



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Optimización de la inmunización con el prototipo vacunal BA71 Δ CD2 frente a la peste porcina africana y estudio de la respuesta inmune protectora inducida

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR UXÍA ALONSO ALONSO
PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTORA EN VETERINARIA
DENTRO DEL PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y
SANIDAD ANIMAL, DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA,

BAJO LA DIRECCIÓN DE

DR. FERNANDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ,
DR. JORDI ARGILAGUET I MARQUÈS
DR. FRANCESC ACCENSI I ALEMANY

Bellaterra, 2022



El **Dr. Fernando Rodríguez González** y el **Dr. Jordi Argilaguet i Marquès**, investigadores del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries - Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CRESA)* y **Dr. Francesc Accensi i Alemany**, profesor *agregat del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

Certifican:

Que la memoria titulada, “Optimización de la inmunización con el prototipo vacunal BA71ΔCD2 frente a la Peste Porcina Africana y estudio de la respuesta inmune protectora inducida”, presentada por **Uxía Alonso Alonso** para la obtención del grado de Doctora en Veterinaria, se ha realizado bajo nuestra supervisión y, considerándola acabada, autorizan su presentación para ser juzgada por la comisión correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Bellaterra, octubre de 2020

Director DR. FERNANDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Director DR. JORDI ARGILAGUET I MARQUÈS

Director DR. FRANCESC ACCENSI I ALEMANY

Este trabajo, incluyendo el contrato de Uxía Alonso Alonso para la realización del doctorado, ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MINECO) del gobierno España.

Referencia de la ayuda predoctoral: BES-2017-080708

Referencia del proyecto: AGL2016-7816-78160-C2-1-R

<i>ABREVIATURAS</i>	9
<i>RESUMEN</i>	15
<i>ABSTRACT</i>	21
<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	25
1. Peste Porcina Africana	27
1.1 Historia de la PPA	27
1.2 Situación actual de la PPA	29
1.3 Enfermedad y ciclo de infección	30
2. El virus de la Peste Porcina Africana	31
2.1 Estructura del VPPA.....	32
2.2 Ciclo de infección del VPPA.....	34
2.3 Interacción VPPA-célula diana	35
2.4 CD2v, una proteína multifuncional	37
3. Respuesta inmune frente al VPPA	39
4. Desarrollo de vacunas frente al VPPA	43
4.1 BA71 Δ CD2, una vacuna atenuada con capacidad cros-protectora	46
<i>II. OBJETIVOS</i>	49
<i>III. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	53
1. Células	55
1.1 Línea celular COS-1	55
1.2 Macrófagos alveolares porcinos (MAPs)	55
1.3 Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	56
1.4 Células de linfonodo (LN) submandibular	57
2. Cepas virales	58
2.1 BA71 Δ CD2	58
2.2 Georgia2007/1	59

3. Titulación viral	59
3.1 Titulación viral mediante la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)	60
3.2 Titulación viral mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	61
4. Protocolos de inmunización, infección y toma de muestras	62
5. Valoración de la respuesta inmunológica.....	65
5.1 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA mediante ELISA.....	65
5.2 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante ELISpot de IFN γ	65
5.3 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante citometría de flujo	66
5.4 Ensayo de Luminex Multiplex	70
6. Preparación de la librería y secuenciación de RNA (RNAseq)	70
7. Ensayo de PCR cuantitativa utilizando la tecnología “microfluídica”	71
8. Preparación de la librería y secuenciación de <i>single-cell RNA-sequencing</i> (RNA-seq)	72
9. Análisis bioinformático	73
9.1 RNA-seq de las muestras de PBMCs	73
9.2 scRNA-seq de las muestras de LN submandibular	74
10. Análisis estadísticos	75
<i>IV. RESULTADOS</i>	77
1. La inoculación intranasal con BA71ΔCD2 protege de manera dosis-dependiente frente a la infección con el virus pandémico Georgia2007/1	79
1.1 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 es segura	79
1.2 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 protege frente a la infección letal con Georgia2007/01	80
1.3 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una potente respuesta humoral y celular específica	84

2. La vacunación intranasal con BA71ΔCD2 induce una respuesta inmune de memoria que a su vez contribuye a activar una respuesta inflamatoria	88
2.1 La estimulación <i>in vitro</i> de PBMC de animales vacunados intranasalmente con BA71 Δ CD2 induce una potente respuesta inmune innata.....	88
2.2 La estimulación <i>in vitro</i> de PBMC de animales vacunados con BA71 Δ CD2 induce una respuesta específica Th1 acompañada de una respuesta inflamatoria	90
2.3 La estimulación <i>in vitro</i> con Georgia2007/1 induce una potente respuesta inmune similar a la descrita tras la estimulación con BA71 Δ CD2	96
2.4 La secreción de IFN γ por células T de memoria en respuesta a la estimulación <i>in vitro</i> con el VPPA induce la producción de TNF en células mieloides	99
3. La vacunación intranasal con BA71ΔCD2 induce una respuesta celular citotóxica específica detectable tras la estimulación <i>in vitro</i>.....	103
3.1 Los datos obtenidos mediante <i>single cell</i> RNA-seq amplían en células de LN submandibular los resultados obtenidos en PBMCs	104
3.2 Una óptima estimulación <i>in vitro</i> con BA71 Δ CD2 permite detectar la activación de una respuesta citotóxica específica en PBMCs de animales vacunados.....	115
<i>V. DISCUSIÓN</i>.....	119
<i>VI. CONCLUSIONES</i>	133
<i>VII. BIBLIOGRAFÍA</i>.....	137
<i>APÉNDICES</i>.....	155

ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, del inglés <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Cadena complementaria del ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección americana de cultivos tipo, del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
BATF2	Factor de transcripción, del inglés <i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 2</i>
BST2	Antígeno 2 de célula de estroma de médula ósea, del inglés <i>Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2</i>
CCL2	Quimiocina, del inglés <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CCL4	Quimiocina, del inglés <i>C-C Motif Chemokine Ligand 4</i>
CCR2	Quimioatrayente de monocitos, del inglés <i>C-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
CCR7	Receptor de quimiocinas CC de tipo 7, del inglés <i>C-C Motif Chemokine Receptor 7</i>
CEG	Copias equivalentes del genoma
CNAG-CRG	Centro Nacional de Análisis Genómico-Centre de Recerca Genòmica
cpm	Contajes por millón
CTLs	Linfocitos T citotóxicos, del inglés <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CXCL10	Quimiocina CL10, del inglés <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 10</i>
CXCL9	Quimiocina CL9, del inglés <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 9</i>
CXCR4	Quimiocina CR4, del inglés <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
CD	Células dendríticas, del inglés <i>dendritic cells</i>
DE	Diferencialmente expresados
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco, del inglés <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (CH ₃ SOCH ₃)
DO	Densidad óptica
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FSC-A	Dispersión frontal, del inglés <i>forward scatter</i>
xg	Unidad de fuerza centrífuga relativa
GEMs	Emulsiones de perlas de gel, del inglés <i>Gel bead-in-emulsions</i>
GEX	Expresión génica, del inglés <i>Gene expresión</i>
GO	Ontología génica, del inglés <i>Gene Ontology</i>

GZMA.1	Granzima A
IAP	proteína de inhibición de apoptosis, del inglés <i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IFN-I	Interferón de tipo I
IFNα	Interferón alfa
IFNγ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12p40	Interleucina 12
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL15	Interleucina 15
IL2	Interleucina 2
IL27	Interleucina 27
IPMA	Técnica de inmunoperoxidasa en monocapa, del inglés <i>Immunoperoxidase monolayer assay</i>
IRF1	Factor de regulación de interferón 1, del inglés <i>Interferon Regulatory Factor-1</i>
ISG	<i>Genes estimulados por interferón</i> , del inglés <i>Interferon-Stimulated Genes</i>
ISG15	Proteína estimulada por interferón, del inglés <i>interferón-Stimulation Protein, 15 KDa</i>
ISG20	Gen estimulado por interferón 20, del inglés <i>Interferon Stimulated Exonuclease Gene 20</i>
LAVs	Vacunas vivas atenuadas, del inglés <i>live attenuated vaccines</i>
LN	Linfonodo
log₁₀	Logaritmo en base 10
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPs	Macrófagos alveolares porcinos
MDS	Escala multidimensional
ml	mililitro
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés <i>multiplicity of infection</i>
MX1	Proteína inducida por interferón, del inglés <i>Myxoma Resistance Protein</i>
NF-kB	Factor de transcripción, del inglés <i>nuclear factor-kappa-B</i>
NKs	Células “asesinas naturales”, del inglés <i>Natural killer cells</i>
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORFs	Marcos de lectura abiertos, del inglés <i>open reading frames</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica, del inglés <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Solución salina tamponada con fosfato, del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PFN1	<i>Profilin 1</i>
PHA	Fitohemaglutinina
pi	Post-infección
PMA	Forbol miristato acetato del inglés <i>Phorbol myristate acetate</i>
PPA	Peste porcina africana
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones, del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RIG-1	Gen inducible del inglés, <i>Retinoic Acid-Inducible Gene 1</i>
RNAseq	Secuenciación de RNA
scRNA-seq	Secuenciación de ARN de células individuales, del inglés <i>single-cell RNA-sequencing</i>
SFB	Suero fetal bovino
SLAII	Antígeno leucocitario porcino, del inglés <i>Swine Leukocyte Antigen II</i>
SPF	Libre de patógenos específicos, del inglés <i>Specific Pathogen Free</i>
SSC	Dispersión lateral, del inglés <i>Side Scatter</i>
Th1	Respuesta de tipo 1 de linfocitos, del inglés <i>T helper 1</i>
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> , del inglés <i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral, del inglés <i>tumoral necrosis factor</i>
UE	Unión Europea
UFP	Unidades formadoras de placas.
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
VPPA	Virus de la peste porcina africana
VPPC	Virus de la peste porcina clásica
VPRRS	Virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
XCL1	Quimiocina 1, del inglés <i>C motif ligand 1</i>
µg	microgramo

RESUMEN

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad vírica letal que afecta a cerdos y jabalíes, actualmente responsable de una pandemia con consecuencias devastadoras para la industria porcina a nivel mundial. Debido a la ausencia de una vacuna eficaz, el control de la enfermedad recae en extremar las medidas de bioseguridad y políticas de vaciado sanitario. Hasta el momento, las vacunas basadas en virus vivos atenuados, a pesar de no ser óptimas en términos de bioseguridad, son las únicas que han demostrado conferir inmunidad protectora frente al virus de la PPA (VPPA). Por ello, estas vacunas también son una herramienta ideal para esclarecer los mecanismos inmunológicos que juegan un papel en protección. En nuestro laboratorio hemos desarrollado previamente un prototipo vacunal, denominado BA71 Δ CD2, eliminando la proteína CD2v del virus virulento parental BA71. A diferencia de otras vacunas vivas atenuadas desarrolladas por otros laboratorios, que únicamente inducen protección homóloga, la vacunación intramuscular con BA71 Δ CD2 confiere protección no solo frente al virus parental, si no también frente a otras cepas heterólogas, incluyendo al aislado Georgia2007/1, causante de la actual pandemia. Desafortunadamente, algunos de los animales vacunados secretaban virus vacunal aunque a niveles bajos.

El **primer objetivo** de esta tesis doctoral fue optimizar la vacunación con BA71 Δ CD2. Para ello se testaron tres dosis de la vacuna administrada intranasalmente en cerdos, y se analizó tanto su seguridad, como la respuesta inmune inducida y la protección conferida frente a la infección con Georgia2007/1 mediante contacto directo con cerdos infectados. La inoculación intranasal de la vacuna resultó más segura que la

intramuscular, apenas detectándose virus vacunal ni en sangre ni en hisopos nasales. Además, los animales vacunados quedaron protegidos frente a la infección de manera dosis-dependiente, y la protección se asoció con la presencia de anticuerpos y células secretoras de IFN γ específicas frente al VPPA. El **segundo objetivo** de la tesis doctoral fue caracterizar la respuesta inmune protectora inducida tras la vacunación intranasal con la dosis óptima de BA71 Δ CD2. En primer lugar, se caracterizó el transcriptoma celular de células mononucleares de sangre de cerdos vacunados tras una estimulación con el virus *in vitro*. Esta estrategia reveló la activación de una respuesta Th1 mediada por células T CD4+CD8+ polifuncionales. Además, se demostró que esta respuesta específica frente al VPPA induce, mediante la secreción de IFN γ , la activación de una respuesta inflamatoria orquestada por monocitos/macrófagos secretores de TNF. En segundo lugar, se ampliaron los resultados obtenidos analizando, mediante *single-cell RNA-sequencing*, la respuesta inducida en células del linfonodo submandibular, uno de los órganos que primero recibe el virus tras una infección oro-nasal. La estimulación *in vitro* de estas células confirmó la inducción de una respuesta Th1 acompañada de la activación de la respuesta inflamatoria. Además, reveló la presencia de una variada respuesta citotóxica, mediada por células T CD4+CD8+, células T CD8+, células T $\gamma\delta$ y células NK.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral demuestran que la administración intranasal del prototipo vacunal BA71 Δ CD2 es una opción segura y eficaz, que permite plantear su futura utilización en campo como vacuna capaz de inducir inmunidad frente a Georgia2007/1. Por otro lado, se han caracterizado con ensayos *in vitro* los diferentes componentes de la

inmunidad generados tras la vacunación mostrando la intervención de una respuesta Th1 específica frente al virus. Dichos resultados sugieren que una rápida activación de la respuesta innata por parte de las células T podría ser un factor clave para controlar la infección. En conjunto, esta tesis doctoral contribuye al desarrollo de una vacuna efectiva frente al VPPA, profundizando además en la descripción de los componentes inmunológicos que deberían ser considerados para el diseño racional de las vacunas del futuro.

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a lethal viral disease of domestic pigs and wild boars causing a worldwide pandemic affecting the porcine industry and leading to important global economic consequences. Due to the lack of effective vaccines, the control of the disease mainly relies on the combination of culling in affected farms and biosafety measures. At the moment, and despite biosafety concerns, live attenuated vaccines (LAV) are the only ones inducing protective immunity against African swine fever virus (ASFV). In addition, LAV are also a good tool to study the immune mechanisms involved in protection. Previous work from our group developed a recombinant LAV, BA71 Δ CD2, eliminating the CD2v protein from the parenteral virulent virus BA71. Intramuscular vaccination with BA71 Δ CD2 confers protection against challenge with homologous and heterologous virulent ASFV isolates, including the Georgia2007/1 ASFV strain, the responsible of the current pandemic. Unfortunately, BA71 Δ CD2 presented certain biosafety issues since a few of the vaccinated animals shed some vaccine virus after immunization.

The **first objective** of this thesis was to optimize the vaccination with BA71 Δ CD2. With this aim we tested three different vaccine doses through intranasal inoculation of pigs, to analyze security, vaccine-induced immune response, and protection against a challenge by direct contact with Georgia2007/1-infected pigs. Intranasal vaccination improved biosafety compared to intramuscular administration, and conferred dose-dependent cross-protection associated with both ASFV-specific antibodies and IFN γ -secreting cells. The **second objective** of the thesis was to characterize the protective immune response induced after intranasal vaccination with the optimal dose of BA71 Δ CD2. First, we applied bulk RNA-sequencing to

characterize the *in vitro* recall responses induced in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from BA71 Δ CD2 immunized pigs. This strategy revealed a robust Th1 response defined by the presence of polyfunctional CD4⁺CD8⁺ T cells. This adaptive immune response induced an IFN γ -dependent positive feedback regulation of innate immunity, characterized by rapid activation of inflammation with the presence of TNF secreting monocytes/macrophages. Furthermore, we analyzed the single-cell transcriptome of submandibular lymph node (LN) cells from vaccinated animals after ASFV *in vitro* stimulation. This recall response in LN cells confirmed the data obtained in PBMCs. Moreover, it revealed the activation of a broad cytotoxic response mediated by CD4⁺CD8⁺ T cells, CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells, and NK cells.

Overall, the results of this PhD thesis prove that intranasal administration of BA71 Δ CD2 is an effective and safe option that allows us to consider its use in field as a LAV against Georgia2007/1. Moreover, analysis of the *in vitro* recall response induced by immune cells from intranasally vaccinated pigs unravel key immune components involved in the protective response against ASFV. These results suggest a role of a timely adaptive-innate immunity crosstalk in the induction of a rapid inflammatory response to efficiently control ASFV infection. While efforts to identify antigenic ASFV proteins to develop safer subunit vaccines are ongoing, this study represents a step forward to shift vaccine development from the current trial-and-error based approach to a more rational strategy.

I. INTRODUCCIÓN

1. Peste Porcina Africana

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad viral contagiosa causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA), virus de doble cadena de ADN, único miembro de la familia *Asfarviridae*, género *Asfivirus*. La PPA, que afecta a diferentes miembros de la familia *Suidae*, concretamente al cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) y al jabalí (*Sus scrofa ferus*), es una enfermedad de declaración obligatoria dentro del marco de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, antigua OIE).

1.1 Historia de la PPA

La PPA apareció por primera vez en 1921 en Kenia, en las zonas en las que los colonos ingleses comenzaron a introducir cerdos desde Europa para su producción y comercio. El VPPA inicialmente circulaba entre la población de cerdos salvajes africanos y garrapatas blandas del género *Ornithodoros* de forma inaparente, y sólo cuando el virus comenzó a infectar a la población de cerdo doméstico se detectó la enfermedad, que cursaba con una mortalidad cercana al 100% (Montgomery, 1921). La enfermedad se expandió rápidamente desde el África oriental, donde se describió el primer brote, hasta áreas del centro y este de África. El VPPA se aisló por primera vez de un cerdo infectado en 1932 (Steyn, 1932). Hoy en día, la PPA permanece enzoótica en muchos países del área Subsahariana, lo que ha contribuido negativamente al desarrollo económico de las áreas afectadas. Hasta hoy se han descrito alrededor de 24 genotipos virales diferentes circulando en África (Njau et al., 2021).

La falta de conocimiento acerca de los patrones de transmisión, riesgo y evolución viral dentro del continente africano, así como la dificultad de su control, hace que la enfermedad sea impredecible y constituye un gran riesgo para las zonas libres de la enfermedad, ya sea dentro o fuera de África (Njau et al., 2021; Penrith et al., 2019; Penrith y Kivaria, 2022). Así, en el año 1957 se detectó por primera vez una cepa del VPPA del genotipo I fuera del continente africano, en Portugal, foco que se consiguió controlar. Tras tres años de silencio epidemiológico, un nuevo foco del virus (también de genotipo I) fue descrito de nuevo en Portugal, en 1960. En esta ocasión, el virus se extendió rápidamente a España, países ambos en los que el virus circuló de forma endémica durante más de 35 años, contribuyendo al retraso socioeconómico de la zona. Durante las décadas comprendidas entre los 60s y los 80s, el virus se diseminó por Italia, Francia y Bélgica, llegando hasta Latinoamérica (Figura 1), zonas en las que el VPPA pudo ser controlado antes de llegar a hacerse endémico.

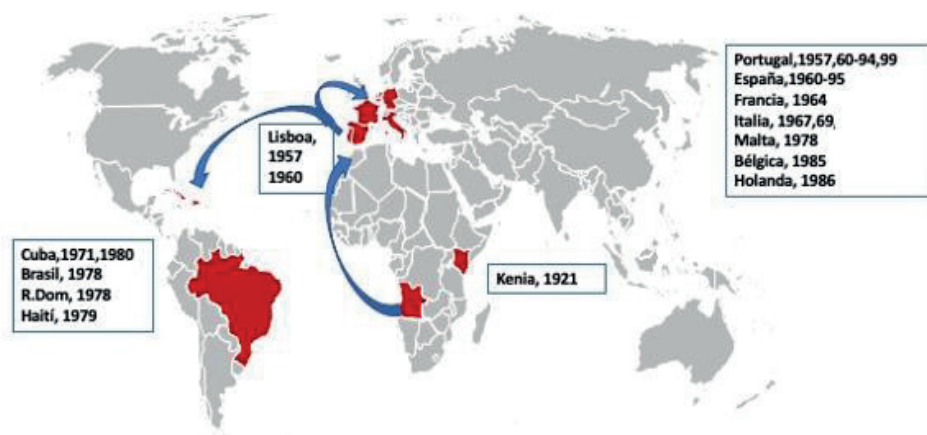


Figura 1. Mapa de la distribución del VPPA entre 1921 y 1999.

A finales de los años 90, tras la implementación de estrictos programas de erradicación y control, siendo clave la implementación de políticas de compensación económica a los productores impulsadas desde la Unión Europea (UE), se consiguió eliminar de forma paulatina el VPPA de la Península Ibérica, último reducto del virus en la Europa continental (Danzetta et al., 2020). Es importante comentar que el virus no se consiguió erradicar de la isla de Cerdeña, dónde el VPPA continúa endémico a día de hoy (Cappai et al., 2018).

1.2 Situación actual de la PPA

Desde su erradicación de la Península Ibérica, el VPPA estuvo ausente en la Europa continental hasta que, en el año 2007, se detectó de nuevo un brote de VPPA en la República de Georgia. El virus se introdujo a través de un barco con productos alimenticios contaminados procedente del Este de África, y el brote fue causado por una cepa virulenta del genotipo II (Georgia2007/1) (Owlands et al., 2007). Desde esta región del Cáucaso y, principalmente, a través de jabalíes infectados, el virus se expandió de forma paulatina e inexorable por toda Europa del Este, llegando hasta los Países Bálticos, y alcanzando en 2014 la UE. En 2018, marcando un antes y un después en la historia de la VPPA, el virus se detectó en China, principal productor porcino a nivel mundial (Zhang et al., 2019). Desde entonces, la enfermedad se ha propagado rápidamente y de manera incontrolada por diferentes regiones de Asia, donde se ha aislado en 16 países, llegando a Oceanía en 2020. El virus también ha avanzado en Europa Occidental, incluyendo Bélgica, Italia y Alemania, en algunos casos realizando saltos de más de 500km de distancia, todavía por esclarecer. Tras más de 40 años libres de la enfermedad, el virus ha

aparecido de nuevo en América, concretamente en República Dominicana y Haití (www.woah.org). Así, actualmente la VPPA es una pandemia que está causando enormes pérdidas a nivel socioeconómico en los países afectados. Cabe tener en cuenta que, durante la presente pandemia, sólo han logrado erradicar la enfermedad, recuperando el estatus de país libre de PPA, dos estados: la República Checa y Bélgica.

1.3 Enfermedad y ciclo de infección

La PPA es una enfermedad que puede cursar con diferentes cuadros: hiperagudo, agudo, subagudo y crónico. Que la enfermedad curse de una forma u otra depende tanto de la cepa del virus, como del estatus sanitario de los animales afectados. Los síntomas característicos de la PPA son: fiebre elevada (40°-42°), letargo, anorexia, inactividad y la aparición de cianosis (Salguero, 2020).

La PPA se transmite mediante garrapatas del género *Ornithodoros*, vectores naturales del virus, pero también por contacto estrecho entre animales infectados, por ingestión de materia contaminada y por fómites. Se han descrito diferentes ciclos de infección dependiendo del área. En ciertas zonas de África, el ciclo de infección es selvático y en él están involucrados las garrapatas y los facóqueros (*Phacochoerus africanus*), reservorios naturales del VPPA. En estas áreas, las garrapatas son un factor de riesgo importante a la hora de transmitir el virus entre los facóqueros y el cerdo doméstico. Fuera del continente africano y en la presente epidemia de PPA, no se ha descrito que las garrapatas jueguen un papel importante a la hora de transmitir el virus, si bien cabe tener en cuenta el riesgo potencial que puede suponer su presencia en algunas zonas, como podría

ser el Sur de la Península Ibérica, coincidiendo con áreas donde se cría el cerdo ibérico en extensivo.

En Europa, el VPPA ha circulado y sigue circulando principalmente entre jabalíes, cada vez más abundantes en los bosques y áreas interurbanas, suponiendo así un factor de riesgo al ser susceptibles a la enfermedad y poder transmitirla a cerdo doméstico al establecer un contacto entre si. Sobre todo, en escenarios en los que las granjas presentan bajos niveles de bioseguridad. Otros factores de riesgo, en la introducción de la VPPA en las granjas son la entrada de animales que puedan estar infectados sin estar diagnosticados, los fómites contaminados y la alimentación de animales con restos alimentarios contaminados. Este factor ha resultado clave en el continente asiático, así como en pequeñas explotaciones de traspatio en el este de Europa, a pesar de su prohibición justamente debido al elevado riesgo que supone esta práctica, no solo para la transmisión de VPPA, sino de cualquier otro patógeno circulante.

2. El virus de la Peste Porcina Africana

El VPPA es un virus complejo de doble cadena de ADN nucleocitoplasmático, con un genoma de entre 170 a 190kb que contiene más de 150 marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *open reading frames*), dependiendo de la cepa viral. Se trata de un virus sumamente complejo, capaz de expresar proteínas de una forma regulada en el tiempo, incluyendo proteínas inmediatamente tempranas y tempranas, que se expresan antes de que el virus haya replicado, y tardías, expresadas tras la replicación del genoma viral (Dixon et al. 2013; Yáñez et al., 1995). Hasta el momento se han descrito más de 50 proteínas estructurales distintas en el virión (Almazán et al., 1992; Rodríguez y Salas, 2013), reflejando su

complejidad estructural. Del mismo modo, el VPPA codifica por distintas proteínas involucradas en transcripción, replicación y ensamblaje viral, así como un grupo de proteínas especializadas en la evasión de la respuesta inmune del huésped, interfiriendo, por ejemplo, en la vías de interferón de tipo I o apoptosis (Dixon et al., 2019; Reis et al., 2017). Lamentablemente, en la actualidad aún se desconoce la función de más de la mitad de los genes del virus.

Tras la infección con cepas virulentas de VPPA en cerdo doméstico, la enfermedad cursa con una desregulación del sistema inmune iniciada en los macrófagos infectados, y la subsiguiente tormenta de citoquinas que indirectamente contribuye a la apoptosis de las células B y T circulantes (Sánchez-Cordón et al., 2021). El resultado final es la depleción de las células blancas en órganos linfoides y sangre periférica, que desencadena una inmunosupresión que contribuye a la diseminación del virus por el organismo, así como a la destrucción de las células epiteliales de los vasos sanguíneos lo que provoca las hemorragias características de la PPA y al consiguiente fallo sistémico del organismo en pocos días (Blome et al, 2013).

2.1 Estructura del VPPA

Recientemente, se ha podido definir mediante cristalografía la estructura tridimensional del VPPA que ha permitido confirmar la extrema complejidad del virus (Andrés et al., 2020; Liu et al., 2019). De hecho, se ha podido demostrar la existencia de una segunda cápside proteica en el virus, modificando así la imagen que hasta el momento se tenía de la estructura del VPPA (Figura 2).

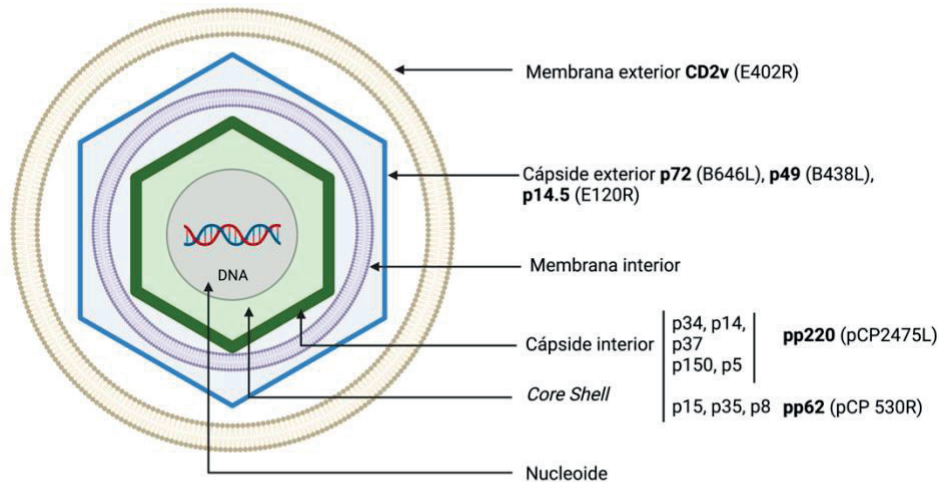


Figura 2. Esquema de la estructura del VPPA en el que se indican las proteínas principales que forman parte de las diferentes envolturas. Basado en lo descrito por: Andrés et al. (2020) y Alejo et al. (2018).

El virus dispone su material genético en un nucleoide en el que la doble cadena de ADN viral se encuentra acomplejada con una serie de proteínas virales (*Core Shell*), entre las que destacan la p10 (pK78R) (Nunes-Correia et al., 2008) y la pA104R (Frouco et al., 2017). Estas facilitan el transporte y reconocimiento del ADN por parte de la maquinaria celular, permitiendo la transcripción temprana de una batería de genes esenciales en la progresión de la infección (Salas y Andrés, 2013). El *Core Shell* está envuelto por una cápside interna, recientemente descrita, formada al menos por las proteínas derivadas de las poliproteína pp62 (p35, p15 y p8) y de pp220 (p5, p14, p34, p37 y p150 (Alejo et al., 2018; Simón-Mateo et al., 1993 y 1997). La cápside interna está envuelta por una membrana lipídica procedente del retículo endoplasmático (Andrés et al., 1998; Suárez et al., 2015) y por una doble cápside externa, formada por la proteína mayoritaria

p72 y por la p49 (Andrés et al., 2002). El virus intracelular maduro puede salir de la célula por lisis de esta, sin membrana exterior, o bien por evaginación rodeado de una envuelta lipídica procedente de la membrana externa de la célula infectada. En ambos casos, con o sin la membrana exterior, los virus resultantes son infectivos.

2.2 Ciclo de infección del VPPA

El VPPA infecta principalmente monocitos y macrófagos, si bien también se ha descrito la infección de células dendríticas y, en estadios tardíos de la enfermedad, de células epiteliales (Alcamí et al., 1990; Franzoni et al., 2017; Gómez-Villamandos et al., 2013). A pesar de que en 2003 se postuló el receptor CD163 como receptor del virus necesario para su internalización en la célula (Sánchez-Torres et al., 2003), más recientemente se ha demostrado que este marcador de monocitos-macrófagos no es imprescindible para la infección con el VPPA (Popescu et al., 2017). Así pues, los mecanismos de entrada del virus en la célula están todavía en discusión, se han descrito un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina (Galindo et al., 2015; Hernáez y Alonso, 2010), macropinocitosis o fagocitosis (Alcamí et al., 1989 y 1990; Andrés 2017; Salas y Andrés, 2013; Valdeira y Geraldés, 1985).

