the regulatory T cells as cell therapies in autoimmunity and cancer. *Frontiers in Medicine*, 10(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1244298>

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, *et al.* (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, T Cell-Mediated Immunity*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10762/>

Jiang, Y., Li, G., Yu, L., Li, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Tong, W., Liu, C., Gao, F., & Tong, G. (2020). Genetic Diversity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) From 1996 to 2017 in China. *Frontiers in Microbiology*, 11(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00618>

Jiao, J., & Wu, P. (2024). A meta-analysis on the potency of foot-and-mouth disease vaccines in different animal models. *Scientific Reports*, 14(1), 8931. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59755-4>

Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479–480, 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>

Kvisgaard, L. K., Kristensen, C. S., Ryt-Hansen, P., Pedersen, K., Stadejek, T., Trebbien, R., Andresen, L. O., & Larsen, L. E. (2020). A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(5), 1786–1796. <https://doi.org/10.1111/tbed.13555>

Li, C., Lee, A., Grigoryan, L., Arunachalam, P. S., Scott, M. K. D., Trisal, M., Wimmers,

- F., Sanyal, M., Weidenbacher, P. A., Feng, Y., Adamska, J. Z., Valore, E., Wang, Y., Verma, R., Reis, N., Dunham, D., O'Hara, R., Park, H., Luo, W., ... Pulendran, B. (2022). Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. *Nature Immunology*, 23(4), 543–555. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01163-9>
- Li, C., Liu, Z., Chen, K., Qian, J., Hu, Y., Fang, S., Sun, Z., Zhang, C., Huang, L., Zhang, J., & Huang, N. (2022). Efficacy of the Synergy Between Live-Attenuated and Inactivated PRRSV Vaccines Against a NADC30-Like Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in 4-Week Piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.812040>
- Li, J., & Murtaugh, M. P. (2012). Dissociation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralization from antibodies specific to major envelope protein surface epitopes. *Virology*, 433(2), 367–376.
- Liang, C., Xia, Q., Zhou, J., Liu, H., Chen, Y., Liu, Y., Ding, P., Qi, Y., & Wang, A. (2021). Identification of potential SLA-I-restricted CTL epitopes within the M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109131>
- Liao, Y.-C., Lin, H.-H., Lin, C.-H., & Chung, W.-B. (2013). Identification of cytotoxic T lymphocyte epitopes on swine viruses: multi-epitope design for universal T cell vaccine. *PLoS One*, 8(12), e84443.
- López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1), 69–89.
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>

Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., & Dea, S. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 58(1), 55–64.

Marsman, C., Jorritsma, T., Ten Brinke, A., & van Ham, S. M. (2020). Flow Cytometric Methods for the Detection of Intracellular Signaling Proteins and Transcription Factors Reveal Heterogeneity in Differentiating Human B Cell Subsets. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122633>

Martín-Valls, G. E., Cortey, M., Allepuz, A., Illas, F., Tello, M., & Mateu, E. (2023). Introduction of a PRRSV-1 strain of increased virulence in a pig production structure in Spain: virus evolution and impact on production. *Porcine Health Management*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00298-3>

McMahan, K., Yu, J., Mercado, N. B., Loos, C., Tostanoski, L. H., Chandrashekar, A., Liu, J., Peter, L., Atyeo, C., Zhu, A., Bondzie, E. A., Dagotto, G., Gebre, M. S., Jacob-Dolan, C., Li, Z., Nampanya, F., Patel, S., Pessaint, L., Van Ry, A., ... Barouch, D. H. (2021). Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 590(7847), 630–634. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>

Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Pérez-Sánchez, G., Pavón, L., Rodríguez-Cruz, A., García-Alcocer, G., & Berumen, L. C. (2018). Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocrine Connections*, 7(5), 791–802. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0145>

Mokhtar, H., Pedrera, M., Frossard, J. P., Biffar, L., Hammer, S. E., Kvisgaard, L. K., Larsen, L. E., Stewart, G. R., Somavarapu, S., Steinbach, F., & Graham, S. P. (2016). The non-structural protein 5 and matrix protein are antigenic targets of T cell immunity to genotype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Frontiers in Immunology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00040>

Montaner-Tarbes, S., Del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key Gaps in

- the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
- Mountford, A. P., Coulson, P. S., Cheever, A. W., Sher, A., Wilson, R. A., & Wynn, T. A. (1999). Interleukin-12 can directly induce T-helper 1 responses in interferon- γ (IFN- γ) receptor-deficient mice, but requires IFN- γ signalling to downregulate T-helper 2 responses. In *Immunology*.
- Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S. A., & Azargashb, E. (2011). The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 10(4), 895–903.
- Mulligan, M. K., Kleiman, J. E., Caldemeyer, A. C., Harding, J. C. S., & Pasternak, J. A. (2022). Porcine reproductive and respiratory virus 2 infection of the fetus results in multi-organ cell cycle suppression. *Veterinary Research*, 53(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01030-3>
- Núñez-Anita, R. E., Calderón-Rico, F., Pérez-Duran, F., Arenas-Arrocena, M. C., Zamora-Avilés, A. G., Franco-Correa, L. E., Bravo-Patiño, A., & Hernández-Morales, I. (2023). Response of lymphocytes from pigs naturally infected with porcine respiratory disease complex at 3 different stages of development. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 87(2), 110–119.
- Pan, X., Zhang, N., Wei, X., Jiang, Y., Chen, R., Li, Q., Liang, R., Zhang, L., Ma, L., & Xia, C. (2020). Illumination of PRRSV Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes by the Three-Dimensional Structure and Peptidome of Swine Lymphocyte Antigen Class I (SLA-I). *Frontiers in Immunology*, 10(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02995>
- Perez-Duran, F. (2020a). *Evaluación de la respuesta inmune contra subunidades proteicas del virus PRRS en un modelo murino* [UMSNH]. https://doi.org/http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1974

- Perez-Duran, F. (2020b). *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO*.
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1974
- Petrini, S., Ramadori, G., Villa, R., Borghetti, P., de Angelis, E., Cantoni, A., Corradi, A., Amici, A., & Ferrari, M. (2013). Evaluation of Different DNA Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) in Pigs. *Vaccines*, 1(4), 463–480. <https://doi.org/10.3390/vaccines1040463>
- Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, 47(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>
- Piña Díaz, M. (2021). *Estudio de la respuesta inmune adaptativa celular a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino* [Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
https://doi.org/http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/6400
- Renukaradhya, G. J., Meng, X. J., Calvert, J. G., Roof, M., & Lager, K. M. (2015). Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine*, 33(27), 3065–3072. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.102>
- Rezaei, M., & Nazari, M. (2022). New Generation Vaccines for COVID-19 Based on Peptide, Viral Vector, Artificial Antigen Presenting Cell, DNA or mRNA. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 14(1), 30–36.
<https://doi.org/10.18502/ajmb.v14i1.8167>
- Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2007). Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 529–536.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.11.002>
- Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-

- 6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4 T Cells. In *J. Exp. Med* (Vol. 185, Issue 3).
- Rout, P., Caminero, F., Iqbal, Z., & Tadi, P. (2023). Histology, Cytotoxic T Cells. In *In StatPearls*. StatPearls. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644705/>
- Rowland, R. R. R. (2010). The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Research*, 154(1–2), 114–122.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.001>
- Sakowska, J., Arcimowicz, Ł., Jankowiak, M., Papak, I., Markiewicz, A., Dziubek, K., Kurkowiak, M., Kote, S., Kaźmierczak-Siedlecka, K., Połom, K., Marek-Trzonkowska, N., & Trzonkowski, P. (2022). Autoimmunity and Cancer—Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.793234>
- Sheikh, N. A., Rajanathanan, P., Attard, G. S., & Morrow, W. J. W. (1999). Generation of antigen specific CD8+ cytotoxic T cells following immunization with soluble protein formulated with novel glycoside adjuvants. *Vaccine*, 17(23–24), 2974–2982.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00173-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00173-5)
- Siedlik, J. A., Deckert, J. A., Benedict, S. H., Bhatta, A., Dunbar, A. J., Vardiman, J. P., & Gallagher, P. M. (2017). T cell activation and proliferation following acute exercise in human subjects is altered by storage conditions and mitogen selection. *Journal of Immunological Methods*, 446, 7–14.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.03.017>
- Somasundaram, C., Takamatsu, H., Aoni, C. A., Audonnet, J.-C., Fischer, L., Lefeuvre, F., & Charley, B. (1999). Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70, 277–287.
- Spetz, J., Presser, A. G., & Sarosiek, K. A. (2019). T Cells and Regulated Cell Death: Kill or Be Killed. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 342, 27–71.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.07.004>

- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). (2020). *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*. Arteriviridae (Taxid:76803).
<https://viralzone.expasy.org/28>
- Tondini, E., Reintjens, N. R. M., Castello, G., Arakelian, T., Isendoorn, M., Camps, M., Vree, J., van der Marel, G. A., Filippov, D. V, Codee, J. D. C., & Ossendorp, F. (2022). Lipid A analog CRX-527 conjugated to synthetic peptides enhances vaccination efficacy and tumor control. *Npj Vaccines*, 7(1), 64.
<https://doi.org/10.1038/s41541-022-00484-y>
- TopuzoĞullari, M., Acar, T., Pelit Arayici, P., UÇar, B., UĞurel, E., Abamor, E. Ş., ArasoĞlu, T., Turgut-Balik, D., & Derman, S. (2020). An insight into the epitope-based peptide vaccine design strategy and studies against COVID-19. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi*, 44(3), 215–227.
<https://doi.org/10.3906/biy-2006-1>
- Vanhee, M., Van Breedam, W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., & Nauwynck, H. (2011). Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine*, 29(29), 4794–4804.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.071>
- Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
- Wang, J., Lin, S., Quan, D., Wang, H., Huang, J., Wang, Y., Ren, T., Ouyang, K., Chen, Y., Huang, W., Luo, T., & Wei, Z. (2020). Full Genomic Analysis of New Variants of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Revealed Multiple Recombination Events Between Different Lineages and Sublineages. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00603>
- Wei, X., Luo, M., & Wei, Y. (2020). ALHYDROGEL - SODIUM CHLORIDE COMPOUND IMMUNOLOGIC ADJUVANT , PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(United States Patent : 5861366) (US 10,869,922 B2). In *New York* (US 10,869,922 B2).

Welner, S., Nielsen, M., Rasmussen, M., Buus, S., Jungersen, G., & Larsen, L. E. (2017). Prediction and in vitro verification of potential CTL epitopes conserved among PRRSV-2 strains. *Immunogenetics*, 69(10), 689–702.
<https://doi.org/10.1007/s00251-017-1004-8>

Westmeier, J., Paniskaki, K., Karaköse, Z., Werner, T., Sutter, K., Dolff, S., Overbeck, M., Limmer, A., Liu, J., Zheng, X., Brenner, T., Berger, M. M., Witzke, O., Trilling, M., Lu, M., Yang, D., Babel, N., Westhoff, T., Dittmer, U., & Zelinskyy, G. (2020). Impaired Cytotoxic CD8(+) T Cell Response in Elderly COVID-19 Patients. *MBio*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02243-20>

Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., & Kozdruń, W. (2012). Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy ducks by real-time polymerase chain reaction: correlation between age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses. *BMC Veterinary Research*, 8(05), 0–10.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-29>

Yang, H., & M. Binns, R. (1993). CD44 Is involved in porcine natural cytotoxicity. *Cellular Immunology*, 149(149), 227–236. <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1150>

Zhang, W., Lin, Y., Bai, Y., Tong, T., Wang, Q., Liu, N., Liu, G., Xiao, Y., Yang, T., & Bu, Z. (2011). Identification of CD8+ cytotoxic T lymphocyte epitopes from porcine reproductive and respiratory syndrome virus matrix protein in BALB/c mice. *Virology Journal*, 8(1), 1–9.

Zhou, C., Lu, R., Lin, G., & Yao, Z. (2011). The latest developments in synthetic peptides with immunoregulatory activities. *Peptides*, 32(2), 408–414.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.019>

ANEXO 1.



Article

Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Fernando Calderon-Rico ¹, Alejandro Bravo-Patiño ¹, Irasema Mendieta ², Francisco Perez-Duran ¹, Alicia Gabriela Zamora-Aviles ¹, Luis Enrique Franco-Correa ¹, Roberto Ortega-Flores ¹, Ilane Hernandez-Morales ³ and Rosa Elvira Nuñez-Anita ^{1,*}

- ¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Km. 9.5 S/N carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarimbaro PC 58893, Mexico; 1028153g@umich.mx (F.C.-R.); alejandro.bravo@umich.mx (A.B.-P.); 0618713g@umich.mx (F.P.-D.); 1106849c@umich.mx (A.G.Z.-A.); 1837980k@umich.mx (L.E.F.-C.); 0840020c@umich.mx (R.O.-F.)
- ² Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro PC 76010, Mexico; alicia.mendieta@uaq.mx
- ³ Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Leon, Universidad Nacional Autónoma de México, Biv. UNAM No. 2011, Leon PC 37684, Guanajuato, Mexico; ihernandez@enes.unam.mx
- * Correspondence: rosa.anita@umich.mx; Tel.: +52-443-146-4030



Citation: Calderon-Rico, F.; Bravo-Patiño, A.; Mendieta, I.; Perez-Duran, F.; Zamora-Aviles, A.G.; Franco-Correa, L.E.; Ortega-Flores, R.; Hernandez-Morales, I.; Nuñez-Anita, R.E. Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses* **2024**, *16*, 14. <https://doi.org/10.3390/v16010014>

Academic Editor: Douglas Gladue

Received: 22 November 2023

Revised: 12 December 2023

Accepted: 14 December 2023

Published: 21 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We analyzed the T-cell responses induced by lineal epitopes of glycoprotein 5 (GP5) from PRRSV to explore the role of this protein in the immunological protection mediated by T-cells. The GP5 peptides were conjugated with a carrier protein for primary immunization and booster doses. Twenty-one-day-old pigs were allocated into four groups (seven pigs per group): control (PBS), vehicle (carrier), PTC1, and PTC2. Cytokine levels were measured at 2 days post-immunization (DPI) from serum samples. Cytotoxic T-lymphocytes (CTLs, CD8+) from peripheral blood were quantified via flow cytometry at 42 DPI. The cytotoxicity was evaluated by co-culturing primed lymphocytes with PRRSV derived from an infectious clone. The PTC2 peptide increased the serum concentrations of pro-inflammatory cytokines (i.e., TNF- α , IL-1 β , IL-8) and cytokines that activate the adaptive cellular immunity associated with T-lymphocytes (i.e., IL-4, IL-6, IL-10, and IL-12). The concentration of CTLs (CD8+) was significantly higher in groups immunized with the peptides, which suggests a proliferative response in this cell population. Primed CTLs from immunized pigs showed cytolytic activity in PRRSV-infected cells in vitro. PTC1 and PTC2 peptides induced a protective T-cell-mediated response in pigs immunized against PRRSV, due to the presence of T epitopes in their sequences.

Keywords: PRRS; pig virus; T-cells; CD8+; GP5; epitopes

1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most devastating viruses in the pork industry worldwide [1–3]. PRRSV belongs to the family *Arteriviridae* in the order *Nidovirales*. It is an enveloped single-stranded positive-sense RNA virus [4,5]. The PRRSV genome is polycistronic [6], of approximately 14.9 kb to 15.5 kb in length. It contains at least 10 open reading frames (ORFs) [7,8], namely, ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6, and ORF7 [9].

Currently, there are two main PRRSV genotypes: type 1, or the European genotype (PRRSV EU-type), also known as the Lelystad virus (LV); and type 2, known as the American genotype (NA-type), also called VR-2332 [4,10]. In 2006, a new genotype emerged: the highly pathogenic PRRSV (HP-PRRSV), originating from PRRSV type 2 [11]. During the HP-PRRSV outbreak in China, HP-PRRSV caused over 400,000 deaths and affected 2 million

pigs [3,11]. HP-PRRSV causes severe lung injury, characterized by extensive hemorrhage, inflammatory cells, and serous fluid infiltration in the lungs' vascular system [12].

Particularly, PRRSV type 2 causes severe reproductive impairment in sows and respiratory pathologies in pigs of all ages [11]. PRRSV is frequently related to the porcine respiratory disease complex (PRDC), which is promoted by poor sanitary practices, stressful environments, and opportunistic viruses and bacteria [13,14].

In 2013, worldwide PRRSV-related economic losses were estimated at USD 664 million [15,16]. Current estimations indicate losses of USD 2.5 billion in the USA and Europe alone [17,18]. Therefore, the swine industry is highly affected by PRRSV worldwide.

Vaccination strategies can control the spread of PRRSV because they reduce the viral load in blood [19] and reduce tissue damage in target organs, such as the alveoli. Hence, viral load reduction is an important correlate of vaccine protection [19]. Vaccination, however, does not induce sterilizing immunity. Therefore, viral transmission still occurs [18].

Commercial PRRS-modified live virus (MLV) vaccines are the most widely used strategy for disease control, but they provide partial or no protection against heterologous viruses [19–21]. Other commercial vaccines include inactivated virus vaccines or strain-specific vaccines (i.e., autologous vaccines manufactured with virus isolated from the same farm) [22,23]. The current vaccines fail to provide effective protection because PRRSV possesses several evasion strategies and high antigenic heterogeneity [24].

Vaccine efficacy is improved by adjuvants, which is the reason for developing novel adjuvants [25]. The most common adjuvants are aluminum salts (commercially known as Alhydrogel®), which are widely used because they have been approved by the FDA based on their safety and efficacy [26].

New-generation vaccines use subunits, synthetic or recombinant proteins, and DNA or RNA [27]. For PRRSV, the vaccines in development include subunit vaccines and virus-vectored vaccines [28]. Nevertheless, more research is needed to improve the effectiveness of PRRSV vaccine candidates against heterologous strains [29]. For instance, studies have confirmed that GP5 peptides induce specific antibodies but do not correlate with antibody-mediated neutralization [30,31]. Therefore, GP5 is an interesting target for vaccine development.

The first studies using vaccines based on baculovirus-expressed GP3, GP5, and N subunits did not show the induction of IFN-producing cells. The GP3 and GP5 subunits showed 50 to 68% protection against PRRSV, whereas the N protein did not. In general, these types of vaccines show similar results compared to the commercial inactivated vaccines. Based on this, it could be considered that protein subunit vaccines are not effective against PRRSV [29]. Antibody titers are the classical correlates of protection for PRRSV vaccine candidates. In this context, GP5-derived peptides have been studied as neutralization epitopes, particularly linear peptides [32]. Peptides can bind to MHC and activate the immune system [33]; they are also capable of activating dendritic cells (DCs), promoting DC maturation and T-cell activation *in vitro*, stimulating DC migration, and the priming of functional T-cells *in vivo* [34].

The evaluation of the protective response provided by cellular immunity is not commonly used as a correlate of protection. Therefore, the efficacy of the cellular immunity mediated by cytotoxic lymphocytes (CTLs) is poorly understood. This cellular immunity has been recently explored for vaccine candidates against SARS-CoV-2 and influenza viruses [35–37].