Una vez internalizadas las partículas virales, independientemente de la vía de entrada, comienza la fase endocítica del ciclo. En primer lugar, las partículas internalizadas pasan de los endosomas tempranos a los endosomas tardíos, en los que se produce la descapsidación de la partícula viral a causa de la acidificación luminal, liberándose de este modo el núcleo (*core shell*) (Cuesta-Geijo et al., 2012). Los genes inmediatamente tempranos y los tempranos se expresan con la maquinaria transcripcional

del virión antes de que comience la replicación del ADN (Galindo y Alonso, 2017), para la cual es necesaria la entrada en el núcleo (Ballester et al., 2010; García-Beato et al., 1992; Rojo et al., 1999). Las fases finales de la replicación, así como la expresión de los genes intermedios y tardíos junto con el ensamblaje final de las partículas virales, tienen lugar en las denominadas factorías virales localizadas en el área perinuclear (Almazán et al., 1992; Alonso et al. 2001; Andrés et al., 1998; García-Escudero et al., 1998; Hernáez et al., 2006; Netherton y Wileman, 2013).

La membrana interna del virión es adquirida del retículo endoplasmático, y posteriormente se forma la cápside icosaédrica, de manera simultánea a la formación del *core shell* (Andrés et al., 2002). El último paso de la morfogénesis del virión es la encapsulación del ADN, tras la cual se completa la formación de los viriones maduros ya ensamblados (Brookes et al., 1996). El transporte de las partículas a través del citoplasma está mediado por microtúbulos y finalmente salen de la célula atravesando la membrana citoplasmática, adquiriendo de este modo la membrana exterior (Alonso et al., 2013). Alternativamente, el virus puede salir directamente sin atravesar la membrana citoplasmática como consecuencia de la lisis de la célula infectada, liberando viriones sin la membrana externa, que son igualmente infectivos.

2.3 Interacción VPPA-célula diana

Las células infectadas por un virus detectan la presencia del patógeno mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptor*), entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés *Toll-like receptor*), los receptores tipo RIG-1 (RLR, del inglés *RIG-I-like Receptor*) y sensores citoplasmáticos de ADN

(p.e.: cGAS, IFI16, etc.). Este reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) resulta en la activación de la respuesta inmune innata, caracterizada por la producción de interferones de tipo I (IFN-I) y de citoquinas inflamatorias (Akira et al., 2006). Para eludir esta respuesta inmune innata muchos virus han desarrollado mecanismos para interferir con las correspondientes rutas de señalización (Chathuranga et al., 2021). En el caso del VPPA se han descrito diferentes proteínas cuya función es modular la respuesta inmune innata inducida en la célula infectada (revisado recientemente por Wu et al., 2021). Por ejemplo, se han identificado diferentes proteínas que bloquean la producción de IFN-I, entre las que se incluyen las codificadas por algunos miembros de las familias multigénicas (MGF 360 y MGF 530/505) (Zsak et al., 2001), la I267L (Ran et al., 2022), el componente de la cápside pE120R (Liu et al., 2021), y la pI215L, la única enzima E2 conjugada a ubiquitina que expresa el virus (Freitas et al., 2018). Otras proteínas interfieren con la producción de citoquinas inflamatorias, como el factor de virulencia pDP96R (UK) o la proteína homóloga del TLR3 pI329L, que inhiben tanto la respuesta de interferón de tipo I como la señalización mediada por NF- κ B (Oliveira et al., 2011; Wang et al., 2018); o como la proteína A238L, que inhibe la activación de los factores de transcripción NF- κ B, c-JUN, y NFAT (Grigoriu et al., 2013; Powell et al., 1996). Estos son algunos ejemplos, de los muchos que probablemente quedan todavía por desvelar, que demuestran como el VPPA, durante su evolución con el huésped, intenta evadir su reconocimiento inicial por el sistema inmune, favoreciendo así su replicación y diseminación por el organismo infectado.

Otro de los mecanismos que utiliza el virus para evitar la respuesta antiviral es la modulación de la apoptosis, proceso de muerte celular programada mediante el cual el organismo elimina las células infectadas o dañadas. Curiosamente, el virus dispone tanto de genes que codifican inhibidores de la apoptosis, que permiten al virus mantener la célula viva hasta que las partículas virales se completan, así como genes proapoptóticos, que favorecen la liberación de los viriones de las células infectadas (Dixon et al., 2017). Entre las primeras, cabe destacar el papel que juega la pA224L, homóloga de la proteína inhibidora de la apoptosis (IAP, del inglés *inhibitor of apoptosis protein*) (Nogal et al., 2001), la A179L, homóloga de la Bcl-2 (Brun et al., 1998), y la DP71L, que inhibe la activación de la apoptosis mediada por el estrés inducido en el retículo endoplasmático (Hang et al., 2010). Otra proteína que también se ha descrito que inhibe la apoptosis es la pEP153R, proteína que presenta un dominio lectina tipo-C y que reduce la activación de la proteína p53, la cual activa la transcripción de inhibidores de la apoptosis (Granja et al., 2004; Hurtado et al., 2004). Se ha descrito también que la proteína pEP153R inhibe la expresión de MHC-I lo que favorece el camuflaje del virus al reducir la presentación antigénica en las células infectadas (Hurtado et al., 2011). En cuanto a los promotores de la apoptosis, cabe destacar la proteína estructural E183L/p54 que interactúa con la cadena ligera de la dineína (DLC8) (Alonso et al., 2001; Hernáez et al., 2004).

2.4 CD2v, una proteína multifuncional

De entre los factores de virulencia más interesantes del VPPA, se encuentra la proteína CD2v, inicialmente descrita como la hemaglutinina viral responsable de la unión del virus a los eritrocitos (hemaglutinación)

y de las células infectadas a los mismos (hemadsorción) (Rodríguez et al., 1993). CD2v es, hasta el momento, la única proteína del virus descrita tanto en la superficie de la membrana externa de la célula infectada como en los viriones extracelulares que la forman durante su salida de la membrana celular (Goatley y Dixon, 2011). Su nombre proviene de la homología observada entre su dominio extracelular y el antígeno leucocitario celular CD2, una proteína implicada, entre otras muchas funciones, en el reconocimiento entre la células presentadora de antígenos y las células T-específicas (Beyers et al., 1989; Bierer y Burakoff, 1989). Adicionalmente a este dominio extracelular, implicado en la unión del virus o de las células infectadas a las membranas de los glóbulos rojos, el CD2v posee dos dominios transmembranas y un dominio intracelular con capacidad para unirse a diversos sustratos celulares implicados en rutas de transducción de la respuesta inmune del VPPA. CD2v juega un papel en la evasión de la respuesta inmune por el virus entre otras funciones se ha descrito que inhibe diversas funciones en las células T (Borca et al., 1997). Recientemente, se ha descrito que la CD2v induce la activación de NF- κ B y de IFN- β , a la vez que promueve la apoptosis de linfocitos y macrófagos (Chaulagain et al., 2021). CD2v es una proteína enormemente variable tanto en su dominio extracelular como intracelular, permitiendo definir, por primera vez para el caso del VPPA, la clasificación del virus no sólo en genotipos sino en serotipos. Así, se ha propuesto la clasificación en serotipos dependiendo de la capacidad de los anticuerpos generados durante la infección para inhibir *in vitro* la hemadsorción de determinadas cepas virales (Malogolovkin et al., 2015). Por último, cabe destacar el potencial protector de CD2v, antígeno viral que induce tanto anticuerpos

como células T-CD8 específicas implicadas en protección homóloga y heteróloga (Argilaguet et al., 2012; Ruíz-Gonzalvo et al., 1996).

3. Respuesta inmune frente al VPPA

Los animales infectados con cepas altamente virulentas mueren antes de desarrollar una respuesta inmune adaptativa. En cambio, los animales que sobreviven a la infección con cepas atenuadas desarrollan una respuesta inmune de memoria protectora que les permite sobrevivir a una reinfección con cepas virulentas homólogas o genotípicamente cercanas. A pesar de cierta controversia sobre el papel de los anticuerpos neutralizantes en protección, existe consenso científico acerca de la hipótesis de que tanto la respuesta humoral como la respuesta celular están involucradas en la respuesta inmune protectora (Montoya et al., 2021; Onisk et al., 1994; Oura et al., 2005; Takamatsu et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos intrínsecos detrás de esta respuesta inmune protectora no se han descrito al detalle, exigiendo una investigación más pormenorizada. El papel que juegan los anticuerpos en la protección frente a la VPPA se ha demostrado mediante estudios de transferencia pasiva de inmunoglobulinas de animales supervivientes a la infección con el VPPA a animales control sin infectar. Así, los animales recipientes de las inmunoglobulinas específicas eran capaces de sobrevivir a la infección con el virus homólogo (Onisk et al., 1994); ratificando resultados preliminares obtenidos en lechones tras la transferencia de anticuerpos específicos de la madre mediante calostro (Schlafer et al., 1984). Desgraciadamente, todavía hoy en día se desconocen los mecanismos funcionales subyacentes a la protección parcial observada en ambos casos. Algunos autores (Ardley et al., 1985) lo asocian a la presencia de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), mientras que otros lo asocian a la presencia de anticuerpos neutralizantes, aunque su relevancia, e incluso su existencia, es objeto de debate (Canter et al. 2022; Gómez-Puertas et al. 1996; Neilan et al. 2004).

Hasta el momento y en nuestra propia experiencia, únicamente la presencia de anticuerpos capaces de inhibir la infección *in vitro* se asocia con protección in vivo (Ruíz Gonzalvo et al., 1986), en ocasiones asociados con su capacidad para inhibir la hemaglutinación o la hemadsorción (Burmakina et al., 2019; Gómez-Puertas et al., 1996). A pesar de estas evidencias, la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA también se ha asociado con la exacerbación de la infección (Argilaguët et al., 2011; Blome et al., 2014; Gaudreault y Richt, 2019; Netherton et al., 2019). Del mismo modo, estudios clásicos de infecciones crónicas de PPA asociaban la presencia concomitante de VPPA con altos títulos de anticuerpos y las lesiones encontradas en estos animales con la deposición de inmunocomplejos (Fernández et al. 1992; Slauson y Sánchez-Vizcaino, 1981), confirmando una vez más la difícil tarea que supone no sólo discernir entre anticuerpos protectores y no protectores, sino además cómo poder inducir los unos sin los otros. Independientemente de su potencial protector, la presencia de anticuerpos específicos en animales supervivientes a la infección ha facilitado las tareas de diagnóstico permitiendo optimizar los planes de control y erradicación de la PPA en zonas endémicas de la enfermedad (Sánchez-Vizcaíno et al., 1982). A día de hoy, el diagnóstico de la PPA se realiza por métodos moleculares que permiten detectar el ácido nucleico del VPPA, ya que en la infección aguda los animales sucumben a la infección, en muchas ocasiones, antes de que

les haya dado tiempo a desarrollar anticuerpos específicos (Pan y Hess 1984; Pikalo et al., 2019; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015).

La adaptación progresiva del virus al huésped y su endemicidad provocará sin lugar a duda, la aparición de formas más atenuadas del VPPA que aconsejarán la inclusión de un doble diagnóstico molecular y serológico, que permita realizar un diagnóstico más eficaz de la enfermedad en el futuro.

Otro componente de la respuesta inmune que ha demostrado jugar un papel importante frente el VPPA son las células T CD8. Uno de los estudios clave que validó esta hipótesis inicial fue el realizado por (Oura et al., 2005), en el que se demostró que la depleción in vivo de células CD8 en animales supervivientes a la infección con un VPPA atenuado, resultaba en la pérdida de su inmunidad protectora, volviéndose totalmente susceptibles al desafío con el virus homólogo virulento. Posteriormente se ha podido ratificar el papel que las células T CD8 específicas en protección (Argilaguet et al., 2012; Lacasta et al., 2014; Takamatsu et al., 2013). En nuestro laboratorio demostramos, utilizando vacunas experimentales de ADN experimentales, que se puede conferir protección frente al desafío con virus virulentos homólogos en ausencia de anticuerpos específicos, mediante la inducción de células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs, del inglés *cytotoxic T lymphocytes*) específicas frente al CD2v y otros antígenos del VPPA (Bosch-Camós et al., 2021a y 2021b; Lacasta et al., 2014;), incluso en ausencia de anticuerpos (Argilaguet et al., 2012). Estos trabajos no hacen sino ratificar evidencias indirectamente observadas por otros investigadores, que correlacionaban la protección conferida por los virus atenuados con su capacidad de inducir células de memoria CD4⁺CD8⁺

citotóxicas específicas frente al virus (Canals et al., 1992; Denyer et al., 2006; Martins et al., 1993).

En la actualidad, no se conoce ningún componente de la respuesta inmune que correlacione con protección y que por lo tanto sirva para predecir la capacidad de un animal de sobrevivir a la infección experimental con el VPPA. Hasta el momento, únicamente existen evidencias indirectas que asocian determinadas respuestas con protección. Así, además de la respuesta citotóxica específica (Norley y Wardley, 1984; Wardley y Wilkinson, 1980), se ha podido asociar protección a la inducción de respuesta innata mediada por células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*) CD8 positivas (Leitão et al., 2001), o con presencia de células específicas de VPPA productoras de IFN γ (Argilaguet et al., 2012; King et al., 2011; Sánchez-Cordón et al., 2020; Takamatsu et al., 2013). Sin embargo, no se ha podido establecer correlación perfecta, existiendo animales que sobreviven en ausencia de este tipo de respuestas, así como animales que sucumben a la infección a pesar de presentar un elevado número de células efectoras en sangre antes del desafío.

Conocer los mecanismos intrínsecos que gobiernan la protección frente al VPPA, así como establecer correlatos de protección, facilitaría no solo el desarrollo de vacunas en el futuro, sino que además permitiría evitar desafíos experimentales innecesarios, evitando así el subsiguiente sufrimiento de los animales empleados para ello. Mientras esta predicción no sea posible, sólo el desafío experimental permite ensayar la eficacia de nuestros prototipos vacunales.

4. Desarrollo de vacunas frente al VPPA

La obtención de una vacuna efectiva y segura frente al VPPA es uno de los desafíos más urgentes en el mundo de la sanidad animal. Hasta el momento, se ha demostrado que las vacunas clásicas inactivadas, independientemente del método y del adyuvante utilizado, no son efectivas independientemente del método y del adyuvante utilizado, no son efectivas (Gabriel y Beer, 2014; Stone y Hess, 1967). La inmunización con estas vacunas inactivadas induce anticuerpos en los cerdos inmunizados, pero fallan a la hora de inducir una respuesta celular. Quizás en el futuro, con la implementación de nuevas formulaciones de adyuvantes que dirijan la inmunización hacia una respuesta celular, o con métodos de inactivación menos drásticos, se pueda diseñar una vacuna inactivada efectiva. Por otro lado, y hasta el momento, los intentos de conseguir una vacuna de subunidades que confiera una protección sólida no han sido lo suficientemente satisfactorios. A la enorme complejidad que supone la tarea de desarrollar vacunas de subunidades frente a un virus tan complejo, con más de 150 proteínas distintas, hay que añadir la disparidad en los resultados de protección obtenidos utilizando un mismo antígeno, dependiendo de la cepa de VPPA que se emplea para el desafío. Así, antígenos como la p30, p54, p72 o el CD2v, con potencial protector demostrado frente al aislado virulento E75, genotipo I aislado en España en los años setenta (Lacasta et al., 2014; Ruíz-Gonzalvo et al., 1996), han fracasado cuando han sido testados frente a otras cepas del virus (Neilan et al., 2004), incluyendo al virus pandémico (Argilaguet et al., 2013; Lokhandwala et al., 2019; Pérez-Núñez et al., 2019). Debido a sus óptimas prestaciones en cuanto a bioseguridad, las vacunas basadas en subunidades serían ideales para su utilización, más aún en países libres de la

enfermedad. Lamentablemente, no serán una realidad a corto plazo, pues la protección conferida hasta ahora, al menos frente al virus pandémico, está muy por debajo de lo mínimamente exigido para su justificado uso en el campo. Cada vez se está aportando más información acerca de los mecanismos intrínsecos detrás de la respuesta inmune protectora y acerca los antígenos del VPPA implicados en ella, por lo que es factible que en el futuro se puedan desarrollar nuevas formulaciones más eficaces frente al VPPA. A este respecto, caben destacar las aportaciones de los grupos del Dr. Netherton (*The Pirbright Institute*, Reino Unido), o las de nuestro laboratorio del IRTA-CreSA, en el que se han comenzado a identificar numerosos antígenos del VPPA con potencial protector (Bosch-Camós et al., 2021a y 2021b; Netherton et al., 2019). Conseguir optimizar no sólo la formulación antigénica ideal, sino su modo de presentación *in vivo*, son tareas que exigen una inversión en I+D+i en el futuro inmediato.

Independientemente de los esfuerzos realizados y descritos hasta el momento, cabe destacar que, a día de hoy sólo las vacunas vivas atenuadas (LAVs, del inglés *live attenuated vaccines*) han aportado resultados óptimos de protección frente al virus pandémico (Borca et al., 2020; Carlson et al., 2016; Donnell et al., 2015; Fonso et al., 1998; Monteagudo et al., 2017; Zsak et al., 1996). A pesar de sus inconvenientes, esencialmente ligados a la inseguridad inherente a su naturaleza viva (Gavier-Widén et al., 2020), las LAVs se han postulado como la única tecnología que a corto medio plazo podría garantizar la disponibilidad de vacunas eficaces frente a la enfermedad, capaces de frenar la expansión del virus (Arias et al., 2017; Bosch-Camós et al., 2020; Gladue y Borca, 2022). Haciendo realidad esta premisa, Vietnam ha aprobado la comercialización de la primera vacuna frente al VPPA basada en un virus vivo recombinante

(Tran et al., 2021). Lamentablemente, tras el primer mes de implementación de la vacunación, esta se ha suspendido temporalmente debido a la muerte de alrededor de 600 animales, poniendo de manifiesto la dificultad de implementar una vacuna viva en campo (Khanh 2022).

A pesar de su eficacia, la implementación en campo de vacunas atenuadas presenta diferentes riesgos a nivel de bioseguridad ligados no sólo a la posibilidad de reversión de la virulencia y/o la posible recombinación del virus vacunal con cepas de VPPA circulantes, sino con su contraindicación en el caso de animales con un deficiente estatus sanitario o con un sistema inmunitario deficiente. Esta realidad, muchas veces ignorada, se hizo patente al describir la extrema susceptibilidad de cerdos libres de patógenos específicos (SPF, del inglés *specific pathogen free*) a cepas atenuadas del virus, totalmente inocuas para cerdos crecidos en granjas convencionales (King et al., 2011; Lacasta et al., 2015). De nuevo, muy probablemente reflejando esta realidad, se ha descrito la aparición de brotes de PPA muy severos, asociados a virus atenuados, tanto en África, como más recientemente en China (Sun et al., 2021).

Como ya sucedió en la península ibérica en los últimos años de la anterior pandemia, la utilización ilegal de vacunas recombinantes del genotipo II y/o la importación ilegal de cepas atenuadas de forma natural del genotipo I (FAO, 2021; Sun et al., 2021), podrían explicar la aparición de determinados brotes de enfermedad en China que complican aún más la situación epidemiológica y el futuro control de la PPA en Asia. El hecho de que haya cepas atenuadas y virulentas co-circulando en granjas dificulta el control y erradicación de la enfermedad, aumenta la posibilidad de recombinación y generación de revertientes. Además, este hecho exige la implementación de vacunas capaces de proteger frente a cada uno de los

virus circulantes, pues salvo con contadas excepciones, no existe cross-protección entre estos dos genotipos del VPPA.

4.1 BA71 Δ CD2, una vacuna atenuada con capacidad cross-protectora

Actualmente varios grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de vacunas vivas, basadas tanto en virus atenuados de forma natural y aislados en campo, como en virus atenuados mediante la eliminación de uno o varios genes. La inmunización con estas LAVs induce una potente respuesta humoral y celular específica confiriendo protección frente a cepas virulentas homólogas (Borca et al., 2020; Chen et al. 2020; Donnell et al., 2015; Tran et al., 2021). En nuestro laboratorio se ha desarrollado una LAV denominada BA71 Δ CD2 basada en la eliminación del gen EP402R, que codifica la proteína CD2v de la cepa viral virulenta aislada en España BA71 (Monteagudo et al., 2017). El CD2v es la hemaglutinina del virus que, junto con la Lectina (EP153R), le permite unirse a los eritrocitos del huésped (Galindo et al., 2000; Rodríguez et al., 1993). El BA71 Δ CD2 es el único prototipo vacunal que ha sido capaz de conferir tanto protección homóloga frente a la cepa parental patógena, BA71, como frente a cepas heterólogas, tanto del genotipo I (E75) como de otros genotipos, incluyendo la cepa Georgia2007/1 (genotipo II). Este hecho cobra una especial relevancia, teniendo en cuenta que, actualmente, en Asia y en África circulan cepas de ambos genotipos (Sun et al., 2021^a). Otra de las ventajas de este prototipo vacunal es su capacidad de propagarse en la línea celular COS-1, de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC- CRL1650), sin necesidad de previa adaptación, lo que facilita la

producción a gran escala de la LAV, manteniendo su integridad genética (Monteagudo et al., 2017). En términos de bioseguridad, el prototipo vacunal requiere de ciertas mejoras, pues tras la inoculación intramuscular, algunos animales presentan picos de fiebre y secreción viral a nivel intranasal.

En una tesis recientemente realizada en nuestro grupo se hizo hincapié en intentar mejorar la bioseguridad durante la inmunización con el prototipo vacunal BA71 Δ CD2 (López, 2019). Por un lado, se desarrollaron dos nuevos virus eliminando en cada uno un segundo factor de virulencia además del CD2v, y se testó su capacidad protectora. Los virus doble delecionados obtenidos: BA71 Δ CD2 Δ UK y BA71 Δ CD2 Δ EP153R, carecían además de la hemaglutinina viral de dos proteínas identificadas como relevantes para la virulencia del VPPA (Wang et al., 2018): la enzima uridina quinasa (UK) y de la lectina viral (EP153R), respectivamente. Desafortunadamente, la vacunación intramuscular con estos dos prototipos vacunales resultó mucho menos eficiente, confiriendo una protección menor frente la infección experimental con Georgia2007/1 que el propio BA71 Δ CD2 (López et al., 2021), mostrando una vez más la dificultad de predecir el comportamiento de un virus tras su manipulación genética.

Durante esa misma tesis doctoral (López, 2019), se pudo demostrar que la administración intranasal del BA71 Δ CD2 resultaba más segura para el animal inoculado que la inoculación intramuscular, apenas detectándose secreción viral ni fiebre. El hecho de que la eficacia vacunal frente al desafío experimental con Georgia07 no se viera afectada por la ruta de vacunación empleada y la mejora en la respuesta inmune de mucosas

conferida tras la inmunización intranasal, permite un cierto optimismo en cuanto a la futura utilización de esta ruta como una la vía óptima de administración del prototipo BA71 Δ CD2.

II. OBJETIVOS

BA71 Δ CD2 es un virus vivo atenuado obtenido en nuestro laboratorio con capacidad de conferir protección cruzada frente al virus parental homólogo y frente al virus heterólogo pandémico circulante Georgia2007/01. La seguridad del prototipo vacunal inoculado intramuscularmente se veía comprometida por el hecho de que una proporción de los animales vacunados secretaban virus al medio, coincidiendo con la detección de este en sangre. En la tesis anterior se comprobó que la administración intranasal del prototipo BA71 Δ CD2, mejoraba su bioseguridad sin comprometer su eficacia. Los mecanismos inmunológicos detrás de la respuesta inmune protectora frente a la VPPA inducida tras la vacunación sigue siendo una tarea pendiente, lo que dificulta el poder diseñar nuevas estrategias que ayuden racionalmente a mejorar las vacunas del futuro.

Partiendo de este punto, estos fueron los objetivos planteados:

1. Confirmar la vía intranasal como una alternativa segura para BA71 Δ CD2 y optimizar una formulación segura y eficaz frente a la infección letal con el virus pandémico Georgia2007/01.
2. Caracterizar la respuesta inmune protectora inducida tras la vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 a nivel sistémico (PBMCs) y local (células de LN submandibular) utilizando herramientas punteras que incluyen: *RNAseq*, *single-cell RNAseq* y citometría de flujo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células

1.1 Línea celular COS-1

Las células COS-1 (ATCC- CRL1650), presentan una morfología de fibroblasto y son derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Las condiciones de cultivo de dichas células son: incubación a 37 °C en atmósfera suplementada con un 5% CO₂, en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Cultek), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich) y L-glutamina (Invitrogen) a 2 mM. Al tratarse de una línea celular adherente, en los pases sucesivos las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) y fueron desprendidas del frasco de cultivo utilizando tripsina/EDTA (0,25% y 0,025% p/v, respectivamente) (Sigma-Aldrich). Las células se conservaron a -150°C en SFB con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

1.2 Macrófagos alveolares porcinos (MAPs)

Los MAPs se extrajeron de pulmones de cerdos Large White X Landrace, obtenidos tras el sacrificio de dichos animales. Dichos MAPs se extrajeron en condiciones de máxima asepsia mediante lavado pulmonar con PBS suplementado con 1µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich). Mediante el uso de un embudo estéril a través de la tráquea, se inocularon 250ml de la solución de PBS en el interior de los pulmones. A continuación, se realizó un masaje durante 5 minutos y se recogió el volumen de PBS inoculado en una botella estéril. Este lavado se repitió un total de 3 veces. El volumen

recogido en la botella se centrifugó a 400 xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y los pellets se lavaron con PBS. Finalmente, las células se mantuvieron en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de SFB (Cultek), 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), y L-glutamina a 2 mM (Invitrogen). El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, mediante tinción vital con azul tripano (Sigma). Los MAPs se congelaron en SFB con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) y se almacenaron a -150°C a una concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml. Una vez descongelados, los MAPs se cultivaron a 37°C, con una atmósfera suplementada con un 5% CO₂ en RPMI (Gibco) suplementado con un 10% de SFB (Cultek), 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), L-glutamina al 2 mM (Invitrogen) y un 0,5% de nistatina.

1.3 Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) se purificaron a partir de sangre completa recogida en tubos BD Vacutainer (*Plus Blood collection tubes* K2E, con 18 mg de EDTA como anticoagulante), mediante gradiente de densidad sobre Histopaque 1077 (Sigma). Brevemente, la sangre total diluida 1:1 en PBS, se depositó suavemente sobre el volumen de Histopaque y tras centrifugación a 400 xg, sin aceleración ni freno, se obtuvo el anillo de la interfase generada con el Histopaque entre la fracción celular (formada por PBMCs) y el plasma sanguíneo. Una vez lavadas con PBS, se procedió a eliminar la posible contaminación por eritrocitos mediante lisis por incubación con cloruro de amonio durante 5 minutos. Finalmente, tras un nuevo lavado con PBS, las PBMCs se resuspendieron

en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de SFB, 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen) y 2-mercaptoetanol a 0,05 mM. Finalmente, se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer, utilizando el colorante azul tripano (Sigma) para excluir las células muertas. Las PBMCs se cultivaron a 37°C, en atmósfera enriquecida con un 5% CO₂ en RPMI (Gibco) suplementado.

1.4 Células de linfonodo (LN) submandibular

Los linfonodos (LNs) submandibulares se obtuvieron en necropsia de manera aséptica, con tijeras y pinzas estériles y fueron transferidos a tubos cónicos tipo Falcon® de 50 ml, conteniendo 20 ml de DMEM suplementado con 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Con pinzas y bisturí estériles se procedió a diseccionar el LN en fragmentos de aproximadamente 3 mm cuadrados de superficie, seleccionando únicamente el tejido linfocitario. Los fragmentos de LN fueron transferidos a un tubo cónico tipo Falcon® de 15 ml y se incubaron a 37 °C durante 30 min en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 U/μl de DNasaI Recombinante libre de RNasa (Roche) y 10 mg/ml de Colagenasa tipo IV (Gibco Invitrogen), agitando la suspensión cada 5 minutos. A continuación, el tejido disociado enzimáticamente se filtró a través de un filtro estéril de malla de 40 μm. Las células obtenidas se centrifugaron a 400 xg, se descartó el sobrenadante y los *pellets* se lavaron con PBS. Finalmente, los *pellets* obtenidos se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de SFB, 100 IU de penicilina/estreptomicina/ml (Invitrogen), L-glutamina a 2mM (Invitrogen) y 2-mercaptoetanol a 0,05 mM. Para comprobar la viabilidad celular se utilizó azul tripano. Las células de LN se incubaron a 37°C, con

una atmósfera con un 5% CO₂ en RPMI (Gibco), suplementado con un 10% de SFB (Cultek), 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen) y 2-mercaptoetanol a 0,05mM.

2. Cepas virales

En la tesis se han utilizado dos cepas del VPPA: el prototipo BA71 Δ CD2 y la cepa virulenta Georgia2007/1, actualmente circulando de forma pandémica. En un experimento de estimulación *in vitro* de PBMCs se utilizaron la cepa ALL-183 atenuada del virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VPRRS) y la cepa virulenta Margarita del virus de la peste porcina clásica (VPPC) que fueron cedidas por el Dr. Enric Mateu (UAB, Barcelona) y la Dra. Llilianne Ganges (IRTA-CReSA, Barcelona), respectivamente. Además, en los experimentos de estimulación *in vitro* en los pocillos control (sin estímulo vírico) se añadió lo que denominamos “medio control”, es decir, el sobrenadante obtenido en los frascos de cultivo dónde se hizo la producción celular en paralelo a las producciones virales.

2.1 BA71 Δ CD2

El prototipo vacunal BA71 Δ CD2 es un virus vivo atenuado obtenido mediante la eliminación del gen EP402R (que codifica la proteína CD2v) mediante recombinación homóloga de la cepa virulenta BA71 (genotipo I), aislada en España en 1971 (Monteagudo et al. 2017).

Los *stocks* virales de BA71 Δ CD2 utilizados *in vivo* se obtuvieron siempre en COS-1 (ATCC-CRL-1650) utilizando una multiplicidad de infección

(MOI, del inglés *multiplicity of infection*) de 0,1. Tras una incubación de aproximadamente 72 horas a 37°C, con una atmósfera enriquecida con un 5 % de CO₂. Cuando se observó efecto citopático, las células y el sobrenadante del cultivo se recogieron y congelaron a -80°C. Tras tres ciclos de descongelación y congelación para liberar las partículas virales de las células infectadas, las muestras se centrifugaron a 3220 xg durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. Los stocks de virus se alicuotaron y congelaron a -80°C.

2.2 Georgia2007/1

La cepa virulenta utilizada en los ensayos *in vivo* e *in vitro* fue Georgia2007/1 (genotipo II). La cepa Georgia 2007/1 fue aislada en la República de Georgia en 2007 y fue cedida a nuestro laboratorio por el laboratorio de la Dra. Linda Dixon (*The Pirbright Institute*, Reino Unido). Georgia 2007/1 se creció en MAPs a una MOI de 0,01 siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para BA71ΔCD2.