For PRRSV, epitopes identified from a contemporary PRRSV strain exhibited high immunostimulatory activity that improved the cellular responses mediated by CD4+ helper T-lymphocytes and CD8+ cytotoxic T-lymphocytes [38]. Peptides with the potential to stimulate cytotoxic cells are conserved among PRRSV type 2 strains [39]. In this regard, cytotoxic T-lymphocytes are key effector cells because they can induce the apoptosis of PRRSV-infected cells [39]. This information supports the hypothesis that GP5-derived peptides, containing putative T epitopes, may induce a cytotoxic T-cells response against PRRSV [40].

Consequently, the objective of this study was to demonstrate the contribution of CTL to the protective immunity induced by a peptide derived from GP5 of PRRSV, as has been demonstrated for other viruses such as SARS-CoV-2 and influenza [35–37].

2. Materials and Methods

2.1. Peptides

The peptides were named PTC1 and PTC2 and are derived from the GP5 sequence of PRRSV type 2. The PTC1 peptide was previously identified in our work group. The antigenicity of PTC1 was determined via bioinformatic analysis (Immunoepitope Data base IEDB and CCL Main Workbench 20.0). In contrast, the PTC2 peptide contains two epitopes together reported by Vashit et al., 2008 [40]. Moreover, PTC1 was chosen due to its high degree of conservation (over 80% homology) among the different genotypes reported in the database.

Both peptide sequences match the endodomain of GP5, corresponding to residues 117 to 163. The peptides were chemically synthesized by solid-phase synthesis by GenScript (Piscataway, NJ, USA). PTC1, RLYRWRSVPVIGHLIDLKRVVRVSAEQWGRP (30 aa) and PTC2, KGRLYRWRSVPVIVEKLAALICFVIRLAKN (29 aa), showed 95 and 98% purity, respectively. To bind peptides with a carrier protein, we included a cysteine at the terminal carboxyl end. Both peptides were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) and adjusted to a concentration of 1 mg/mL of a stock solution. The peptides were used at a concentration of 4 g/mL for the detection of specific antibodies and immunoreactivity assays.

We compared the sequences of PTC1 and PTC2 with the sequences reported for PRRSV type 1, 2, and high pathogenic strains in the Protein BLAST program. The results show a Query Cover for PTC1 of 100% for PRRSV type 1, 96–100% for PRRSV type 2, and 93–100% for HP-PRRSV. PTC2 showed a Query Cover of 100% for the three genotypes. These results suggest that the sequences are conserved [41].

2.2. Animal studies

Experimental Design, Animals, and Housing

The pigs originated from a certified farm (Good Livestock Practices or BLP) where the animals were regularly tested and found to be negative for PCV2 and PRRSV. We selected randomly twenty-one-day-old, weaned piglets from six litters without distinguishing their sex. The piglets were a crossbreed of Large White and Pietrain. They were all subjected to a standard preventive medicine plan, which included iron supplementation (iron zinc) and vaccinations. The vaccinations included *Coccidia* (Coxizuril 5%, 20 mg/Kg orally, Lapisa, Mexico) administered 3 days after birth, *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV 2 (Combiflex 2.0 mL IM) administered at 3 days and 19 days after birth, and swine influenza (Porcimine influenza 2.0 mL IM Lapisa, Mexico) administered at 21 days old.

At the age of 21 days, we transferred 28 piglets to a separate experimental stockyard measuring $>33.6 \text{ m}^2$. Each piglet was ear-tagged and randomly assigned to one of two groups, with 14 individuals in each group. To determine the assignment, we used the GraphPad-Random number generator online tool, which randomly distributed the animals into four groups of seven individuals each.

On day zero of the experiment, the animals were inoculated based on their assigned group. The control group received 800 μL of PBS ($N = 7$), the vehicle group received a preparation of 400 μL of PBS and 400 μL of aluminum hydroxide (adjuvant) ($N = 7$), the PTC1 group received a preparation containing PTC1 ($N = 7$), and the PTC2 group received a preparation containing PTC2 ($N = 7$). The inoculation preparation for the peptides consisted of 200 μg of peptide PTC1 or PTC2 (1 mg/mL), 200 μg maleimide [1 mg/mL] (ThermoFisher Maleide Activated BSA), conjugated according to manufacturer specifications, and 400 μL adjuvant alhydrogel (InvivoGen, San Diego, CA, USA) with a final volume of 800 μL . The piglets were immunized intramuscularly by attaching their legs. Hereafter, the control and vehicle groups will be referred to as the control groups.

We visually examined the pigs daily and weighed them weekly. The bedding was cleaned daily, and the piglets had ad libitum access to drinking water and were fed a commercial diet (Folechon phase 1, Vitalechon phase 1, phase 2, phase 3, and Vitalechon initiator Valleys) following the dosages recommended by the manufacturer, using a semi-automatic device (baby pig feeder of 9 pounds). In addition, the stockyards were enriched with play material (suspended chains and bottles). The animals were given a seven-day adaptation period before the start of the experiment. The immunization and blood sampling schedule is shown in (Supplemental Material Figure S1).

Animal housing, handling, animal care, and sampling were conducted under the guidelines of the Animal Care and Use Program (NIH, Washington, DC, USA) and the Official Mexican standard NOM-062-ZOO-1999. The study protocol CICUMSNH-A101-FMVZ was approved by the Institutional Research Ethics Committee (Committee on Animal Research and Ethics of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, from Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo).

2.3. Blood Sampling and Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Blood samples were collected via jugular vein puncture at 2 and 42 days after treatment. The blood was collected with and without EDTA (15 mL per animal) using Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and processed within 3 h of collection.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood using density gradient separation with Lymphoprep™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's standard procedure. Briefly, 15 mL complete blood samples were diluted 1:1 (volume:volume) with Lymphoprep reagent, then centrifuged at $464 \times g$ for 25 min. The interface was collected and transferred to a conical tube, washed two times with 2 mL of PBS, and then centrifuged at $694 \times g$ for 15 min. RBC lysis buffer 1× (Milltenyi) was added and incubated at room temperature for 5 min. Then, washed two times with 2 mL of PBS, and centrifuged at $573 \times g$ during 5 min. The cell pellet was resuspended in 2400 μ L of FBS/DMSO 5% and divided into four cryotubes. The samples were deep-frozen at -80°C until being used for subsequent analyses.

2.4. Cytokine Detection Assay Panel

The cytokine concentration was quantified using the commercial pre-configured immunoassay multiplex Cytokine and Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex™ panel kit (Invitrogen, Vienna, Austria, Cat. EPX090-60829-901), following the manufacturer's protocols (ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay user guide). To that end, we used the Luminex 200 instrument (Austin, TX, USA). The concentration was evaluated in serum samples obtained two days after immunization (2 DPI). The cytokines assessed included IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p40. When the Luminex instrument indicated a concentration "below the limit of detection," the values were reported as zero.

2.5. Cytometric Analysis

Cytometry was conducted using approximately 1×10^6 cells/mL of PBS per sample. The cells were stained and analyzed using the Attune NxT acoustic focusing cytometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), which is equipped with a blue laser (488 nm) and a violet laser (405 nm). The analysis focused on three subpopulations of T-cells: CD3+/CD8+/CD44+, CD8+/CD44−, and CD8−/CD44+. The antibodies used for staining were anti-pig-CD3 ϵ PE-Cy™7 (Becton Dickinson, cat: 561477), anti-pig-CD8 α FITC (Invitrogen, cat: MA5-28714), and anti-pig-CD44 PE (Invitrogen, cat: MA1-19781).

A minimum of 10,000 events in the cells gate were collected for each sample to analyze the individual event packages. A dot plot was generated by comparing forward scatter-A against forward scatter-H, and any doublets were excluded. A linear dot plot of side scatter against linear forward scatter was used to identify the lymphocyte population. Within the lymphocyte population, a subset gating strategy was employed to compare BL1-CD3+

cells against the linear scatter side. Then, another subset quadrant gating was performed to select four subpopulations of T-lymphocytes: CD8[−]/CD44[−] (Q4), CD8⁺/CD44⁺ (Q2), CD8⁺/CD44[−] (Q3), and CD8[−]/CD44⁺ (Q1) (Supplemental Material S2). The results obtained from each subpopulation are presented as a percentage of positive cells.

2.6. In Vitro Assays

Plasmid and Cell Lines

The infectious clone of North American PRRSV type 2 (strain NVSL 97-78950) cloned in the plasmid pFL-12 was generously provided by Dr. Asit K. Pattnaik of the University of Nebraska. The cell line PK-15 Siglec-10⁺ CD163⁺ (PK-15 S10-CD163) was kindly donated by Dr. Hans J. Nauwynck of the University of Ghent. PK-15 S10-CD163 and MARC-145 (ATCC CRL-2378.1) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (P/S; 10,000 U/mL; 10 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), and 0.5% gentamycin (10,000 U/mL; Thermo Fisher Scientific).

2.7. In Vitro Transcription and Virus Recovery

The plasmid pFL-12 containing the full genome of PRRSV type 2 was quantified using the NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Endpoint PCR was performed with the primers previously described by our research group: ORF3 5'-3': forward: GGATGTACCGCACCATTGGAA, reverse: CCTGTCATGCCGAGATTGTG (pb: 187); ORF4 5'-3': forward: AAGGCCACTTGACCAGTGTT, reverse: ATGCTGCCGGTAGTGTGGT (pb: 368); ORF5 5'-3': forward: TGCTCGCGATTCCTTCTTT, reverse: ATGAGAGCTGCTGTTGCTGT (pb: 84); ORF6 5'-3': forward: CCTTGACACAGTCGGTCTGG, reverse: ACGACATCCAGTTCTTCGCA (pb: 140) and ORF7 5'-3': forward: GTTGGCTGCGCAGAAAAGCTG, reverse: GGGCTTCTCCGGGTTTA (pb: 210). Gel electrophoresis was subsequently performed using the complete plasmid and the amplifications of the ORFs to confirm the presence and integrity of the plasmid and PRRSV genome.

Next, the plasmid was linearized with the AclI enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for RNA in vitro transcription, which was carried out using the TranscriptAid T7 High Yield kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, 5 µg of viral RNA was transfected into MARC-145 cells using Lipofectamine 3000™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) as previously described [42]. The infected MARC-145 cells were incubated for two days, after which the cells and supernatant were lysed. A passage was then made into a new MARC-145 culture with DMEM 10% FBS without antibiotics and incubated during for 48 h to allow virus replication. The cells and the supernatant were subsequently lysed, aliquoted, and stored at −80 °C in the original DMEM media supplemented with 20% FBS.

2.8. RNA Extraction, Retro Transcription, Endpoint PCR, and Real-Time PCR Assay for Virus Detection

Viral RNA was extracted from 500 µL of MARC-145 cells infected with PRRSV, as described previously. RNA extraction was carried out using 500 µL of TRIzol™ reagent (Invitrogen Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA), following the user guide for RNA isolation. The RNA pellet was then resuspended in 15 µL of RNase-free water and kept on ice. Reverse transcription was performed using the RevertAid H Minus Reverse Transcriptase™ kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

The viral copies were quantified via qPCR with 11 µL of cDNA and the Syber green™ reagent (Biorad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. The primers used were ORF7 forward 5'-3': GTTGGGTGGCAGAAAAGCTG and reverse 5'-3': GGGCTTCTCCGGGTTTA, 0.5 µL [10 µM], which amplify a product of 210 pb from ORF7.

2.9. Standard Curve for PRRSV Quantification

The qPCR standard curve was performed using the pFL-12 PRRSV plasmid. The concentration of the plasmid was correlated with an estimated viral copy number [43]. Six-fold serial dilutions ranging from 6.4×10^9 to 2.0×10^6 in viral copy number were used to measure viral copies in serum samples and infected cells (Supplemental Material S3).

The calculation of the standard curve parameters showed a correlation coefficient (R²) of 0.996, a slope of -3.159 , an intercept of 21.55 , and an efficiency (E) of 107.279% . The viral copy number in the examined samples could be quantified by applying the standard formula for the regression analysis ($Y = -3.159X + 21.55$).

2.10. Co-Cultures of Primary Lymphocytes with PK-15 S10-CD163 Cells Infected with PRRSV

The cytotoxicity assay was performed using a co-culture of PK-15 S10-CD163 as target T-cells and primary porcine lymphocytes isolated from the experimental groups as primed cells.

Initially, the PK-15 S10-CD163 cells were seeded at a concentration of 10,000 cells/well in a 96-well black plate with a clear flat bottom (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) in DMEM 2% FBS (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). The cells were incubated for 24 h at 37°C and $5\% \text{CO}_2$. Subsequently, the cells were infected with PRRSV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.2 in DMEM 10% inactivated FBS and seeded simultaneously with the lymphocytes in the plate.

The primary lymphocytes cryopreserved from 42 DPI were thawed at room temperature and seeded into 100 mm culture plates (Corning, NY, USA) under standard culture conditions using RPMI (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) 10% FBS. Prior to the experiment, the viable lymphocytes were normalized as a control for viability. Viability was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The cells were cultured at a density of 1×10^4 cells/well in RPMI basal medium and incubated at 37°C in 96-well plates with $5\% \text{CO}_2$. Then, 20 μL of MTT (5 mg/mL in PBS) was added to each well, and cells were incubated for 4 h at 37°C . After centrifugation at $830 \times g$ for 5 min, the supernatants were immediately removed. Then, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added, and the absorbance (595 nm) was measured using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell viability was expressed as percentage of viability compared to fresh lymphocytes as the control. The viability percentage was calculated as follows: $[(\text{optical density of the samples})/(\text{optical density of the control})] \times 100$. The samples were analyzed in triplicate. All groups showed approximately 40% viability after thawing (Supplemental Material S4).

After incubation, the non-attached lymphocytes were collected and identified as the lymphocyte isolate. These lymphocytes were divided into two samples: one was cultured with RPMI 10% FBS, and the other was cultured with RPMI 10% FBS supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of phytohemagglutinin (PHA) (SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were incubated for 24 h at 37°C and $5\% \text{CO}_2$.

For the co-culture assays, lymphocyte isolate was added to the infected PK-15 cells. In detail, primary lymphocytes were added at a concentration of 8000 cells/50 μL /well to achieve an 8:1 ratio (lymphocyte: PK-15), using RPMI 10% FBS without phenol red (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). Additionally, each well received 50 μL of Green celltox reagent (Promega, Madison, WI, USA). The co-cultures were incubated at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. The fluorescence was quantified at 12 h and 24 h using a Varioskan LUX (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) instrument measured at 485/520 nm.

2.11. Statistical Analysis

The statistical differences between the infected and non-infected groups were initially assessed using normality and lognormality tests for all assays. Subsequently, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was conducted, followed by post hoc tests such as Kruskal–Wallis or Brown–Forsythe and Welch post hoc tests, as specified in the figure legends. Significance levels of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ were considered

statistically significant. The data are presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). The statistical software GraphPad Prism (version 8.0.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was utilized for the analysis.

3. Results

3.1. Weight Gain Was Not Influenced by the Immunization Protocol

Weekly weight gain increased steadily over the course of the experiment in the four groups. There were non-significant differences observed between the PBS and vehicle groups compared to the PTC1 and PTC2 groups (Figure 1).

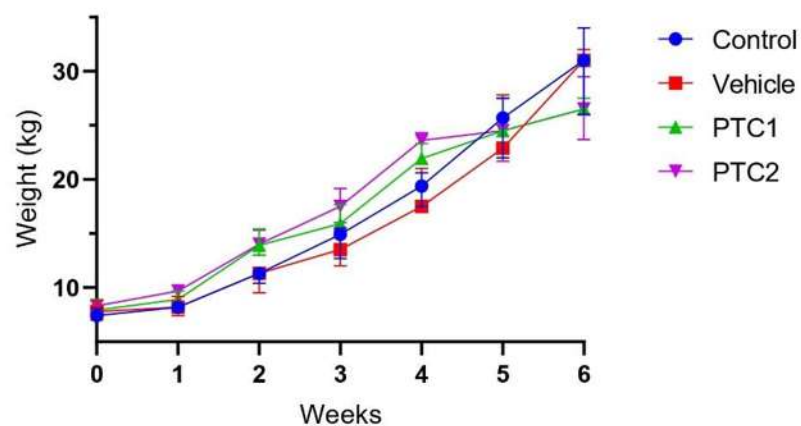


Figure 1. Weight gain. Weight of pigs at different growth stages (N = 28) divided into four groups (N = 7). The curves represent the median weight of seven individual subjects, while the error bars indicate the interquartile range. Statistical significance was determined using a Two-way ANOVA and Tukey pos hoc test. Non-significant differences were observed.

3.2. PTC2 Peptide Increased the Concentration of Proinflammatory Cytokines

Cytokine concentrations were quantified in serum samples collected 2 DPI post-immunization to determine the proinflammatory state. Pigs immunized with PTC2 exhibited significantly higher serum concentration of TNF- α and IL-1 β compared to both the control and vehicle groups (Figure 2A,B). In contrast, there were no significant differences in the serum concentrations of IL-8 and IFN- α between the PTC2 group and the control groups (Figure 2C,D). The PTC1 group did not show differences in cytokine serum concentrations compared to the controls. These findings suggest that the PTC2 peptide induces a proinflammatory condition after immunization. The cytokine concentrations were measured 48 h after immunization to observe the immunomodulatory effect during the initial stage of antigen processing and presentation.

3.3. PTC2 Peptide Increased the Serum Concentration of Cytokines Related to the Activation of Cellular Immunity

Pigs in the PTC2 group exhibited a significant increase in their serum concentrations of IL-4, IL-10, and IL-6 compared to both the control and vehicle groups (Figure 3A,B,D,E). Additionally, the concentration of IL-12 increased in the vehicle, PTC1, and PTC2 groups compared to the control group (Figure 3C). These findings suggest that the vehicle used in this experimental setup may influence the concentration of IL-12.