3. Titulación viral

Georgia2007/1 no crece en células COS-1, mientras que BA71ΔCD2 crece tanto en MAPs como en COS-1 sin necesidad de adaptación previa (Hurtado et al., 2010) contribuyendo a su estabilidad genética tras el pase en cultivo. Así pues, dependiendo del virus y de la célula empleada, los virus se han titulado de diversas formas. Georgia2007/01, al ser un virus hemadsorbente, puede titularse mediante hemaglutinación (Ruíz-Gonzalvo y Coll, 1993), mientras que esta técnica no pudo ser utilizada en

el caso de BA71 Δ CD2 por carecer de la hemaglutinina viral (CD2v). Del mismo modo, BA71 Δ CD2 forma placas de lisis detectables en monocapas de COS-1 (Monteagudo et al., 2017) mientras que Georgia2007/01 no. Así pues, las únicas técnicas comúnmente empleadas para ambos virus fue la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA, del inglés *immunoperoxidase monolayer assay*) o mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

3.1 Titulación viral mediante la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)

Los stocks virales de BA71 Δ CD2 y Georgia2007/1 se titularon mediante una IPMA en MAPs. Para ello se sembraron 25.000 MAPs por pocillo en placas de 96 pocillos, y se infectaron con diluciones decimales seriadas del virus (8 réplicas por cada dilución). Las placas se incubaron a 37 °C, en atmósfera suplementada con un 5% de CO₂ durante 96 horas, y, transcurrido este tiempo, las células se fijaron con metanol, conservando las placas a -20 °C hasta el día de su titulación. Para detectar las células infectadas se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C con suero inactivado de animales supervivientes a la PPA diluido 1:200, seguido de una incubación con proteína-A conjugada con peroxidasa (Millipore) diluida 1:750 (1 hora a 37°C). Finalmente, las placas se incubaron con una solución de AEC (3-amino-9-diethyl-carbazone) durante 10 minutos para detectar las células infectadas. Bajo el microscopio invertido se contabilizaron como positivos todos los pozos que presentaron al menos una célula teñida. El título viral se calcula en TCID₅₀/ml (del inglés *Tissue Culture Infectious Dose*) mediante el método de Reed–Muench (Reed y Muench, 1938), que por definición indica la dilución del virus necesario

para infectar el 50% de un cultivo celular. En ocasiones, los títulos virales se transformaron en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml), multiplicando el valor de TCDI₅₀/ml por 0,7 siguiendo la distribución de *Poisson*. En el caso de BA71ΔCD2 se ratificó la correspondencia mediante ensayos de titulación en placa. Algunas muestras biológicas obtenidas *in vivo* se titularon por IPMA para ratificar la presencia de virus infeccioso en las mismas.

3.2 Titulación viral mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Además del stock viral de Georgia2007/1 utilizado en la infección *in vivo*, las muestras biológicas (suero e hisopo nasal) obtenidas en los experimentos *in vivo* se titularon mediante qPCR. Con tal fin, la extracción del ADN viral se realizó mediante el kit MagAttract 96 cador (QUIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación del ADN viral se utilizaron los cebadores qPCR-PK-F (GTCCAGGCCGGAACAACA) y qPCR-PK-R (CCTTTCCACCTTTGCTGTAGGA) que amplifican un fragmento de 85pb del gen R298L (PK) del VPPA (Lacasta et al. 2014). Todas las amplificaciones se realizaron en placas MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction plate (Applied Biosystem) y utilizando PowerUp Sybr green Master mix 2X (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se realizó mediante el termociclador ABI 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). La curva estándar fue realizada mediante la amplificación y cuantificación de un amplicón de 891pb del gen de la PK del VPPA. Los resultados de la qPCR se expresan en Log₁₀ de copias genómicas equivalente por mililitro (CGE/ml), siendo el límite de

detección de la técnica de 10^3 CGE/ml, al menos para el tipo de muestras biológicas analizadas. Como se ha comentado con anterioridad, algunas de las muestras positivas a PCR (presencia del material genético del VPPA), se utilizaron para confirmar o descartar la presencia de virus infeccioso en las mismas titulándolas por IPMA.

4. Protocolos de inmunización, infección y toma de muestras

Todos los experimentos *in vivo* se realizaron con cerdos convencionales Landrace x Large White de 6-8 semanas de edad, en las instalaciones de seguridad biológica de nivel 3 (NSB3) del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (IRTA-CReSA). El número de animales utilizado en cada experimento se especifica en el apartado de resultados, tanto en el texto como en la leyenda de las figuras. El cuidado de los animales y los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de las Buenas Prácticas Experimentales y con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la *Generalitat de Catalunya* (códigos de proyecto: CEA-OH/10874/2 y CEA-OH/11241/1). El periodo de aclimatación de los animales establecido fue de siete días antes de la vacunación. Los animales se alimentaron *ad libitum*. Los resultados presentados en la presente tesis provienen de cinco experimentos independientes.

En el **experimento 1** se inocularon las siguientes tres dosis del prototipo vacunal BA71 Δ CD2 (Monteagudo et al. 2017): dosis baja (10^3 ufp/animal), dosis intermedia (3.3×10^4 ufp/animal), y dosis alta (10^6 ufp/animal). Se utilizó un grupo control inoculado con PBS. Cada animal

recibió 2 ml de la dosis vacunal o PBS *administrada vía intranasal* (1 ml/fosa nasal). Para ello, se utilizaron los dispositivos de atomización para mucosa intranasal MAD Nasal™ (Teleflex) y la inoculación se realizó en el momento en el que los cerdos inspiraban de forma natural, asegurando así la óptima administración del virus. A las tres semanas post-vacunación (día 0 post infección), los animales se infectaron por contacto directo con cerdos previamente infectados intramuscularmente con la cepa virulenta Georgia2007/1 (a los que denominaremos animales troyanos). En detalle, los animales se distribuyeron en 3 boxes diferentes, cada uno de ellos separado en dos espacios, uno con 7 cerdos y otro con 6. Estos espacios permitían contacto visual, pero no físico. En uno de los espacios había 6 cerdos vacunados (una dosis diferente en cada box), mientras que en el otro espacio de cada box había 4 cerdos troyanos y dos cerdos no vacunados. Así, entre los tres boxes, contábamos con un total 6 cerdos controles no vacunados. El día anterior a la infección por contacto, los animales troyanos fueron inoculados intramuscularmente con 10^3 CGE de la cepa virulenta Georgia2007/1. Al día siguiente los animales vacunados se mezclaron en el mismo espacio con los animales troyanos y los controles al retirarse la barrera que los separaba (Figura 3). De este modo, la ratio de infección fue de 2:1 animales vacunados o control frente a animales troyanos.

Se tomaron muestras de sangre e hisopo nasal y rectal a todos los animales los días 4, 7 y 14 tras la vacunación y los días 0, 3, 6, 10, 13 y 20 tras la infección.

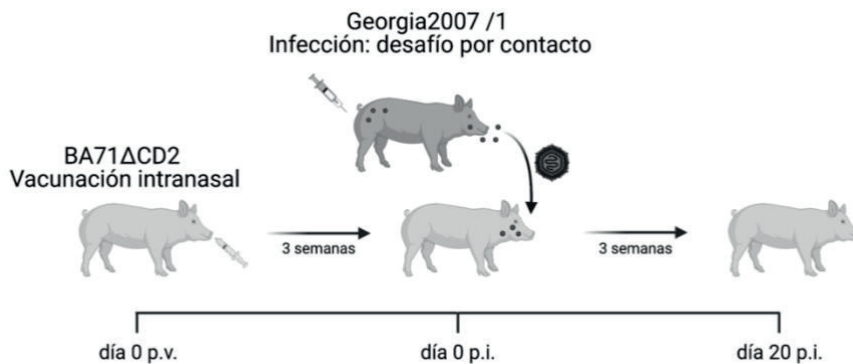


Figura 3. Esquema del diseño experimental utilizado para la vacunación intranasal e infección por contacto directo de los cerdos en el experimento 1.

En los **experimentos 2, 3 y 4** los animales se vacunaron con la dosis alta de BA71ΔCD2 (10^6 ufp) o PBS como control, siguiendo el mismo protocolo de inmunización descrito para el experimento 1. Todos los animales se sacrificaron tres semanas tras la vacunación y se tomaron muestras de sangre y LN submandibular.

En todos los experimentos se realizó un seguimiento clínico diario tanto de la temperatura rectal, como del estado general de cada animal. Tras la infección con cepas virulentas de VPPA, todos los animales fueron observados diariamente para determinar la aparición de los siguientes signos clínicos característicos de una infección por PPA: fiebre, postración, pérdida de apetito, cianosis, diarrea y hemorragias (Galindo-Cardiel et al., 2013). En el momento en que se detectaron signos graves de PPA los animales fueron sacrificados siguiendo los protocolos éticos establecidos y posteriormente se realizó una necropsia completa para confirmar o descartar la presencia de lesiones compatibles con PPA.

5. Valoración de la respuesta inmunológica

5.1 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA mediante ELISA

La detección de anticuerpos específicos frente a VPPA en suero se realizó mediante un ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) aprobado por la OMSA y basado en extractos solubles de células infectadas con VPPA (Gallardo et al., 2013). La presencia de sueros positivos se detectó utilizando una anti-IgG de cerdo conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich), diluida 1:20000. Como sustrato específico se empleó 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) soluble (Sigma-Aldrich), parando la reacción 10 minutos más tarde con H₂SO₄, 1N (Merck), para su posterior lectura. Los resultados obtenidos se representaron por duplicado como la absorbancia obtenida para cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm.

5.2 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante ELISpot de IFN γ

Para la medición de la respuesta celular específica frente al VPPA, se realizó un recuento de células secretoras de IFN γ mediante la técnica de ELISpot (Díaz y Mateu, 2005). Se tapizaron placas de 96 pocillos (COSTAR, 3590) con el anticuerpo anti-IFN γ porcino (clon P2G10, BD Pharmingen) a una dilución 1:100 y se incubaron *overnight* a 4°C. Posteriormente, se añadieron las PBMCs a una concentración de 5x10⁵ PBMCs en cada pocillo, salvo en los pocillos control positivo, en los cuales se añadieron 2,5x10⁵ PBMCs. Las células se estimularon durante 16-18 horas a 37°C, en una atmósfera suplementada con un 5% de CO₂, con

BA71 Δ CD2 o Georgia2007/1 a una MOI de 0.2. Como control negativo se utilizó medio RPMI y como control positivo, fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) a 5 μ g/ml. Para detectar las células secretoras de IFN γ se utilizó el anticuerpo porcino anti-IFN γ biotinilado (clon P2C11, BD Pharmingen) y, a continuación, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Biosource) a una concentración de 0.5 μ g/ml. Para revelar las placas se utilizó TMB insoluble (Calbiochem). Una vez reveladas, se procedió al recuento de puntos (*spots*) coloreados (que representan la presencia de una célula productora de IFN γ) en cada uno de los pocillos mediante el uso de una lupa binocular. Los resultados definitivos se obtuvieron sustrayendo del recuento obtenido en los pocillos problema los valores obtenidos en los pocillos del control negativo, y se presentan como el número de células específicas secretoras de IFN γ por cada 1.000.000 PBMCs (Puntos/ 1×10^6 PBMCs).

5.3 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante citometría de flujo

Para los análisis de citometría se utilizaron PBMCs recién obtenidas a 21 días tras la inmunización se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Corning) (10^6 células/pocillo). Dichas células se estimularon a 37°C, en una atmósfera suplementada con un 5% de CO₂, durante diferentes tiempos dependiendo del ensayo funcional, con BA71 Δ CD2 a una MOI de 0,2 o medio control durante diferentes tiempos dependiendo del ensayo funcional. Así, para la detección intracelular de IFN γ y TNF, las PBMCs se estimularon durante 8 horas, en presencia de Brefeldin A (BD GolgiPlug™ *protein transport inhibitor*) las dos últimas horas para permitir la acumulación intracelular de las citoquinas. Para la detección de

perforina, las PBMCs se estimularon durante 48 horas. En todos los casos se utilizó RPMI y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, del inglés *phorbol myristate acetate*; 5 ng/ml)-Ionomicina (500 ng/ml) como controles negativo y positivo, respectivamente. En el experimento de bloqueo de IFN γ durante la estimulación con BA71 Δ CD2 se añadió el anticuerpo anti-IFN γ porcino (clon P2G10, BD Pharmingen) a 5 μ g/ml (Mateu et al. 1998). Tras la estimulación correspondiente en cada caso, las células se tiñeron con el marcador de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Red Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, antes de comenzar las tinciones se realizó el bloqueo de los receptores Fc mediante la incubación, durante 15 minutos en hielo, con PBS con un 5% de suero fetal porcino (SFP). Para la tinción extracelular, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los correspondientes anticuerpos diluidos en buffer FACS (PBS 2% FCS). Para la tinción intracelular, las células se fijaron y permeabilizaron con el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se incubaron posteriormente con los anticuerpos diluidos en Perm/Wash buffer durante 30 minutos en hielo. La información de todos los anticuerpos utilizados se incluye en la Tabla S1. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSAria IIu (BD Biosciences) y los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Inc). Las estrategias de selección de las poblaciones celulares utilizadas para el análisis de células productoras de IFN γ y TNF o Perforina se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

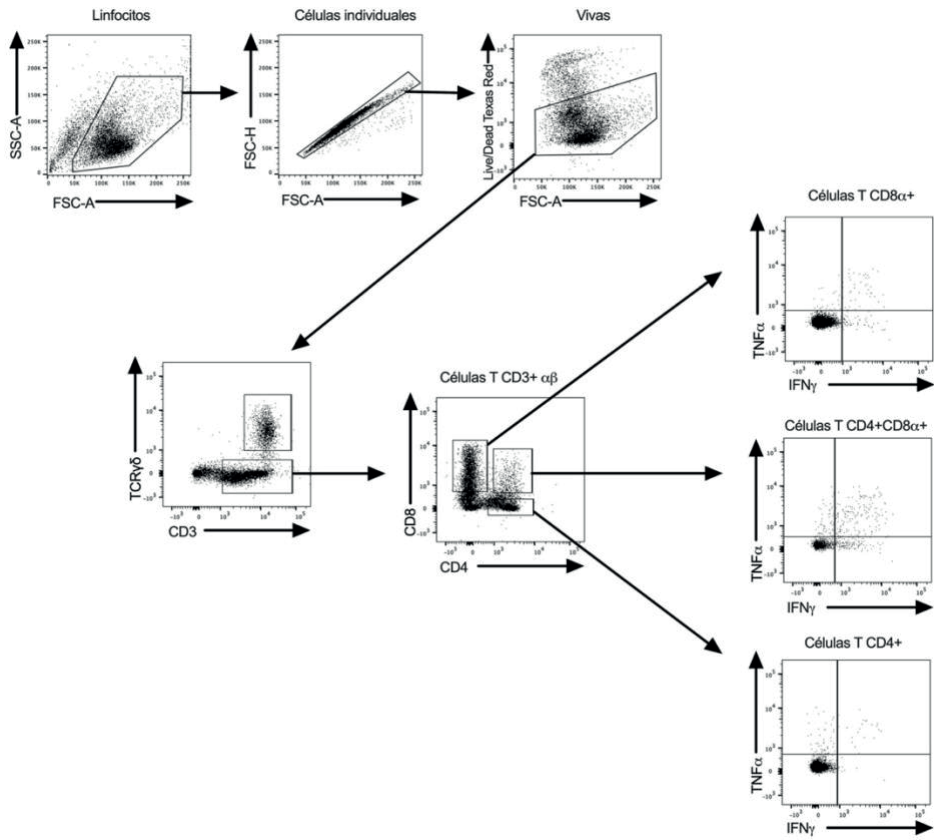


Figura 4. Estrategia de selección de las poblaciones celulares para obtener los porcentajes de células T CD4+, CD8+ y CD4+CD8+ que producen IFN γ y TNF tras la estimulación específica con el VPPA.

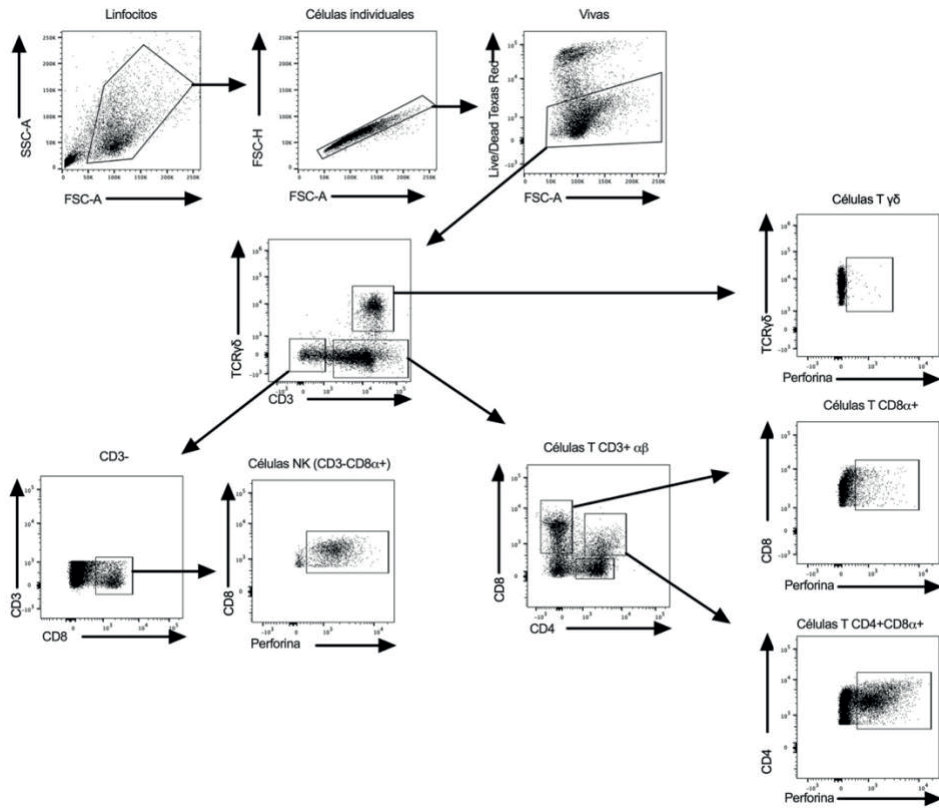


Figura 5. Estrategia de selección de las poblaciones celulares para obtener los porcentajes de células que producen Perforina tras la estimulación específica con el VPPA.

5.4 Ensayo de Luminex Multiplex

Las PBMCs obtenidas 21 días tras la vacunación del experimento 1, se estimularon *in vitro* durante 10 horas con BA71 Δ CD2 a una MOI de 0.2 o con medio control. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo de las PBMCs y se cuantificaron los niveles de diferentes citoquinas mediante la tecnología Luminex xMAP siguiendo las indicaciones del fabricante (ThermoFisher Scientific). El kit incluye la medición del siguiente panel de citoquinas: IFN α , IFN γ , IL-1b, IL-10, IL-12p40, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF (ProcartaPlex Porcine Cytokine & Chemokine Panel 1; ThermoFisher Scientific). Las concentraciones de las diferentes citoquinas se calcularon utilizando el programa xPONENT (Luminex, ThermoFisher Scientific).

6. Preparación de la librería y secuenciación de ARN (*RNAseq*)

Las PBMCs obtenidas de cerdos 21 días tras la vacunación del experimento 1, se estimularon con BA71 Δ CD2 con una MOI de 0.2 durante 10 horas a 37°C y se conservaron en TRIzol Reagent (Invitrogen) a -80°C. A continuación, se aisló el ARN total mediante fenol-cloroformo en combinación con el kit de purificación por columna RNeasy MinElute spin (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para asegurar una buena calidad del ARN obtenido, se realizó un tratamiento con DNaseI (RNase-Free DNase Set, Qiagen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La calidad y concentración del ARN se analizó mediante el uso de Agilent Bioanalyzer, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN

total de las PBMCs se envió a analizar al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG).

Las librerías de secuenciación se obtuvieron tras eliminar el ARN ribosómico mediante el kit Ribo-Zero (Illumina), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó y marcó mediante la adición de adaptadores de códigos de barras Truseq. Las librerías se cuantificaron utilizando el kit de cuantificación KAPA Library (KapaBiosystems) antes de realizar la amplificación con Illumina's cBot. Finalmente se mezclaron y secuenciaron cuatro librerías (cadena simple, 50 nts) en un secuenciador Illumina HiSeq2000 para obtener 50-60 millones de lecturas por muestra.

7. Ensayo de PCR cuantitativa utilizando la tecnología “microfluídica”

Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 6 para la extracción del ARN total de las muestras de las PBMCs obtenidas 21 días tras la vacunación del experimento 2 y estimuladas *in vitro* con BA71 Δ CD2 o Georgia2007/1 (MOI 0.2). Brevemente, se obtuvo el ADNc mediante transcripción reversa del ARN total (110 ng) utilizando el kit PrimeScriptTM RT (Takara, Japan, Cat. RR036A), siguiendo las indicaciones del fabricante. El diseño de los cebadores utilizados y la validación de los mismos se hizo siguiendo los criterios previamente descritos (Nigeer et al. 2021). La lista de los cebadores utilizados se especifica en la Tabla S2.

Los niveles de expresión se analizaron por duplicado utilizando el sistema de 96.96 *Dynamic Array integrated fluidic circuit of the Biomark* HD (Fluidigm Corporation). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el

programa de análisis Fluidigm Real-Time PCR 4.1.3, junto con el programa de expresión DAG 1.0.5.6 (Ballester, Cordón et al., 2013). La curva estándar se calculó siguiendo las indicaciones de *Applied Biosystems user bulletin #2*. Como genes de expresión de referencia, utilizados para normalizar los resultados, se seleccionaron: YWHAZ, RPL4 y GAPDH. Los resultados se representaron en un mapa de calor utilizando los valores normalizados mediante *z-score*.

8. Preparación de la librería y secuenciación de *single-cell RNA-sequencing* (RNA-seq)

Suspensiones celulares de LNs submandibulares obtenidos a día 21 post vacunación de un animal vacunado y un animal control del experimento 3 (como se describe en la sección 1.4) se estimularon con BA71 Δ CD2 (MOI de 0.2) o medio control durante 16 horas a 37°C. A continuación, las células se fijaron con metanol siguiendo el protocolo previamente descrito para PBMCs de humano (Chen et al. 2018) y se conservaron a -80°C hasta que fueron enviadas secuenciar a la plataforma de secuenciación *10x Genomics scRNA-seq* del CNAG-CRG, con el fin de obtener la secuenciación del ARN de células individuales (*scRNA-seq*, del inglés *single-cell RNA-sequencing*). Así, las células fijadas en metanol fueron rehidratadas siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente (Chen et al. 2018). De manera resumida, las células se equilibraron de los -80°C a 4°C durante 5 minutos y a continuación se centrifugaron a 1000 xg durante 5 minutos a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en tampón de lavado y se filtró a través de una malla de 40 μ m (PluriSelect). Para determinar la concentración celular se utilizó el contador automático de células TC20

(BioRad). Las células fueron incluidas en las denominadas *gel bead-in-emulsions* (GEMs) utilizando el *Chromium Controller system* (10x Genomics) con el objetivo de secuenciar 5.000 células. Las librerías de expresión génica (GEX, del inglés *gene expression*) de cada célula fueron preparadas utilizando el kit *Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v3.1* (10x Genomics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transcripción reversa de las GEM y el *clean-up*, se amplificó el ADNc utilizando 13 ciclos. El análisis de la calidad y la cuantificación del ADNc se realizó mediante *Agilent Bioanalyzer High Sensitivity chip* (Agilent Technologies). Se utilizaron entre 10 y 50 ng del ADNc para preparar la librería y dichas librerías se indexaron mediante PCR utilizando *Single Index Kit T Set A* (10x Genomics). El tamaño de la distribución y la concentración de las librerías 3' GEX se verificó mediante el chip *Agilent Bioanalyzer High Sensitivity*. Finalmente, las muestras se secuenciaron utilizando el secuenciador Illumina NovaSeq6000 y se obtuvieron aproximadamente 40.000 lecturas por célula.

9. Análisis bioinformático

9.1 RNA-seq de las muestras de PBMCs

Las lecturas obtenidas mediante Illumina se mapearon al genoma de referencia de *Sus scrofa* (Sscrofa11.1) empleando la versión 2.5.3a del software STAR (Dobin et al. 2013) con parámetros ENCODE. Los genes anotados se cuantificaron con la versión 1.3.0 de RSEM (Li y Dewey, 2011) empleando los parámetros predeterminados utilizando la actualización 100 de la anotación de *Sus scrofa* del ENSEMBL. Las

lecturas obtenidas mediante ilumina también se mapearon frente el genoma del VPPA del BA71 (código de acceso KP055815.1), empleando la versión 2.5.3a del software STAR con parámetros ENCODE. Los genes anotados se cuantificaron con la versión 1.3.0 de RSEM (Li y Dewey, 2011) empleando los parámetros predeterminados y la anotación KP055815.1. El análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete v3.42.3 de limma (Ritchie et al., 2015), utilizando la normalización TMM. La función de voom (Law et al., 2014) se utilizó para transformar los datos en “log₂-counts” por millón (logCPM), estimar la relación media-varianza para calcular el peso “observación”. Estos datos voom se usaron para ajustar los modelos lineales *duplicate Correlation*. Se extrajeron los contrastes para las comparaciones por pares, así como los contrastes para el efecto de interacción entre el tratamiento y el estado de vacunación. Los genes se consideraron diferencialmente expresados (DE) si se ajustaban a un p-valor < 0.05. El análisis de enriquecimiento funcional se realizó utilizando los genes DE con un *fold change* absoluto > 1.5 utilizando gprofiler2 v0.1.8 (Kolberg et al., 2020) (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Las similitudes de las muestras se analizaron con un gráfico de escala multidimensional (MDS) utilizando los 500 genes más variables.

9.2 *scRNA-seq* de las muestras de LN submandibular

Las lecturas de secuenciación se procesaron mediante CellRanger v.5.0.1 (Kolberg et al. 2020), utilizando el genoma concatenado del cerdo (Sscrofa11.1) y el de la cepa de VPPA BA71V (número de acceso KP055815) como genomas de referencia. El archivo resultante “*filtered_feature_bc_matrix*” se utilizó para realizar el posterior análisis con el paquete de R Seurat 4.0.6 (R.4.1.2) (Hao et al. 2021). Para asegurar

la calidad de las células, únicamente se analizaron las células marcadas con un rango de entre 200-2000 genes detectados y con un contenido mitocondrial inferior al 5%. Los datos se normalizaron con el método *SCTransform* y se seleccionaron las 3000 características más variables para ser integradas en el *FindIntegrationAnchors* predeterminado de Seurat. El gráfico *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) se realizó con los 30 primeros componentes principales, seguido de las funciones *FindNeighbours* y *FindClusters* con una resolución de 0.8 y 0.5. Para cada célula también se calcularon marcadores de ciclo celular y el porcentaje de transcritos del VPPA. El análisis de *sub clustering* de los *clusters* 7, 8, 9 y 14 se realizó mediante la función *FindSubCluster* con resolución de 0.2, 0.3, 0.5 y 0.3 respectivamente. El tipo celular se anotó manualmente buscando la presencia de diferentes marcadores inmunológicos genéticos porcinos. La expresión diferencial de los diferentes tipos celulares entre la muestra control y la del animal vacunado se realizó con la función *FindMarkers* con $\text{min.pct}=0.25$ y $\text{logfc.threshold}=0.25$. El análisis de enriquecimiento ontológico (GO, del inglés *Gene Ontology enrichment analyses*) se realizó utilizando *gprofiler2* v0.1.8 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>).

10. Análisis estadísticos

Los gráficos se crearon y analizaron utilizando la versión 8.3.0. del software Prism (GraphPad). Los test estadísticos utilizados se indican en las leyendas de las figuras. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$ y se presenta en estilo Graph Pad (GP) 0.05 y se presenta en estilo Graph Pad (GP) ($p > 0.05$ ns, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ****

$p \leq 0.0001$). Los tests estadísticos de los datos del estudio de *microfluidic quantitative PCR* se realizaron con R v4.1.2 (tabla S3); las comparaciones de la expresión de los valores entre grupos (vacunado y no vacunado) se realizaron utilizando t-test emparejados por pares, mientras que las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando un t-test independiente por pares.

IV. RESULTADOS

1. La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 protege de manera dosis-dependiente frente a la infección con el virus pandémico Georgia2007/1

El trabajo realizado en los últimos años en colaboración con el laboratorio de la Dra. Salas del CBMSO-CSIC permitió desarrollar el prototipo vacunal BA71 Δ CD2, un virus atenuado obtenido tras eliminar mediante recombinación homóloga el gen CD2v del genoma del virus virulento BA71. La inoculación intramuscular de BA71 Δ CD2 protegió no sólo contra el virus parental BA71, sino que además demostró su capacidad de conferir protección cruzada frente a virus distintos, incluyendo la cepa Georgia2007/01 (Monteagudo et al, 2017), actualmente presente en los cinco continentes. Con el objetivo de optimizar la inmunización, en la tesis de Elisabeth López (López, 2019), se comparó la inmunización intramuscular con la intranasal. De este estudio se concluyó que, mientras ambos métodos de administración inducían una protección similar, la vía intranasal resultaba más segura, reduciendo drásticamente la detección del virus en suero e hisopos nasales y rectales (secreción de virus) tras la inmunización, así como los picos de fiebre que presentaban algunos animales inmunizados por la vía intramuscular.

1.1 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 es segura

En un intento de optimizar la inoculación intranasal, en este primer estudio se evaluaron 3 dosis diferentes de BA71 Δ CD2: dosis baja (10^3 ufp/animal), dosis intermedia (3.3×10^4 ufp/animal), dosis alta (10^6 ufp/animal) y se añadió un grupo control inoculado con PBS. La

inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 resultó totalmente segura para los animales, independientemente de la dosis utilizada. Así, ninguno de los animales vacunados mostró sintomatología alguna compatible con PPA, sin picos de fiebre ni de viremia (Figura 6 y Tablas S4).