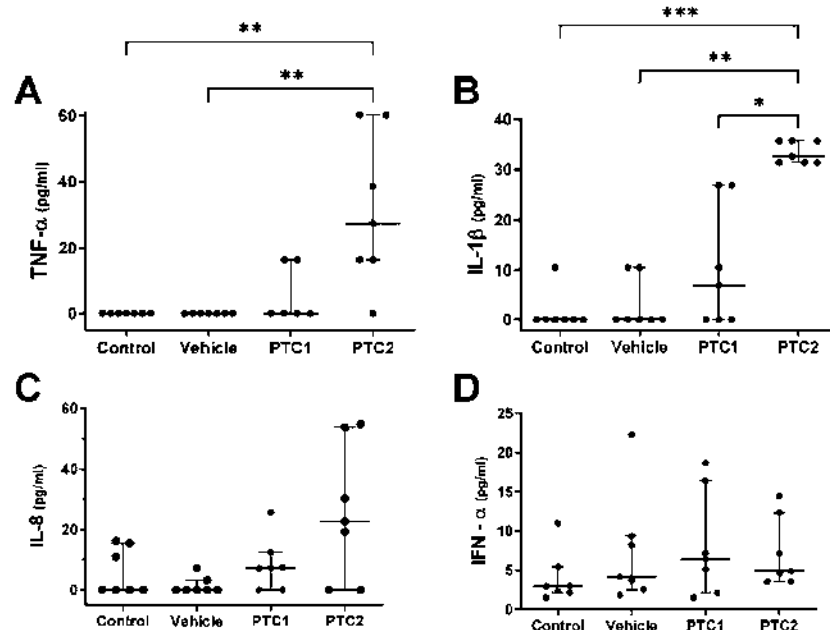


Figure 2. Analysis of proinflammatory cytokines in serum from pigs immunized with PTC1 and PTC2. Serum samples were collected 48 h post-inoculation. Cytokines were measured using a multiplex Luminex-based cytokine immunoassay. (A) TNF- α . (B) IL-1 β . (C) IL-8. (D) IFN- α . Bars indicate the median of 7 individual subjects and the error bars represent the interquartile range. Statistical significance was determined using ANOVA and Kruskal–Wallis post hoc test. Significance levels of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ were considered statistically significant. ns: non-significant.

3.4. PTC1 and PTC2 Immunizations Correlated with Increased CD8+ Cell Count in Peripheral Blood

The quantification of cytotoxic lymphocytes (CD8+) in peripheral blood was conducted 42 days after immunization. The results show that the pigs immunized with PTC1 and PTC2 exhibited a higher CD8+ cell population compared to the groups treated with PBS and the vehicle (Figure 4A). Although the group immunized only with the vehicle depicted a higher CD8+ cell count, it was still lower than the count observed in the pigs immunized with both peptides. These findings suggest that the peptides may have a direct effect on the production and differentiation of cytotoxic lymphocytes.

To determine whether the peptides could influence the activation state of cytotoxic lymphocytes, we quantified CD8+/CD44+ double-positive cells via flow cytometry. However, no significant difference in CD8+/CD44+ count was observed between the peptide-immunized groups compared to the control groups (Figure 4B).

3.5. PTC1 Primed Lymphocytes Recognize and Eliminate PRRSV Infected Cells

Lymphocytes isolated at 42 DPI from all experimental groups were co-cultivated with PRRSV-infected cells to evaluate their cytotoxic activity. The cytotoxic activity was estimated based on the relative fluorescence units (RFUs), which were indicative of non-viable cells. As a viability control, PK-15 cells (alone) infected with the virus were used.

After 12 h of co-incubation, there was not a significant difference in viable cells among the treatment groups, indicating a similar level of cell death regardless of the immunization scheme (Figure 5A). In contrast, when lymphocytes were stimulated with PHA, the group immunized with PTC1 showed a significantly higher difference in cell viability (Figure 5B).

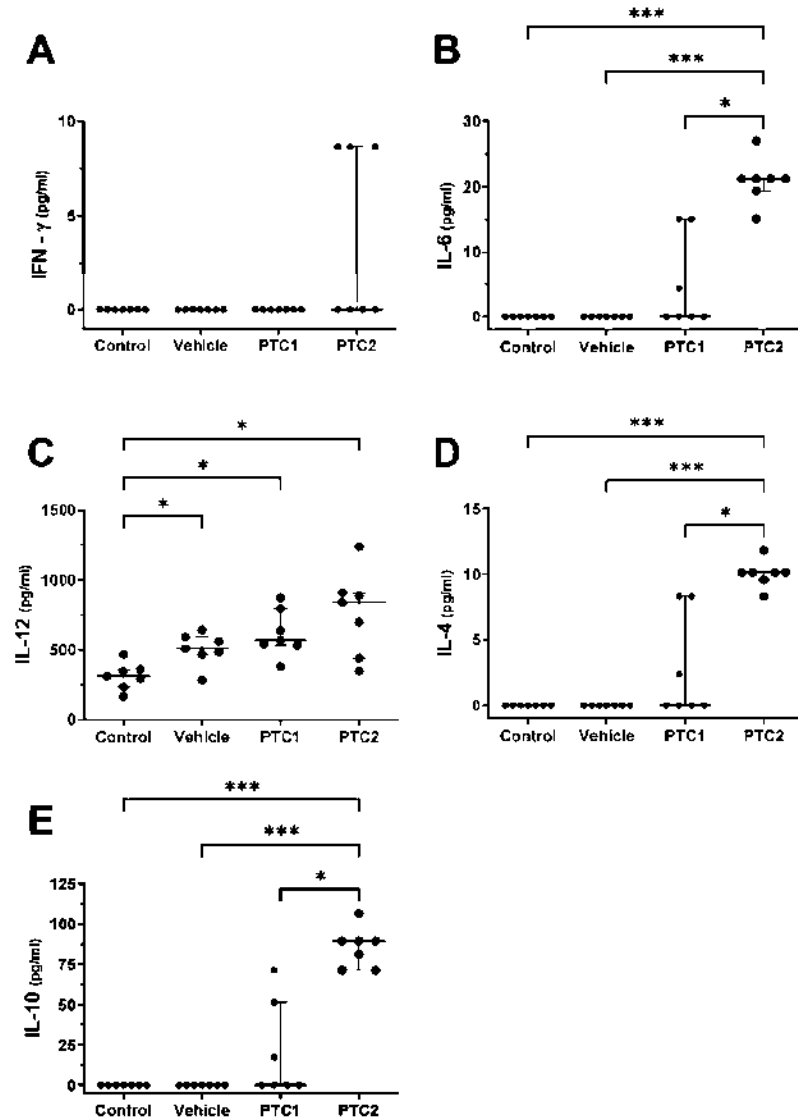


Figure 3. Quantification of IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-4, and IL-10 in pig sera. Sera from pigs were collected at 48 h post inoculation. Cytokines were measured using a multiplex Luminex-based cytokine immunoassay. Bars indicate the median of 7 individual subjects and the error bars represent the interquartile range. (A) IFN- γ , (B) IL-6, (C) IL-12, (D) IL-4, and (E) IL-10. Statistical significance was determined using ANOVA and Kruskal–Wallis post hoc test. Significance levels of * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ were considered statistically significant. ns: non-significant.

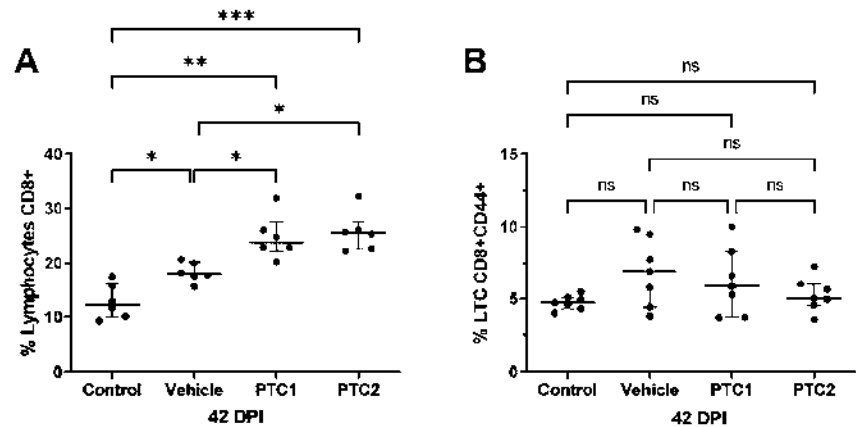


Figure 4. Analysis of T-lymphocyte, CD8+, and CD8+CD44+ cell populations from pigs at 42 DPI. (A) Percentage of total cytotoxic cell population CD8+ and (B) percentage of total activated cytotoxic cells CD8+CD44+. Bars indicate the median of 7 individual subjects and the error bars represent the interquartile range. Statistical significance was determined using ANOVA and Brown–Forsythe and Welch post hoc tests. Significance levels of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ were considered statistically significant. ns: non-significant.

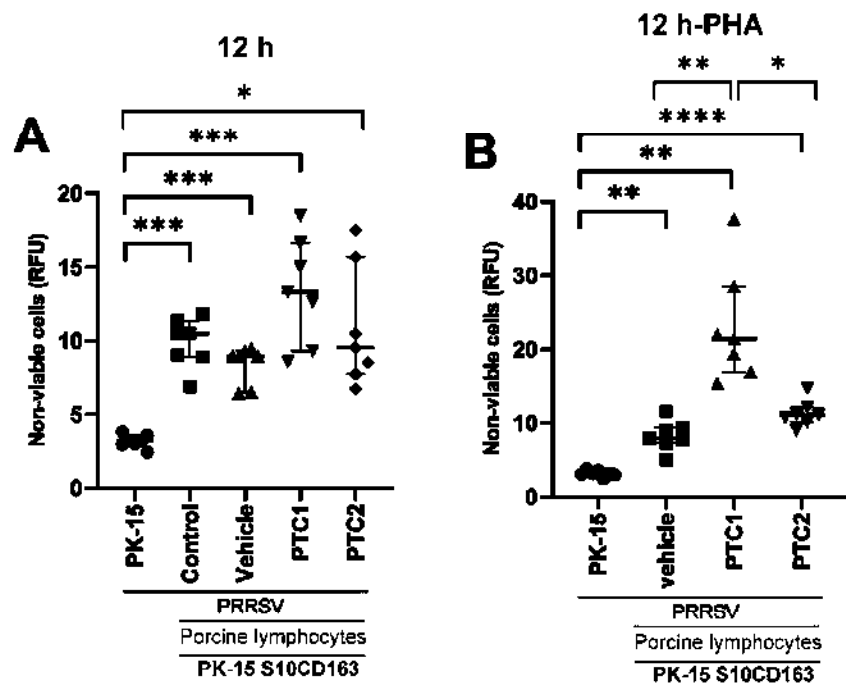


Figure 5. Cont.

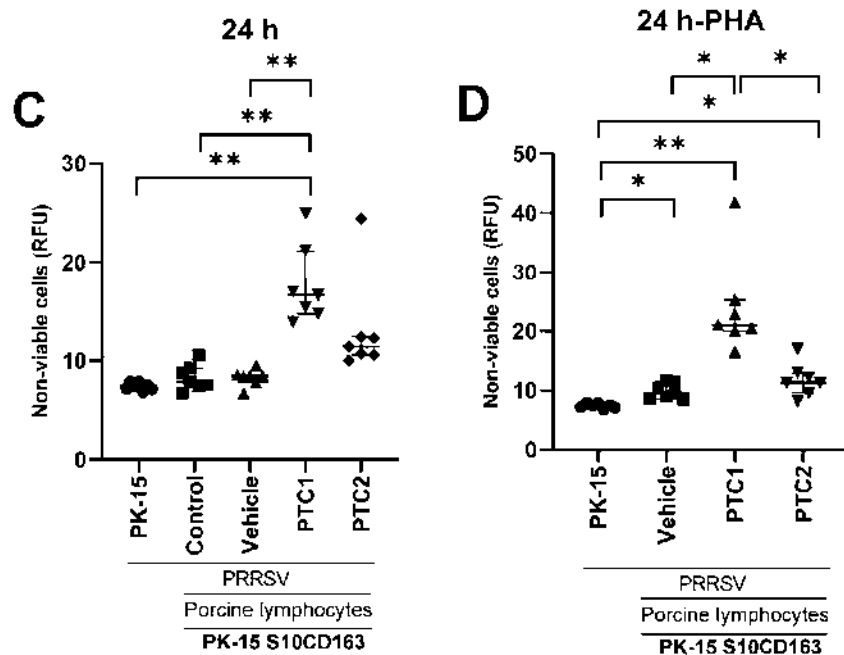


Figure 5. PRRSV peptide-specific CTL responses in vitro. PK-15 S10-CD163 cells were seeded at a ratio of 1:8 with isolated lymphocytes from immunized pigs according to the experimental groups: control, vehicle, PTC1, and PTC2. Additionally, lymphocytes from the vehicle, PTC1, and PTC2 were pre-activated with PHA in vitro for 24 h before co-cultivation. (A) RFU measurement at 12 h of co-culture. (B) RFU measurement at 12 h of co-culture with pretreated lymphocytes with PHA. (C) RFU measurement at 24 h of co-culture. (D) RFU measurement at 24 h of co-culture with pretreated lymphocytes with PHA. Bars indicate the median of 7 individual subjects, and the error bars represent the interquartile range. Statistical significance was determined using ANOVA and Brown–Forsythe and Welch post hoc tests. Significance levels of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ were considered statistically significant. ns: non-significant.

After 24 h of coincubation, the effect of PTC1 on cell viability was notably higher than that of PTC2 and the control groups, both with and without PHA stimulation (Figure 5C,D).

4. Discussion

Subunit-based PRRSV vaccine candidates have been studied for over 25 years. The protective efficacy of these vaccines varies and is comparable to that of inactivated virus vaccines [29]. MLV vaccines are currently the most widely used type, but these vaccines do not provide complete and sterilizing protection against PRRSV, nor do other new-generation vaccines that are currently under investigation. Consequently, there is an ongoing need for effective and safe PRRSV vaccines. Notably, both natural and synthetic peptides have demonstrated a robust induction of T-cell mediated immunity [44], thereby indicating their potential promise for vaccine development.

In this study, we evaluated peptides from GP5 as potential vaccines candidates. First, the experimental setup did not affect the health or growth rate of the pigs. In our study, weight gain was independent of the immunization protocol (Figure 1), suggesting that the pigs maintained a normal growth rate. Frequently, monitoring weight gain serves as an indicator of the health and welfare status of production animals [45]. Furthermore, all the piglets used for the experiment were confirmed to be PRRSV-negative, as determined using PCR (Supplemental Material S5).

We report here the immunogenic characteristics of two PRRSV type 2 GP5 peptides as potential vaccine candidates, with a particular focus on their ability to induce T-cell mediated immunity. PTC1 encompasses residues 148–161 (Seq. Ref. UJD73100.1), and PTC2 corresponds to residues 116–130 and 148–163 (Seq. Ref. UOA04012.1). PTC1 shares 76% similarity with the sequence previously reported by Chen, C. et al. [46]. The GP5-149T contains a T-cell epitope and has been shown to induce a T-cell immune response [46]. PTC2 contains two sequences; the first one corresponds to an immunodominant T-cell epitope reported by Vashisht, K et al. [40]. The second sequence overlaps the PTC1 sequence. T-cell epitopes have been identified in GP5, which supports the use of this protein to induce a T-cell mediated response [40,46–48]. Studies have found that peptides similar to PTC1 and PTC2 have induced the activation of IFN- γ secreting cells (CTLs) and proliferation of PBMCs in mice and pigs in assays related to T-cells [40,46,48].

The vaccine candidate formulation, containing one of two peptides derived from GP5, showed different stimulation patterns concerning proinflammatory cytokines, cytokines related to the activation of cellular immunity, and the cytotoxic activity of primed lymphocytes.

The proinflammatory profile of the pigs immunized with the peptides was evaluated by measuring the concentration of TNF- α , IL1- β , IL-8, and IFN- α (Figure 2). The results demonstrate an increase in TNF- α and IL1- β (Figure 2A,B), suggesting that PTC1 induces a proinflammatory state at 2 DPI. Similar studies using peptides derived from PRRSV and carrier proteins as a vehicle revealed an increase in TNF- α , a cytokine associated with the augmentation of the Th1 immune response [46]. The addition of carrier proteins to the peptides has proven to be an effective strategy to enhance the immune response to vaccine antigens [46].

To assess the profile of cytokines related to the activation of cellular immunity, we focused our cytokines measurement at 48 h, as previous reports have indicated changes during the first 24 and 48 h post-treatment. The changes involved an increase in proinflammatory cytokines and signaling pathways related to T-cell activation [47,49]. Following this, it is observed that signaling pathways such as STAT, which is associated with the Th1 phenotype, decreased [47]. Arunachalam et al., 2023 reported that after 3 days of vaccination with the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine, cytokines like CXCL10, IL-6, IFN- α , and IFN- γ returned to normal levels [50,51].

Immunization with PTC2, after 2 DPI or 48 h, corresponded to an elevated serum concentration of cytokines related to the Th1 and Th2 immunological response (Figure 3). Specifically, the higher concentration of IFN- γ and IL-12 is associated with the activation of helper lymphocytes of the Th1 lineage [52], whereas the higher concentration of IL-4 and IL-6 suggests the stimulation of Th2 lymphocytes [53,54].

This study reveals that cellular immunity associated with Th1 and Th2 was activated. This same response has been observed in a murine model immunized with SARS-CoV-2 [55]. Th1/Th2-related immune responses through the secretion of their predominant cytokines such as IFN- γ and IL-4 could confer protection [55]. The activation of Th1/Th2 may contribute to the reduction of viral loads and could also significantly prevent body weight loss, as observed in SARS-CoV-2. In addition, the potential secretion of neutralizing antibodies is favored with the activation of Th1 and Th2 [55]. In our study, the role of neutralizing antibodies was not examined, but in future research, the secretion of neutralizing antibodies will be investigated to determine their ability to recognize and neutralize PRRSV.

Overall, PTC2 induces a T helper Th1/Th2 proinflammatory cytokine immunomodulatory profile, whereas PTC1 primes lymphocytes (likely CTLs) with a cytotoxic effect on PRRSV-infected cells.

The cytotoxic activity of the CTL response has been previously studied using peptides derived from type 1 and HP-PRRSV [56,57]. In these studies, pigs immunized with NSP2 and M-protein-derived peptides demonstrated an increased activity of CTLs producing IFN- γ [56], suggesting that this response could be sufficient to protect against PRRSV, even

in the absence of neutralizing antibodies [57]. Moreover, it has been suggested that peptides capable of inducing CTLs might be required for optimal immunity against PRRSV [58–60].

In our study, we evaluated the cytotoxic lymphocyte population in pigs immunized with PTC1 and PTC2 peptides at 42 DPI. Both peptides induced a significant increase in CD8+. Previously, in a mice model, we observed an increase in the CTL population (CD8+) after PTC1 immunization. This result is confirmed in the present study, where we observed an increased population of total cytotoxic lymphocytes (CD8+) with both the PTC1 and PTC2 groups compared to the control and vehicle group (Figure 4). The increase in total cytotoxic lymphocytes in the vehicle group (BSA protein) is well characterized for the adjuvant aluminum hydroxide (alhydrogel), because it modulates the T-lymphocyte response by increasing the inflammasome receptor protein 3 (NLRP3, also called NALP3) as well as other inflammasome-independent pathways. These pathways promote the secretion of high levels of proinflammatory factors through antigen-presenting cells. These particles act directly or indirectly on B- and T-cells [45]. Moreover, aluminum salts increase the population of activated cytotoxic cells [61], promote the cross-presentation of DC antigens *in vitro*, and improve the cytolytic activity of CTLs [61,62].