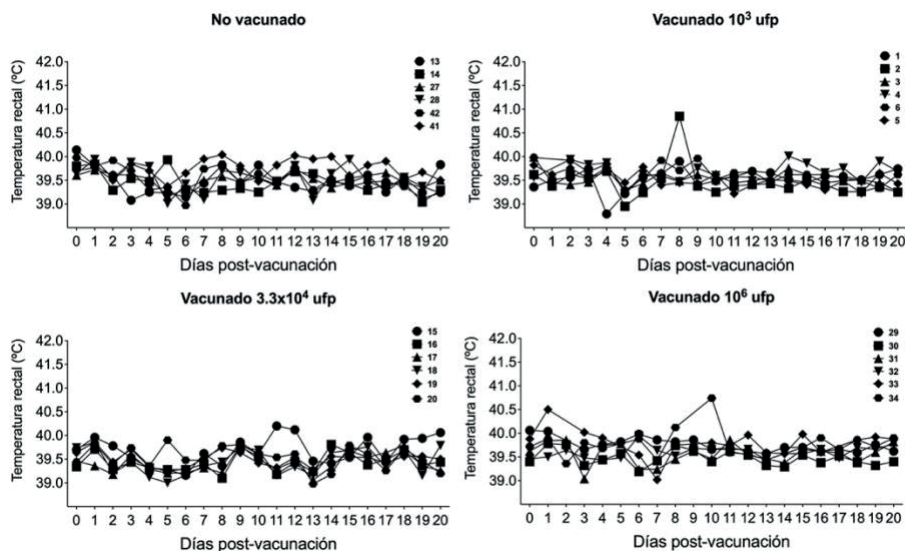


Figura 6. Los animales vacunados no presentan fiebre tras la inmunización con BA71 Δ CD2. En las gráficas se muestran las cinéticas de las temperaturas rectales tomadas individualmente en cada grupo

1.2 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 protege frente a la infección letal con Georgia2007/01

A los 21 días tras la inoculación todos los animales se sometieron a un desafío por contacto con el virus Georgia2007/1. Como era de esperar, los 6 animales del grupo no vacunado se infectaron y empezaron a presentar fiebre alta a partir del séptimo día tras la infección (Figura 7). Todos los animales se sacrificaron a las dos semanas tras la infección por motivos humanitarios (Figura 8). En claro contraste con los animales control, los animales vacunados con BA71 Δ CD2 quedaron protegidos de forma dosis-

dependiente. Tras la inmunización con la dosis baja (10^3 ufp/animal) sobrevivieron el 50% de los animales a la infección letal con Georgia2007/1 (Figura 8). En el caso de la dosis intermedia (3.3×10^4 ufp/animal) y alta (10^6 ufp/animal) la inmunización protegió de la infección letal a todos los animales, con la excepción del cerdo número 16 del grupo inmunizado con la dosis intermedia. Los animales protegidos o bien no presentaron fiebre ni signos clínicos compatibles con PPA, o simplemente presentaron picos de fiebre tras el contacto con el virus virulento (Figura 7). En cualquier caso, todos los animales inmunizados con estas dosis de BA71 Δ CD2, con la excepción del 16, llegaron al final de experimento (día 20 post-infección (dpi), sin fiebre ni signos clínicos compatibles con PPA (Figura 7).

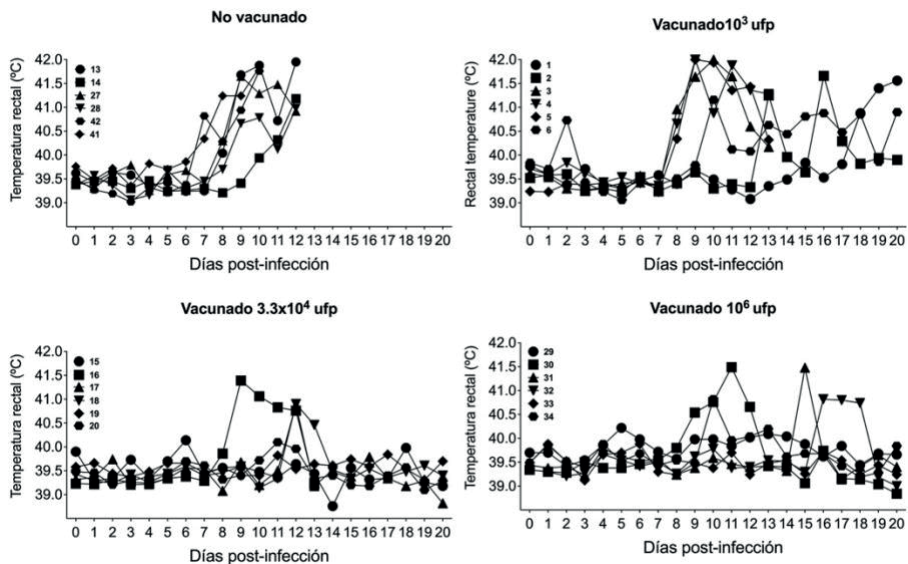


Figura 7. Los animales vacunados con dosis intermedias y altas de BA71 Δ CD2 están sólidamente protegidos frente a la infección con Georgia2007/1 y no presentan fiebre a día 20 post-infección (final de experimento). En las gráficas se muestran las cinéticas de las temperaturas rectales tomadas individualmente en cada grupo.

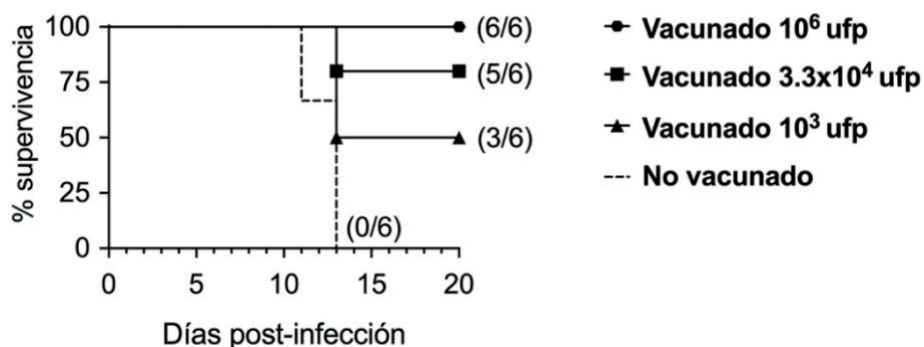


Figura 8. La inoculación intranasal de BA71 Δ CD2 protege a los cerdos frente a la infección letal con Georgia2007/1 de forma dosis-dependiente. Gráfico de supervivencia en el que se muestra el porcentaje de cerdos que sobreviven a la infección a lo largo del tiempo. El tiempo cero viene marcado por el momento en el que los animales de los diferentes grupos se pusieron en contacto con los animales infectados intramuscularmente (troyanos).

En contraposición con los animales vacunados con las dosis intermedia y alta, los cerdos supervivientes que habían sido vacunados con la dosis baja de BA71 Δ CD2 (animales 1, 2 y 6), sufrieron periodos más largos de fiebre, llegando al final del experimento en plena subida de fiebre (Figura 7). Correlacionando con las cinéticas de fiebre observadas, los animales control presentaron virus en suero y en secreciones nasales a partir del día 7 dpi. Con la excepción del animal 16 del grupo inmunizado con 3.3×10^4 ufp/animal, los animales vacunados con la dosis intermedia y alta mostraron o bien picos concretos de virus, siempre mucho más bajos que los encontrados en los animales control, o incluso nada de virus independientemente del tiempo testado (Figura 9). De nuevo coincidiendo con lo observado para la fiebre, en el momento de fin de experimento (21 dpi), los animales no mostraron virus en suero ni en cavidad nasal (Figura 9).

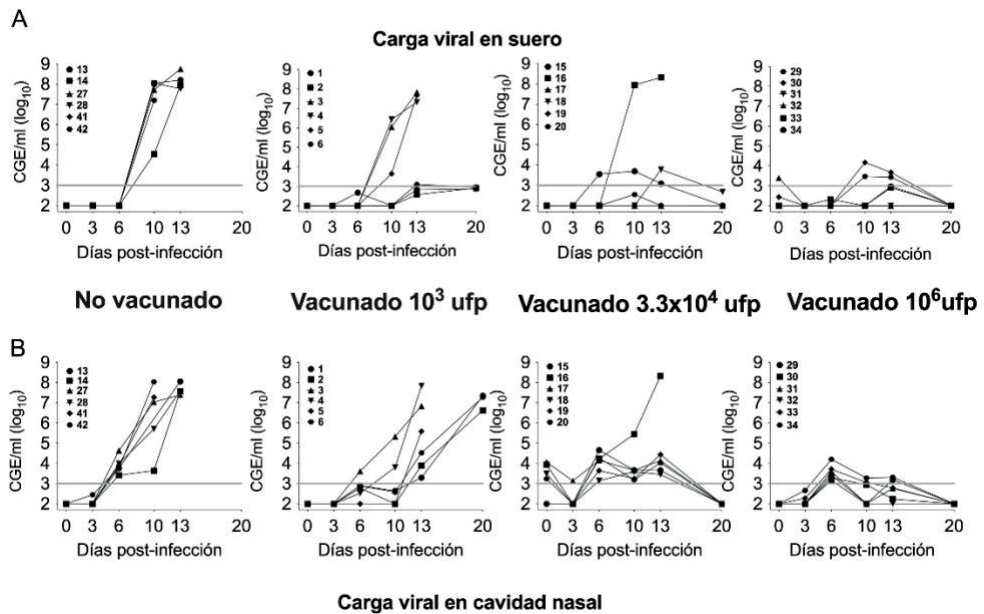


Figura 9. Los animales vacunados con BA71 Δ CD2 y protegidos frente al desafío con Georgia2007/1 no presentan carga viral ni en suero ni en cavidad nasal a día 20 post-infección. Carga viral en suero (A) y en cavidad nasal (B) medido mediante qPCR en los tiempos indicados después del desafío por contacto con Georgia2007/1.

La vacunación con la dosis baja (10^3 ufp de BA71 Δ CD2) resultó mucho más ineficiente que las dosis intermedia y alta. Así, a pesar de que los tres animales supervivientes mostraban títulos muy bajos de virus en suero (Figura 9A), simplemente vieron retrasada la secreción del virus, llegando a observarse niveles muy altos de virus en secreción nasal a día 20 dpi (Figura 9B). Los animales vacunados que no sobrevivieron a la enfermedad mostraron cinéticas virales indistinguibles de las de los cerdos control (Figura 9).

1.3 La inoculación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una potente respuesta humoral y celular específica

En un intento de explicar los mecanismos involucrados en protección, se estudió tanto la producción de anticuerpos como de células T específicas frente al VPPA.

Como se ha descrito en estudios anteriores, la infección con una cepa virulenta en cerdos no inmunes es tan rápida que el animal no tiene tiempo de desarrollar una respuesta humoral potente antes de morir (Figura 10). Sin embargo, la vacunación con BA71 Δ CD2 induce la producción de anticuerpos específicos frente al VPPA, observándose de nuevo una relación directa entre la dosis de vacuna empleada y la respuesta obtenida (Figura 10). En el caso de la dosis intermedia y alta todos los animales seroconvirtieron y mostraron títulos altos de anticuerpos específicos a los 14 días postvacunación (dpv), con la excepción, de nuevo, del cerdo 16 vacunado con la dosis intermedia (Figura 10), muy probablemente debido a un fallo durante la vacunación, más que de la vacuna en si. De forma reseñable, los cerdos vacunados con la dosis alta de la vacuna respondieron de una forma más homogénea. Las respuestas de anticuerpos observadas con los animales vacunados con la dosis baja confirman los resultados obtenidos hasta ahora, mostrando una cinética de inducción de anticuerpos retrasada que no alcanza los valores obtenidos con las dosis intermedias y altas (Figura 10).

Cinética de anticuerpos específicos del VPPA

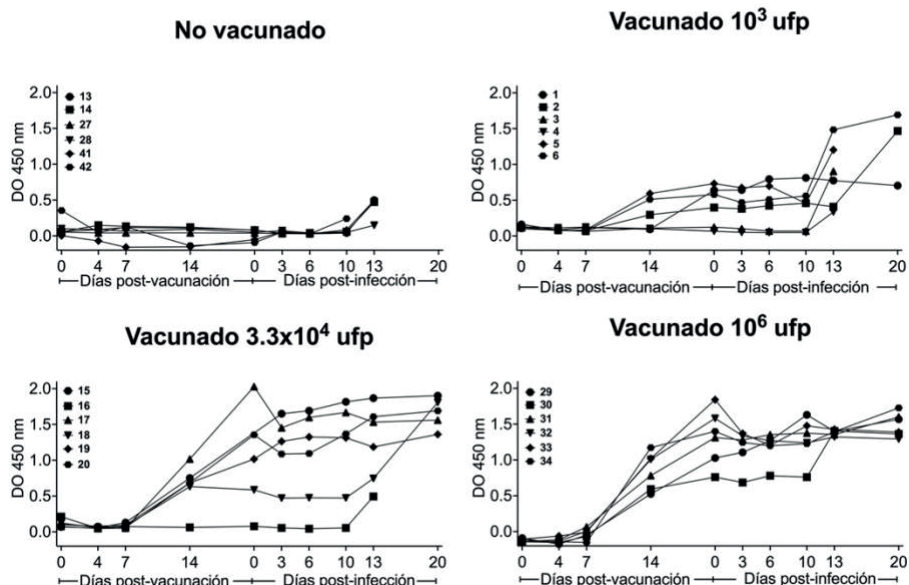


Figura 10. Cinética de anticuerpos específicos frente al VPPA. Anticuerpos específicos del VPPA en animales vacunados y no vacunados obtenidos mediante un ELISA. Los valores se representan como densidades ópticas a 450nm obtenidas en los tiempos indicados.

Junto con el papel de la respuesta humoral en la protección frente VPPA, se ha descrito que la respuesta celular específica, ligada a la producción de $IFN\gamma$, es clave (King et al., 2011). Por ello se realizó un ELISpot de $IFN\gamma$ utilizando PBMCs de todos los animales obtenidos a 21 dpv, antes de la infección con la cepa virulenta. Las PBMCs obtenidas se estimularon tanto con el virus vacunal (BA71 Δ CD2), como con el virus heterólogo virulento utilizado en la infección (Georgia2001/1). Como era de esperar, en los animales no vacunados no se detectaron células específicas secretoras de $IFN\gamma$. En el caso de los animales vacunados y protegidos, independientemente de la dosis, se detectaron células específicas secretoras de $IFN\gamma$ antes del desafío (Figura 11). El número de células específicas secretoras de $IFN\gamma$ mostró un patrón dosis dependiente, siendo

más elevado en los animales vacunados con la dosis alta (10^6 ufp/animal). Otro dato que merece la pena reseñar es que la estimulación con BA71 Δ CD2 induce un mayor número de células específicas secretoras respecto a la estimulación con Georgia2007/1 (Figura 11A), una observación recurrente.

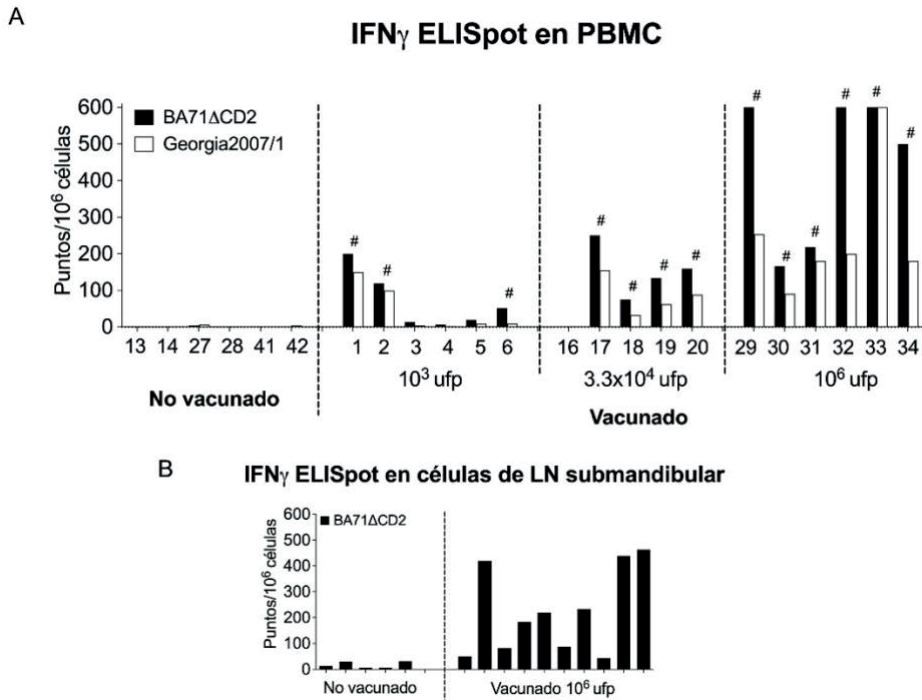


Figura 11. La vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una respuesta VPPA específica. PBMCs (A) y células de LN submandibular (B) obtenidas a 21 dpv se estimularon *in vitro* con BA71 Δ CD2 o Georgia2007/1, y se cuantificó el número de células secretoras de IFN γ específicas de PPA mediante un ELISpot de IFN γ . Se muestran los valores medios de los duplicados, una vez restados los valores de estimulación obtenidos con RPMI. Los asteriscos indican los animales supervivientes. El animal 15 vacunado con la dosis intermedia no pudo ser analizado, debido a un fallo en la toma de muestras.

Para complementar el análisis de la respuesta inmune periférica analizada en PBMC, seguidamente estudiamos la respuesta celular inducida en LN submandibular, tejido diana principal del VPPA. Para ello se realizó un

experimento complementario (experimento 3), con un grupo de animales previamente vacunados intranasalmente (n=10) con la dosis alta de BA71 Δ CD2 (10^6 ufp/animal) y un grupo control (n=6). A 21dpv se sacrificaron estos animales y se extrajeron los LN submandibulares, a partir de los cuales se obtuvieron las suspensiones celulares mediante digestión enzimática, y se realizó un ELISpot de IFN γ tras estimular estas células con el virus vacunal. Confirmando los resultados obtenidos en sangre, se pudo observar en células de LN submandibular de animales vacunados la presencia de un alto número de células T secretoras de IFN γ en células de LN submandibular de animales vacunados respondiendo de forma específica frente al virus vacunal (Figura 11B). De forma resumida, se pudo observar que los animales protegidos, independientemente de la dosis empleada, presentaban antes de la infección con la cepa virulenta niveles significativos de anticuerpos y células secretoras de IFN γ específicos frente VPPA y que ambos parámetros correlacionaban de manera inversamente proporcional con la aparición de fiebre tras la infección con Georgia2007/01 (Figura 12).

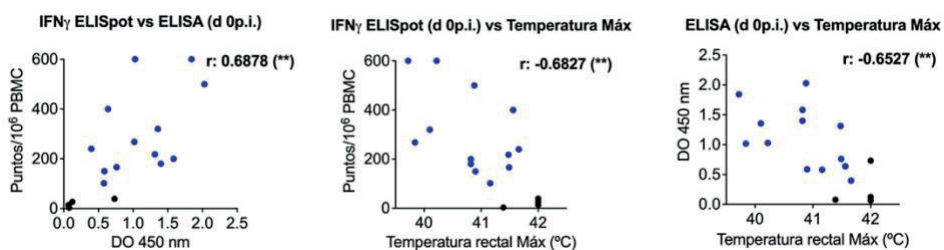


Figura 12. La vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una respuesta específica frente el VPPA y ésta se asocia con la disminución de fiebre tras el desafío. Correlación de Pearson entre el número de células específicas secretoras de IFN γ (puntos/10⁶ PBMCs) o el título de anticuerpos (DO 450 nm) y la temperatura rectal máxima de cada animal después de la infección. Los puntos azules corresponden a los animales protegidos y los negros a los animales no protegidos frente a la infección con Georgia2007/1.

2. La vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una respuesta inmune de memoria que a su vez contribuye a activar una respuesta inflamatoria

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la respuesta inmune protectora inducida tras la vacunación con BA71 Δ CD2, se seleccionó el grupo de animales vacunados vía intranasal con la dosis alta (10^6 ufp/animal) y el grupo no vacunado como control. A 21 dpv, justo antes de la infección con la cepa patógena, se obtuvieron las PBMCs de ambos grupos. Estas PBMCs se estimularon *in vitro* durante 10 horas, bien con BA71 Δ CD2 o bien con medio control. Por un lado, se valoró la presencia de diferentes citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de estas PBMCs utilizando la técnica de Luminex; por otro lado, se recogieron las células para analizar los cambios en el transcriptoma mediante la secuenciación del ARN (*RNA-seq*).

2.1 La estimulación *in vitro* de PBMC de animales vacunados intranasalmente con BA71 Δ CD2 induce una potente respuesta inmune innata

El primer hallazgo interesante nos lo encontramos al comparar mediante Luminex los niveles de diferentes citoquinas en los sobrenadantes del cultivo de las PBMCs. De las 9 citoquinas analizadas solo se detectaron TNF y IFN α en los sobrenadantes de las PBMCs de los animales vacunados tras su estimulación *in vitro* con BA71 Δ CD2. Como se puede observar en la figura 13, los niveles de ambas citoquinas, claves en la respuesta inmune innata, se veían elevados de forma estadísticamente significativa en células de los animales vacunados, en comparación con lo encontrado en las muestras de los animales control. Sin embargo, no se

detectó $\text{IFN}\gamma$ en los sobrenadantes de las PBMCs de animales vacunados (Figura 12), pareciendo contradecir los resultados obtenidos en ELISpot de $\text{IFN}\gamma$ (Figura 11).

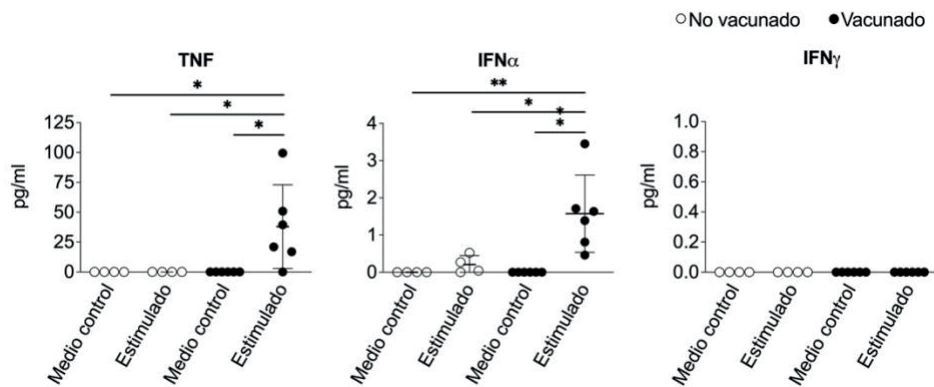


Figura 13. Cuantificación de $\text{IFN}\alpha$, TNF e $\text{IFN}\gamma$ mediante Luminex en sobrenadantes de PBMCs estimuladas *in vitro*. Se representan valores obtenidos a partir de PBMCs de animales vacunados ($n=6$) con círculos negros y de animales control ($n=4$) con círculos blancos, tras la estimulación con medio control o BA71 Δ CD2. Se realizó un test ANOVA de dos vías, seguido de un test Tukey's de comparación múltiple y se muestra en estilo GP ($p > 0.05$ ns, $* p \leq 0.05$, $** p \leq 0.01$).

Una posible respuesta a esta dicotomía podría venir explicada por diferencias en la sensibilidad de ambas técnicas. Así, el ELISpot está diseñado para detectar células T que específicamente secretan $\text{IFN}\gamma$ concentrando la señal en un punto concreto, mientras que el Luminex detecta la señal diluida en el sobrenadante. En resumen, estos resultados muestran una sobre activación de la respuesta innata en los animales vacunados con respecto a los no vacunados tras la estimulación *in vitro* en PBMCs.

2.2 La estimulación *in vitro* de PBMC de animales vacunados con BA71 Δ CD2 induce una respuesta específica Th1 acompañada de una respuesta inflamatoria

Tras analizar los sobrenadantes, el siguiente paso fue analizar el transcriptoma de las PBMCs correspondientes, obtenidas a partir de 4 animales vacunados y 4 animales control. Una vez obtenidos los datos de *RNA-seq* de estas PBMCs, un análisis de escalado multidimensional (MDS, del inglés *multi dimensional scaling*) reveló que las muestras de animales vacunados y estimuladas *in vitro* presentaban cambios transcriptómicos notables con relación a los demás grupos, incluyendo las muestras de los animales control y las de animales vacunados no estimuladas (Figura 14A). Posteriormente, se analizó el número de genes diferencialmente expresados (DE) tras la estimulación con BA71 Δ CD2, tanto en PBMCs de cerdos vacunados como de los no vacunados. Teniendo como referencia en cada grupo las células no estimuladas, se identificaron 2.176 genes en las células de animales vacunados, y únicamente 144 genes en los animales control, la mayoría comunes a ambos grupos (135 genes) (Figura 14B). Cabe destacar que además del mayor número de genes DE en las muestras de animales vacunados, los niveles de expresión de estos son más elevados que en los animales control (Figura 14C). En este gráfico tipo Volcán (Figura 14C) se señalan de forma específica los puntos que corresponden con la localización de las citoquinas TNF e IFN γ , confirmando que ambas se encontraban sobreexpresadas en células estimuladas de los animales vacunados.

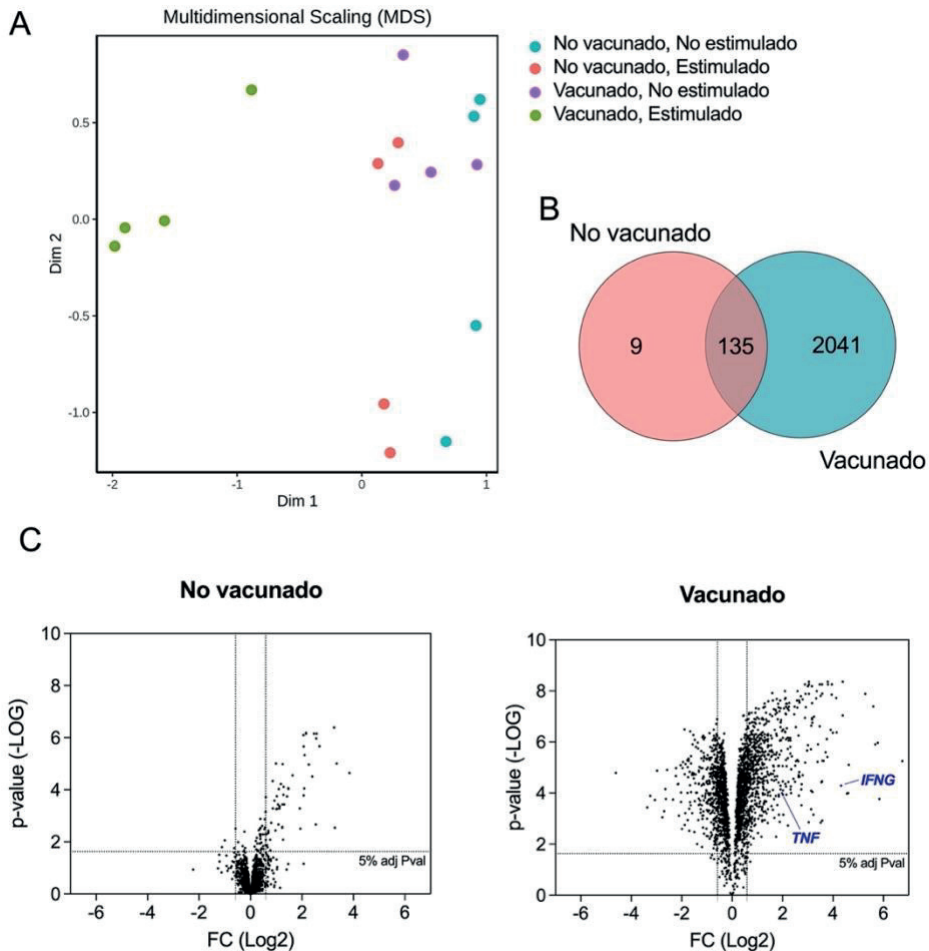


Figura 14. El análisis transcriptómico revela la presencia de 2041 genes diferencialmente expresados en las PBMCs de los animales vacunados con BA71 Δ CD2 tras la estimulación *in vitro* con el virus vacunal. **(A)** Análisis *Multidimensional scaling* de la expresión normalizada de los datos de *RNA-seq* (log₂CPM). **(B)** Diagrama de Venn donde se muestra el número de genes DE en los animales vacunados y no vacunados. **(C)** Gráfico tipo Volcán que muestra los niveles de expresión (en inglés, *fold changes*) de los genes DE en las células de los grupos de animales vacunados y no vacunados.

Para clasificar los genes DEs y agruparlos según sus características funcionales, se realizó un análisis de enriquecimiento de GO (Figura 15). El análisis reflejó que tras la estimulación con BA71 Δ CD2, tanto en las células de animales vacunados como de no vacunados, se expresaban genes relacionados con respuesta antiviral, respuesta de IFN-I y respuesta

innata (Figura 15). A pesar de que estos términos de GO estaban sobre expresados en ambos grupos, el número de genes dentro de ellos fue más elevado en las muestras de los animales vacunados que en la de los animales control (Figura 15). En consonancia con lo observado en los datos del Luminex obtenidos a partir de los sobrenadantes (Figura 13), estos resultados confirman la sobre activación de una respuesta inmune innata tras la estimulación *in vitro* de PBMC de animales vacunados.

El análisis de GO también permitió confirmar la activación de genes implicados en respuesta T y B en las muestras obtenidas de los animales vacunados (Figura 15), indicando la presencia de linfocitos de memoria circulantes. Adicionalmente, se identificaron también enriquecidos de forma específica en animales vacunados términos GO relacionados con la producción de IFN γ y TNF, con inflamación y con la diferenciación y activación de macrófagos (Figura 15).

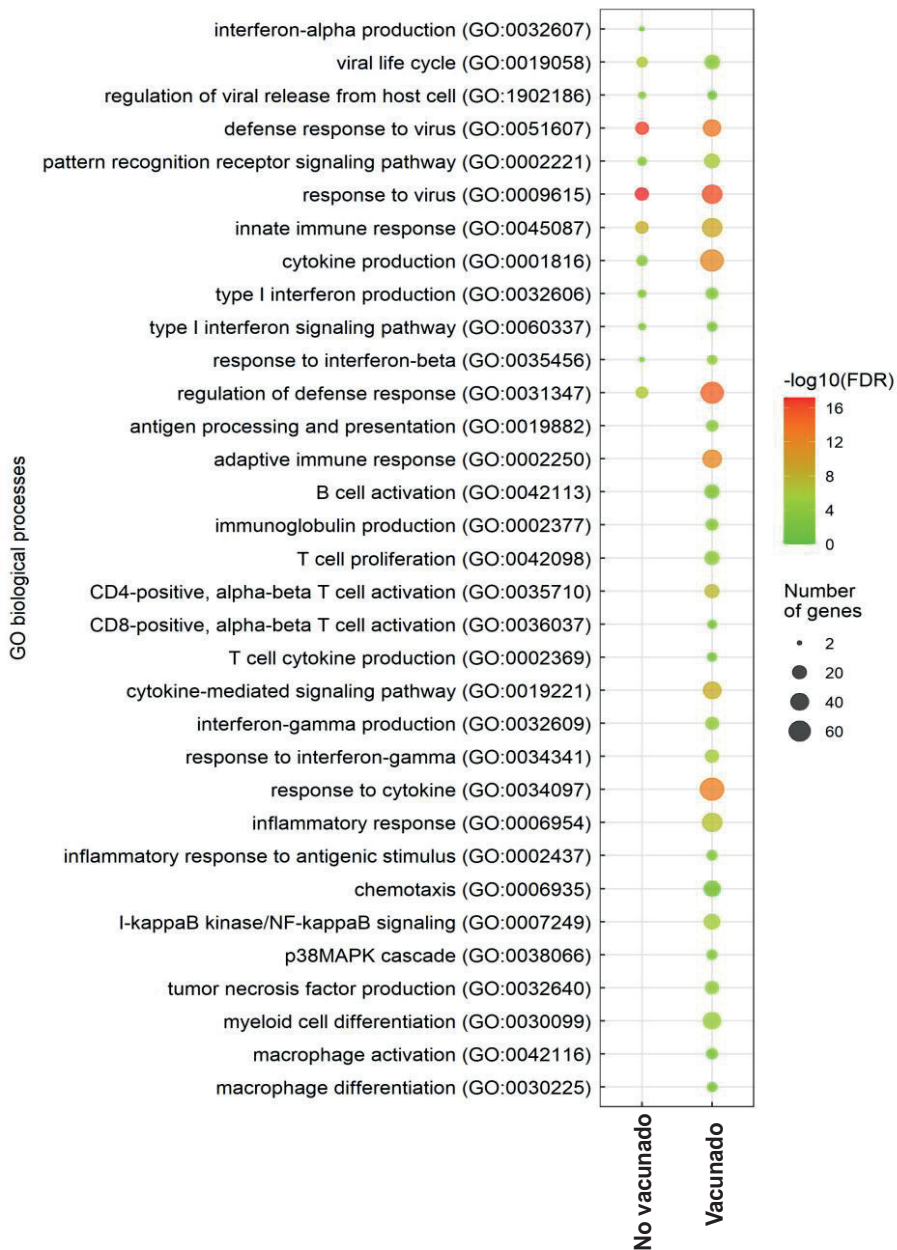


Figura 15. La estimulación *in vitro* con BA71ΔCD2 de PBMCs de animales vacunados provoca cambios transcriptómicos relacionados tanto con respuesta adaptativa como con innata. Listado de términos representativos de GO utilizando tanto muestras de animales vacunados como no vacunados. El tamaño del punto representa el número de genes DE asociados con cada término y el color indica el valor FDR (FDR del inglés *false discovery rate*) expresado en $-\log_{10}$.

Para poder visualizar los genes DE en conjunto y poder establecer comparaciones entre ambos grupos, se graficaron los resultados de una selección de genes de interés en formato de *heatmap*. En este gráfico, se representan los niveles normalizados (*Z-score*) para cada gen y en cada animal (Figura 16 y Figura S1). Los resultados demostraron un aumento de la expresión de genes estimulados por interferón (ISG, del inglés *interferon-stimulated genes*) en las PBMCs de animales vacunados, en comparación con los observados en los no vacunados, también activados, pero en menor medida (Figura 16). En animales vacunados también se detectó una sobreexpresión de las citoquinas claves $IFN\gamma$ y TNF (Figura 16 y 17), así como de IL2, IL15, IL27 y XCL1, citoquinas relacionadas con la activación de respuesta Th1. Del mismo modo, únicamente en animales vacunados se detectaron los marcadores CD69 y CD274 (Figura 16), involucrados en la activación de células T. De entre los genes únicamente sobre expresados en las muestras de animales vacunados también se identificaron genes relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria. Entre ellos encontramos genes relacionados con las vías de señalización NF- κ B-y MAPK-, con la producción de TNF, así como relacionados con la diferenciación de macrófagos. Entrando más al detalle, cabe destacar la sobreexpresión de los factores de transcripción y quimiocinas BATF2, IRF1, CXCL9, CXCL10, CCL2 y CCL4, que ligados a la reducción en la expresión de los marcadores de activación de macrófagos CD163 y CCR2 (Figura 16 y Figura S1), nos permite plantear la hipótesis de que los principales grupos celulares que orquestan la respuesta inflamatoria inducida tras la estimulación *in vitro* son monocitos/macrófagos (Buechler et al., 2013; Phillips et al., 2005; Roy et al., 2015).

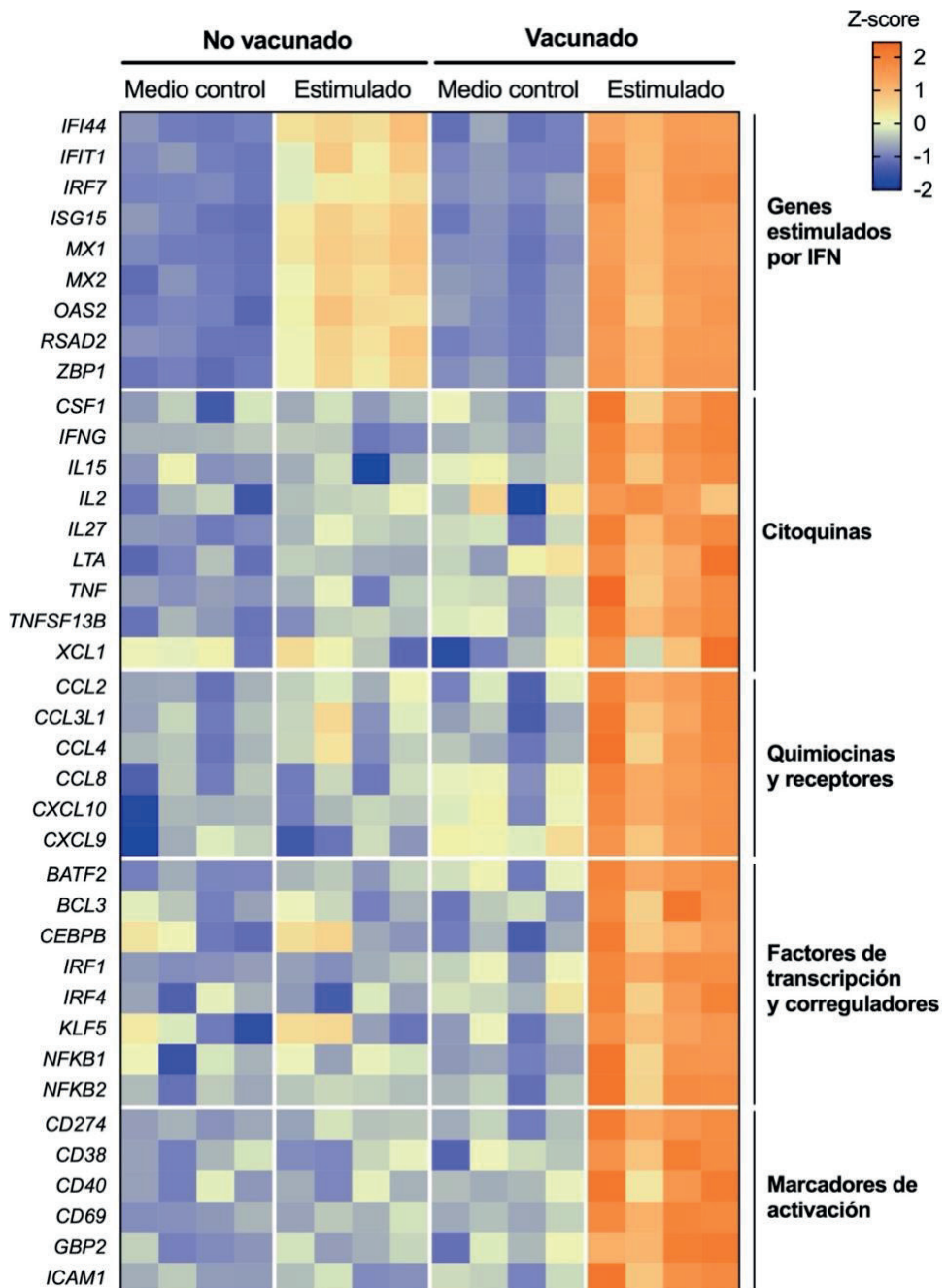


Figura 16. El análisis de los genes DEs tras la estimulación *in vitro* de PBMC de animales vacunados, muestra una respuesta de tipo Th1 junto con una respuesta inflamatoria. *Heatmap* donde se muestran los niveles de expresión normalizados para los genes DE derivados del *RNA-seq* medidos como log₂CPM (cuentas por millón, representados en formato logarítmico en base dos).

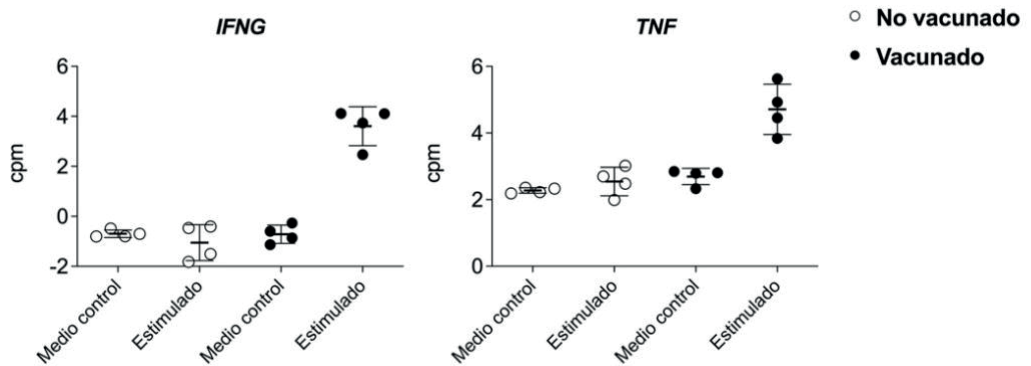


Figura 17. Los genes IFN γ y TNF se encuentran diferencialmente activados de forma específica en animales vacunados con BA71 Δ CD2 tras la estimulación *in vitro*. Niveles de ARN de IFN γ y TNF expresados en contajes por millón (cpm) en escala logarítmica.

En conjunto, los resultados obtenidos tras analizar el transcriptoma de las PBMCs estimuladas *in vitro* y los sobrenadantes de estas células, demuestran que la vacunación con BA71 Δ CD2 induce una respuesta inmune que se caracteriza por la inducción de una respuesta adaptativa Th1 concomitante con una potente respuesta innata/inflamatoria.

2.3 La estimulación *in vitro* con Georgia2007/1 induce una potente respuesta inmune similar a la descrita tras la estimulación con BA71 Δ CD2

Una vez descrita la respuesta tras la estimulación *in vitro* con el virus vacunal BA71 Δ CD2, se procedió a realizar un nuevo experimento para analizar si se obtenían resultados similares al estimular las células con el virus virulento Georgia2007/1, la cepa pandémica empleada para realizar la infección por contacto. Con este objetivo, 8 animales fueron vacunados intranasalmente con la dosis alta de BA71 Δ CD2 (10^6 ufp/animal) y 6 animales fueron utilizados como control del ensayo. A 21 dpv se obtuvieron PBMCs para realizar la estimulación *in vitro* durante 10 horas utilizando bien medio control, BA71 Δ CD2 o Georgia2007/1. Para analizar

los cambios transcriptómicos inducidos tras la estimulación se seleccionaron 37 genes de los datos obtenidos previamente en el ensayo de *RNA-seq*. Estos genes son representativos de respuesta innata, inflamatoria y de respuesta inmune Th1. Los niveles de expresión de estos genes se analizaron mediante la técnica *microfluidic quantitative PCR*, que permite el análisis cuantitativo simultáneo de diferentes genes mediante PCR cuantitativa.

La estimulación con ambos virus reveló patrones de expresión génica similares en las células de cerdos vacunados, confirmando la activación en las PBMCs de los animales vacunados de genes relacionados con una respuesta de IFN-I, de genes implicados en respuesta inflamatoria y de genes relacionados con la respuesta Th1 (Figura 18 y Tabla S3). También confirmando los datos anteriores, en las muestras de los animales no vacunados se observó la activación de una respuesta innata de menor intensidad que en los animales vacunados, y no se observó la activación de respuesta adaptativa específica o de memoria (Figura 18 y Tabla S3).

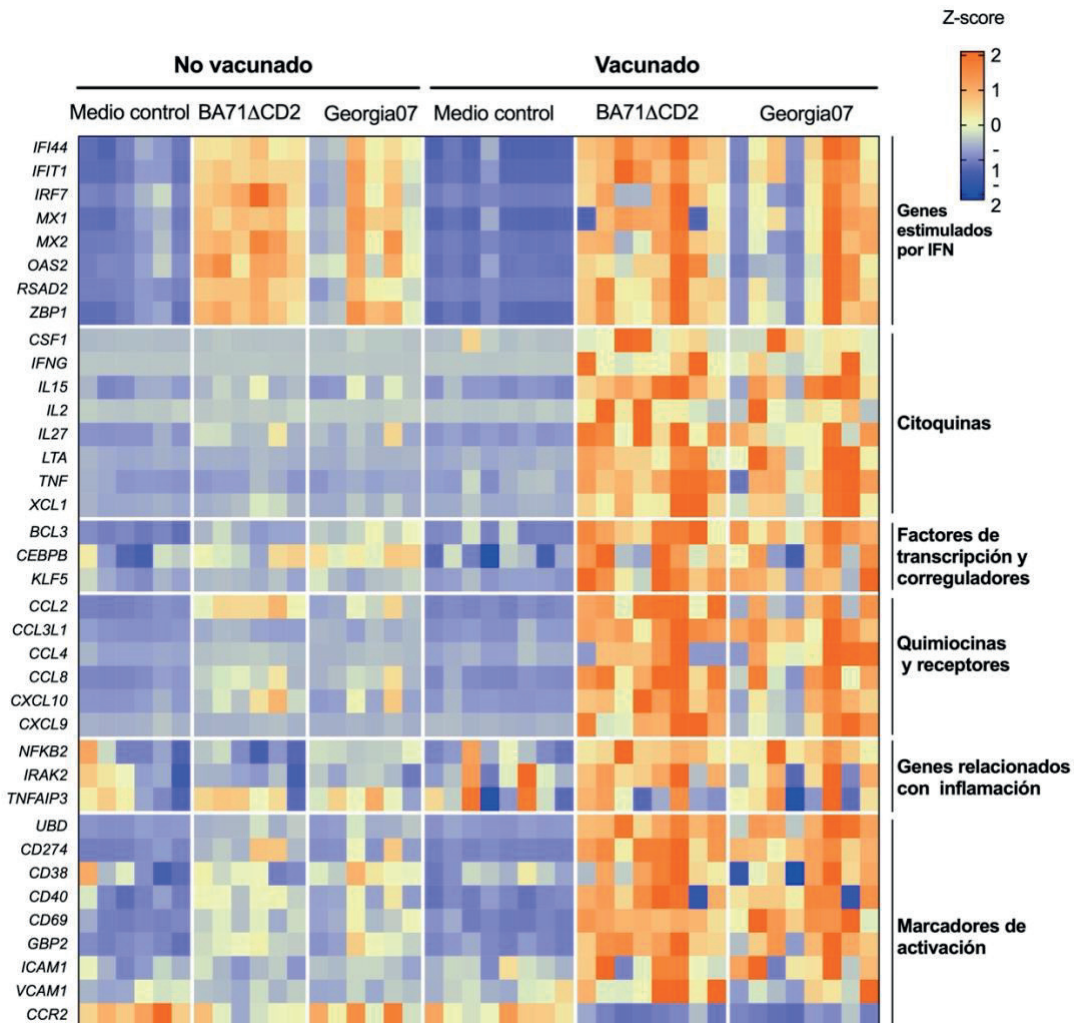


Figura 18. La estimulación *in vitro* de PBMC de cerdos vacunados induce una respuesta similar frente al virus vacunal BA71ΔCD2 o frente al virus pandémico Georgia2007/1. Tras la estimulación *in vitro* de las PBMCs de animales vacunados y no vacunados con el BA71ΔCD2, Georgia2007/1 o con el medio control, se analizó la expresión de 37 genes representativos de los resultados obtenidos mediante *RNA-seq* y se cuantificaron mediante un ensayo de *microfluidic quantitative PCR*. En el mapa de calor se muestran los valores normalizados en Z-score.

A pesar de que el patrón de genes activados es similar tras la estimulación con ambos virus, nos encontramos que la estimulación de genes relacionados con respuesta innata en las muestras estimuladas con Georgia2007/1 sigue un patrón menos uniforme, reflejado en el hecho de que las muestras obtenidas de alguno de los animales respondían poco o de forma indetectable para alguno de los genes estudiados (Figura 18).

2.4 La secreción de IFN γ por células T de memoria en respuesta a la estimulación *in vitro* con el VPPA induce la producción de TNF en células mieloides

La marcada activación de la respuesta inflamatoria, observada tras la estimulación *in vitro* con el VPPA en las muestras de los animales vacunados, podría ser explicada por la presencia de un mayor número de macrófagos diferenciados en las PBMCs de los animales vacunados con relación a la observada en los animales control, que, por ser diana natural del VPPA (Lithgow et al., 2014; Mccullough et al., 1999; Sánchez-Torres, et al., 2003), podrían a su vez soportar una mayor tasa de replicación viral durante la estimulación *in vitro*.

Para descartar esta hipótesis, se procedió a analizar mediante citometría de flujo los porcentajes totales de células mieloides (CD3-CD172a+) y de células mieloides maduras (CD3-CD172a+SLAII+ o CD3-CD163+), existentes en las PBMCs tanto de animales vacunados como de animales no vacunados. Como se puede observar en la Figura 19A, los porcentajes de estas poblaciones fueron similares en los dos grupos de animales (Figura 19A). Este dato, junto con el hecho de que tampoco se observaran diferencias cualitativas ni cuantitativas en los niveles de transcritos virales analizados por *RNA-seq* correspondientes a genes expresados

temprana o tardíamente tras la infección entre ambas muestras (Figura 19B), permitieron descartar esta primera hipótesis.

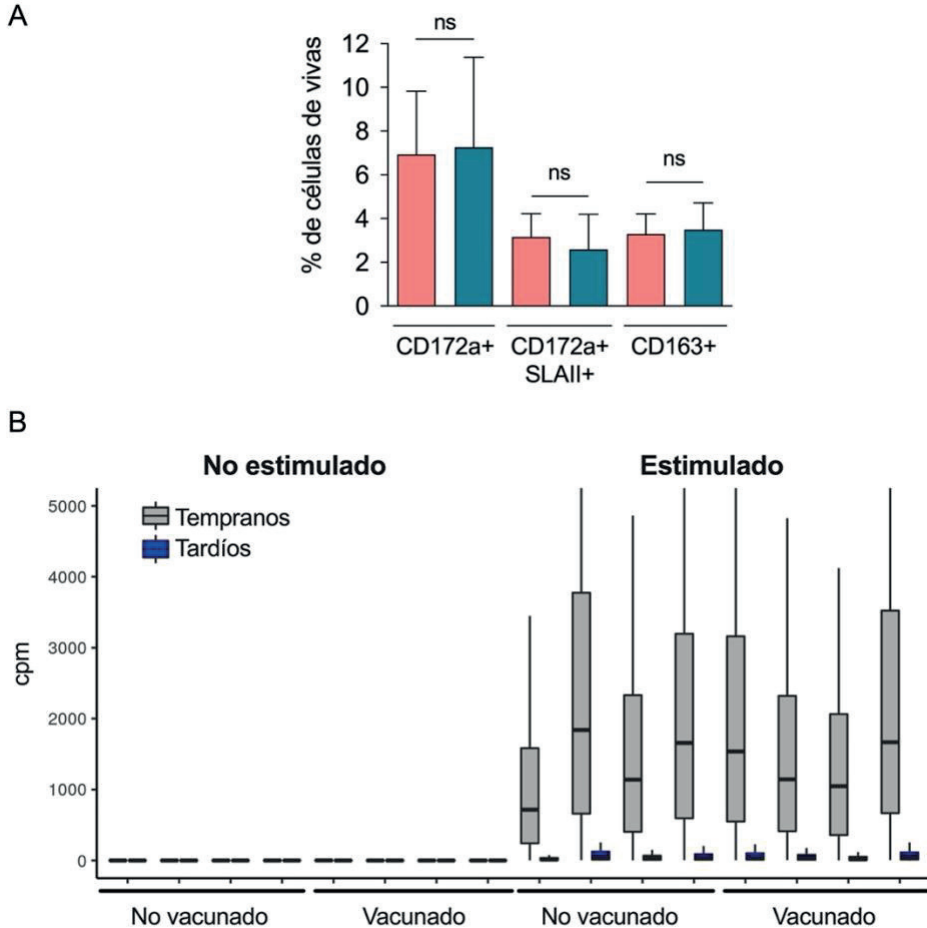


Figura 19. La respuesta inflamatoria observada tras la estimulación *in vitro* no se debe a una diferencia en el porcentaje de macrófagos presentes en ambos grupos de animales ni a una mayor tasa de replicación viral en PBMC de cerdos vacunados. (A) Porcentaje de células mieloides (CD3-CD172a+ o CD3-CD172a+SLAI+) y monocitos/macrófagos (CD3-CD163+) en PBMCs de animales vacunados con BA71ΔCD2 (n = 7) y no vacunados (n = 5), analizadas mediante citometría de flujo. (B) Número de lecturas obtenidas mediante *RNA-seq* de genes de VPPA tempranos y tardíos tras la estimulación de las PBMCs durante 10 horas con medio control o con BA71ΔCD2.

La capacidad del propio IFN γ inducido por las células T-específicas de memoria de activar al monocito/macrófago, demostrada en otros modelos de infección (Schenkel et al., 2013; Soudja et al., 2014), permite plantear este mecanismo como una hipótesis plausible capaz de explicar la sobreactivación de la respuesta inflamatoria observada en nuestros experimentos. Para validar esta hipótesis, comenzamos por estudiar mediante citometría de flujo el inmunofenotipo de las poblaciones celulares involucradas en la secreción de IFN γ y TNF tras la estimulación *in vitro* con VPPA (Figura 20A).

El marcaje intracelular de citoquinas en las PBMCs estimuladas de animales vacunados reveló un elevado número de células T CD4+CD8+ productoras de IFN γ y TNF (Figura 20B), fenotipo característico de las células T de memoria en la especie porcina (Zuckermann y Husmann, 1996). Adicionalmente, se observó que las células mieloides (CD3-CD172a+) producían a su vez una gran cantidad de TNF, pero no de IFN γ (Figura 20C), confirmando la contribución de las células mieloides en la respuesta inflamatoria específica inducida tras la vacunación, y explicando a su vez las diferencias observadas entre los niveles de TNF e IFN γ en los sobrenadantes de las PBMCs mediante el Luminex (Figura 13) y el hecho de que el IFN γ fuera sólo detectable por ELISpot (Figura 11A).

Una vez identificadas las fuentes de expresión de ambas citoquinas, procedimos a bloquear la señalización mediada por el IFN γ con un anticuerpo anti-IFN γ . Como se puede observar en la Figura 20D, el bloqueo del IFN γ permitió reducir drásticamente la producción de TNF por parte de monocitos/macrófagos (CD3-CD14+CD163+).

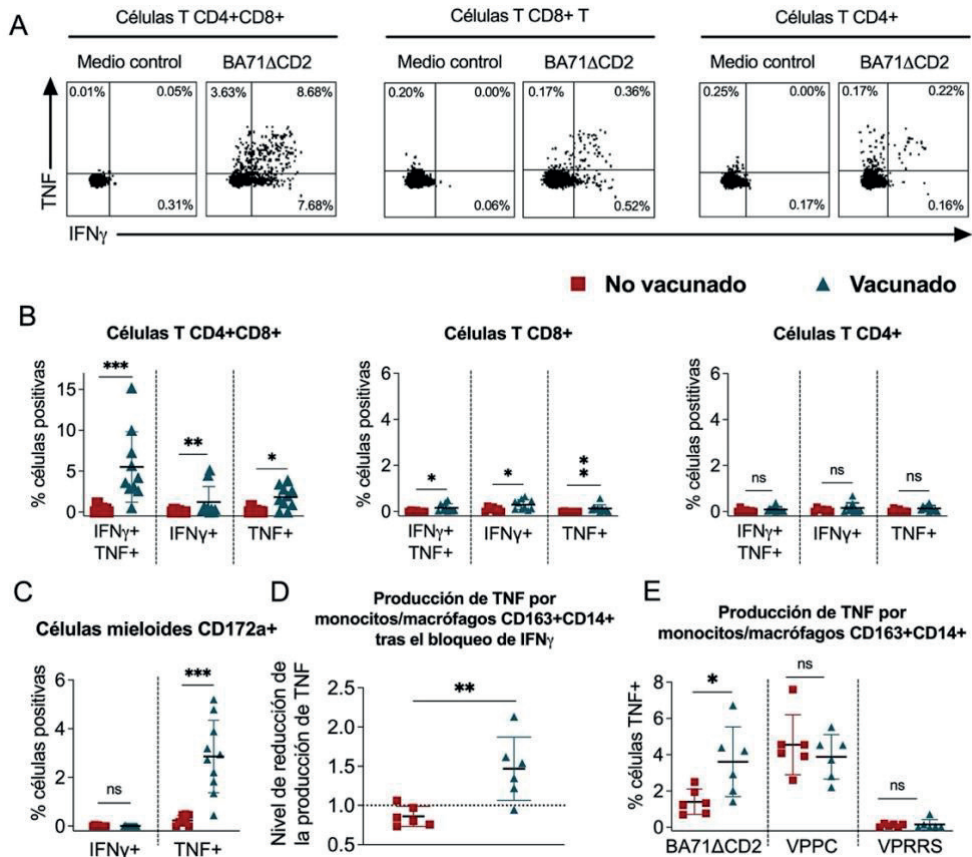


Figura 20. El IFN γ producido tras la estimulación específica induce la secreción de TNF en células mieloides. (A) Gráficos de puntos representativos del marcaje intracelular de IFN γ y TNF en células T en animales vacunados, detectados por citometría de flujo. (B-C) Porcentaje de células T (CD4+CD8+, CD8+ y CD4+) (B) y células mieloides (CD3-CD172a+) (C) productoras de IFN γ y/o TNF en PBMCs de animales no vacunados (n = 7-8) y vacunados (n = 10) tras la estimulación *in vitro* con medio control o BA71ΔCD2. Se representan los valores individuales y la media y desviación estándar de cada grupo. (D) Reducción en la producción de TNF por monocitos/macrófagos (CD3-CD14+CD163+) en PBMCs estimuladas con BA71ΔCD2 de animales no vacunados (n=6) y vacunados con BA71ΔCD2 (n=6) tratadas o no con un anticuerpo anti-IFN γ . La reducción fue calculada mediante la división entre el porcentaje de células productoras de TNF sin anti-IFN γ y el porcentaje con anti-IFN γ . (E) Porcentaje de monocitos/macrófagos (CD3-CD14+CD163+) productores de TNF en PBMCs de animales no vacunados (n=6) y vacunados con BA71ΔCD2 (n=6) tras la estimulación con BA71ΔCD2, VPPC o VPRRS. Se realizó un t-test de dos vías para datos de distribución normal, o un test Mann-Whitney U de dos vías, para los datos que no siguen una distribución normal y se muestra en estilo GraphPad ($p > 0.05$ ns, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

El siguiente paso fue evaluar si la respuesta inflamatoria observada se debía al desarrollo de inmunidad entrenada en monocitos sanguíneos tras la vacunación. Con este objetivo, estimulamos PBMCs de animales no vacunados y de animales vacunados con BA71 Δ CD2 con dos virus que infectan monocitos y/o macrófagos, la cepa atenuada de ALL-183 devVPRRS y la cepa virulenta Margarita de PPC. Mientras que la estimulación con VPPC resultó con una producción de TNF en monocitos/macrófagos (CD3-CD14+CD163+) tanto en vacunados como en no vacunados, la estimulación con la cepa atenuada de PRRSV no indujo una respuesta inflamatoria (Figura 20E). Estos datos confirman la especificidad de la activación de la respuesta inflamatoria en PBMCs de animales vacunados tras la estimulación con BA71 Δ CD2, indicando una ausencia de monocitos/macrófagos de memoria en la sangre de cerdos vacunados.

En conjunto, estos datos demuestran que la respuesta inflamatoria inducida en las PBMCs de animales vacunados tras la estimulación *in vitro* con VPPA es dependiente de la producción de IFN γ , probablemente por parte de las células T de memoria polifuncionales activadas.

3. La vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 induce una respuesta celular citotóxica específica detectable tras la estimulación *in vitro*

La inducción de memoria inmunológica en el órgano diana resulta crucial para controlar las primeras etapas de replicación viral y obtener una protección eficaz tras la vacunación. Teniendo esto en mente, nos planteamos extender el estudio de la respuesta inducida en PBMCs a

células del LN submandibular, uno de los primeros sitios de replicación viral tras la infección oro-nasal con el VPPA (Plowright et al., 1968). El hecho de que en ensayos anteriores de vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 ya se hubieran detectado células T específicas secretoras de IFN γ en células de este LN (Figura 11B) y que no se detectase virus vacunal en estos tejidos a día 21 post vacunación (Tabla S5) permitía ser optimista en cuanto a la idoneidad del órgano diana escogido.

3.1 Los datos obtenidos mediante *single cell RNA-seq* amplían en células de LN submandibular los resultados obtenidos en PBMCs

Con el objetivo de ampliar en células de LN submandibular los resultados obtenidos en PBMCs, y a la vez profundizar en los mecanismos de la respuesta protectora inducida por la vacunación, se procedió a estudiar a nivel transcriptómico y en células individuales de LN submandibular, las diferencias observadas entre las muestras obtenidas de un animal vacunado con BA71 Δ CD2 y de un animal control sin vacunar. Como se describe más al detalle en la sección de metodología, las suspensiones celulares obtenidas a 21dpv se estimularon con BA71 Δ CD2 o con medio control durante 16 horas y, tras su fijación con metanol, se secuenciaron utilizando la plataforma 10x Genomics *single cell RNA-seq*. En total se analizaron 4.254 células procedentes del animal vacunado y 5.849 células procedentes del animal no vacunado.

A la hora de analizar los datos, el primer paso consistió en identificar los diferentes clústeres celulares que conforman el LN y así establecer los subconjuntos de células incluidos en cada uno de ellos, tomando como referencia la expresión de diferentes marcadores convencionales

previamente descritos en la literatura (Figura 21). Siguiendo esta sistemática, se establecieron 22 grupos celulares en los que se incluyen: macrófagos, células dendríticas (CDs), células NK (NKG7+KLRB1+KLRK1+), células T-CD4 (CD3E+CD4+), células T-CD8 (CD3E+CD8A+CD8B+), linfocitos citotóxicos (CTLs) T-CD8 (CD8A+GZMA.1+GZMK+), CTLs y células T en fase de proliferación (con elevada expresión de marcadores de fase G2/M), células T $\gamma\delta$ (TRDC+), células B (CD79A+), plasmablastos (NME2+), células B de centro germinal GC (GCSAM+) y células plasmáticas (JCHAIN+MZB1+XBP1+) (Figura. 21). Se describieron tres clústeres de células B, pero el correspondiente subtipo celular no se pudo identificar. Los grupos celulares que presentaban elevados niveles de contenido mitocondrial se asignaron como células apoptóticas.