We evaluated the activation phenotype of CD8+ T-cells (CD8+/CD44+) at 42 DPI. Despite observing a higher population in the immunization groups, there was no significant difference in the activation profiles of the CD8+ population. These results align with the findings of Franzoni et al., 2013, who demonstrated that a viral challenge is needed to observe a difference in CD8+ activation. Specifically, only the group immunized with an attenuated Classical Swine Fever Virus (CSFV) vaccine and subsequently challenged with a virulent strain depicted a higher CD8+ activation profile after 56 days of immunization [63]. This result suggests that primed CD8+ could be activated by the presence of the viral antigen *in vitro* or *in vivo* after a correct stimulation in the immunized pigs.

Given that the CD8+ cell population was higher in immunized pigs, we further explored their cytotoxic activity *in vitro* to confirm that the peptides could prime lymphocytes in our experimental setup. We conducted *in vitro* cytolysis co-culture assays based on previously reported methodologies [64]. CD8+ from immunized pigs showed increased cytotoxic activity when co-cultured with PRRSV-infected cells and stimulated with PHA (Figure 5). This suggests that PTC1 and PTC2 may prime CD8+ cells upon immunization. It is well established that PHA can induce lymphocyte proliferation through the cross-linking of glycoproteins on the cell surface [65,66]. PHA can activate T-lymphocytes as it binds to the TCR/CD3 complex, mimicking all intracellular activation events, similar to the mechanism triggered by anti-CD3 antibodies [67].

The activity of specific CTLs is a promising indicator of vaccine protection. For instance, Y. Li et al. (2023) showed that primed CTLs enhance protection against PRRSV type 1 in a transplacental infection context, reducing viral load in infected animals [68].

Finally, all these data suggest that both peptides are effective in inducing a cellular immune-mediated response. PTC2 elicited a cytokine reaction characteristic of a coordinated Th1/Th2 response, while PTC1 promoted cytolytic activity. The mechanisms by which PTC1 and PTC2 induce such immune response remain to be elucidated.

5. Conclusions

PTC1 and PTC2 peptides induce a T-cell response and a pro-inflammatory profile in immunized pigs against PRRSV. This suggests a potent and effective immune response, likely attributable to the presence of T epitopes within their sequences.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v16010014/s1>, Figure S1: Immunization and blood sampling schedule; Figure S2: Immunophenotyping CD3+/CD8+ and CD8+/CD44+ cells population from lymphocytes; Figure S3: Standard curve for PRRSV quantification; Figure S4: Viability of the lymphocytes after cryopreservation by MTT assay; Figure S5. Graphical Representation of qPCR Software Results for the Detection of PRRSV in Experimental Pig Samples.

Author Contributions: Conceptualization, F.C.-R., F.P.-D., I.H.-M., A.B.-P., I.M. and R.E.N.-A.; methodology, F.C.-R., F.P.-D., I.H.-M., R.O.-F., I.M. and R.E.N.-A.; validation, F.C.-R., F.P.-D., I.M. and R.E.N.-A.; formal analysis, F.C.-R., F.P.-D. and R.E.N.-A.; investigation, F.C.-R., F.P.-D., I.H.-M., I.M., R.E.N.-A., R.O.-F., L.E.F.-C. and A.G.Z.-A.; resources, I.H.-M., A.B.-P. and R.E.N.-A.; writing—original draft preparation, F.C.-R., I.H.-M., I.M. and R.E.N.-A.; writing review and editing, F.C.-R., I.H.-M., I.M., A.B.-P. and R.E.N.-A.; visualization, F.C.-R.; supervision, R.E.N.-A.; project manager and administration, F.C.-R. and R.E.N.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded and supported by grant CONAHICYT; grant number A1-S-43236. We thank CIC-UMSNH funding (2021–2022), which made part of this research possible. We thank PAPPIT-UNAM IA207519 for partial funding. We thank the Proteomic and Cellular Bioengineering Unit, INFR-2015-01 255010 (CONAHICYT). We also express thanks for the grant from CONAHICYT, “FOMENTO A LA INFRAESTRUCTURA CIENTÍFICA” 2021, project No. 317189. F.C.-R. received a fellowship from the 704097 CONAHICYT.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Animal Research and Ethics Committee of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (protocol code: CICUMSNH-A101-FMVZ and approval of 1 September 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors give thanks to Asit K. Pattnaik, Nebraska Center for Virology for the donation of plasmid pFL-12, which codes North American PRRSV type 2 (strain NVSL 97-78950). We are grateful to Hans J. Nauwynck of the University of Ghent for generously donating the cell line PK-15 Siglec-10+ CD163+ (PK-15 S10-CD163).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest regarding this study.

References

1. Franzo, G.; Barbierato, G.; Pesente, P.; Legnardi, M.; Tucciarone, C.M.; Sandri, G.; Drigo, M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Epidemiology in an Integrated Pig Company of Northern Italy: A Multilevel Threat Requiring Multilevel Interventions. *Viruses* **2021**, *13*, 2510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Jantafong, T.; Sangtong, P.; Saenglub, W.; Mungkundar, C.; Romlamduan, N.; Lekchareonsuk, C.; Lekchareonsuk, P. Genetic Diversity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 229–238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Zhou, L.; Yang, H. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in China. *Virus Res.* **2010**, *154*, 31–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Benfield, D.A.; Nelson, E.; Collins, J.E.; Harris, L.; Goyal, S.M.; Robison, D.; Christianson, W.T.; Morrison, R.B.; Gorcyca, D.; Chladek, D. Characterization of Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS) Virus (Isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Investig.* **1992**, *4*, 127–133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Snijder, E.J.; Meulenbergh, J.J.M. The Molecular Biology of Arteriviruses. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 961–980. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Han, M.; Yoo, D. Engineering the PRRS Virus Genome: Updates and Perspectives. *Vet. Microbiol.* **2014**, *174*, 279–295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Jiang, Y.; Li, G.; Yu, L.; Li, L.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Tong, W.; Liu, C.; Gao, F.; Tong, G. Genetic Diversity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) From 1996 to 2017 in China. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Wang, J.; Lin, S.; Quan, D.; Wang, H.; Huang, J.; Wang, Y.; Ren, T.; Ouyang, K.; Chen, Y.; Huang, W.; et al. Full Genomic Analysis of New Variants of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Revealed Multiple Recombination Events Between Different Lineages and Sublineages. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 603. [\[CrossRef\]](#)
9. Fang, Y.; Snijder, E.J. The PRRSV Replicase: Exploring the Multifunctionality of an Intriguing Set of Nonstructural Proteins. *Virus Res.* **2010**, *154*, 61–76. [\[CrossRef\]](#)
10. Kappes, M.A.; Faaborg, K.S. PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity. *Virology* **2015**, *479*, 475–486. [\[CrossRef\]](#)
11. Swine Health Information Center. *Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*; Swine Health Information Center: Ames, IA, USA, 2016.
12. Sun, W.; Wu, W.; Jiang, N.; Ge, X.; Zhang, Y.; Han, J.; Guo, X.; Zhou, L.; Yang, H. Highly Pathogenic PRRSV-Infected Alveolar Macrophages Impair the Function of Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. *Viruses* **2022**, *14*, 452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Assavacheep, P.; Thanawongnuwech, R. Porcine Respiratory Disease Complex: Dynamics of Polymicrobial Infections and Management Strategies after the Introduction of the African Swine Fever. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 1048861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Brockmeier, S.; Halbur, P.; Thacker, E. Porcine Respiratory Disease Complex. In *Polymicrobial Diseases*; Brogden, K.A., Guthmiller, J.M.E., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2002.
15. Neumann, E.J.; Kliebenstein, J.B.; Johnson, C.D.; Mabry, J.W.; Bush, E.J.; Seitzinger, A.H.; Green, A.L.; Zimmerman, J.J. Assessment of the Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome on Swine Production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2005**, *227*, 385–392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zhang, Z.; Li, Z.; Li, H.; Yang, S.; Ren, F.; Bian, T.; Sun, L.; Zhou, B.; Zhou, L.; Qu, X. The Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Outbreak in Four Chinese Farms: Based on Cost and Revenue Analysis. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 1024720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Tait-Burkard, C.; Doeschl-Wilson, A.; McGrew, M.J.; Archibald, A.L.; Sang, H.M.; Houston, R.D.; Whitelaw, C.B.; Watson, M. Livestock 2.0—Genome Editing for Fitter, Healthier, and More Productive Farmed Animals. *Genome Biol.* **2018**, *19*, 204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Chase-Topping, M.; Xie, J.; Pooley, C.; Trus, I.; Bonckaert, C.; Rediger, K.; Bailey, R.I.; Brown, H.; Bitsouni, V.; Barrio, M.B.; et al. New Insights about Vaccine Effectiveness: Impact of Attenuated PRRS-Strain Vaccination on Heterologous Strain Transmission. *Vaccine* **2020**, *38*, 3050–3061. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Li, C.; Liu, Z.; Chen, K.; Qian, J.; Hu, Y.; Fang, S.; Sun, Z.; Zhang, C.; Huang, L.; Zhang, J.; et al. Efficacy of the Synergy Between Live-Attenuated and Inactivated PRRSV Vaccines Against a NADC30-Like Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in 4-Week Piglets. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 812040. [\[CrossRef\]](#)
20. Brinton, M.A.; Snijder, E.J. Arteriviruses. In *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed.; Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V., Eds.; Academic Press: Oxford, MA, USA, 2008; pp. 176–186. ISBN 978-0-12-374410-4.
21. Kvisgaard, L.K.; Kristensen, C.S.; Ryt-Hansen, P.; Pedersen, K.; Stadejek, T.; Trebbien, R.; Andresen, L.O.; Larsen, L.E. A Recombination between Two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Vaccine Strains Has Caused Severe Outbreaks in Danish Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1786–1796. [\[CrossRef\]](#)
22. Geldhof, M.F.; Vanhee, M.; Van Breedam, W.; Van Doorselaere, J.; Karniyuchuk, U.U.; Nauwynck, H.J. Comparison of the Efficacy of Autogenous Inactivated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccines with That of Commercial Vaccines against Homologous and Heterologous Challenges. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 182. [\[CrossRef\]](#)
23. Lowe, J.F.; Zuckermann, F.A.; Firkins, L.D.; Schnitzlein, W.M.; Goldberg, T.L. Immunologic Responses and Reproductive Outcomes Following Exposure to Wild-Type or Attenuated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine under Field Conditions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2006**, *228*, 1082–1088. [\[CrossRef\]](#)
24. Thanawongnuwech, R.; Suradhat, S. Taming PRRSV: Revisiting the Control Strategies and Vaccine Design. *Virus Res.* **2010**, *154*, 133–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Li, X.; Galliher-Beckley, A.; Huang, H.; Sun, X.; Shi, J. Peptide Nanofiber Hydrogel Adjuvanted Live Virus Vaccine Enhances Cross-Protective Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vaccine* **2013**, *31*, 4508–4515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. U.S. Food and Drug Administration. *Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines*; U.S. Food and Drug Administration: Rockville, MD, USA, 2019.
27. Rezaei, M.; Nazari, M. New Generation Vaccines for COVID-19 Based on Peptide, Viral Vector, Artificial Antigen Presenting Cell, DNA or mRNA. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2022**, *14*, 30–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Nan, Y.; Wu, C.; Gu, G.; Sun, W.; Zhang, Y.-J.; Zhou, E.-M. Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Renukaradhya, G.J.; Meng, X.J.; Calvert, J.G.; Roof, M.; Lager, K.M. Inactivated and Subunit Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: Current Status and Future Direction. *Vaccine* **2015**, *33*, 3065–3072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Li, J.; Murtaugh, M.P. Dissociation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Neutralization from Antibodies Specific to Major Envelope Protein Surface Epitopes. *Virology* **2012**, *433*, 367–376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Petrini, S.; Ramadori, G.; Villa, R.; Borghetti, P.; de Angelis, E.; Cantoni, A.; Corradi, A.; Amici, A.; Ferrari, M. Evaluation of Different DNA Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) in Pigs. *Vaccines* **2013**, *1*, 463–480. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Vanhee, M.; Van Breedam, W.; Costers, S.; Geldhof, M.; Noppe, Y.; Nauwynck, H. Characterization of Antigenic Regions in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by the Use of Peptide-Specific Serum Antibodies. *Vaccine* **2011**, *29*, 4794–4804. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhou, C.; Lu, R.; Lin, G.; Yao, Z. The Latest Developments in Synthetic Peptides with Immunoregulatory Activities. *Peptides* **2011**, *32*, 408–414. [\[CrossRef\]](#)
34. Tondini, E.; Reintjens, N.R.M.; Castello, G.; Arakelian, T.; Isendoorn, M.; Camps, M.; Vree, J.; van der Marel, G.A.; Filippov, D.V.; Codee, J.D.C.; et al. Lipid A Analog CRX-527 Conjugated to Synthetic Peptides Enhances Vaccination Efficacy and Tumor Control. *NPJ Vaccines* **2022**, *7*, 64. [\[CrossRef\]](#)
35. Cox, R. Correlates of Protection to Influenza Virus, Where Do We Go from Here? *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 405–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. McMahan, K.; Yu, J.; Mercado, N.B.; Loos, C.; Tostanoski, L.H.; Chandrashekar, A.; Liu, J.; Peter, L.; Atyeo, C.; Zhu, A.; et al. Correlates of Protection against SARS-CoV-2 in Rhesus Macaques. *Nature* **2021**, *590*, 630–634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

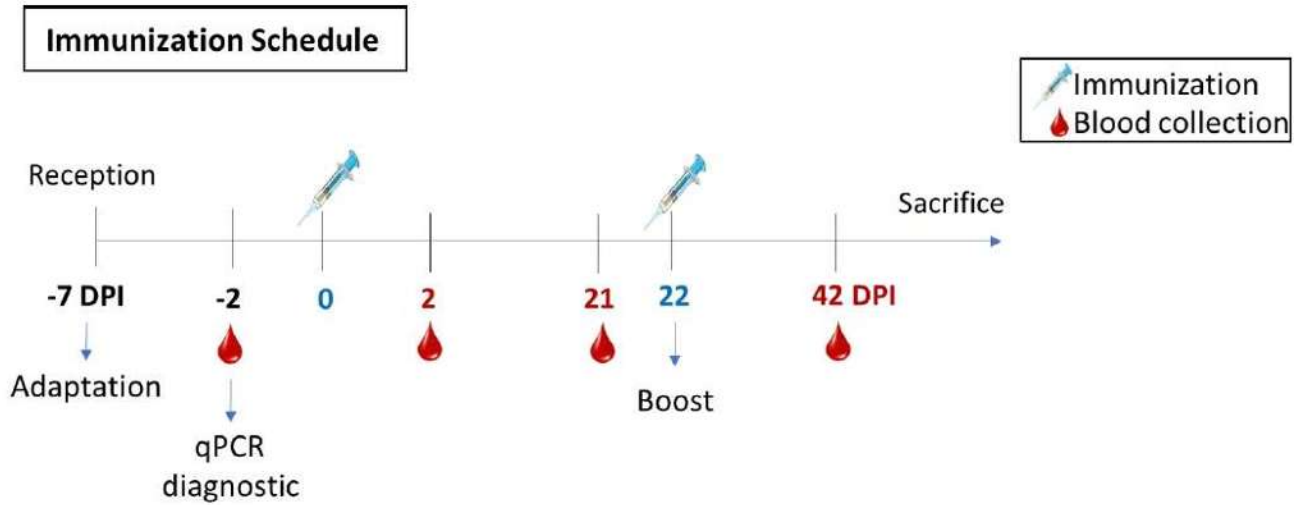
37. Rimmelzwaan, G.F.; Fouchier, R.A.M.; Osterhaus, A.D.M.E. Influenza Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes: A Correlate of Protection and a Basis for Vaccine Development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 529–536. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Cao, Q.M.; Tian, D.; Heffron, C.L.; Subramaniam, S.; Opriessnig, T.; Foss, D.L.; Calvert, J.G.; Meng, X.-J. Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Identified from a Contemporary Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Enhance CD4+CD8+ T, CD8+ T, and I δ T Cell Responses. *Virology* **2019**, *538*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
39. Welner, S.; Nielsen, M.; Rasmussen, M.; Buus, S.; Jungersen, G.; Larsen, L.E. Prediction and in Vitro Verification of Potential CTL Epitopes Conserved among PRRSV-2 Strains. *Immunogenetics* **2017**, *69*, 689–702. [\[CrossRef\]](#)
40. Vashisht, K.; Goldberg, T.L.; Husmann, R.J.; Schnitzlein, W.; Zuckermann, F.A. Identification of Immunodominant T-Cell Epitopes Present in Glycoprotein 5 of the North American Genotype of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vaccine* **2008**, *26*, 4747–4753. [\[CrossRef\]](#)
41. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [\[CrossRef\]](#)
42. Ansari, I.H.; Kwon, B.; Osorio, F.A.; Pattnaik, A.K. Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on Virus Infectivity, Antigenicity, and Ability to Induce Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* **2006**, *80*, 3994–4004. [\[CrossRef\]](#)
43. Woźniakowski, G.; Samorek-Salamonowicz, E.; Kozdruż, W. Quantitative Analysis of Waterfowl Parvoviruses in Geese and Muscovy Ducks by Real-Time Polymerase Chain Reaction: Correlation between Age, Clinical Symptoms and DNA Copy Number of Waterfowl Parvoviruses. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 29. [\[CrossRef\]](#)
44. Hilchie, A.L.; Hoskin, D.W.; Power Coombs, M.R. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1117*, 131–147. [\[CrossRef\]](#)
45. He, P.; Zou, Y.; Hu, Z. Advances in Aluminum Hydroxide-Based Adjuvant Research and Its Mechanism. *Hum. Vaccines Immunother.* **2015**, *11*, 477–488. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Chen, C.; Li, J.; Bi, Y.; Yang, L.; Meng, S.; Zhou, Y.; Jia, X.; Meng, S.; Sun, L.; Liu, W. Synthetic B- and T-Cell Epitope Peptides of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with Gp96 as Adjuvant Induced Humoral and Cell-Mediated Immunity. *Vaccine* **2013**, *31*, 1838–1847. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Marsman, C.; Jorritsma, T.; Ten Brinke, A.; van Ham, S.M. Flow Cytometric Methods for the Detection of Intracellular Signaling Proteins and Transcription Factors Reveal Heterogeneity in Differentiating Human B Cell Subsets. *Cells* **2020**, *9*, 2633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Díaz, I.; Pujols, J.; Ganges, L.; Gimeno, M.; Darwich, L.; Domingo, M.; Mateu, E. In Silico Prediction and Ex Vivo Evaluation of Potential T-Cell Epitopes in Glycoproteins 4 and 5 and Nucleocapsid Protein of Genotype-I (European) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vaccine* **2009**, *27*, 5603–5611. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Somasundaram, C.; Takamatsu, H.; Aoni, C.A.; Audonnet, J.-C.; Fischer, L.; Lefeuvre, F.; Charley, B. Enhanced Protective Response and Immuno-Adjuvant Effects of Porcine GM-CSF on DNA Vaccination of Pigs against Aujeszky's Disease Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1999**, *70*, 277–287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Li, C.; Lee, A.; Grigoryan, L.; Arunachalam, P.S.; Scott, M.K.D.; Trisal, M.; Wimmers, F.; Sanyal, M.; Weidenbacher, P.A.; Feng, Y.; et al. Mechanisms of Innate and Adaptive Immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 Vaccine. *Nat. Immunol.* **2022**, *23*, 543–555. [\[CrossRef\]](#)
51. Arunachalam, P.S.; Scott, M.K.D.; Hagan, T.; Li, C.; Feng, Y.; Wimmers, F.; Grigoryan, L.; Trisal, M.; Edara, V.V.; Lai, L. Systems Vaccinology of the BNT162b2 mRNA Vaccine in Humans. *Nature* **2021**, *596*, 410–416. [\[CrossRef\]](#)
52. Mountford, A.P.; Coulson, P.S.; Cheever, A.W.; Sher, A.; Wilson, R.A.; Wynn, T.A. Interleukin-12 Can Directly Induce T-Helper 1 Responses in Interferon- γ (IFN- γ) Receptor-Deficient Mice, but Requires IFN- γ Signalling to Downregulate T-Helper 2 Responses. *Immunology* **1999**, *97*, 588–594. [\[CrossRef\]](#)
53. Rincón, M.; Anguita, J.; Nakamura, T.; Fikrig, E.; Flavell, R.A. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-Producing CD4 T Cells. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 461–470. [\[CrossRef\]](#)
54. Heijink, I.H.; Vellenga, E.; Borger, P.; Postma, D.S.; De Monchy, J.G.R.; Kauffman, H.F. Interleukin-6 Promotes the Production of Interleukin-4 and Interleukin-5 by Interleukin-2-Dependent and -Independent Mechanisms in Freshly Isolated Human T Cells. *Immunology* **2002**, *107*, 316–324. [\[CrossRef\]](#)
55. Chung, N.H.; Chen, Y.C.; Yang, S.J.; Lin, Y.C.; Dou, H.Y.; Hui-Ching Wang, L.; Liao, C.L.; Chow, Y.H. Induction of Th1 and Th2 in the Protection against SARS-CoV-2 through Mucosal Delivery of an Adenovirus Vaccine Expressing an Engineered Spike Protein. *Vaccine* **2022**, *40*, 574–586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Liang, C.; Xia, Q.; Zhou, J.; Liu, H.; Chen, Y.; Liu, Y.; Ding, P.; Qi, Y.; Wang, A. Identification of Potential SLA-I-Restricted CTL Epitopes within the M Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Microbiol.* **2021**, *259*, 109131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Mokhtar, H.; Pedrera, M.; Frossard, J.P.; Biffar, L.; Hammer, S.E.; Kvisgaard, L.K.; Larsen, L.E.; Stewart, G.R.; Somavarapu, S.; Steinbach, F.; et al. The Non-Structural Protein 5 and Matrix Protein Are Antigenic Targets of T Cell Immunity to Genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Zhang, W.; Lin, Y.; Bai, Y.; Tong, T.; Wang, Q.; Liu, N.; Liu, G.; Xiao, Y.; Yang, T.; Bu, Z. Identification of CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes from Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Matrix Protein in BALB/c Mice. *Virol. J.* **2011**, *8*, 263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

59. Liao, Y.-C.; Lin, H.-H.; Lin, C.-H.; Chung, W.-B. Identification of Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes on Swine Viruses: Multi-Epitope Design for Universal T Cell Vaccine. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Pan, X.; Zhang, N.; Wei, X.; Jiang, Y.; Chen, R.; Li, Q.; Liang, R.; Zhang, L.; Ma, L.; Xia, C. Illumination of PRRSV Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes by the Three-Dimensional Structure and Peptidome of Swine Lymphocyte Antigen Class I (SLA-I). *Front. Immunol.* **2020**, *10*, 2995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Wei, X.; Luo, M.; Wei, Y. Alhydrogel—Sodium Chloride Compound Immunologic Adjuvant, Preparation Method and Use Thereof. United States Patent 5861366, 22 December 2020.
62. Sheikh, N.A.; Rajanathanan, P.; Attard, G.S.; Morrow, W.J.W. Generation of Antigen Specific CD8+ Cytotoxic T Cells Following Immunization with Soluble Protein Formulated with Novel Glycoside Adjuvants. *Vaccine* **1999**, *17*, 2974–2982. [[CrossRef](#)]
63. Franzoni, G.; Kurkure, N.V.; Edgar, D.S.; Everett, H.E.; Gerner, W.; Bodman-Smith, K.B.; Crooke, H.R.; Grahama, S.P. Assessment of the Phenotype and Functionality of Porcine Cd8 t Cell Responses Following Vaccination with Live Attenuated Classical Swine Fever Virus (CSFV) and Virulent CSFV Challenge. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, *20*, 1604–1616. [[CrossRef](#)]
64. Mendieta, I.; Nuñez-Anita, R.E.; Pérez-Sánchez, G.; Pavón, L.; Rodríguez-Cruz, A.; García-Alcocer, G.; Berumen, L.C. Effect of A549 Neuroendocrine Differentiation on Cytotoxic Immune Response. *Endocr. Connect.* **2018**, *7*, 791–802. [[CrossRef](#)]
65. Siedlik, J.A.; Deckert, J.A.; Benedict, S.H.; Bhatta, A.; Dunbar, A.J.; Vardiman, J.P.; Gallagher, P.M. T Cell Activation and Proliferation Following Acute Exercise in Human Subjects Is Altered by Storage Conditions and Mitogen Selection. *J. Immunol. Methods* **2017**, *446*, 7–14. [[CrossRef](#)]
66. Chilson, O.P.; Boylston, A.W.; Crumpton, M.J. Phaseolus Vulgaris Phytohaemagglutinin (PHA) Binds to the Human T Lymphocyte Antigen Receptor. *EMBO J.* **1984**, *3*, 3239–3245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Movafagh, A.; Heydary, H.; Mortazavi-Tabatabaei, S.A.; Azargashb, E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2011**, *10*, 895–903. [[PubMed](#)]
68. Li, Y.; Díaz, I.; Martín-Valls, G.; Beyersdorf, N.; Mateu, E. Systemic CD4 Cytotoxic T Cells Improve Protection against PRRSV-1 Transplacental Infection. *Front. Immunol.* **2023**, *13*, 1020227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

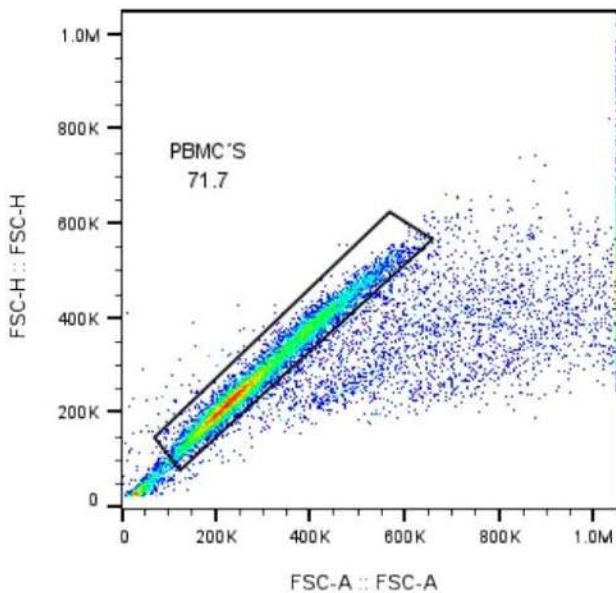
SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1. Immunization and blood sampling schedule

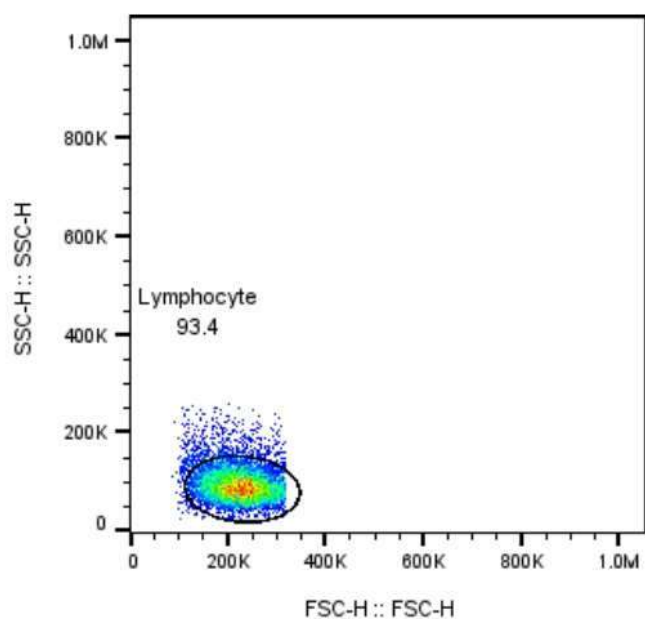


S2. Immunophenotyping CD3+/CD8+ and CD8+/CD44+ cells population from lymphocytes

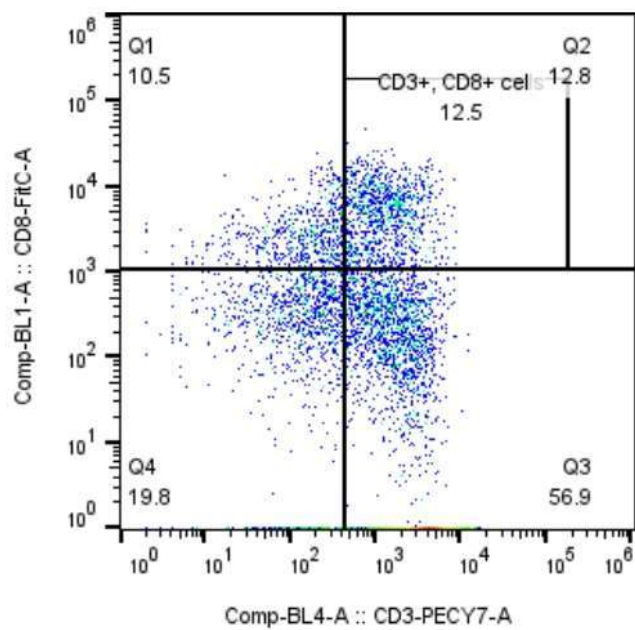
Selection of singlets cells from PBMC



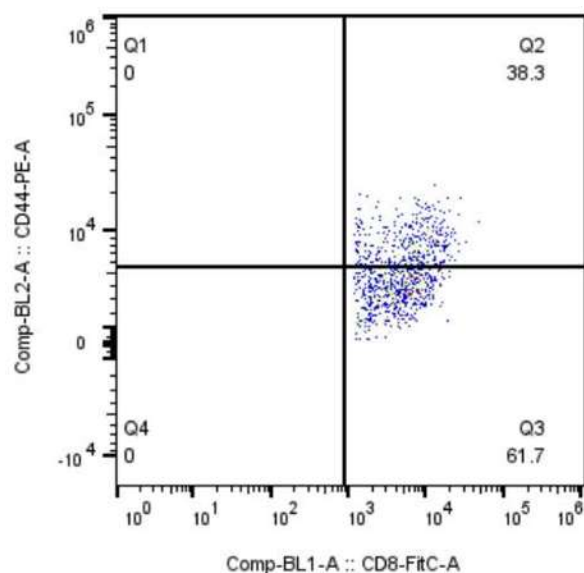
Lymphocytes populations from singlets were analyzed according to their size and complexity.



CD3+/CD8+ cell immunodetection population from lymphocytes

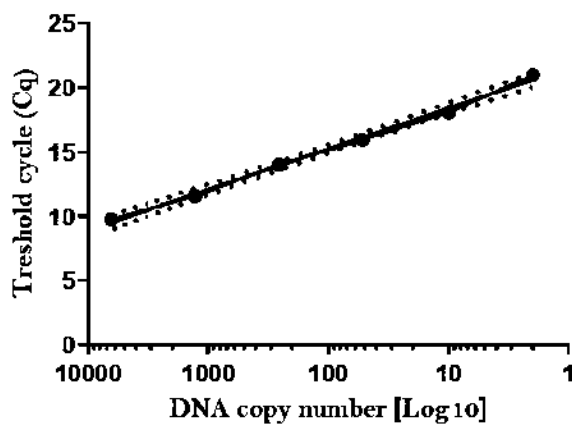


CD8+/CD44+ cell immunodetection population from lymphocytes



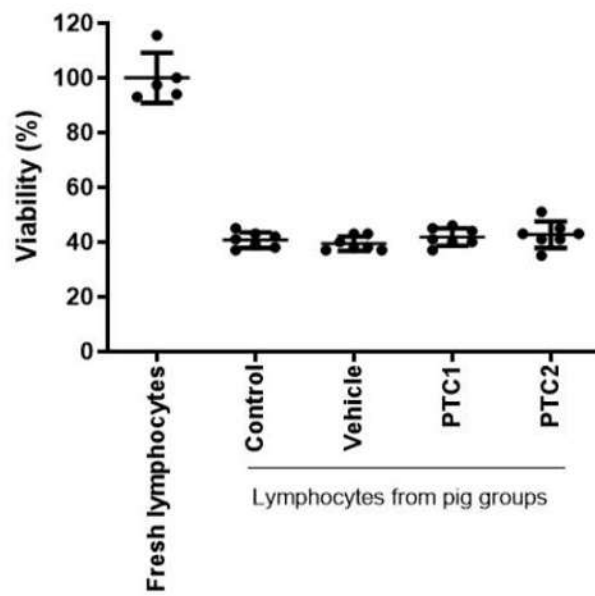
S3. Standard curve for PRRRSV quantification.

R²= 0.996
 Slope= -3.159 Intercept= 21.55
 Real-time PCR efficiency=107.279%

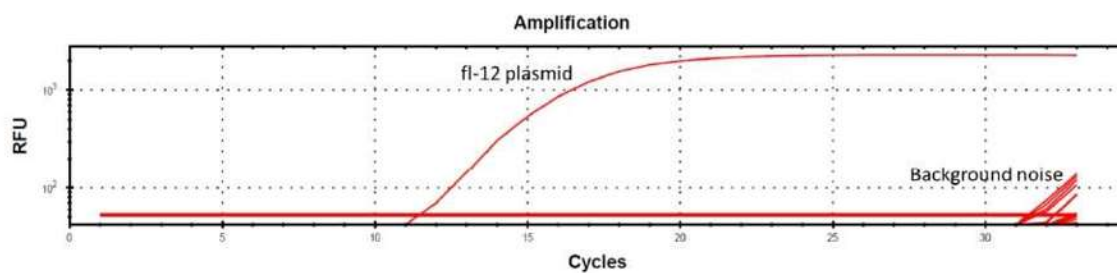


Standard curve for the quantification of viral copy number by real-time PCR. The used six-fold dilutions ranged from 6.4×10^9 to 2.0×10^6 copies based in Log10 per μL were plotted as X-axis . Cq values are indicated on Y-axis.

S4. Viability of the lymphocytes after cryopreservation by MTT.



S5. Diagnosis of experimental pigs by PCR real time



ANEXO 2.



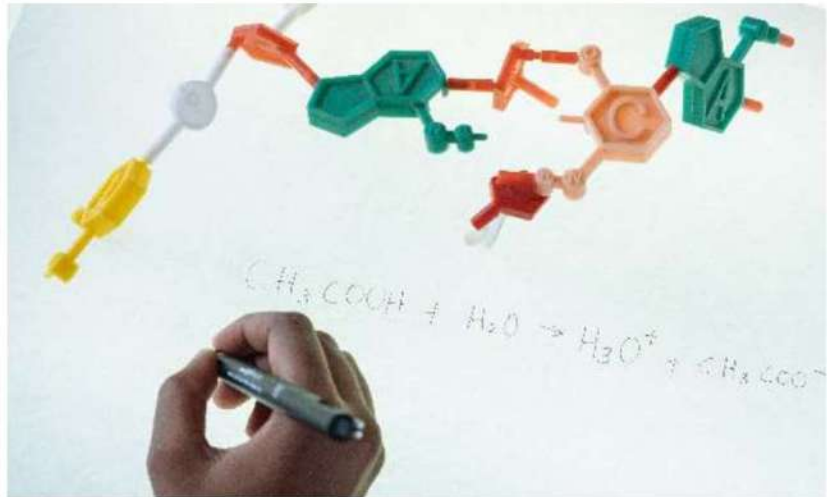
¡Tengo una infección viral! ¿Qué está pasando en mi cuerpo?

Fernando Calderón Rico
Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita
Doctorado en Ciencias Biológicas

Probablemente ya tengas idea de que el sistema inmune nos protege contra las infecciones. En años recientes cobró relevancia la comprensión de la función del sistema inmune porque nos protege de las infecciones virales. En general, el sistema inmune es un sistema de defensa. El sistema inmune interactúa con el entorno donde habitamos, de hecho, funciona de una manera similar en todos los mamíferos. Este maravilloso sistema está alerta todo el tiempo. Su función es simple: reconocer, categorizar y decidir cómo actuar ante cualquier partícula extraña, ya sea un grano de polvo, polen o un microorganismo que puede ser una bacteria o un virus.

Nuestro sistema inmunitario está en constante evolución, se adapta y busca la manera de reconocer y diferenciar lo propio de lo extraño. Se activa desde que nacemos y en las primeras etapas de vida, junto con el calostro o leche materna se le conoce como la primera línea de defensa en el cuerpo, por lo que a este tipo de inmunidad se le llama inmunidad innata. Los anticuerpos provenientes del calostro sirven como protección contra el entorno que hasta entonces era desconocido para nosotros. Posterior a esto, cuando se termina la lactancia, nuestro organismo, específicamente el sistema inmune innato, tiene que aprender a reconocer el entorno que lo rodea. Principalmente para limitar a cualquier microorganismo extraño, destruyéndolo en cuestión de minutos u horas. Esta barrera innata de defensa incluye la piel, las membranas mucosas, las lágrimas, la saliva y el ácido del estómago, que ayudan a evitar la entrada de microorganismos.

A pesar de que esta inmunidad tiene una amplia actividad de protección porque es inmediata y la mayoría de las veces es muy eficaz, también tiene una limitante, y es que, durante las infecciones virales, esta protección no es suficiente. De hecho, cuando un microorganismo ingresa al cuerpo, el sistema inmune innato tiene

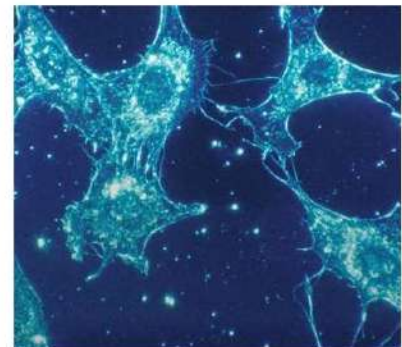


aproximadamente unas cuarenta y ocho horas para eliminar o limitar al organismo extraño, pero si falla en esta tarea, se tiene que activar un sistema exclusivamente dirigido al microorganismo en particular. Aquí es donde entra en acción el sistema inmune adaptativo. Dicha inmunidad está caracterizada por presentar una respuesta altamente específica y particular contra un microorganismo como virus o bacteria. Asimismo, la inmunidad adaptativa cuenta con varios flancos de defensa que se puede dividir principalmente en dos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

¿Pero cómo funcionan?, ¿Como saben cómo actuar?