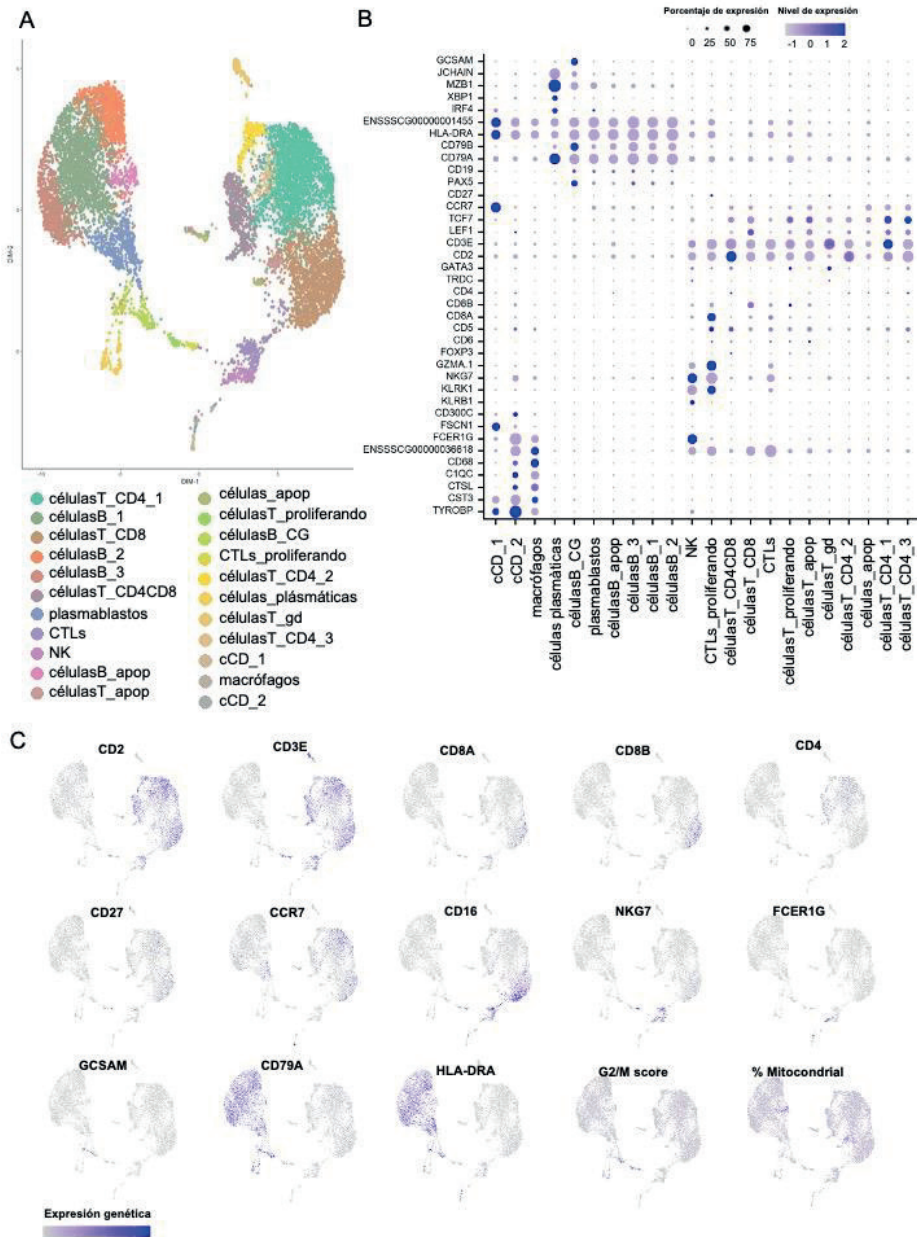


Figura 21. Clasificación de los grupos celulares identificados mediante *scRNA-seq* en las células de LN submandibular. (A) Gráfico UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) representando los 22 grupos celulares transcriptómicamente distintos, expresados en colores diferentes. **(B)** Gráfico de puntos en él que se visualizan los genes marcadores para cada clúster. El tamaño del punto indica el porcentaje de células que expresan el gen en particular, mientras que el color expresa la media de expresión del gen en cuestión. *ENSSSCG00000001455* = *SLA-DRB1*, *ENSSSCG00000036618* = *FCGR3A*. **(C)** Gráfico de puntos que muestra la expresión de genes característicos claves para definir cada clúster.

El siguiente paso fue analizar los genes DE entre las células aisladas de los LNs vacunado y no vacunado, para identificar marcadores relacionados con protección. En un primer análisis nos centramos en los grupos celulares que contaban con el suficiente número de células como para poder analizar genes DE: células B (B_1, B_2, B_3), plasmablastos, células T-CD4, células T-CD4CD8 y células T-CD8 (Figura 22).

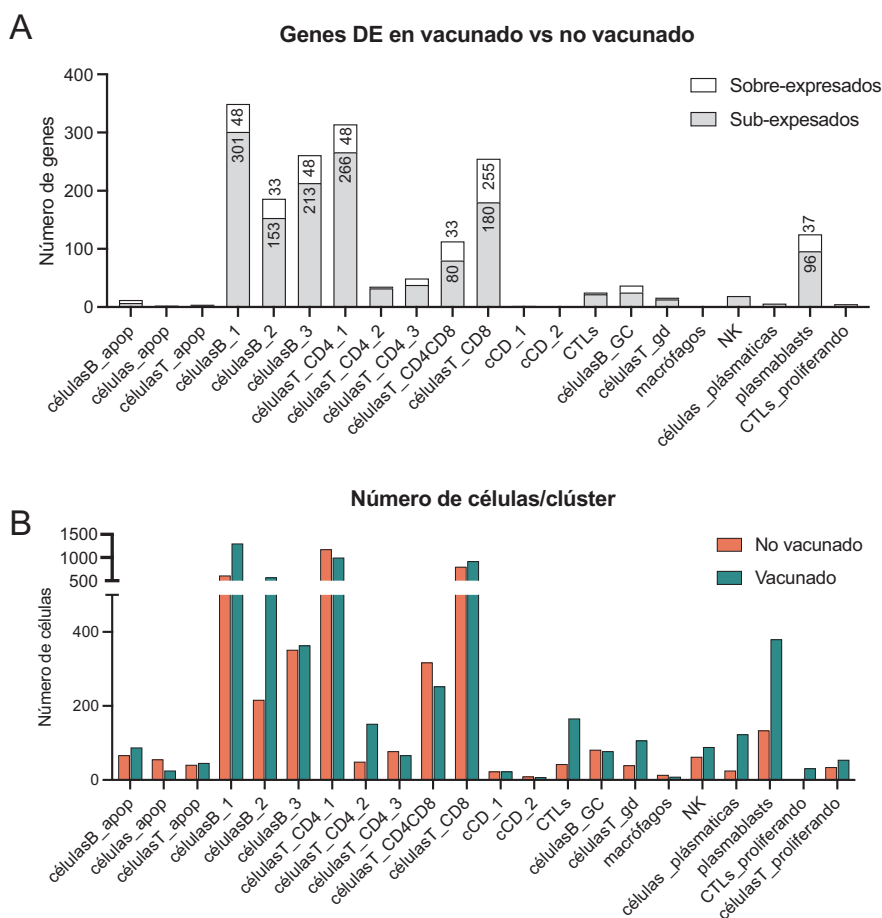


Figura 22. Datos obtenidos del análisis de las células de LN submandibular mediante *scRNA-seq*. **(A)** Número de genes diferencialmente expresados en cada clúster entre la muestra del animal vacunado y no vacunado. **(B)** Número de células identificadas en cada clúster mediante *scRNA-seq*.

Con los genes DE identificados en el LN submandibular del animal vacunado, se realizó un análisis de enriquecimiento de GO. El análisis de GO reflejó que en todos los grupos celulares se encontraron enriquecidos términos GO relacionados con IFN-I e IFN γ (Figura 23), siguiendo la misma línea que los resultados obtenidos anteriormente en PBMCs. De hecho, se observó que tras la estimulación *in vitro* con BA71 Δ CD2, las células de LN submandibular del animal vacunado presentaban diferentes ISG sobreexpresados, entre los que se destacan *BST2*, *ISG15*, *ISG20* y *MX1* (Figura 24).

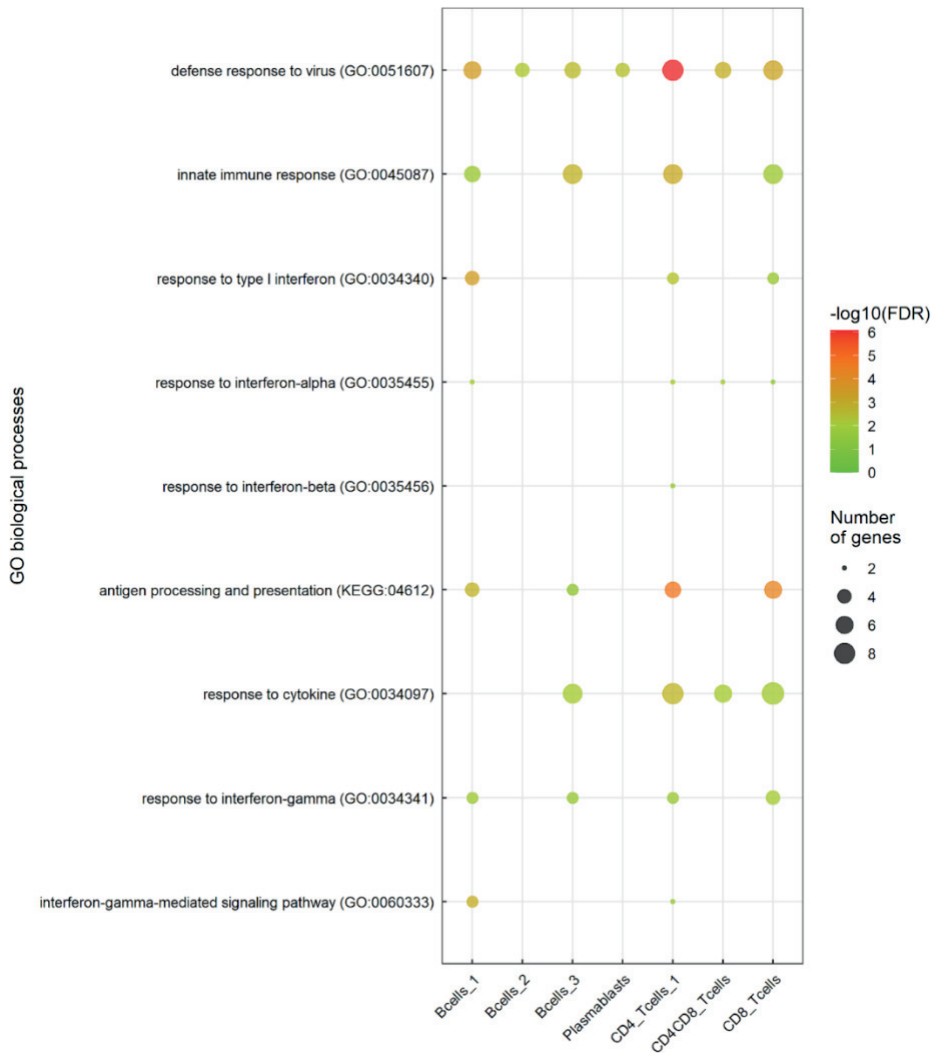


Figura 23. El análisis de enriquecimiento de GO de los genes DE entre la muestra estimulada y la no estimulada derivados de los datos obtenidos mediante *scRNA-seq* muestra la activación de una respuesta innata en células del LN submandibular de los animales vacunados. El tamaño del punto representa el número de genes DE asociados con cada término y el color indica el valor FDR (*false discovery rate*) expresado en $-\log_{10}$.

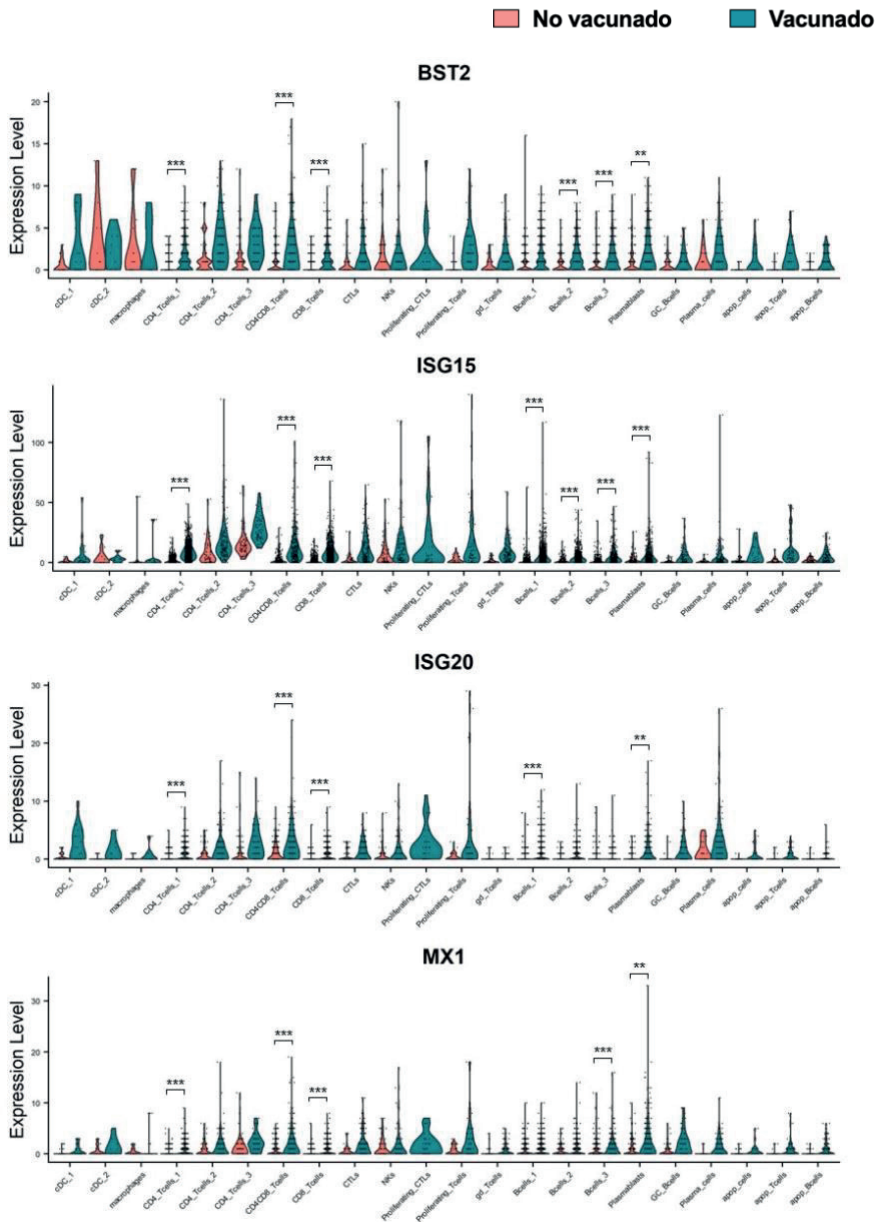


Figura 24. La expresión de varios ISG en diferentes grupos celulares es mayor en la muestra del animal vacunado que en la del animal no vacunado. Gráficos tipo violín que muestran la expresión de diferentes ISG en cada grupo celular, derivados de los datos obtenidos del análisis de *scRNA-seq*. Los asteriscos indican el significado estadístico de las diferencias observadas: ** p valor ≤ 0.01 , *** p valor ≤ 0.001 .

Cabe remarcar que los transcritos virales se detectaron a niveles similares en las muestras procedentes del animal vacunado y del no vacunado y que, como cabía esperar, éstos se identificaron en macrófagos (Figura 25), célula diana del VPPA (Carrascosa et al., 1999). Estos datos validan el hecho de que la respuesta inmune innata diferencial obtenida entre la muestra del animal vacunado y la del animal no vacunado, no se pueda asociar a una mayor tasa de replicación viral.

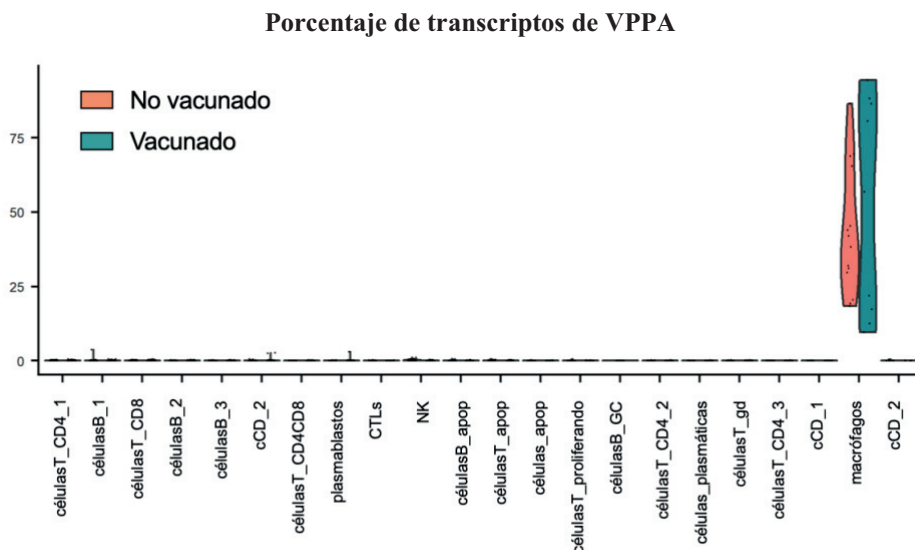


Figura 25. Los transcritos virales se localizan en macrófagos a niveles similares en el LN submandibular del animal vacunado y el del no vacunado. Gráfico tipo violín que muestra el porcentaje de transcritos de VPPA en cada grupo celular.

En un segundo análisis nos centramos en aquellos grupos celulares con un número de células significativamente diferente entre muestras del LN submandibular del animal vacunado y el no vacunado (Figura 26 y Tabla S6). Se pudo comprobar que varias poblaciones celulares estaban sobre

representadas en la muestra del animal vacunado, incluyendo varios grupos de células B, plasmablastos y células plasmáticas, así como de células T (célulasT_CD4_2, célulasT_ $\gamma\delta$ y CTLs); sugiriendo un papel relevante de las mismas en protección frente al VPPA.

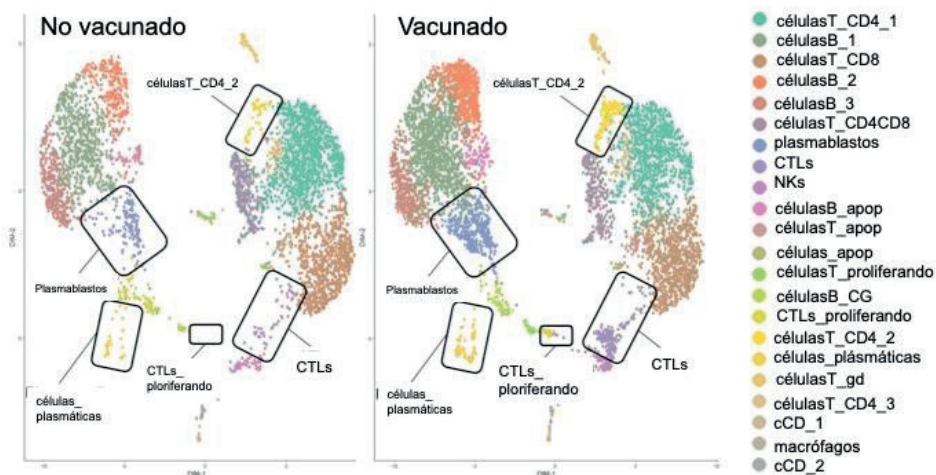


Figura 26. Grupos celulares involucrados en la respuesta inmune específica frente VPPA. Gráficos UMAP comparando los grupos celulares presentes en el LN submandibular del animal vacunado y no vacunado. Los clústeres en los que se encontraron más diferencias en el número de células entre las dos muestras están señalados en el gráfico.

Dentro de cada clúster sobre representado en la muestra del animal vacunado, se procedió a caracterizar más al detalle la expresión diferencial de los genes. Así, la quimiocina proinflamatoria *CXCL10* estaba específicamente sobre expresada en plasmablastos, en células T-CD4 y en células dendríticas cCD_1 (Figura 27). *CXCL10* está ligada a la estimulación mediada por IFN- γ (Liu et al. 2011), confirmando así de nuevo la activación de una respuesta Th1 específica tras la estimulación *in vitro*.

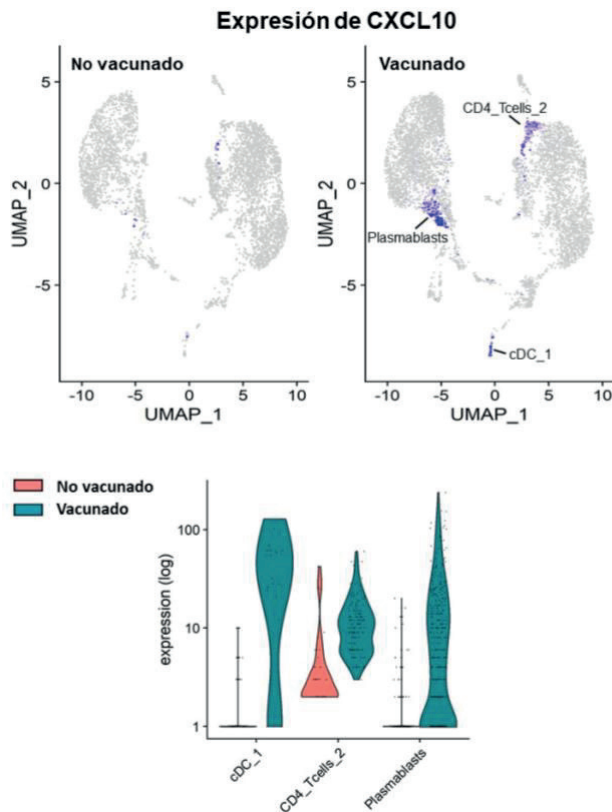


Figura 27. Expresión diferencial de la quimiocina proinflamatoria CXCL10 en diferentes grupos celulares del animal vacunado. Gráficos tipo UMAP y violín que muestran la expresión de CXCL10 en plasmablastos, cDC_1 y células T-CD4_2.

Siguiendo la misma aproximación, se pudo detectar la activación de una respuesta celular citotóxica, marcada por un número más elevado de células T CD8 (CTLs y CTLs que proliferan) en el LN submandibular del animal vacunado (Figura 26). Yendo más al detalle, la población de CTLs del animal vacunado se caracterizaba por la disminución en la expresión de *CCR7* y *CXCR4*, fenotipo de células T CD8 efectoras (Kobayashi et al., 2004) y de *PFN1*, regulador negativo de la liberación de gránulos líticos (Schoppmeyer et al., 2017) (Figura 28A). Además, se observó el aumento

significativo de la expresión de la proteasa granzima A (*GZMA.1*) (Figura 28B), marcador funcional de células citotóxicas. Estos hallazgos confirman el estado de activación de las CTLs y de las CTLs que proliferan en el animal vacunado. También se detectó sobre expresada la *GZMA.1* en células NK en respuesta a la estimulación *in vitro* con BA71 Δ CD2, tanto en la muestra del cerdo vacunado como en la del no vacunado (Figura 28B).

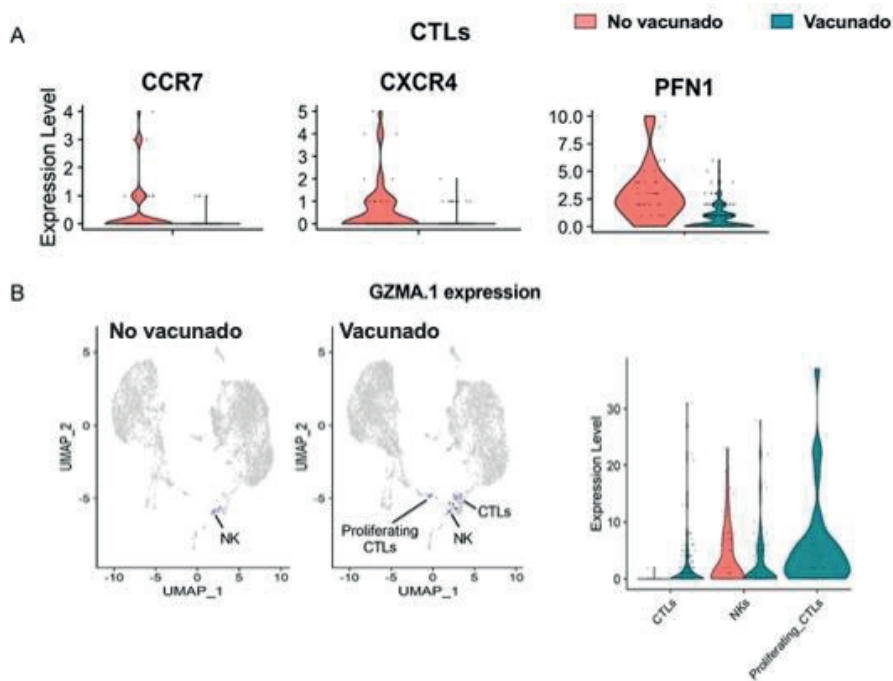


Figura 28. La vacunación induce una robusta respuesta citotóxica específica orquestada por CTLs. (A) Gráficos tipo violín donde se muestra los niveles de expresión de *CCR7*, *CXCR4* y *PFN1* en CTLs derivado de los datos de *scRNA-seq*. **(B)** Gráfico UMAP y violín donde se muestra la expresión de *GZMA.1* en CTL y células NK.

Cabe destacar que esta respuesta citotóxica específica frente al VPPA no se había observado en el estudio de transcriptómica utilizando PBMCs. Varios son los motivos que podrían explicar estas diferencias: (i) el tiempo de estimulación empleado: 16h para LN submandibular y 10h para PBMCs, (ii) la diferente composición celular de ambas muestras, (iii) la presencia de un número menor de precursores de CTLs en sangre que en LN o (iv) una combinación de las tres.

3.2 Una óptima estimulación *in vitro* con BA71 Δ CD2 permite detectar la activación de una respuesta citotóxica específica en PBMCs de animales vacunados

Para validar los resultados referentes a la respuesta de células citotóxicas obtenidos mediante *scRNA-seq* con un mayor número de muestras, se obtuvieron PBMCs de animales vacunados intranasalmente con la dosis elevada de BA71 Δ CD2 (n=9), a día 21 post vacunación, utilizando un grupo de animales no vacunados como control negativo (n=8). En esta ocasión y con el objetivo de optimizar la monitorización de la actividad de memoria citotóxica en cultivo, partimos de estimulaciones más largas que permiten su reactivación y expansión celular (Pipkin et al, 2010). Así pues, en esta ocasión, las PBMCs se estimularon durante 48 horas con BA71 Δ CD2 o medio control, para, a continuación, analizar mediante citometría de flujo la expresión de perforina en células NK (CD3-CD8 α +), células T CD8 (CD3+CD8 α +), células T $\gamma\delta$ (TRDC+) y células T CD4+CD8+ (CD3+CD4+CD8 α +). Las PBMCs de animales vacunados mostraron un elevado porcentaje de células T CD4+CD8+ perforina+ tras la estimulación *in vitro* con BA71 Δ CD2 (Figura 29), y aunque en menor grado, también de células T gamma-delta ($\gamma\delta$) perforina+ (Figura 29B)

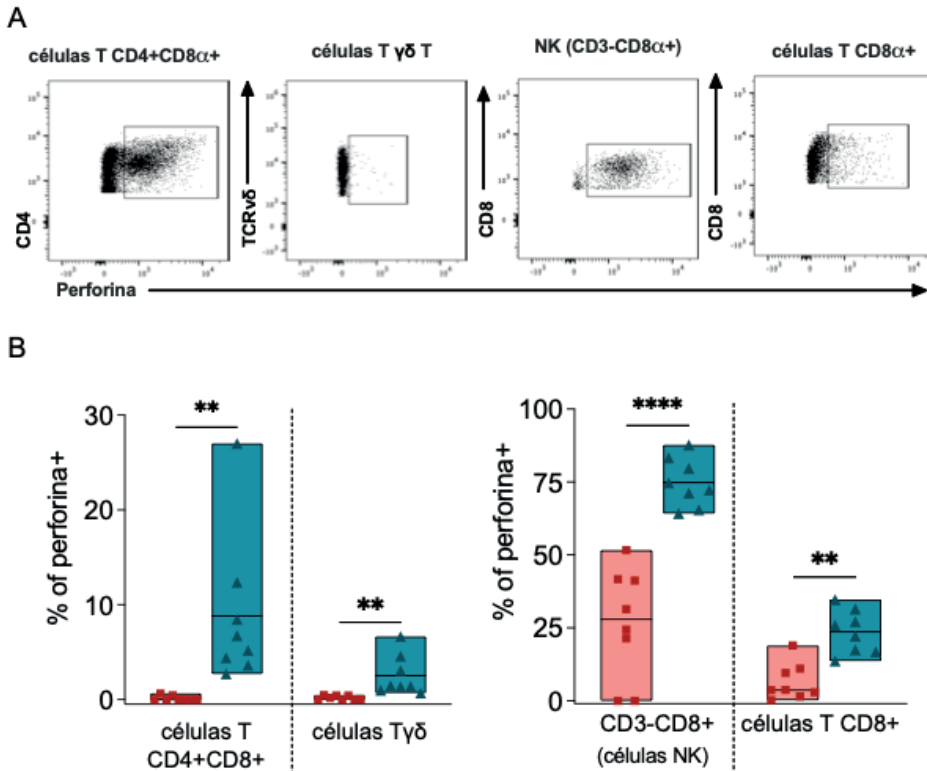


Figura 29. La vacunación con BA71 Δ CD2 induce una respuesta citotóxica de memoria orquestada por células T CD4+CD8+ y células T $\gamma\delta$ (A-B) PBMCs de animales no vacunados (n=8) y vacunados con BA71 Δ CD2 (n=8) se estimularon con BA71 Δ CD2 o medio control durante 48 horas y se analizaron mediante citometría de flujo los porcentajes de células T, CD8+, CD4+CD8+, $\gamma\delta$ y de células NK (CD3-CD8+) productoras de perforina. Las diferencias significativas estadísticamente se analizaron mediante un t-test de dos vías no pareadas, representándose en estilo GP ($p > 0.05$ ns, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$).

Por otro lado, cabe destacar que tras la estimulación con BA71 Δ CD2, tanto en células de animales vacunados, como de no vacunados, encontramos un incremento tanto de células NK perforina+, como de células T CD8 α + perforina+. La activación de estas poblaciones fue significativamente más elevada en las muestras de animales vacunados (Figura 29B). Este hallazgo indica la contribución de estas poblaciones celulares en la activación de la respuesta innata inducida tras la infección con VPPA.

Los resultados de analizar las muestras de LN submandibular mediante single cell *RNA-seq* validan los datos obtenidos previamente en PBMCs, y además extienden estos resultados reflejando la activación de una respuesta citotóxica concomitante a la respuesta Th1 e inflamatoria.

V. DISCUSIÓN

La PPA está causando una gran crisis en la industria porcina a nivel mundial. La alta mortalidad asociada a la enfermedad, así como los elevadísimos costes de las políticas sanitarias implementadas para intentar controlarla, producen incalculables pérdidas económicas. La obtención de una vacuna eficaz frente a la PPA permitiría controlar la actual pandemia. No obstante, hasta ahora su desarrollo se ha visto comprometido, entre otros factores, por la falta de conocimiento acerca la inmunidad protectora frente al virus (Bosch-Camós et al., 2020; Sereda et al. 2022).

Los resultados de esta tesis contribuyen a optimizar el uso de un prototipo vacunal que en un futuro podría ser utilizado en zonas afectadas por la PPA y a caracterizar la respuesta inmune protectora frente al VPPA. El desarrollo en nuestro laboratorio del virus atenuado BA71 Δ CD2, obtenido a partir de la eliminación del gen CD2v del virus parental BA71, perteneciente al genotipo I (Monteagudo et al., 2017), ha sido determinante para poder abordar estos estudios. El prototipo vacunal BA71 Δ CD2 induce protección cruzada tras su administración intramuscular frente a la infección experimental con Georgia2007/1, la cepa que circula actualmente de forma pandémica. No obstante, a pesar de su innegable eficacia experimental, algunos de los animales vacunados secretaban pequeñas cantidades de virus vacunal (López et al., 2021), comprometiendo así su implementación en el campo. Esta realidad, a pesar de ser aceptada para la práctica totalidad de las LAV existentes en el mercado, representa el mayor hándicap para la implementación de vacunas frente a enfermedades de declaración obligatoria de la OMSA, entre las que se incluye la PPA (www.woah.org). Esta es una de las razones por la que países libres de Peste Porcina Clásica (PPC) exportadores netos de productos derivados del porcino, incluyendo a Estados Unidos, Australia

o países de la UE, prohíben la utilización de vacunas vivas frente a la PPC, a pesar de su probada eficacia. Así pues, como en el caso de la PPC y tantos otros que afectan a enfermedades de declaración obligatoria para la OMSA, las vacunas han de demostrar ser tan seguras como eficaces. Esta realidad, a veces controvertida, no hace sino fortalecerse con evidencias científicas que demuestran que el uso de vacunas vivas, incluso tan eficaces y seguras como las de PPC, pueden a largo plazo contribuir a agravar la situación epidemiológica de la enfermedad, especialmente si la fauna salvaje juega un papel en su transmisión.

A la compleja experiencia de implementación de vacunas vivas frente a la PPA en el pasado en España hay que añadir experiencias más recientes realizadas en China y especialmente en Vietnam, donde el comienzo de la campaña de vacunación en campo con una LAV, se ha tenido que suspender en algunas zonas tras la detección de un elevado número de muertes asociadas a la misma (www.feedstrategi.com). Estos resultados en conjunto, confirman la complejidad del problema (Gavier-Widén et al., 2020), así como la necesidad de coordinación entre las agencias nacionales e internacionales competentes, incluyendo a la OMSA y a la FAO, para establecer protocolos universalmente reconocidos que regulen la aprobación de futuras vacunas y los protocolos de implementación de las mismas. En el caso concreto del VPPA, su atenuación no reside únicamente en su dotación genómica, sino también en factores ambientales de difícil control, tales como el estado sanitario e inmunológico de los animales (Radulovic et al., 2022), la dieta (Rodríguez, 2022) o la composición de su microbiota intestinal (Lacasta et al., 2014; Zhang et al., 2020). Realidad que complica todavía más predecir el comportamiento de una LAV al emplearse en campo.

Es relevante destacar que la cepa utilizada en esta tesis doctoral, BA71 Δ CD2, es el único prototipo vacunal que ha demostrado protección cruzada frente a la infección experimental con diferentes genotipos de VPPA, incluyendo la cepa Georgia2007/1 del genotipo II, y otras cepas del genotipo I (López et al., 2021; Monteagudo et al., 2017).. Este hecho adquiere más relevancia si tenemos en cuenta la reciente aparición en China de cepas de VPPA del genotipo I. Estas cepas tienen una gran homología a aislados naturales atenuados detectados en Portugal en la década de los setenta del siglo pasado, indicando que muy probablemente han sido introducidas como vacunas ilegales (Sun et al., 2021a). Así, la situación epidemiológica en China se ha complicado enormemente con la aparición de estas cepas del genotipo I derivadas de laboratorios junto con las cepas del genotipo II (Sun et al., 2021b; Zhenzhong et al., 2022).

Lejos de pretender solucionar la enorme complejidad de la realidad recién descrita, sirva esta entrada para justificar el porqué del objetivo inicial de esta tesis: intentar conseguir una formulación vacunal que permita garantizar, en la medida de lo posible, la máxima seguridad de nuestro prototipo BA71 Δ CD2. Desafortunadamente, trabajos previos de nuestro grupo y de otros, enfocados en la eliminación selectiva de factores de virulencia adicionales para mejorar la seguridad de los prototipos vacunales, lejos de mejorar su seguridad contribuyeron a comprometer su eficacia (Abrams et al., 2013; Gladue et al., 2020; López et al., 2021). En cambio, en esta tesis confirmamos que la administración del BA71 Δ CD2 vía intranasal es más segura que la vía intramuscular. El prototipo vacunal no presenta CD2v, proteína que permite al virus unirse a eritrocitos y por lo tanto diseminarse por el organismo VPRRS o el virus de la Influenza, que han demostrado ser eficaces por vía intranasal, habiendo despertado

enormes expectativas de futuro (Chaikhumwang et al., 2022; Martini et al., 2022; Vincent et al., 2007). De hecho ya existe una vacuna comercial frente a la Influenza porcina desarrollada por Boehringer Ingelheim (Ingelvac Provenza™) cuya administración es vía intranasal (Genzow et al., 2018).

El primer estudio de la tesis doctoral demuestra que la inoculación intranasal con BA71ΔCD2 confiere inmunidad cruzada de manera dosis-dependiente frente a la infección con la cepa virulenta Georgia2007/1. Además, la protección correlaciona con la presencia de células T productoras de IFN γ y un elevado título de anticuerpos específicos. Así pues, una vez demostrado un compromiso óptimo entre seguridad y eficacia, el resto de nuestro trabajo se centró en caracterizar la respuesta inducida por la vacunación con la dosis óptima. Para ello se analizó la reactivación específica de la respuesta inmune tras la estimulación *in vitro* de células de animales vacunados y no vacunados. El análisis abordó tanto la respuesta a nivel sistémico en células de sangre, como a nivel de LN submandibular, uno de los primeros tejidos diana tras una infección oro nasal con el VPPA

Uno de los hallazgos claves del estudio de la respuesta inmune inducida por la vacunación con BA71ΔCD2 fue que la reactivación *in vitro* tanto de PBMCs como de células de LN revelara la activación concomitante de una respuesta adaptativa de tipo Th1, una respuesta inflamatoria marcada por la activación de células mieloides y una respuesta celular citotóxica. En concreto, se detectó la activación de una respuesta inflamatoria dependiente de IFN γ mediada por CXCL10. Esta respuesta innata inducida por parte de células T específicas está caracterizada por la activación de una respuesta antiviral de interferón de tipo I, la diferenciación de

monocitos en macrófagos y el incremento de células NK y células T citotóxicas. En conjunto, los resultados sugieren que una activación rápida de la respuesta innata mediada por la respuesta adaptativa tipo Th1, así como una respuesta citotóxica inducida durante las primeras horas tras la infección, son componentes claves en la protección frente a VPPA.

El bloqueo del IFN γ durante la estimulación con BA71 Δ CD2, nos permitió demostrar el papel clave de esta citoquina en la activación de la respuesta innata. En concreto, los resultados indican que el IFN γ producido por células T específicas inducidas por la vacuna es el responsable de la producción por parte de monocitos y macrófagos de la citoquina proinflamatoria TNF. Nuestros resultados descartan que esta respuesta inflamatoria sea mediada por la inmunidad innata entrenada, descrita como la capacidad de monocitos, macrófagos y células NK de programarse para mantener memoria inmunológica tras el primer encuentro con un patógeno o tras la vacunación (Netea et al., 2016). El hecho que la estimulación con otros virus capaces de infectar monocitos y macrófagos porcinos como el VPRRS (Duan et al., 1997b) o el VPPC (Trautwein, 1988) diera resultados idénticos en células de cerdos vacunados y no vacunados, sugiere que la activación de la respuesta inflamatoria no se debe a la presencia de monocitos de memoria en sangre que puedan responder de manera inespecífica (Goodridge et al. 2016). No obstante, no se puede descartar que la inmunidad innata entrenada juegue un papel en la protección conferida frente al VPPA, especialmente en tejidos diana del virus. Por ejemplo, se ha descrito que infecciones virales respiratorias inducen memoria innata en macrófagos alveolares, que responden de manera más efectiva e inespecífica (Yao et al., 2018).

La activación de la respuesta innata dependiente de $\text{IFN}\gamma$ procedente de células T de memoria inducidas por la vacunación concuerda con otros trabajos en otros modelos de infecciones (Schenkel et al. 2013, 2014; Soudja et al. 2014; Arunachalam et al. 2020). En ellos se demuestra que la activación específica de antígenos de las células T desencadena una respuesta inflamatoria mediada por $\text{IFN}\gamma$, que a su vez actúa reclutando células de la respuesta innata en el lugar de infección. En la misma dirección, nuestros resultados indican que un reducido número de células T $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ de memoria polifuncionales específicas de virus desencadenan la activación de una potente respuesta innata tras la estimulación con VPPA. La dependencia de la activación de la respuesta inflamatoria por parte de la respuesta adaptativa también se va reflejada por la sobreexpresión de CXCL10, la quimiocina inducible por $\text{IFN}\gamma$. El receptor CXCR3, al que se une CXCL10, se expresa en células Th1, NK, CD8^+ y en células B de memoria cuando se diferencian a plasmablastos (Muehlinghaus et al., 2005). La detección de la quimiocina CXCL10 en plasmablastos indicaría que el $\text{IFN}\gamma$ no solo está activando la respuesta inflamatoria, sino que también está promoviendo la migración de las células B de memoria al lugar de la infección y su diferenciación en plasmablastos, para posteriormente terminar de diferenciarse a células plasmáticas.

El rápido aumento de la respuesta de tipo IFN-I y la consiguiente producción de ISG observada podría contribuir a frenar la expansión del virus. El hecho que el VPPA presente diversos genes capaces de interferir con las vías de señalización de IFN-I (Razzuoli et al., 2020; Wu et al., 2021), confirma la relevancia de activar esta vía si se quiere frenar la expansión viral. En este sentido, cabe destacar también que se observaron

diferencias sutiles en la respuesta de IFN-I al estimular con el virus vacunal BA71 Δ CD2 o con el virus virulento Georgia2007/01, asociadas a una menor capacidad estimuladora de este último. Estas diferencias no pueden ser explicadas únicamente por la capacidad inmunosupresora de CD2v (Dixon et al., 2004), ausente en la vacuna, ya que recientemente se ha demostrado que esta molécula induce la producción de IFN β (Chaulagain et al., 2021). Independientemente de la acción de CD2v, no podemos descartar el papel de otros factores de virulencia presentes en Georgia2007/01 o ausentes en BA71 y viceversa.

En la patogénesis de la PPA, los macrófagos juegan un papel fundamental, tanto de manera directa como indirecta. Se ha descrito que los macrófagos activados mediante IFN α e IFN γ son más resistentes a la infección con VPPA (Esparza et al., 1988; Franzoni et al., 2017 y 2020). Así, el IFN γ producido por las células T efectoras-secretoras de IFN γ próximas al lugar de la infección, reduciría el número de macrófagos susceptibles al VPPA, permitiendo la participación de los susodichos macrófagos en la respuesta inmune antiviral efectora antes de ser infectados, en contraposición a lo que ocurre en los animales *naive* (Franzoni et al., 2018). Así pues, la activación de este estado antiviral inducido en el lugar de la infección facilitaría la resolución de esta. Por otro lado, los resultados de transcriptómica revelaron que, tras la estimulación de las PBMCs, los monocitos en sangre se diferenciaban a macrófagos, los cuales se ha descrito que son más susceptibles a la infección con VPPA (Sánchez-Torres et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados de estimulación *in vitro* revelaron tasas de replicación similares entre animales no vacunados y vacunados. Además, en los ensayos *in vivo*, no se han detectado elevados títulos virales tras la infección con la cepa virulenta. De toda manera, como

no podemos descartar que la activación de la respuesta innata favorezca la replicación viral, al contribuir al aumento de células susceptibles, más experimentos serían necesarios para aclarar este punto. Este balance entre la activación de la respuesta innata antiviral y el reclutamiento de células susceptibles en el lugar de la infección tras la infección en animales vacunados, puede ser crítico no solo en caso de la VPPA, sino también en otras enfermedades cuyas células diana son células del sistema inmune, como es el caso del VPPC (Trautwein, 1988), VPRRS (Duan et al., 1997a) en cerdos o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lee et al., 1999).

Capítulo aparte merece el hecho que, tras la estimulación *in vitro* con VPPA en animales vacunados, se observara la activación de diferentes células citotóxicas que estarían participando en el control de la infección. Por un lado, en los animales vacunados se observó una respuesta citotóxica específica en células T CD4+CD8+ y células T $\gamma\delta$, lo que coincidió con la activación de la respuesta Th1 observada. Las células T $\gamma\delta$ son abundantes en sangre en los cerdos, pero no expresan perforina en condiciones basales (Takamatsu et al., 2006), por lo que el incremento de su actividad citotóxica tras la estimulación con VPPA *in vitro* podría tener un papel relevante. Las células T $\gamma\delta$ reconocen diferentes tipos de antígenos que las células T $\alpha\beta$, independientemente de MHC (Petersen et al. 2021), por lo que podrían estar complementando la respuesta citotóxica mediada por las células T CD4+CD8+ citotóxicas de memoria (Argilaguët et al., 2012; Takamatsu et al., 2013).

Complementariamente a esta respuesta T citotóxica específica, tanto en los animales no vacunados como en los vacunados, se detectaron células T CD8+ y células NK con capacidad citotóxica, aunque en mayor proporción

en estos últimos. Estos resultados indican que la expansión inespecífica de NK y CD8⁺ se ve posiblemente incrementada en animales vacunados por la activación de la vía de comunicación IFN γ -CXCL10. Este hecho también puede ser crucial a la hora de frenar la replicación viral temprana. En trabajos anteriores se había asociado la presencia de estas dos poblaciones celulares con el control de la infección de VPPA a nivel sistémico (Leitão et al., 2001; Oura et al., 2005; Takamatsu et al., 2013), aunque las evidencias eran escasas, necesitando una exploración más detallada. La hipótesis que la respuesta citotóxica participa en la protección frente a VPPA, va en la misma línea que los datos preliminares presentados por Takamatsu y colaboradores (2013), en los que se asociaba la proliferación *in vitro* de células T CD4⁺CD8⁺ estimuladas con VPPA con protección. Además, las tres poblaciones citotóxicas mencionadas (NK, T-CD8⁺ y T-CD4⁺CD8⁺) expresan la proteína CD8 α . Así, dichas poblaciones podrían participar en la protección adquirida ligada a la presencia de células CD8 α ⁺, demostrada tras la depleción *in vivo* en cerdos inmunes (Oura et al., 2005), aunque, como hemos dicho anteriormente, se necesitan más estudios para confirmar la relevancia concreta de cada una de las poblaciones celulares. Por otro lado, resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que la población de células T-CD8⁺perforina⁺ aparece en gran proporción en animales con sintomatología clínica de PPA aguda (resultados no incluidos en la presente tesis). Este hecho podría indicar un papel dual de estas células en patogénesis y protección. En conjunto, demostramos que los cerdos vacunados con BA71 Δ CD2 responden a la estimulación con VPPA mediante la activación de una respuesta citotóxica confirmando la importancia de la respuesta celular en

el control de la infección con VPPA (Argilaguet et al., 2012; Takamatsu et al., 2013).

Un factor clave para entender la respuesta inmune frente al VPPA, así como para evaluar la eficacia de una vacuna, es la identificación de correlatos de protección. En el caso de la PPA se sabe que tanto la respuesta humoral como la celular contribuyen en la respuesta inmune protectora (Onisk et al., 1994; Oura et al. 2005; Schlafer et al., 1984), pero una cuantificación adecuada de ambos mecanismos es clave para poder esclarecer los mencionados correlatos de protección. En la presente tesis se identificó una correlación entre el elevado título de anticuerpos y la presencia de células productoras de IFN γ con protección, pero esta correlación no siempre se ha presentado en otros estudios (Monteagudo et al., 2017). Lo más probable es que la protección adquirida frente a la PPA requiera de la coordinación de diferentes componentes del sistema inmune, y que los valores mínimos necesarios de cada uno se vean modificados de forma interrelacional, como se ha descrito en otras enfermedades (Arunachalam et al., 2020; Bocharov et al., 2021). La protección conferida frente a la PPA podría estar asociada con inmunidad local inducida en el sitio de entrada del virus y que no necesariamente pueda medirse en sangre, complicando aún más la posibilidad de establecer correlatos de protección fiables de manera sencilla. Para añadir aún más complejidad al sistema, el desarrollo de correlatos de protección útiles exigirá no sólo entender los mecanismos protectores sino, además, caracterizar al máximo el repertorio de antígenos con potencial protector de entre las más de 150 proteínas del VPPA.

Por otra parte, no debemos olvidar la relevancia del modelo utilizado en este estudio. Por un lado, el desafío por contacto utilizado es el que más se

aproxima a la vía de infección natural fuera de África entre jabalíes y/o cerdos domésticos. Así, la inducción de inmunidad de mucosas generada por la vacunación intranasal con BA71 Δ CD2 podría ser efectiva para controlar la diseminación de la PPA en campo, siempre teniendo en cuenta los estudios de bioseguridad que son necesarios para implementar el uso extensivo de una LAV. Por otro lado, BA71 Δ CD2 es la única LAV descrita hasta el momento que confiere protección cruzada frente a distintos genotipos (Bosch-Camós et al., 2020). La rápida activación de la respuesta innata que observamos en los animales inmunes tras la estimulación *in vitro*, podría ser un factor clave en la adquisición de esta inmunidad cruzada. Comparar nuestros resultados con los obtenidos al utilizar otros prototipos vacunales basados en virus atenuados que no inducen protección heteróloga sería interesante para poder identificar parámetros claves en la protección cruzada. De igual modo, utilizar modelos de protección frente a distintas cepas del VPPA (King et al., 2011; López et al., 2020), podría facilitar el diseño de vacunas universales frente a la PPA en el futuro.

Las vacunas “fáciles” ya han sido desarrolladas y están a disposición del mercado, con lo que, como sucede en medicina humana con el VIH; no nos queda sino seguir investigando. La presente tesis doctoral ayuda a esclarecer la compleja respuesta inmunológica asociada con protección frente al VPPA, aportando, además, información sobre componentes clave que deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar futuras estrategias vacunales. Hemos demostrado que la rápida activación de la respuesta inflamatoria podría jugar un papel clave en la protección frente a la PPA. Mientras la obtención de una vacuna de subunidades eficaz contra la PPA se vea lastrada por los lentos avances en la identificación de antígenos

asociados a la protección dentro del ingente repertorio del virus (Bosch-Camós et al., 2021), el trabajo presentado en esta tesis doctoral representa un paso adelante en el desarrollo de vacunas contra la PPA, del actual ensayo y error ciego, a una estrategia más racional.

VI. CONCLUSIONES

1. La administración intranasal del prototipo vacunal BA71 Δ CD2 es una ruta segura que confiere protección frente a la infección con Georgia2007/1 de manera dosis-dependiente.
2. La inmunidad cross-protectora inducida por el prototipo vacunal BA71 Δ CD2 está marcada por la presencia de anticuerpos específicos y presencia de células T específicas secretoras de IFN γ circulantes antes de la infección.
3. El análisis mediante *RNAseq* y citometría de flujo de las PBMCs de animales vacunados con BA71 Δ CD2 tras la estimulación *in vitro* con VPPA, revela la activación específica de células T CD4+CD8+ de memoria polifuncionales, concomitante con la activación de una respuesta inflamatoria orquestada por células mieloides.
4. La respuesta inflamatoria mediada por células mieloides observada específicamente en los animales inmunizados con BA71 Δ CD2, es dependiente en gran medida de la secreción de IFN γ por parte de las células T específicas de memoria una vez activadas.
5. El análisis mediante *single-cell RNAseq* y citometría de flujo de células de LN submandibular estimuladas *in vitro*, confirma los resultados obtenidos en sangre y revela la expansión específica de células T citotóxicas en los animales inmunizados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, C. C., L. Goatley, E. Fishbourne, D. Chapman, L. Cooke, C. A. Oura, C. L. Netherton, H. Takamatsu, & L. K. Dixon. 2013. "Deletion of Virulence Associated Genes from Attenuated African Swine Fever Virus Isolate OUR T88/3 Decreases Its Ability to Protect against Challenge with Virulent Virus." *Virology* 443 (1): 99–105.
- Akira, S., S. Uematsu, & O. Takeuchi. 2006. "Pathogen Recognition & Innate Immunity." *Cell* 124 (4): 783–801.
- Alcamí, A., A. L. Carrascosa, & E. Viñuela. 1989. "Saturable Binding Sites Mediate the Entry of African Swine Fever Virus into Vero Cells." *Virology* 168 (2): 393–98.
- Alcamí, A., A. L. Carrascosa, & E. Viñuela. 1990. "Interaction of African Swine Fever Virus with Macrophages." *Virus Research* 17 (2): 93–104.
- Alejo, A., T. Matamoros, M. Guerra, & G. Andrés. 2018. "A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle." *Journal of Virology* 92 (23): e01293-18.
- Almazán, F., J. M. Rodríguez, G. Andrés, R. Pérez, E. Viñuela, & J. F. Rodríguez. 1992. "Transcriptional Analysis of Multigene Family 110 of African Swine Fever Virus." *Journal of Virology* 66 (11): 6655–67.
- Alonso, C., J. Miskin, B. Hernáez, P. Fernandez-Zapatero, L. Soto, C. Cantó, I. Rodríguez-Crespo, L. Dixon, & J. M. Escribano. 2001. "African Swine Fever Virus Protein P54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein." *Journal of Virology* 75 (20): 9819–27.
- Alonso, C., I. Galindo, M. A. Cuesta-Gejjo, M. Cabezas, B. Hernaez, & R. Muñoz-Moreno. 2013. "African Swine Fever Virus-Cell Interactions: From Virus Entry to Cell Survival." *Virus Research* 173 (1): 42–57.
- Andrés, G. 2017. "African Swine Fever Virus Gets Undressed: New Insights on the Entry Pathway." *Journal of Virology* 91 (4): 01906-16.
- Andrés, G., D. Charro, T. Matamoros, R. Dillard, & N. Abrescia. 2020. "The Cryo-EM Structure of African Swine Fever Virus Unravels a Unique Architecture Comprising Two Icosahedral Protein Capsids & Two Lipoprotein Membranes." *The Journal of Biological Chemistry* 295 (1): 1–12.
- Andrés, G., R. García-Escudero, M. L. Salas, & J. M. Rodríguez. 2002. "Repression of African Swine Fever Virus Polyprotein Pp220-Encoding Gene Leads to the Assembly of Icosahedral Core-Less Particles." *Journal of Virology* 76 (6): 2654–66.
- Andrés, G., R. García-Escudero, C. Simón-Mateo, & E. Viñuela. 1998. "African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the Endoplasmic Reticulum." *Journal of Virology* 72 (11): 8988–9001.

- Ardley, R. C., S. G. Norley, P. J. Wilkinson, & S. Williams. 1985. "The Role of Antibody in Protection against African Swine Fever Virus." *Vet Immunol Immunopathol* 9 (3): 201–12.
- Argilaguët, J. M., E. Pérez-Martín, C. Gallardo, F. J. Salguero, B. Borrego, A. Lacasta, F. Accensi, et al. 2011. "Enhancing DNA Immunization by Targeting ASFV Antigens to SLA-II Bearing Cells." *Vaccine* 29 (33): 5379–85.
- Argilaguët, J. M., E. Pérez-Martín, S. López, M. Goethe, J. M. Escribano, & K. Giesow. 2013. "BacMam Immunization Partially Protects Pigs against Sublethal Challenge with African Swine Fever Virus." *Antivir Res* 98 (1): 61–65.
- Argilaguët, J.M., E. Pérez-Martín, M. Nofrarías, C. Gallardo, F. Accensi, A. Lacasta, M. Mora, et al. 2012. "DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies." *PLoS One* 7 (9): e40942.
- Arias, M., A. de la Torre, L. K. Dixon, C. Gallardo, F. Jori, A. Laddomada, C. Martins, R. M. Parkhouse, & Y. Revilla. 2017. "Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines." *Vaccines* 5 (4): 35.
- Arunachalam, P. S., T. P. Charles, V. Joag, V. S. Bollimpelli, M. K. Scott, F. Wimmers, S. L. Burton, et al. 2020. "T Cell-Inducing Vaccine Durably Prevents Mucosal SHIV Infection Even with Lower Neutralizing Antibody Titers." *Nature Medicine* 26 (6): 932–40.
- Ballester, M., I. Galindo-Cardiel, C. Gallardo, J. M. Argilaguët, J. Segalés, J. M. Rodríguez, & F. Rodríguez. 2010. "Intranuclear Detection of African Swine Fever Virus DNA in Several Cell Types from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues Using a New in Situ Hybridisation Protocol." *Journal of Virological Methods* 168 (1–2): 38–43.
- Ballester, M., R. Cordon, & J. M. Folch. 2013. "DAG Expression: High-Throughput Gene Expression Analysis of Real-Time PCR Data Using Standard Curves for Relative Quantification." *PLoS One* 8 (11): e80385.
- Beyers, A. D., A. N. Barclay, D. A. Law, Q. He, & A. F. Williams. 1989. "Activation of T Lymphocytes via Monoclonal Antibodies against Rat Cell Surface Antigens with Particular Reference to CD2 Antigen." *Immunol. Rev* 111: 59–77.
- Bierer, B. E., & S. J. Burakoff. 1989. "T-Lymphocyte Activation: The Biology and Function of CD2 and CD4." *Immunol. Rev* 111: 267–94.
- Blome, S., C. Gabriel, & M. Beer. 2013. "Pathogenesis of African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar." *Virus Research* 173 (1): 122–30.
- Blome, S., C. Gabriel, & M. Beer. 2014. "Modern Adjuvants Do Not Enhance the Efficacy of an Inactivated African Swine Fever Virus Vaccine Preparation." *Vaccine* 32 (31): 3879–82.

- Bocharov, G., D. Grebennikov, J. M. Argilaguët, & A. Meyerhans. 2021. "Examining the Cooperativity Mode of Antibody and CD8+ T Cell Immune Responses for Vaccinology." *Trends in Immunology* 42 (10): 852–55.
- Borca, M. V., C. Carrillo, L. Zsak, W. Laegreid, G. F. Kutish, J. G. Neilan, T. G. Burrage & D. L. Rock. 1998. "Deletion of a CD2-Like Gene, 8-DR, from African Swine Fever Virus Affects Viral Infection in Domestic Swine" *Journal of Virology* (72) 2881–2889
- Borca, M. V., E. Ramirez-Medina, E. Silva, E. Vuono, A. Rai, S. Pruitt, L. Holinka, L. Velazquez-Salinas, J. Zhu, & D. Gladue. 2020. "Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain." *Journal of Virology* 94 (7): 02017–19.
- Borca, M. V., G. F. Kutish, C. L. Afonso, P. Irusta, C. Carrillo, A. Brun, M. Sussman, & D. L. Rock. 1994. "An African Swine Fever Virus Gene with Similarity to the T-Lymphocyte Surface Antigen CD2 Mediates Hemadsorption." *Virology* 199 (2): 463–68.
- Bosch-Camós, L., E. López, M. Navas, S. Pina-Pedrero, F. Accensi, F. Correa-Fiz, C. Park, et al. 2021a. "Identification of Promiscuous African Swine Fever Virus T-Cell Determinants Using a Multiple Technical Approach." *Vaccines* 9 (1): 29.
- Bosch-Camós, L., E. López, & F. Rodríguez. 2020. "African Swine Fever Vaccines: A Promising Work Still in Progress." *Porcine Health Management* 6 (July): 17.
- Bosch-Camós, L., E. López, J. Collado, M. J. Navas, M. Blanco-Fuertes, S. Pina-Pedrero, F. Accensi, et al. 2021b. "M448R and MGF505-7R: Two African Swine Fever Virus Antigens Commonly Recognized by ASFV-Specific T-Cells and with Protective Potential." *Vaccines* 9 (5): 508.
- Brookes, S. M., L. K. Dixon, & R. M. Parkhouse. 1996. "Assembly of African Swine Fever Virus: Quantitative Ultrastructural Analysis in Vitro and in Vivo." *Virology* 224 (1): 84–92.
- Brun, A., F. Rodríguez, J. M. Escribano, & C. Alonso. 1998. "Functionality and Cell Anchorage Dependence of the African Swine Fever Virus Gene A179L, a Viral Bcl-2 Homolog, in Insect Cells." *J. Virol* 72: 10227–33.
- Buechler, C., K. Eisinger, & S. Krautbauer. 2013. "Diagnostic and Prognostic Potential of the Macrophage Specific Receptor CD163 in Inflammatory Diseases." *Inflammation & Allergy Drug Targets* 12 (6): 391–402.
- Burmakina, G., A. Malogolovkin, E. R. Tulman, W. Xu, G. Delhon, D. Kolbasov, & D. L. Rock. 2019. "Identification of T-Cell Epitopes in African Swine Fever Virus CD2v and C-Type Lectin Proteins." *The Journal of General Virology* 100 (2): 259–65.
- Canals, A., F. Alonso, J. Tomillo, & J. Domínguez. 1992. "Analysis of T Lymphocyte Subsets Proliferating in Response to Infective and UV-

- Inactivated African Swine Fever Viruses.” *Veterinary Microbiology* 33 (1–4): 117–27.
- Canter, J. A., T. Aponte, E. Ramirez-Medina, S. Pruitt, D. P. Gladue, M. V. Borca, & J. J. Zhu. 2022. “Serum Neutralizing and Enhancing Effects on African Swine Fever Virus Infectivity in Adherent Pig PBMC.” *Viruses* 14 (6): 1249.
- Cappai, S., S. Rolesu, A. Coccollone, A. Laddomada, & F. Loi. 2018. “Evaluation of Biological and Socio-Economic Factors Related to Persistence of African Swine Fever in Sardinia.” *Preventive Veterinary Medicine* 152 (April): 1–11.
- Carlson, J., V. Donnell, M. Alfano, L. V. Salinas, L. G. Holinka, & P. W. Krug. 2016. “Association of the Host Immune Response with Protection Using a Live Attenuated African Swine Fever Virus Model.” *Viruses* 8 (10).
- Carrascosa, A. L., M. J. Bustos, I. Galindo, & E. Viñuela. 1999. “Virus-Specific Cell Receptors Are Necessary, but Not Sufficient, to Confer Cell Susceptibility to African Swine Fever Virus.” *Archives of Virology* 144 (7): 1309–21.
- Chaikhumwang, P., A. Madapong, K. Saeng-Chuto, D. Nilubol, & A. Tantituvanont. 2022. “Intranasal Delivery of Inactivated PRRSV Loaded Cationic Nanoparticles Coupled with Enterotoxin Subunit B Induces PRRSV-Specific Immune Responses in Pigs.” *Scientific Reports* 12 (1): 3725.
- Chathuranga, K., A. Weerawardhana, N. Dodantenna, & J. Lee. 2021. “Regulation of Antiviral Innate Immune Signaling and Viral Evasion Following Viral Genome Sensing.” *Experimental & Molecular Medicine* 53 (11): 1647–68.
- Chaulagain, S., G. A. Delhon, S. Khatiwada, & D. L. Rock. 2021. “African Swine Fever Virus CD2v Protein Induces β -Interferon Expression and Apoptosis in Swine Peripheral Blood Mononuclear Cells.” *Viruses* 13 (8): 1480.
- Chen, J., CHI Consortium, F. Cheung, R. Shi, H. Zhou, & W. Lu. 2018. “PBMC Fixation and Processing for Chromium Single-Cell RNA Sequencing.” *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 198.
- Chen, W., D. Zhao, X. He, R. Liu, Z. Wang, X. Zhang, F. Li, et al. 2020. “A Seven-Gene-Deleted African Swine Fever Virus Is Safe & Effective as a Live Attenuated Vaccine in Pigs.” *Science China. Life Sciences* 63 (5): 623–34.
- Cuesta-Geijo, M. A., I. Galindo, B. Hernáez, J. I. Quetglas, I. Dalmau-Mena, & C. Alonso. 2012. “Endosomal Maturation, Rab7 GTPase and Phosphoinositides in African Swine Fever Virus Entry.” *PloS One* 7 (11): e48853.
- Danzetta, M. L., M. L. Marenzoni, S. Iannetti, P. Tizzani, P. Calistri, & F. Feliziani. 2020. “African Swine Fever: Lessons to Learn from Past

- Eradication Experiences. A Systematic Review.” *Frontiers in Veterinary Science* 7 (June): 296.
- Denyer, M.S., T. E. Wileman, C. M. Stirling, B. Zuber, & H. Takamatsu. 2006. “Perforin Expression Can Define CD8 Positive Lymphocyte Subsets in Pigs Allowing Phenotypic and Functional Analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC Un-Restricted Cytotoxic T-Cells.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 110 (3–4): 279–92.
- Díaz, I., & E. Mateu. 2005. “Use of ELISPOT and ELISA to Evaluate IFN-Gamma, IL-10 and IL-4 Responses in Conventional Pigs.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106 (1–2): 107–12.
- Dixon, L. K., M. Islam, R. Nash, & A. L. Reis. 2019. “African Swine Fever Virus Evasion of Host Defences.” *Virus Research* 266 (June): 25–33.
- Dixon, L. K., P. J. Sánchez-Cordón, I. Galindo, & C. Alonso. 2017. “Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis.” *Viruses* 9 (9): 241.
- Dixon, L. K., C. C. Abrams, G. Bowick, L. C. Goatley, P. C. Kay-Jackson, D. Chapman, E. Liverani, R. Nix, R. Silk, & F. Zhang. 2004. “African Swine Fever Virus Proteins Involved in Evading Host Defence Systems.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 100 (3–4): 117–34.
- Dixon, L. K., D. A. Chapman, C. L. Netherton, & C. Upton. 2013. “African Swine Fever Virus Replication and Genomics.” *Virus Research* 173 (1): 3–14.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, & T. R. Gingeras. 2013. “STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (1): 15–21.
- Donnell, V., L. G. Holinka, P. W. Krug, D. P. Gladue, J. Carlson, & B. Sanford. 2015. “African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), When Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge.” *J Virol* 89 (16): 8556–66.
- Duan, X., H. J. Nauwynck, & M. B. Pensaert. 1997a. “Effects of Origin and State of Differentiation and Activation of Monocytes/Macrophages on Their Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV).” *Archives of Virology* 142 (12): 2483–97.
- Duan, X., H. J. Nauwynck, & M. B. Pensaert. 1997b. “Virus Quantification and Identification of Cellular Targets in the Lungs and Lymphoid Tissues of Pigs at Different Time Intervals after Inoculation with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV).” *Veterinary Microbiology* 56 (1–2): 9–19.
- Esparza, I., J. C. González, & E. Viñuela. 1988. “Effect of Interferon-Alpha, Interferon-Gamma and Tumour Necrosis Factor on African Swine Fever Virus Replication in Porcine Monocytes and Macrophages.” *The Journal of General Virology* 69 (Pt 12) (12): 2973–80.