En realidad, limitar una infección viral es un trabajo en equipo. Las células llamadas linfocitos B, son un tipo de sensor que puede reconocer fragmentos del virus de forma directa o con la ayuda de otras células que le presentan fragmentos virales. Las células presentadoras requieren fagocitar (comer) al virus para fragmentarlo, después se unen a los linfocitos B para proceder a la presentación de una parte del virus o bacteria. Una vez que los lin-

focitos B detectan a las partículas virales, se lleva a cabo la generación de múltiples copias exactamente iguales de ellos mismos. Luego en su forma madura, los linfocitos B producen y liberan anticuerpos para rodear a los microorganismos circulantes y evitar que se diseminen por todo el cuerpo. Precisamente los nuevos virus han evolucionado para escapar del mecanismo protector que representan los anticuerpos. Cada vez que un virus se multiplica, se producen cambios sutiles en su superficie, esto les ayuda a no ser reconocidos por los anticuerpos.



Suplemento

En ese momento de la infección es cuando se solidarizan las células presentadoras de antígeno, las cuales se conocen como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Todas ellas están encargadas de reconocer y fagocitar o “comer” al microorganismo para fragmentarlo y posteriormente los fragmentos son presentados a los linfocitos. Los linfocitos reconocen al fragmento viral y se activan, al proceso, se le conoce como presentación del antígeno. Pero esto requiere de más pasos para contener la infección viral desde el punto de vista inmunológico, porque no solo se presenta el antígeno, los macrófagos y células dendríticas se unen a los linfocitos como dos grandes esferas que se unen y en el centro de la unión se lleva a cabo la presentación, además, hay secreción de varias sustancias químicas llamadas citocinas que ayudan a la activación y la co-estimulación de receptores en los linfocitos que funcionan como llave que enciende la maquinaria dentro del linfocito. Estos tres estímulos provocan la activación de los linfocitos que, a su vez, se expanden clonalmente en múltiples copias y una vez activados cumplen varias funciones.

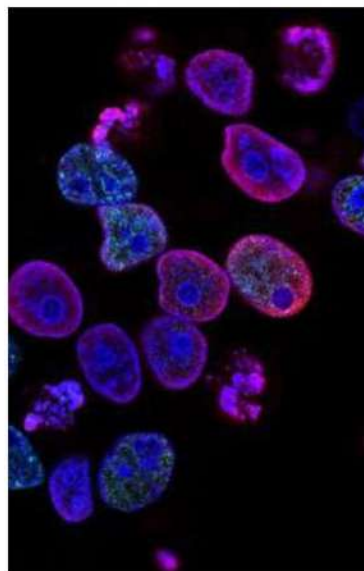
Por otra parte, están los linfocitos Th o ayudadores, su función es proveer de apoyo a todas las células inmunes. Esto lo hacen con la liberación de citocinas proinflamatorias, que son proteínas solubles con una potente acción sobre las células, que ayudan a otras células fagocíticas a eliminar microorganismos de la periferia e incluso ayudarlas a ser más reactivas e ir a sitios más alejados de la circulación, como los tejidos, para limitar la infección. Sin embargo, muchas veces no basta con fagocitar a los virus que se encuentran fuera de las células, sino también deben eliminarse células ya infectadas (con virus dentro), por lo que se deben llevar a cabo otras acciones más radicales para contener la enfermedad infecciosa.

¿Te has preguntado como elimina el cuerpo a las células infectadas por virus?

Aquí es donde entran en acción los linfocitos citotóxicos, estas son células especializadas que se encargan de detectar y

eliminar células infectadas por microorganismos intracelulares como los virus.

Y si te preguntas ¿Cómo lo hacen? La respuesta es que hay dos caminos por los cuales los linfocitos citotóxicos reconocen y eliminan a células infectadas, estos son:



Primero, la vía directa donde se une el linfocito con la célula infectada para darle “el beso de la muerte”. Esta es la destrucción directa, donde el linfocito expulsa componentes que rompen la superficie de la célula infectada. Estos componentes llamados perforinas tienen la función de desequilibrar a la célula y provocar lo mismo que cuando se llena demasiado un globo con agua, pero a diferencia de un globo, la célula se fragmenta como diminutas esferas que posteriormente serán fagocitadas por las células inmunitarias. También hay otros componentes como las proteínas llamadas granzimas, las cuales provocan que, al interior de la célula infectada, se dé la orden para que se detengan todos los procesos metabólicos que se estén llevando a cabo y empiece a fragmentarse la célula infectada, de igual manera que con las perforinas.

La segunda es la vía indirecta, donde, por medio de citocinas, se les indican a

las células infectadas que detengan todo proceso y activen la vía de muerte celular. Esto de igual manera conduce a la célula a ser fagocitada y eliminada del cuerpo por células inmunes.

Así es como el sistema inmune y en especial los linfocitos citotóxicos tienen un amplio repertorio de posibilidades para detectar y destruir células infectadas. Sin embargo, hasta años recientes no se prestaba mucha atención a todos los elementos del sistema inmune, por ejemplo, tradicionalmente para conocer si las vacunas eran efectivas, se medía el incremento de anticuerpos y se creía que, a mayor incremento, mayor protección. Pero en los últimos años se ha demostrado que el incremento de los linfocitos citotóxicos también es importante para brindar protección antiviral. Esto ha cobrado relevancia porque entonces se incluye a las células citotóxicas como un indicador de protección, además de los anticuerpos.

Entender como funciona nuestro sistema inmune ante una infección viral, es un paso importante para la creación de mejores medicamentos y para el desarrollo de nuevas vacunas contra los múltiples virus que afecta la salud pública de animales y humanos.

Referencias

- León J. SARS-CoV-2 y sistema inmune una batalla de titanes. Horizonte Médico (Barcelona) [Internet]. 2020; 20(2):e1209. Available from: <http://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/1209/755%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emexb&NEWS=N&AN=2007125863>
- Tello-Lafoz M. Un fuerte apretón de manos con el cáncer. Immunity [Internet]. 2021;4(5):4–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8119359/>
- Dhawan M, Rabaan AA, Fawarah MM Al, Almuthree SA, Alsubki RA, Alfara AH, et al. Updated Insights into the T Cell-Mediated Immune Response against SARS-CoV-2: A Step towards Efficient and Reliable Vaccines. Vaccines [Internet]. 2023;11(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/11/1/101>

Response of lymphocytes from pigs naturally infected with porcine respiratory disease complex at 3 different stages of development

Rosa Elvira Nuñez-Anita, Fernando Calderón-Rico, Francisco Pérez-Duran,
María Concepción Arenas-Arrocena, Alicia Gabriela Zamora-Avilés, Luis Enrique Franco-Correa,
Alejandro Bravo-Patiño, Ilane Hernández-Morales

Abstract

The objective of this study was to analyze the response of lymphocytes from pigs naturally infected with porcine respiratory disease complex (PRDC) at 3 different stages of development. Porcine respiratory disease complexes were isolated from 2 groups: The infected group, consisting of pigs with PRDC and no vaccination against any virus ($n = 24$), and the control group, consisting of vaccinated and noninfected piglets ($n = 24$). Both groups were sampled at 3 stages of development: Weaning (WEA) ($n = 8$), initiation (INI) ($n = 8$), and growth (GRO) ($n = 8$). The PRDC status was confirmed by serological testing against porcine circovirus type 2 (PCV-2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine influenza virus (H1N1), and *Mycoplasma hyopneumoniae*. PCV-2+ cells were quantified by flow cytometry. Weight gain was registered at each stage. PCV-2+ cells, CD4+ cells, monocytes and lymphocytes populations were measured. Gene expression in CD4+ cells was quantified for interferon- γ (IFN- γ), GATA binding protein 3 (GATA3), T-box transcription factor (T-bet), interleukin-10 (IL-10), and IL-4. Control piglets gained approximately 35% more weight than those infected with PRDC. Specifically, PCV-2+ cells were detected in piglets from the infected group in the following proportions: WEA $\leq$ INI $\leq$ GRO. In infected piglets, the CD4+ count increased at WEA and decreased at GRO, CD4+ expression profile showed an overexpression of T-bet at INI and GRO, and the expression of IFN- γ was lower at WEA and GRO. In contrast, IL-4 was overexpressed at all 3 stages. GATA3 was overexpressed at INI and GRO. The infected piglets showed lymphopenia and less CD4+ cells. CD4+ cells showed a different expression profile than the control group, in which IFN- γ was less expressed, whereas IL-4 and T-bet were overexpressed.

Résumé

L'objectif de cette étude était d'analyser la réponse des lymphocytes de porcs naturellement infectés par le complexe respiratoire porcin (PRDC) à trois stades de développement différents. Des PRDC ont été isolés à partir de deux groupes : le groupe infecté, composé de porcs atteints de PRDC et non vaccinés contre un virus ($n = 24$), et le groupe témoin, composé de porcelets vaccinés et non infectés ($n = 24$). Les deux groupes ont été échantillonnés à trois stades de développement : sevrage (WEA) ($n = 8$), initiation (INI) ($n = 8$) et croissance (GRO) ($n = 8$). Le statut de PRDC a été confirmé par des tests sérologiques contre le circovirus porcin de type 2 (PCV-2), le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), le virus de la grippe porcine (H1N1) et *Mycoplasma hyopneumoniae*. Les cellules PCV-2+ ont été quantifiées par cytométrie en flux. Un gain de poids a été enregistré à chaque étape. Les populations de cellules PCV-2+, de cellules CD4+, de monocytes et de lymphocytes ont été mesurées. L'expression génique dans les cellules CD4+ a été quantifiée pour l'interféron- γ (IFN- γ), la protéine de liaison GATA 3 (GATA3), le facteur de transcription T-box (T-bet), l'interleukine-10 (IL-10) et l'IL-4. Les porcelets témoins ont pris environ 35 % de poids en plus que ceux infectés par le PRDC. Plus précisément, des cellules PCV-2+ ont été détectées chez les porcelets du groupe infecté dans les proportions suivantes : WEA $\leq$ INI $\leq$ GRO. Chez les porcelets infectés, le nombre de CD4+ a augmenté à WEA et diminué à GRO, le profil d'expression de CD4+ a montré une surexpression de T-bet à INI et GRO, et l'expression d'IFN- γ était plus faible à WEA et GRO. En revanche, l'IL-4 était surexprimée aux trois stades. GATA3 était surexprimé à INI et GRO. Les porcelets infectés présentaient une lymphopénie et moins de cellules CD4+. Les cellules CD4+ ont montré un profil d'expression différent de celui du groupe témoin, dans lequel l'IFN- γ était moins exprimé, tandis que l'IL-4 et le T-bet étaient surexprimés.

(Traduit par Docteur Serge Messier)

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km. 9.5 S/N carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58893, La Palma, Tarímbaro, Michoacán, México (Nuñez-Anita, Calderón-Rico, Pérez-Duran, Zamora-Avilés, Franco-Correa, Bravo-Patiño); Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, Bv. UNAM No. 2011, Predio el Sauccillo, Comunidad Los Tepetates, El Potrero, León, Guanajuato, México (Arenas-Arrocena, Hernández-Morales).

Address all correspondence to Dr. Rosa Elvira Nuñez-Anita; telephone: +52-443-146-4030, email: rosa.arita@unich.mx

Supplementary material is available online from: www.canadianveterinarians.net

Drs. Rosa Elvira Nuñez-Anita and Fernando Calderón-Rico contributed equally to this work.

Received August 23, 2022. Accepted November 20, 2022.

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is present in the pig industry as a persistent virus. The mechanisms by which it remains in healthy animals and can reemerge to be infective are not known. We believe that cells of the immune system could be compromised and favor persistence.

Porcine circovirus type 2 (PCV-2), a member of the family *Circoviridae*, is the smallest known non-enveloped, single-stranded, circular DNA virus (1). Two types of PCV are now recognized. Porcine circovirus type 1 is considered to be nonpathogenic (2,3) and PCV-2 is associated with porcine circovirus-associated disease (PCVAD) (4,5).

Porcine circovirus-associated disease (PCVAD) is a pathology caused by the association of 2 or more diseases, including porcine respiratory disease complex (PRDC) (6–8). Porcine respiratory disease complex is caused by a set of viral and bacterial pathogens and environmental stressors, such as stress during the production process (9,10). Primary agents, consisting of viruses and bacteria, evade the normal mechanisms of the innate immune response and colonize the nasal cavity or tonsils to spread to the lungs (10,11). This process predisposes the entry of opportunistic viruses and bacteria, known as secondary agents, that cause severe health complications and decrease in weight gain (7,12,13).

Primary agents include viruses such as porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRSV), swine influenza virus (SIV), pseudorabies virus (PRV), porcine circovirus type 2 (PCV-2), and possibly porcine respiratory coronavirus (PRCV). Bacterial agents include *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Opportunistic or secondary agents vary but most commonly include *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis*, and *Aeromonas hydrophila* (11).

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) appears most frequently as a subclinical infection. One of the obvious signs of infection is the progressive loss of weight or reduction in weight gain (14). Porcine circovirus type 2 affects pigs at all stages of development, particularly those in the initiation to growth stages, which range from 4 to 16 wk of age. These pigs show marked signs of disease and even increased mortality (15). Piglets 6 to 18 wk of age are the most affected and show clinical signs, especially during transition from the late-nursery to mid-finishing stage, although these clinical signs are related to secondary infections.

These observations have been confirmed in pigs experimentally infected with PCV-2, in which common clinical signs include inflammation of lymph nodes, growth retardation, lymphopenia, and pale-ness or jaundice, although the disease is aggravated by secondary microbial infections (16). Secondary pathogens appear to increase the replication and pathogenesis of PCV-2. Pigs are frequently coinfect- ed with PCV-2 and PRRSV. Moreover, PRRSV increases and potentiates the effects associated with PCV-2, such as lesions in different lymphoid organs, and increases viremia (7,17). In contrast, PCV-2 does not affect the viral load of PRRSV (18).

The most common route of infection with PCV-2 is *via* oro-nasal secretions. Vertical transmission has been demonstrated by monitoring experimental intranasal infections in pregnant sows (15). In

adult pigs, PCV-2 target cells are the macrophages (19), although B-lymphocytes and CD4+ T-lymphocytes can also be infected (20). Porcine circovirus type 2 can persist in the tonsils for several years (21–24). The mechanisms behind this immune evasion strategy are not well understood (24), but it might be through the impairment of lymphocyte functions.

Many viruses evade the host immune response, interfering with interferon- γ (IFN- γ) expression and the IFN- γ signaling pathway. For instance, during HIV infection, CD4+ infected cells produce more IL-10 and less IFN- γ , presumably by overexpressing T-box transcription factor (T-bet) (25). T-bet is a T-helper type 1 (Th1)-specific transcription factor that increases IFN- γ production in Th2 cells, represses the expression of Th2 cytokines, and directly activates IFN- γ activity. It was initially proposed that T-bet was induced by interleukin-12 (IL-12) and signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) activation in order to inhibit GATA binding protein 3 (GATA-3) and to act as a master switch for the development of Th1 cells.

Other studies have shown that T-bet expression during T-cell activation was dependent on IFN- γ and STAT4, but was independent of STAT4 (26). Some authors agree that Th1 expresses IFN- γ , which directly regulates IFN- γ expression (27–30). At present, the participation of T-bet transcription factor and its relationship with IFN- γ expression in CD4+ cells have not been studied in the context of PRDC.

In this study, we evaluated the response of lymphocytes in the context of pigs naturally infected with PRDC during the weaning, initiation, and growth stages of development at a commercial farm. The objective was to assess the changes in lymphocyte counts and to reveal a possible dysregulation in the expression of cytokines and transcription factors from CD4+ cells.

Materials and methods

Animals

Twenty-four pigs were randomly selected from a PCV-2-infected farm (infected group) and 24 pigs from a PCV-2-free farm were randomly selected as controls. Each group consisted of 8 pigs at the following stages of development: 4-week-old piglets were at the weaning stage (WEA) (1 to 4 d before weaning); 8-week-old pigs were at the initiation stage (INI); and 12- to 14-week-old pigs were at the growth stage (GRO). The control pigs were also divided ($n = 8$) according to the same 3 stages of development.

Blood samples

Blood samples were taken from the jugular vein, from which 15 mL of peripheral blood were obtained with 2% 0.5 M EDTA and without EDTA and put into Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). All animals were individually weighed before blood collection.

Animal handling and sampling were conducted according to the guidelines of the Animal Care and Use Program [National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA] and the Mexican Official Standard NOM-066-ZOO-1999. The study protocol #IIQB-CIBE-05-2017 was approved by the Institutional

Research Ethics Committee at the Institute of Biological Chemical Research and Michoacan University of San Nicolas de Hidaigo (IUBQ-UMSNH).

Immunodetection of microorganisms associated with porcine respiratory disease complex

Four serum samples per group from the PCV-2-infected farm were sent to a certified laboratory (Department of Swine Medicine and Zootechnics, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Coyoacán, Mexico) for detection of microorganisms associated with PRDC. Specifically, the presence of PRRSV, PCV-2, and *M. hyopneumoniae* were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). H1N1 and H3N2 swine influenza viruses were assessed by hemagglutination.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by density gradient separation using Lymphoprep (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia) according to the manufacturer's standard procedure. Briefly, blood samples were diluted 1:2 (vol:vol) in phosphate-buffered saline/2% fetal bovine serum (PBS/2% FBS), then centrifuged at $800 \times g$ for 30 min. Samples were then transferred to a conical tube, washed twice with PBS/2% FBS and centrifuged at $150 \times g$ for 8 min. Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was then added and incubated at room temperature for 5 min.

The cell pellet was resuspended in PBS and cell concentration was determined using a Neubauer hemocytometer chamber. The cells obtained were separated into 4 groups. The first group for quantification of monocytes and lymphocytes from PBMCs by flow cytometry; the second group for quantification of CD4+ cells by flow cytometry; the third group for immunodetection and quantification of PCV-2+ cells by flow cytometry; and the fourth group for isolation of CD4+ cells by positive selection using MicroBeads for total RNA isolation.

Flow cytometry. Samples were acquired on an Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). The flow cytometer was equipped with 405- and 488-nm lasers and emission filter for fluorescein isothiocyanate (FITC) (BLI: 530/30). The cytometer was routinely calibrated with Attune NxT setup and tracking beads (Lot 1759476A; Thermo Scientific). A minimum of 10 000 events in the intact cells gate was collected for each sample.

Quantification of monocytes and lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (1×10^6 cells/mL) were fixed with 3.4% paraformaldehyde, stored at 4°C, then washed twice with PBS and resuspended in PBS for flow cytometry assessment. Gating was conducted as shown in the Supplementary Material. The general workflow is depicted in Supplementary Figure 1 (All supplementary material is available online from: www.canadianveterinarians.net). Single cells were gated based on forward scatter area (FSC-A) and forward scatter height (FSC-H) properties, followed by intact cells based on side scatter area (SSC-A) and FSC-A (Supplementary Figure 2-A). Cell subtypes were identified as monocytes or lymphocytes based on their FSC-A and SSC-A properties (Supplementary Figure 2-B).

Quantification of CD4+ cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (1×10^5) were fixed with 3.4% paraformaldehyde, washed twice with PBS, and incubated with the primary anti-CD4+ antibody (Mouse Anti-pig; Bio-Rad, Hercules, California, USA) at a dilution of 1/84 in PBS/1% BSA for 1 h. After incubation, the cells were washed with PBS and incubated with the secondary anti-mouse IgG-FITC antibody (Goat Anti-mouse IgG-FITC; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) at a dilution 1/84 in PBS/1% BSA for 1 h. Finally, the cells were washed with PBS and resuspended in 500 μ L of PBS.

Gating was carried out in the same manner as described previously for the quantification of monocytes and lymphocytes (Supplementary Figure 2). Lymphocytes were further subtyped as lymphocyte T-helper cells CD4+, based on surface antigen expression (Supplementary Figure 3). The fold change was calculated from median fluorescence intensity (MFI) values of control cells to MFIs of each sample for each identified PBMC subtype.

Detection and quantification of PCV-2+ cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were fixed with 3.4% paraformaldehyde, then labelled with an anti-PCV-2-FITC antibody (VMRD; Pullman, Washington, USA) at a dilution 1/50 in PBS-0.03% Triton and incubated overnight, protected from light. The cell suspension was washed twice with PBS-0.03% Triton and resuspended in PBS. The PCV-2+ cells were quantified with 10 000 cells per count.

Cell gating was carried out as described previously. Lymphocytes were further subtyped as lymphocytes PCV-2+, based on antigen expression (Supplementary Figure 4). The fold change was calculated as described previously. The analysis was carried out with FlowJo Vol.10 Software (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Duplicated measurements of each sample were analyzed to assess the precision of the multiplexed assay. Median fluorescence intensity (MFI) values of target antibodies against each CD4+ or PCV-2 antigen were normalized against their respective control samples. Coefficient of variation (CV) values were calculated based on the normalized duplicated values.

Isolation of CD4+ lymphocytes

For CD4+ isolation, 10×10^6 fresh PBMC were centrifuged at $150 \times g$ for 5 min and the cell pellet was resuspended in PBS/1% BSA containing a dilution 1/286 of Mouse Anti-pig CD4+ (Bio-Rad). The reaction was incubated for 1 h at 4°C and the suspension was then washed twice with PBS and centrifuged at $150 \times g$ for 5 min. The cell pellet was resuspended in 1 mL of PBS/1% BSA with 20 μ L of Goat Anti-mouse IgG (MicroBeads; Miltenyi Biotec) and incubated for 1 h at 4°C. The suspension was washed twice with 1 mL of PBS, centrifuged at $150 \times g$ for 5 min, and resuspended in 1 mL of PBS/1% BSA. The cell suspension was transferred to a magnetic MS Column Adapter (Miltenyi Biotec) where the CD4+ cells were isolated by positive selection.

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

Ribonucleic acid (RNA) was purified from approximately 1×10^4 CD4+ cells using the Quick-RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, California, USA), following manufacturer's specifications. The quantity and quality of the RNA was assessed in the NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Table 1. List of primers and oligonucleotide sequences.

Gen	Forward/reverse oligonucleotide sequence	Amplicon (pb)	Alignment temperature (°C)	Reference sequence (NCBI)
GAPDH	F: CTCACGGGAAGCTCACTGG R: CACAACCTGGTGTCTCAGTGT	177	60	AF017079
T-bet	F: GCCTGGACCCAACTGTCAA R: GAATGCAGGCTTCATGCTGA	199	60	AY435216.1
IFN- γ	F: GCTCTGGGAACCTGAATGAC R: TCTCTGGCCTTGAACATA	167	60	NM_213948
GATA3	F: TGGGGGCTCTACCAAAAAT R: TCGGTTCTGGTCTGGATGC	240	58	NM_001044567.1
IL-4	F: GTCTGCTTACTGGCATGTACCA R: GCTCCATGCACGAGTTCTTTCT	118	64	NM_214123.1
IL-10	F: AGCCAGCATTAAAGTCTGAGAA R: CCTCTCTGGAGCTTGCTAA	394	60	L20001.1 NM_214041.1

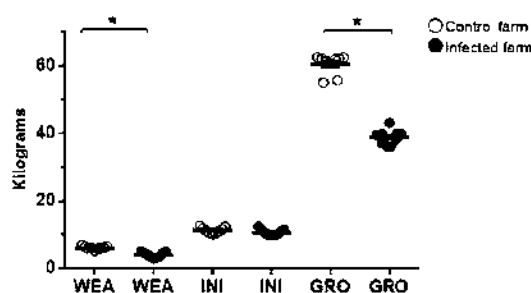


Figure 1. Weight of pigs (N = 54) from the control farm (n = 27) and the infected farm (n = 27) divided according to the following 3 stages of development (n = 9): weaning (WEA), initiation (INI), and growth (GRO). Bars indicate the mean of 9 individual subjects and the error bars represent the standard error of the mean (SEM). Data are presented as mean + SEM. Statistically significant differences were determined by Student's t-tests.

* $P < 0.05$.

Reverse transcription (RT) was carried out using the RevertAid First-strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), following manufacturer's instructions.

The expression profile of IFN- γ , GATA3, T-bet, IL-4, and IL-10 was evaluated by quantitative real-time PCR (qPCR). The reference gene used was porcine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The primer sequences are listed in Table 1. Primers have been described in previous studies for GAPDH and IFN- γ (31), T-bet (32), GATA3 (33), IL-4 (34), and IL-10 (35).

The PCR reaction mix was prepared in a final volume of 12.5 μ L containing 6.5 μ L per reaction of TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio, Carlsbad, California, USA) at a final concentration of 1 $\times$, 2 μ L of forward and reverse primers (10 μ M), and 60 ng/ μ L of cDNA using 2 μ L per reaction. The amplification conditions used were initial denaturation for 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of dena-

tization for 15 s at 95°C, alignment for 30 s at 60°C, and elongation for 30 s at 70°C.

The qPCR reaction was run in the CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) using SYBR Green as a marker for DNA amplification. The relative fold gene expression of each gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (36).

Statistical analysis

Statistical differences between infected and noninfected groups were assessed by 1-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post-hoc* test, for which P -values < 0.05 were considered statistically significant. Student's *t*-test was used to evaluate differences in weight between infected and noninfected animals for each experimental group. GraphPad Prism software (Version 6.01; GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used for data analysis and graph generation.

Results

Porcine respiratory disease complex confirmation and weight gain

Animals in both the infected and control group were weighed at each stage of development. There were no significant changes at the weaning (WEA) and initiation (INI) stages in pigs from both groups. Pigs at the growth (GRO) stage from the infected farm showed less weight gain (Figure 1), which agrees with the findings of other authors (14,37).

Results of ELISA and hemagglutination tests demonstrated that pigs from the infected farm were coinfecting with PCV-2 (Figure 2 A), PRRSV (Figure 2 B), and H1N1 (Figure 2 C). Pigs at the INI and GRO stages were positive for *M. hyopneumoniae*, whereas those at the WEA stage were negative (Figure 2 D). Finally, all samples tested negative for H3N2 (Figure 2 E).

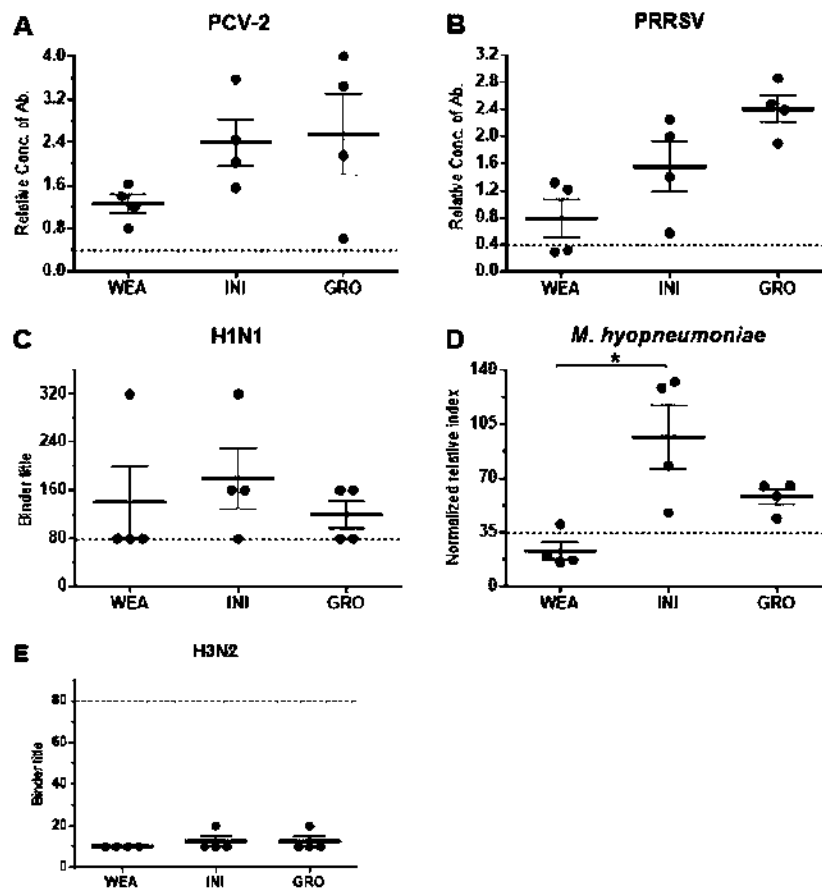


Figure 2. Detection of coinfections related to PRCD at the infected farm. ELISA and hemagglutination antibody detection from serum of pigs (N = 12) divided (n = 4) according to the following 3 stages of development: weaning (WEA), initiation (INI), and growth (GRO). (A) PCV-2, (B) PRRSV, (C) H1N1, (D) *M. hyopneumoniae*, and (E) H3N2. PCV-2, PRRSV, and *M. hyopneumoniae* were determined by ELISA. H1N1 and H3N2 were determined by hemagglutination inhibition. The dotted line represents the limit of detection for positive samples (below the dotted line was considered a negative result). Data are presented as mean ± SEM. Statistically significant differences were determined by individual Student's t-tests.

* P < 0.05.

Further fluorescence-activated cell sorting assays using PBMCs confirmed that infected pigs were positive for the PCV-2 E2 capsid antigen and showed PCV-2+ cells at all stages of development. The concentration of positive cells increased according to the stage of development, with pigs at the WEA stage showing the lowest concentration and those at the GRO stage showing the highest (Figure 3). In contrast, noninfected pigs did not show any PCV-2+ cells.

It was also observed that populations of monocytes and lymphocytes differed according to the stage of development and PCV-2 infection. Monocytes and lymphocytes in PBMCs from infected and noninfected pigs were quantified by flow cytometry to evaluate the effect of PRDC infection and the stage of development on the popu-

lation proportion. Monocytes increased significantly at the WEA stage in infected pigs compared to pigs in the control group. On the contrary, there was no statistical difference ($P < 0.05$) between the 2 groups at the INI and GRO stages (Figure 4 A). For lymphocytes, lymphopenia was observed at the WEA and INI stages in the infected group compared to the control. There was no difference in either the infected or the control group (Figure 4 B).

Concentration of CD4+ cells was different at each stage of development in the context of porcine respiratory disease complex infection

CD4+ cells from all pigs at each stage of development were quantified by flow cytometry to evaluate the changes in cell concentration

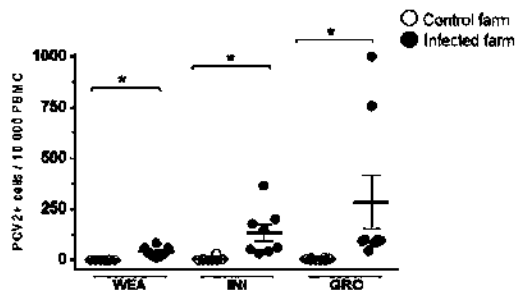


Figure 3. Quantification of PCV-2+ cells at different stages of development. PCV-2+ cells from samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were determined by flow cytometry using an anti-PCV-2-FITC antibody. PBMCs isolated from pigs (N = 48) from the control farm (n = 24) and the infected farm (n = 24) were divided according to the following 3 stages of development (n = 8): weaning (WEA), initiation (INI), and growth (GRO). Data are presented as mean and error bands represent the + SEM. Statistically significant differences were determined by Student's t-tests.

* $P < 0.05$.

related to PRDC infection. Compared to pigs in the control group, infected pigs showed a higher concentration of CD4+ cells at the WEA stage, no changes at the INI stage, and a lower concentration of cells at the GRO stage ($P < 0.05$) (Figure 5).

CD4+ cells from infected pigs presented a dysregulation in the expression of transcription factors and pro-inflammatory cytokines

We quantified the expression of the transcription factors T-bet and GATA3 and cytokines IFN- γ , IL-4, and IL-10 genes from CD4+ lymphocytes isolated from pig blood (Figure 6). In the infected pigs, the expression of T-bet did not change at the WEA stage, whereas it was overexpressed at the INI and GRO stages (Figure 6 A). The expression of GATA3 was equal to that of pigs in the control group at the WEA stage. Although GATA3 was overexpressed in infected pigs at the INI and GRO stages compared to pigs in the control group, the relative mRNA concentration was not higher than the 2-fold-change threshold (Figure 6 D).

IFN- γ expression was significantly lower at the WEA and GRO stages and did not vary at the INI stage ($P < 0.05$) (Figure 6 C). IL-4 was overexpressed only at the INI and GRO stages ($P < 0.05$) (Figure 6 B). There was no differential gene expression of IL-10 at the WEA stage in pigs in the control group. In contrast, a lower expression was observed at the INI and GRO stages ($P < 0.05$) (Figure 6 E).

Discussion

We evaluated the response of lymphocytes in the context of pigs naturally infected with PRDC during the weaning (WEA), initiation (INI), and growth (GRO) stages of development at a commercial farm. It was confirmed by antibody quantification with ELISA test that pigs from the infected farm showed coinfections corresponding to PRDC.

Infected pigs were positive to PCV-2 at all 3 stages of development. As a result, the findings from the experiments are discussed

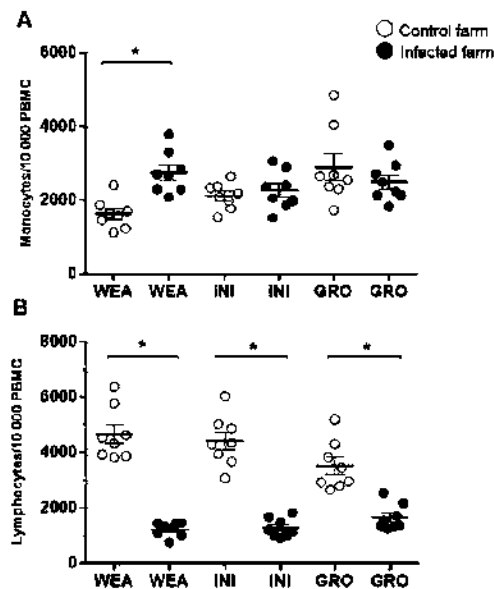


Figure 4. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) populations isolated from blood. Different cell populations were characterized by flow cytometry separation, according to size and complexity. (A) Monocytes, (B) Lymphocytes. Data are presented as the mean of 8 animals (n = 8) and error bars represent the + SEM. Statistically significant differences were determined by Student's t-tests.

* $P < 0.05$.

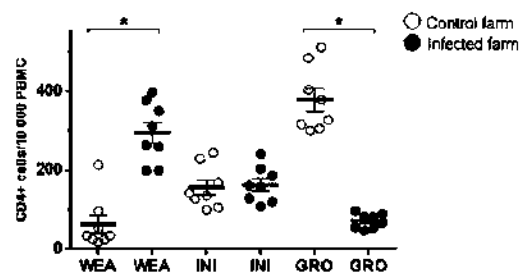


Figure 5. CD4+ cell population at different stages of development at the infected farm and the control farm. CD4+ cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were quantified by flow cytometry using an anti-CD4-FITC antibody. Data are presented as mean + SEM and statistically significant differences were determined by Student's t-tests.

* $P < 0.05$.

here based on the presence of PCV-2 antibodies and PCV-2+ cells. In addition, antibodies against PRRSV, H1N1, and *M. hyopneumoniae* were noted in infected pigs at the INI and GRO stages. Coinfections with these microorganisms compromise the immune response, weakening the adaptive immune response.

Porcine respiratory disease complex (PRDC) contributes to dysfunction in the nutritional and growth needs, which causes the animal's health to deteriorate in the long term (7,38). For example,

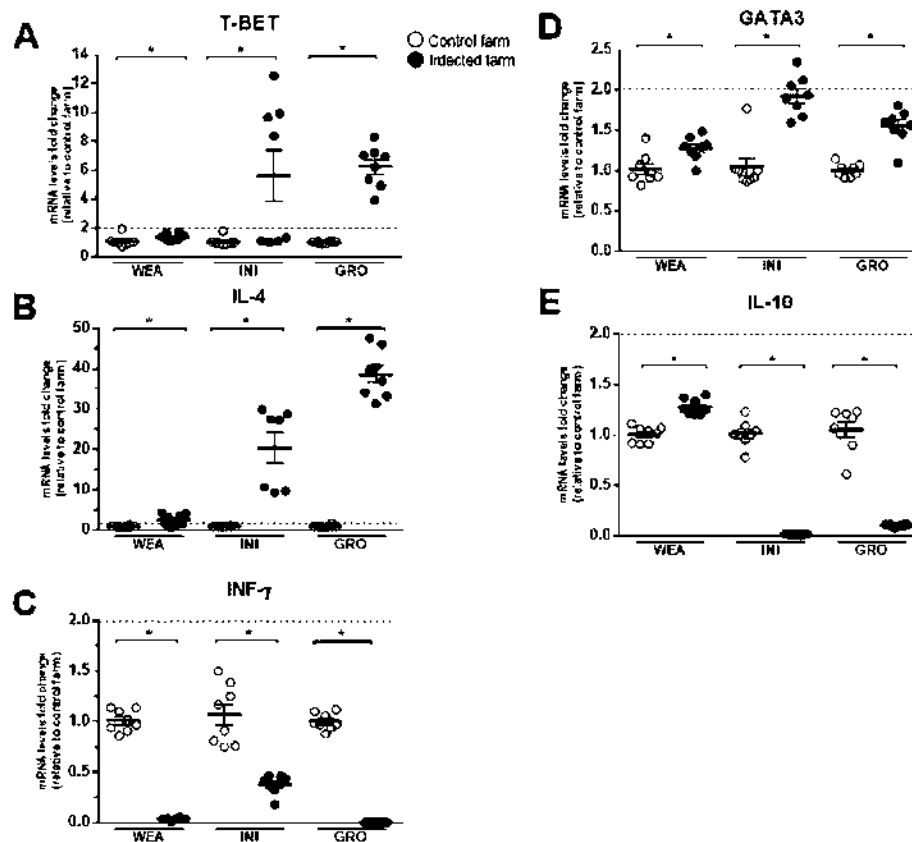


Figure 6. Gene expression of CD4+ cells. The gene expression profile of CD4+ cells was evaluated by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). CD4+ cells were isolated from pigs (N = 48) from the control farm (n = 24) and the infected farm (n = 24) and divided according to the following 3 stages of development (n = 8): Weaning (WEA), initiation (INI), and growth (GRO). (A) T-BET, (B) IL-4, (C) INF- γ , (D) GATA3, (E) IL-10. Data are presented as mean and error bands represent the $\pm$ SEM. Dotted line represents the limit of overexpression gene. Statistically significant differences were determined by Student's t-tests.

* $P < 0.05$.

PCV-2 infects intestinal epithelial cells, disturbing the correct absorption of nutrients and causing diarrhea (24). Other authors have reported coinfections with these pathogens within PRDC, but there is a lack of studies evaluating the degree of impairment of the immune response in experimental or field coinfections (7,39). In our study, weight gain was measured at the 3 stages of development in both groups. Pigs in the infected group showed less weight gain, but only at the GRO stage. The reason for this has yet to be studied.

Monocyte and lymphocyte populations were compared at the 3 stages of development. The results showed that the number of monocytes increased in the infected group at the WEA stage compared to the control, which confirms that the immune response was active during PRDC. Results from an experimental infection of pigs with PCV-2 demonstrated an increase in the monocyte

population (35). Although the mechanisms by which PCV-2 infection induces proliferation of monocytes are not known, it is probably related to anti-apoptotic signals and anti-inflammatory cytokines induced by the virus to favor viral infection (38). Our results confirm that natural infection with PRDC induces monocytosis at the WEA stage of development.

Regarding the lymphocyte population, a marked lymphopenia was observed at all 3 stages of development (Figure 4 B). In contrast, the monocyte population increased at WEA, but remained normal at the INI and GRO stages (Figure 4 A). The lower lymphocyte count correlates with the clinical signs, which were growth retardation, diarrhea, icterus, deterioration, and signs of tiredness. Previous experiments have demonstrated a decrease of B- and T-lymphocytes during the peak of PCV-2 replication, which shows the cellular

immunological compromise (40). Our study is the first to report the population dynamics of lymphocytes at each stage of development in pigs naturally infected with PRDC.

It was determined by flow cytometry that infected pigs were positive for PCV-2 antibodies and PCV-2+ cells at all 3 stages of development. PCV-2 is one of the primary agents in PRDC and it can infect circulating lymphocytes. PCV-2-infected cells have been detected in the heart, lungs, liver, spleen, and inguinal lymph nodes. In addition, PCV-2 replication has been predominantly and consistently demonstrated in lymphoid tissues, with viral antigens and nucleic acid consistently localized in cells with monocyte/macrophage morphology and sporadically in other cell types morphologically characterized as hepatocytes, enterocytes, alveolar, biliary, pancreatic ductular and renal tubular epithelial cells, vascular endothelial cells, lymphocytes, muscle cells, fibroblasts, neurons, and oligodendrocytes. Viral antigens were localized predominantly in the cytoplasm of the infected cells. PCV-2-antigens were rarely observed in the nucleus of cardiomyocytes, hepatocytes, and macrophages (19).

As mentioned previously, pigs from the infected farm were positive for several pathogens corresponding to PRDC. Serologies confirmed coinfection with PRRSV at all 3 stages, with H1N1 at the INI stage and with *M. hyopneumoniae* at both the INI and GRO stages. Furthermore, the cytokine expression profile of lymphocytes was evaluated in the context of an immune response to PRDC. We consider that analyzing lymphocytes could provide information in the context of a specific PCV-2 infection because, although uncommon, lymphocytes can be infected by PCV-2 and there is no evidence of PRRSV infecting these cells. PRRSV normally infects pulmonary alveolar macrophages as well as other cells of the monocyte/macrophage lineage, which later could disseminate the virus to other tissues or support replication to release viral particles into the bloodstream (41). As a result, it is unlikely to see PRRSV-infected lymphocytes. Subsequent studies should confirm coinfection of lymphocytes with PCV-2 and PRRSV in order to evaluate changes in cytokine expression or dysregulation of immune response effector pathways.

The other viruses target different cells and are therefore unlikely to be found inside lymphocytes. Swine influenza A viruses (IAV-S) target epithelial cells of the entire respiratory tract, replicating primarily in the lungs. As virus replication is restricted to the respiratory tract, virus transmission occurs only *via* the respiratory route (40), whereas *M. hyopneumoniae* is primarily found on the mucosal surface of the trachea, bronchi, and bronchioles (42).

PCV-2+ cells were quantified by flow cytometry (Figure 2) and were observed at different concentrations at all stages in pigs in the infected group. A higher number of infected cells were measured at the INI and GRO stages and at a lower concentration at the WEA stage. The data suggest that the number of infected cells is maintained at the GRO stage.

In contrast, no PCV-2+ cells were detected at any stage in pigs in the control group. The animals were also positive to PCV-2 antibodies. It is therefore possible that the infection could have been present for several weeks and PCV-2+ cells could indicate viral persistence. PCV-2+ cells were determined by antigen staining in permeabilized cells, which indicates viral active replication, as has been described in a previous study (42).

We quantified the CD4+ lymphocyte population as an indicator of the status of the immune response in the context of natural PRDC infection. In addition, we correlated the CD4+ count with PCV-2+ cells because PCV-2 could be found infecting circulating lymphocytes and PCV-2 antibodies and PCV-2+ cells were present at all 3 stages of development. The results showed that CD4+ lymphocytes increased at all 3 stages in the control group, whereas the population of lymphocytes decreased in the infected group, with no changes observed at the INI stage.

On the one hand, these data suggest that the increase in the CD4+ population at the WEA stage could be the pig's natural adaptive response to the virus as has been reported for other viruses such as influenza A virus (H1N2), for which pigs are the natural host (38). On the other hand, since there was an increase in infected cells at the INI stage (Figure 2), it could be promoting viral replication in CD4+ cells, which could be associated with the lytic cycle of the virus.

Finally, our data showed that the significant increase in PCV-2+ cells at the GRO stage coincided with decreased CD4+ lymphocytes and overexpression of T-bet and IL-4 (Figures 3, 5, 6 A, and 6 B). This could be favoring the inhibition of IFN- γ expression, which is further discussed in the following paragraphs. This could be confirmed by conducting cytokine expression analysis of PCV-2+ CD4+ double positive lymphocytes.

The cytokine expression profile of CD4+ cells represent a biomarker of the immune response. Therefore, we studied the role of transcription factor T-bet in modulating IFN- γ expression in CD4+ cells. To our knowledge, this is the first study to assess the relationship of T-bet and IFN- γ expression at 3 different stages of development in pigs, in the context of PRDC. T-bet was overexpressed at the INI and GRO stages in the infected group compared to the control, whereas IFN- γ had diminished at all 3 stages.

These data suggest that cell differentiation towards the Th1 cell phenotype is stimulated. However, the low IFN- γ expression could be due to the presence of inhibitory elements in the IFN- γ promoter and may be favored by the presence of PCV-2. In this context, it has been reported that the NF- κ B pathway is compromised during PCV-2 infection. This pathway contains the transcription factor P50/P65, which displaces the inhibitor from the promoter region and favors the expression of IFN- γ (43).

One mechanism by which the virus could be compromising the NF- κ B pathway is by interfering with the inhibitor displacement and thereby inhibiting IFN- γ expression. Moreover, the inhibition of the promoter could also be compromised by the pathways related to the expression of IFN- γ , such as MAPK/ERK, and by favoring anti-apoptotic pathways, such as that related to the pathway for the expression of IL-4, as has been observed in both *in-vitro* and *in-vivo* infection models of PCV-2 (44–46).

The overexpression of T-bet that was observed suggests that the Th1 cellular phenotype is favored. However, repression of IFN- γ suggests that the pathways by which this cytokine is expressed are compromised. The expression level of GATA3 did not change in samples from both infected and noninfected pigs. This finding indicates that this balance in expression could be favoring the expression of T-bet. In addition, IL-4 overexpression was found during the INI and GRO stages, which could favor anti-apoptotic pathways.

Assays using PBMCs have demonstrated that IL-10 has an inhibitory effect on IFN- γ expression by modulating the IL-12 expression pathway (47). In addition, IL-10 downregulates the expression of IFN- γ by favoring the expression of the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) during the differentiation of regulatory T lymphocytes (48). IL-10 and SOCS1 participate in the cascade that triggers lymphocyte differentiation towards the T reg phenotype.

There was no significant difference in the expression of IL-10 at the WEA stage, although a decrease in IL-10 expression was observed in CD4+ cells at the IN1 and GRO stages. This suggests that the Treg phenotype is not related to IFN- γ inhibition at all 3 stages of development. We cannot rule out, however, that cells other than CD4+ could be expressing IL-10, which could influence the Treg population. Further studies evaluating the participation of genes related to the SOCS1 pathway could contribute to understanding the role of IL-10 in T lymphocyte response to PRDC.

In our results, the T-bet-T-box pathway was found to be dysregulated in CD4+ cells from pigs naturally infected with PRDC. This could favor IFN- γ repression at all 3 stages of early pig development. In our results, IL-4 overexpression was also found at 2 stages of development, IN1 and GRO. This could be associated with anti-apoptotic pathways and favor viral persistence. Dysregulation of the T-bet-T-box pathway will be studied in the future.

Although study herein was carried out in commercial pigs and at different levels of technification, both low and medium, the study has practical implications that could be relevant to understanding and rationalizing the development of protective or immunomodulatory vaccines to control PRDC infection in the near future.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT A1-S-43236). The authors thank Coordinación de la Investigación-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) (2019, 2020) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IA207519) for partial funding. We also thank the Proteomic and Cellular Bioengineering Unit, INFR-2015-01 255010 (CONACYT). Fernando Calderón-Rico received a fellowship grant from CONACYT (704097).

References

1. Lv QZ, Guo KK, Zhang YM. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*. 2014;49:1–10.
2. Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res* 2012;164:43–45.
3. Tischer J, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 1974;226:153–167.
4. Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: Porcine circovirus 2. *J Virol* 2009;83:12813–12821.
5. Noriega J, Reyes P, Bucarey S. Circovirus Porcino : Un virus pequeño que genera un gran problema Porcine Circovirus : A small virus that causes a great problem. *Av en Ciencias Vet*. 2007;22:62–71.
6. Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J*. 2003;166:251–256.
7. Saade G, Deblanc C, Bougon J, et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet Res* 2020;51:1–19.
8. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Heal Res Rev* 2005;6:119–142.
9. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* 2010;143:120–131.
10. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2002;17:551–565.
11. Brockmeier S, Halbur P, Thacker F. Porcine respiratory disease complex. In: Brogden K, Guthmiller J, eds. *Porcine Respiratory Diseases*. Washington (DC): ASM Press, 2002.
12. Bochev I. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. 1. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. *Bulg J Vet Med* 2007;2:131–146.
13. Opiessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 2012;12:133–148.
14. López-Soria S, Sibila M, Nofarias M, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Vet Microbiol* 2014;174:296–301.
15. Opiessnig T, Prickett JR, Madson DM, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: Virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet Res* 2010;41:31.
16. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. *Circoviridae and Anelloviridae*. In: *Fenner's Veterinary Virology*. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017:259–268.
17. Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, et al. 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* 2001;38:528–539.
18. Park C, Oh Y, Seo HW, Han K, Chae C. Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:369–376.
19. Sanchez RE, Meerts P, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol* 2003;95:15–25.
20. Lin CM, Jeng CK, Chang HW, et al. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;124:355–366.
21. Horter DC, Yoon K, Zimmerman JJ. A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Anim Health Res Rev* 2003;4:143–156.
22. Kristensen CS, Hjuksaager CK, Larsen LE. A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free. *Porcine Health Manag* 2015;1:1–5.
23. O'Sullivan T, Friendship R, Blackwell T, et al. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. *Can J Vet Res* 2011;75:106–111.

24. Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 2012; 164:78–89.
25. Shete A, Suryawanshi P, Godbole S, Pawar J, Paranjape R, Thalar M. HIV-infected CD4+ T cells use T-bet-dependent pathway for production of IL-10 upon antigen recognition. *Scand J Immune* 2016;83:288–296.
26. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2002;3:549–557.
27. Agnello D, Lankford CSR, Bream J, *et al.* Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: New players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147–161.
28. Lord GM, Rao RM, Choe H, *et al.* T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* 2005;106:3432–3439.
29. Thieu VT, Yu Q, Chang H-C, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 2008;29:679–690.
30. Wang P, Wang Y, Xie L, *et al.* The transcription factor T-bet is required for optimal type 1 follicular helper T cell maintenance during acute viral infection. *Front Immunol* 2019;10:1–17.
31. Pilon C, Levast B, Meurens F, *et al.* CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Mol Immunol* 2009;46:437–447.
32. Dawson HD, Royase AR, Nishi S, *et al.* Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;100:105–111.
33. Gu W, Li CS, Yin WP, *et al.* Expression imbalance of transcription factors GATA-3 and T-bet in post-resuscitation myocardial immune dysfunction in a porcine model of cardiac arrest. *Resuscitation* 2013;84:848–853.
34. Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 2005;306:16–27.
35. Suradhat S, Thanawongnuweh R, Poovorawan Y. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003;84:453–459.
36. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinform Biomath* 2013;3:71–85.
37. Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008;26:3443–3451.
38. Tsai YC, Jeng CR, Hsiao SH, *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells in vitro. *Vet Res* 2010;41:1–12.
39. Qin S, Ruan W, Yue H, Tang C, Zhou K, Zhang B. Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China. *Sci Rep* 2018;8:13341.
40. Steiner E, Balmelli C, Gerber H, Summerfield A, McCullough K. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res* 2009;5:1–13.
41. Talker SC, Koinig HC, Stadler M, *et al.* Magnitude and kinetics of multifunctional CD4+ and CD8 β + T cells in pigs infected with swine influenza A virus. *Vet Res* 2015;46:1–16.
42. Zhu Y, Lau A, Lau J, Jia Q, Karuppanan AK, Kwang J. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology* 2007;369:423–430.
43. Sica A, Dorman L, Viggiano V, *et al.* Interaction of NF- κ B and NFAT with the Interferon- γ Promoter. *J Biol Chem* 1997;272:30412–30420.
44. Du Q, Huang Y, Wang T, *et al.* Porcine circovirus type 2 activates PI3K/Akt and p38 MAPK pathways to promote interleukin-10 production in macrophages via Cap interaction of gC1qR. *Oncotarget* 2016;7:17492–17507.
45. Gessani S, Belardelli F. IFN- γ expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:117–123.
46. Du Q, Wu X, Wang T, *et al.* PCV2 suppresses IL-12p40 induction via Cap/gC1qR-mediated miRNAs and signalings. *J Immunol* 2018;201:533–547.
47. Kekkarainen T, Montoya M, Mateu E, Segalés J. Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* 2008;89:760–765.
48. Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 2003;170:1383–1391.

ANEXO 4. GP52-PTC1



Make Research Easy

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name	GP52
Order ID	U5217FB070_11
Lot No.	U5217FB070-11/PE1705
Sequence	RLYRWRSVPVIGHLIDLKRVVRVSAEQWGRPC
Modification	N/A
Length	31AA
Storage	-20°C
Recommended Solvent*	Ultrapure water
comments	TFA salt

Test Items	Specifications	Results
Molecular Weight	Theoretical MW: 3747.40	Consistent
HPLC purity	≥95.0%	98.4%
Appearance	White lyophilized powder	Conforms
Gross Weight	9 mg	8*1.2mg

*Note: Above recommended solvents for reference only. If there is any request for detailed dissolution conditions, we suggest you choose our 'Peptide Solubility Test Service'.

Caution:

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by: 
Peptide Production Director Date: 04-12-2020

Thank you for your patronage to our Peptide services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: order@genscript.com

Web: www.genscript.com

ANEXO 5. GP5T3-PTC2



Make Research Easy

CERTIFICATE OF ANALYSIS

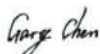
Product Name	GP5T3
Order ID	U5217FB070_1
Lot No.	U5217FB070-1/PE1695
Sequence	KGRLYRWRSVPIVEKLAALICFVIRLAKN
Modification	N/A
Length	29AA
Storage	-20°C
Recommended Solvent*	Ultrapure water
comments	TFA salt

Test Items	Specifications	Results
Molecular Weight	Theoretical MW: 3414.18	Consistent
HPLC purity	≥95.0%	98.0%
Appearance	White lyophilized powder	Conforms
Gross Weight	4 mg	4*1.0mg

*Note: Above recommended solvents for reference only. If there is any request for detailed dissolution conditions, we suggest you choose our 'Peptide Solubility Test Service'.

Caution:

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by: 
Peptide Production Director Date: 04-14-2020

Thank you for your patronage to our Peptide services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: order@genscript.com

Web: www.genscript.com

NOMBRE DEL TRABAJO

**Evaluación de la eficacia y potencia en la
activación de linfocitos citotóxicos con
péptidos de la p**

AUTOR

Fernando Calderón Rico

RECuento DE PALABRAS

16321 Words

RECuento DE CARACTERES

91897 Characters

RECuento DE PÁGINAS

91 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

13.1MB

FECHA DE ENTREGA

Sep 24, 2024 1:38 PM CST

FECHA DEL INFORME

Sep 24, 2024 1:39 PM CST

● **36% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 36% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 0% Base de datos de trabajos entregados
- 26% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	‘EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y POTENCIA EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS CON PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA GP5 DE PRRSV’	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Fernando Calderón Rico	1028153g@umich.mx
Director	Rosa Elvira Nuñez Anita	qfbrena com
Codirector	Alicia Irasema Mendieta Trejo	aliciairaser ail.com
Coordinador del programa	Omar Chassin Noria	omar.chassin@umich.mx

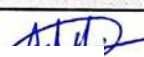
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (si/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	SI	Programa de generación de citas Mendeley

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Fernando Calderón Rico 
Lugar y fecha	Morelia Michoacán a 24 de septiembre del 2024.