- “FAO” 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Emergency Prevention System for Animal Health (EMPRES-AH). 2021. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/>.
- Fernández, A., J. Perez, J. Martin de las Mulas, L. Carrasco, J. Dominguez, & M. A. Sierra. 1992. “Localization of African Swine Fever Viral Antigen, Swine IgM, IgG and C1q in Lung and Liver Tissues of Experimentally Infected Pigs.” *Journal of Comparative Pathology* 107 (1): 81–90.
- Fonso, C. L., L. Zsak, C. Carrillo, M. V. Borca, and D. L. Rock. 1998. “African Swine Fever Virus NL Gene Is Not Required for Virus Virulence.” *J Gen Virol* 79 (10): 2543–47.
- Franzoni, G., S. D. Giudici, & A. Oggiano. 2018. “Infection, Modulation and Responses of Antigen-Presenting Cells to African Swine Fever Viruses.” *Virus Research* 258 (October): 73–80.
- Franzoni, G., S. P. Graham, S. D. Giudici, P. Bonelli, G. Pilo, A. G. Anfossi, M. Pittau, P. S. Nicolussi, A. Laddomada, & A. Oggiano. 2017. “Characterization of the Interaction of African Swine Fever Virus with Monocytes and Derived Macrophage Subsets.” *Veterinary Microbiology* 198 (January): 88–98.
- Franzoni, G., E. Razzuoli, S. D. Giudici, T. Carta, G. Galleri, S. Zinellu, M. Ledda, et al. 2020. “Comparison of Macrophage Responses to African Swine Fever Viruses Reveals That the NH/P68 Strain Is Associated with Enhanced Sensitivity to Type I IFN and Cytokine Responses from Classically Activated Macrophages.” *Pathogens* 9 (3): 209.
- Freitas, F. B., G. Frouco, C. Martins, & F. Ferreira. 2018. “African Swinefever Virus Encodes for an E2-Ubiquitin Conjugating Enzyme That is Mono- and Di-Ubiquitinated & Required for Viral Replication Cycle.” *Sci Rep* 8.
- Frouco, G., F. B. Freitas, J. Coelho, A. Leitão, C. Martins, & F. Ferreira. 2017. “DNA-Binding Properties of African Swine Fever Virus PA104R, a Histone-like Protein Involved in Viral Replication and Transcription.” *Journal of Virology* 91 (12): 02498-16.
- Gabriel, S., & C. Beer. 2014. “Modern Adjuvants Do Not Enhance the Efficacy of an Inactivated African Swine Fever Virus Vaccine Preparation.” *Vaccine* 32 (31): 3879–82.
- Galindo, I., F. Almazán, M. J. Bustos, E. Viñuela, & A. L. Carrascosa. 2000. “African Swine Fever Virus EP153R Open Reading Frame Encodes a Glycoprotein Involved in the Hemadsorption of Infected Cells.” *Virology* 266 (2): 340–51.
- Galindo, I., M. Cuesta-Geijo, Ka Hlavova, R. Muñoz-Moreno, L. Barrado-Gil, J. Dominguez, & C. Alonso. 2015. “African Swine Fever Virus Infects Macrophages, the Natural Host Cells, via Clathrin- and Cholesterol-Dependent Endocytosis.” *Virus Research* 200 (March): 45–55.
- Galindo, I., & C. Alonso. 2017. “African Swine Fever Virus: A Review.” *Viruses* 9 (5): 103.

- Galindo-Cardiel, I., M. Ballester, D. Solanes, M. Nofrarías, S. López-Soria, J. M. Argilagué, A. Lacasta, F. Accensi, F. Rodríguez, & J. Segalés. 2013. "Standardization of Pathological Investigations in the Framework of Experimental ASFV Infections." *Virus Research* 173 (1): 180–90.
- Gallardo, C., A. Soler, R. Nieto, A. L. Carrascosa, G. M. De Mia, R. P. Bishop, C. Martins, et al. 2013. "Comparative Evaluation of Novel African Swine Fever Virus (ASF) Antibody Detection Techniques Derived from Specific ASF Viral Genotypes with the OIE Internationally Prescribed Serological Tests." *Veterinary Microbiology* 162 (1): 32–43.
- García-Beato, R., J. M. P. Freije, C. López-Otín, R. Blasco, E. Viñuela, & M. L. Salas. 1992. "A Gene Homologous to Topoisomerase II in African Swine Fever Virus." *Virology* 188: 938–47.
- García-Escudero, R., G. Andrés, F. Almazán, & E. Viñuela. 1998. "Inducible Gene Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein P72." *Journal of Virology* 72 (4): 3185–95.
- Gaudreault, N. & J. A. Richt. 2019. "Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus." *Vaccines* 7 (2): 56.
- Gavier-Widén, D., K. Ståhl, & L. Dixon. 2020. "No Hasty Solutions for African Swine Fever." *Science* 367 (6478): 622–24.
- Genzow, M., C. Goodell, T. J. Kaiser, W. Johnson, & M. Eichmeyer. 2018. "Live Attenuated Influenza Virus Vaccine Reduces Virus Shedding of Newborn Piglets in the Presence of Maternal Antibody." *Influenza and Other Respiratory Viruses* 12 (3): 353–59.
- Gladue, D. P., & M. V. Borca. 2022. "Recombinant ASF Live Attenuated Virus Strains as Experimental Vaccine Candidates." *Viruses* 14 (5): 878.
- Gladue, D. P., V. Donnell, E. Ramírez-Medina, A. Rai, S. Pruitt, E. A. Vuono, E. Silva, L. Velazquez-Salinas, & M. V. Borca. 2020. "Deletion of CD2-like (CD2v) and C-Type Lectin-like (EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia-Δ9GL Abrogates Its Effectiveness as an Experimental Vaccine." *Viruses* 12 (10): 1185.
- Goatley, L. C., & L. K. Dixon. 2011. "Processing and Localization of the African Swine Fever Virus CD2v Transmembrane Protein." *Journal of Virology* 85 (7): 3294–3305.
- Gómez-Puertas, P., F. Rodríguez, J. M. Oviedo, F. Ramiro-Ibáñez, F. Ruiz-Gonzalvo, C. Alonso, & J. M. Escibano. 1996. "Neutralizing Antibodies to Different Proteins of African Swine Fever Virus Inhibit Both Virus Attachment and Internalization." *Journal of Virology* 70 (8): 5689–94.
- Gómez-Villamandos, J. C., M. J. Bautista, P. J. Sánchez-Cordón, & L. Carrasco. 2013. "Pathology of African Swine Fever: The Role of Monocyte-Macrophage." *Virus Research* 173 (1): 140–49.
- Goodridge, H. S., S. Ahmed, N. Curtis, T. R. Kollmann, O. Levy, M. G. Netea, A. J. Pollard, Reinout van Crevel, & C. B. Wilson. 2016. "Harnessing the

- Beneficial Heterologous Effects of Vaccination.” *Nature Reviews. Immunology* 16 (6): 392–400.
- Granja, A. G., M. L. Nogal, C. Hurtado, J. Salas, M. L. Salas, A. L. Carrascosa, & Y. Revilla. 2004. “Modulation of P53 Cellular Function and Cell Death by African Swine Fever Virus.” *J. Virol* 78: 7165–74.
- Grigoriu, S., R. Bond, P. Cossio, J. A. Chen, N. Ly, G. Hummer, R. Page, M. S. Cyert, & Wo. Peti. 2013. “The Molecular Mechanism of Substrate Engagement and Immunosuppressant Inhibition of Calcineurin.” *PLoS Biology* 11 (2): e1001492.
- Hang, F., A. Moon, K. Childs, S. Goodbourn, & L. K. Dixon. 2010. “The African Swine Fever Virus DP71L Protein Recruits the Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit to Dephosphorylate EIF2 alpha and Inhibits CHOP Induction but Is Dispensable for These Activities during Virus Infection.” *J. Virol* 84: 10681–89.
- Hao, Y., S. Hao, E. Andersen-Nissen, W. M. Mauck 3rd, S. Zheng, A. Butler, M. J. Lee, et al. 2021. “Integrated Analysis of Multimodal Single-Cell Data.” *Cell* 184 (13): 3573–3587.e29.
- Hernández, B., & C. Alonso. 2010. “Dynamin- and Clathrin-Dependent Endocytosis in African Swine Fever Virus Entry.” *Journal of Virology* 84 (4): 2100–2109.
- Hernández, B., G. Díaz-Gil, M. García-Gallo, J. I. Quetglas, I. Rodríguez-Crespo, L. D., J. M. Escribano, & C. Alonso. 2004. “The African Swine Fever Virus Dynein-Binding Protein P54 Induces Infected Cell Apoptosis.” *FEBS Letters* 569 (1–3): 224–28.
- Hernández, B., J. M. Escribano, & C. Alonso. 2006. “Visualization of the African Swine Fever Virus Infection in Living Cells by Incorporation into the Virus Particle of Green Fluorescent Protein-P54 Membrane Protein Chimera.” *Virology* 350 (1): 1–14.
- Hurtado, C., M. J. Bustos, & A. Carrascosa. 2010. “The Use of COS-1 Cells for Studies of Field and Laboratory African Swine Fever Virus Samples.” *Journal of Virological Methods* 164 (1–2): 131–34.
- Hurtado, C., A. G. Granja, M. J. Bustos, M. L. Nogal, G. G. De Buitrago, V. G. De Yebenes, M. L. Salas, Y. Revilla, & A. L. Carrascosa. 2004. “The C-Type Lectin Homologue Gene (EP153R) of African Swine Fever Virus Inhibits Apoptosis Both in Virus Infection and in Heterologous Expression.” *Virology* 326(1): 160–70.
- Hurtado, C., M. J. Bustos, A. G. Granja, P. León, P. Sabina, E. López-Viñas, P. Gómez-Puertas, Y. Revilla, & A. L. Carrascosa. 2011. “The African Swine Fever Virus Lectin EP153R Modulates the Surface Membrane Expression of MHC Class I Antigens.” *Archives of Virology* 156 (2): 219–34.
- Khanh V. 24th August, 2022. "Vietnam suspends African swine fever vaccine after pig deaths". Último acceso octubre de 2022 www.reuters.com

- King, K., D. Chapman, J. M. Argilaguët, E. Fishbourne, E. Hutet, & R. Cariolet. 2011. "Protection of European Domestic Pigs from Virulent African Isolates of African Swine Fever Virus by Experimental Immunisation." *Vaccine* 29: 4593–4600.
- Kobayashi, N., H. Takata, S. Yokota, & M. Takiguchi. 2004. "Down-Regulation of CXCR4 Expression on Human CD8+ T Cells during Peripheral Differentiation." *European Journal of Immunology* 34 (12): 3370–78.
- Kolberg, L., U. Raudvere, I. Kuzmin, J. Vilo, & H. Peterson. 2020. "Gprofiler2 and R Package for Gene List Functional Enrichment Analysis and Namespace Conversion Toolset g:Profiler." *F1000Research* 9 (November): 709.
- Lacasta, A., M. Ballester, P. Monteagudo, J. Rodríguez, M. Salas, F. Accensi, S. Pina-Pedrero, et al. 2014. "Expression Library Immunization Can Confer Protection against Lethal Challenge with African Swine Fever Virus." *Journal of Virology* 88 (22): 13322–32.
- Lacasta, A., P. Monteagudo, A. Jiménez-Marín, F. Accensi, M. Ballester, J. M. Argilaguët, I. Galindo-Cardiel, et al. 2015. "Live Attenuated African Swine Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Viral Pathogenesis and Immune Protection." *Veterinary Research* 46 (1): 135.
- Law, C. W., Y. Chen, W. Shi, & G. K. Smyth. 2014. "Voom: Precision Weights Unlock Linear Model Analysis Tools for RNA-Seq Read Counts." *Genome Biology* 15 (2): R29.
- Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman, & R. W. Doms. 1999. "Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 Levels on Lymphocyte Subsets, Dendritic Cells, and Differentially Conditioned Monocyte-Derived Macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 5215–20.
- Leitão, A., C. Cartaxeiro, R. Coelho, B. Cruz, R. Parkhouse, F. C. Portugal, J. D. Vigário, & C. L. Martins. 2001. "The Non-Haemadsorbing African Swine Fever Virus Isolate ASFV/NH/P68 Provides a Model for Defining the Protective Anti-Virus Immune Response." *The Journal of General Virology* 82 (Pt 3): 513–23.
- Li, B., & C. N. Dewey. 2011. "RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome." *BMC Bioinformatics* 12 (1): 323.
- Lithgow, P., H. Takamatsu, D. Werling, & L. K. Dixon. 2014. "Chapman Correlation of Cell Surface Marker Expression with African Swine Fever Virus Infection Vet." *Vet. Microbiol* 168: 413–19.
- Liu, H., Z. Zhu, T. Feng, Z. Ma, Q. Xue, P. Wu, P. Li, et al. 2021. "African Swine Fever Virus E120R Protein Inhibits Interferon Beta Production by Interacting with IRF3 to Block Its Activation." *Journal of Virology* 95 (18): e0082421.

- Liu, M., S. Guo, J. M. Hibbert, V. Jain, N. Singh, N. O. Wilson, & J. K. Stiles. 2011. "CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22 (3): 121–30.
- Liu, S., Luo Y. Yajuan, L. Shihua, Z. Zhao, Y. Bi, J. Sun, R. Peng, et al. 2019. "Cryo-EM Structure of the African Swine Fever Virus." *Cell Host & Microbe* 26 (6): 836-843.e3.
- Lokhandwala, S., V. Petrovan, L. Popescu, N. Sangewar, C. Elijah, A. Stoian, M. Olcha, et al. 2019. "Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigen Cocktails Are Immunogenic but Not Protective against Intranasal Challenge with Georgia 2007/1 Isolate." *Veterinary Microbiology* 235 (August): 10–20.
- López, E. (2019) *Caracterización de la seguridad y eficacia de ba71Δcd2: una vacuna experimental contra el virus de la peste porcina africana (Tesis de doctorado, Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona)* <https://ddd.uab.cat/record/213632>
- López, E., L. Bosch-Camós, E. Ramírez-Medina, E. Vuono, M. J. Navas, M. Muñoz, F. Accensi, et al. 2021. "Deletion Mutants of the Attenuated Recombinant ASF Virus, BA71ΔCD2, Show Decreased Vaccine Efficacy." *Viruses* 13 (9): 1678.
- López, E., J. Heerden, L. Bosch-Camós, F. Accensi, M. J. Navas, P. Monteagudo, J. M. Argilagué, et al. 2020. "Live Attenuated African Swine Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Cross-Protection." *Viruses* 12 (12): 1474.
- Malogolovkin, A., G. Burmakina, E. R. Tulman, G. Delhon, D. G. Diel, N. Salnikov, G. F. Kutish, D. Kolbasov, & D. L. Rock. 2015. "African Swine Fever Virus CD2v and C-Type Lectin Gene Loci Mediate Serological Specificity." *The Journal of General Virology* 96 (4): 866–73.
- Martini, V., M. Edmans, S. Gubbins, Si. Jayaraman, B. Paudyal, S. Morgan, A. McNee, et al. 2022. "Spatial, Temporal & Molecular Dynamics of Swine Influenza Virus-Specific CD8 Tissue Resident Memory T Cells." *Mucosal Immunology* 15 (3): 428–42.
- Martins, C. L., M. J. Lawman, T. Scholl, C. A. Mebus, & J. K. Lunney. 1993. "African Swine Fever Virus Specific Porcine Cytotoxic T Cell Activity." *Archives of Virology* 129 (1–4): 211–25.
- Mateu, E., R. Husmann, R. Hansen, J. K. Lunney, D. Strom, & S. Martin. 1998. "Quantitative Detection of Porcine Interferon-Gamma in Response to Mitogen, Superantigen and Recall Viral Antigen." *Vet Immunol Immunopathol* 61: 265–77.
- Mccullough, K. C., S. Basta, S. Knötig, H. Gerber, R. Schaffner, Y. B. Kim, & A. Saalmüller. 1999. "Summerfield Intermediate Stages in Monocyte-Macrophage Differentiation Modulate Phenotype and Susceptibility to Virus Infection Immunology" 98: 203–12.

- Monteagudo, P. L., A. Lacasta, E. López, L. Bosch, J. Collado, S. Pina-Pedrero et al. 2017. “BA71ΔCD2: A New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities.” *Journal Virology* 91 (21): e01058-1075.
- Montgomery, E. R. 1921. “On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony).” *The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34 (January): 159–91.
- Montoya, M., G. Franzoni, D. Pérez-Nuñez, Y. Revilla, I. Galindo, C. Alonso, C. L. Netherton, & U. Blohm. 2021. *Understanding and Combatting African Swine Fever*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Muehlinghaus, G., L. Cigliano, S. Huehn, A. Peddinghaus, H. Leyendeckers, A. E. Hauser, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Arce, & R. A. Manz. 2005. “Regulation of CXCR3 and CXCR4 Expression during Terminal Differentiation of Memory B Cells into Plasma Cells.” *Blood* 105 (10): 3965–71.
- Neilan, J. G., L. Zsak, Z. Lu, T. G. Burrage, G. F. Kutish, & D. L. Rock. 2004. “Neutralizing Antibodies to African Swine Fever Virus Proteins P30, P54, and P72 Are Not Sufficient for Antibody-Mediated Protection.” *Virology* 319 (2): 337–42.
- Netea, M. G., L. A. Joosten, E. Latz, K. H. Mills, G. Natoli, H. G. Stunnenberg, L. A. O’Neill, & R. J. Xavier. 2016. “Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease.” *Science* 352 (6284): 1098.
- Netherton, C. L., L. C. Goatley, A. L. Reis, R. Portugal, R. H. Nash, & S. B. Morgan. 2019. “Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens.” *Frontiers Immunol* 10: 1318
- Netherton, C. L., & T. E. Wileman. 2013. “African Swine Fever Virus Organelle Rearrangements.” *Virus Research* 173 (1): 76–86.
- Nigeer T., J. Rodon, M. Ballester, M. Pérez, L. Pailler-García, J. Segalés, J. Vergara-Alert, & A. Bensaid. 2021. “Type I and III IFNs Produced by the Nasal Epithelia and Dimmed Inflammation Are Features of Alpacas Resolving MERS-CoV Infection.” *PLoS Pathogens* 17 (5): 1009229.
- Njau, E. P., J. D. Entfellner, E. M. Machuka, E. N. Bochere, S. Cleaveland, G. M. Shirima, L. J. Kusiluka, et al. 2021. “The First Genotype II African Swine Fever Virus Isolated in Africa Provides Insight into the Current Eurasian Pandemic.” *Scientific Reports* 11 (1): 13081.
- Nogal, M. L., G. González de Buitrago, C. Rodríguez, B. Cubelos, A. L. Carrascosa, M. L. Salas, & Y. Revilla. 2001. “African Swine Fever Virus IAP Homologue Inhibits Caspase Activation and Promotes Cell Survival in Mammalian Cells.” *Journal of Virology* 75 (6): 2535–43.
- Norley, S. G., & R. C. Wardley. 1984. “Cytotoxic Lymphocytes Induced by African Swine Fever Infection.” *Research in Veterinary Science* 37 (2): 255–57.

- Nunes-Correia, I., J. M. Rodríguez, A. Eulálio, A. L. Carvalho, V. Citovsky, S. Simões, C. Faro, M. L. Salas, & M. C. Pedroso de Lima. 2008. "African Swine Fever Virus P10 Protein Exhibits Nuclear Import Capacity and Accumulates in the Nucleus during Viral Infection." *Veterinary Microbiology* 130 (1–2): 47–59.
- Oliveira, V. L., S. C. P. Almeida, H. R. Soares, A. Crespo, S. Marshall-Clarke, & R. M. E. Parkhouse. 2011. "A Novel TLR3 Inhibitor Encoded by African Swine Fever Virus (ASFV)." *Archives of Virology* 156 (4): 597–609.
- Onisk, D. V., M. V. Borca, G. Kutish, E. Kramer, P. Irusta, & D. L. Rock. 1994. "Passively Transferred African Swine Fever Virus Antibodies Protect Swine against Lethal Infection." *Virology* 198 (1): 350–54.
- Oura, C., M. Denyer, H. Takamatsu, & R. Parkhouse. 2005. "In Vivo Depletion of CD8⁺ T Lymphocytes Abrogates Protective Immunity to African Swine Fever Virus." *The Journal of General Virology* 86 (Pt 9): 2445–50.
- Owlands, R. J., V. Michaud, L. Heath, G. Hutchings, C. Oura, & W. Vosloo. 2007. "African Swine Fever Virus Isolate, Georgia." *Emerg Infect Dis* 14 (12): 1870–74.
- Pan, I. C., & W. R. Hess. 1984. "Virulence in African Swine Fever: Its Measurement and Implications." *American Journal of Veterinary Research* 45 (2): 361–66.
- Penrith, A., D. Bastos, E. M. Etter, & D. Beltrán-Alcrudo. 2019. "Epidemiology of African Swine Fever in Africa Today: Sylvatic Cycle versus Socio-Economic Imperatives." *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (2): 672–86.
- Penrith, & F. M. Kivaria. 2022. "One Hundred Years of African Swine Fever in Africa: Where Have We Been, Where Are We Now, Where Are We Going?" *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): 1179–1200
- Pérez-Núñez, D., S. Y. Sunwoo, E. G. Sánchez, N. Haley, R. García-Belmonte, & M. Nogal. 2019. "Evaluation of a Viral DNA-Protein Immunization Strategy against African Swine Fever in Domestic Pigs." *Vet Immunol Immunopathol* 208: 34–43.
- Petersen, B., R. Kammerer, A. Frenzel, P. Hassel, T. H. Dau, R. Becker, A. Breithaupt, R. G. Ulrich, A. Lucas-Hahn, & G. Meyers. 2021. "Generation and First Characterization of TRDC-Knockout Pigs Lacking $\Gamma\delta$ T Cells." *Scientific Reports* 11 (1): 14965.
- Phillips, R. J., M. Lutz, & B. Premack. 2005. "Differential Signaling Mechanisms Regulate Expression of CC Chemokine Receptor-2 during Monocyte Maturation." *Journal of Inflammation* 2 (1): 14.
- Pikalo, J., L. Zani, J. Hühr, M. Beer, & S. Blome. 2019. "Pathogenesis of African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar - Lessons Learned from Recent Animal Trials." *Virus Research* 271 (271): 197614.
- Pipkin, M. E., A. Rao, & M. G. Lichtenheld. 2010. "The Transcriptional Control of the Perforin Locus." *Immunological Reviews* 235 (1): 55–72.

- Plowright, W., J. Parker, & R. F. Staple. 1968. "The Growth of a Virulent Strain of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs." *The Journal of Hygiene* 66 (1): 117–34.
- Popescu, L., N. N. Gaudreault, K. M. Whitworth, M. V. Murgia, J. C. Nietfeld, A. Mileham, M. Samuel, K. D. Wells, R. S. Prather, & R. R. Rowland. 2017. "Genetically Edited Pigs Lacking CD163 Show No Resistance Following Infection with the African Swine Fever Virus Isolate, Georgia 2007/1." *Virology* 501: 102–106.
- Powell, P. P., L. K. Dixon, & R. M. Parkhouse. 1996. "An IkappaB Homolog Encoded by African Swine Fever Virus Provides a Novel Mechanism for Downregulation of Proinflammatory Cytokine Responses in Host Macrophages." *Journal of Virology* 70 (12): 8527–33.
- Radulovic, E., K. Mehinagic, T. Wüthrich, M. Hilty, H. Posthaus, A. Summerfield, N. Ruggli, & C. Benarafa. 2022. "The Baseline Immunological and Hygienic Status of Pigs Impact Disease Severity of African Swine Fever." *PLoS Pathogens* 18 (8): 1010522.
- Ran, Y., D. Li, M. Xiong, H. Liu, T. Feng, Z. Shi, Yu-Hui Li, et al. 2022. "African Swine Fever Virus I267L Acts as an Important Virulence Factor by Inhibiting RNA Polymerase III-RIG-I-Mediated Innate Immunity." *PLoS Pathogens* 18 (1): 1010270.
- Razzuoli, E., G. Franzoni, T. Carta, S. Zinellu, M. Amadori, P. Modesto, & A. Oggiano. 2020. "Modulation of Type I Interferon System by African Swine Fever Virus." *Pathogens* 9 (5): 361.
- Reed, L. J., & H. Muench. 1938. "A Simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoints." *American Journal of Epidemiology* 27 (3): 493–97.
- Reis, A. L., C. Netherton, & L. K. Dixon. 2017. "Unraveling the Armor of a Killer: Evasion of Host Defenses by African Swine Fever Virus." *Journal of Virology* 91 (6): e02338-16.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi, & G. K. Smyth. 2015. "Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies." *Nucleic Acids Research* 43 (7): 47.
- Rodríguez, J. M., R. J. Yáñez, F. Almazán, E. Viñuela, & J. F. Rodríguez. 1993. "African Swine Fever Virus Encodes a CD2 Homolog Responsible for the Adhesion of Erythrocytes to Infected Cells." *Journal of Virology* 67 (9): 5312–20.
- Rodríguez, J. M., & M. L. Salas. 2013. "African Swine Fever Virus Transcription." *Virus Research* 173 (1): 15–28.
- Royo, G., R. García-Beato, E. Viñuela, M. L. Salas, & J. Salas. 1999. "Replication of African Swine Fever Virus DNA in Infected Cells." *Virology* 257 (2): 524–36.
- Roy, S., R. Guler, S. P. Parihar, S. Schmeier, B. Kaczkowski, H. Nishimura, J. W. Shin, et al. 2015. "Batf2/Irf1 Induces Inflammatory Responses in Classically Activated Macrophages, Lipopolysaccharides, and

- Mycobacterial Infection.” *The Journal of Immunology* 194 (12): 6035–44.
- Ruíz Gonzalvo, F., M. E. Carnero, C. Caballero, & J. Martínez. 1986. “Inhibition of African Swine Fever Infection in the Presence of Immune Sera in Vivo and in Vitro.” *American Journal of Veterinary Research* 47 (6): 1249–52.
- Ruíz-Gonzalvo, F., & J. M. Coll. 1993. “Characterization of a Soluble Hemagglutinin Induced in African Swine Fever Virus-Infected Cells.” *Virology* 196 (2): 769–77.
- Ruíz-Gonzalvo, F., F. Rodríguez, & J. M. Escribano. 1996. “Functional and Immunological Properties of the Baculovirus-Expressed Hemagglutinin of African Swine Fever Virus.” *Virology* 218 (1): 285–89.
- Salas, M. L., & G. Andrés. 2013. “African Swine Fever Virus Morphogenesis.” *Virus Research* 173 (1): 29–41.
- Salguero, F. J. 2020. “Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine.” *Frontiers in Veterinary Science* 7 (19): 282.
- Sánchez-Botija, C. 1963. “Modificaciones Del Virus de La PPA En Cultivos Celulares. Patogenicidad y Propiedades Protectivas de Las Cepas Atenuadas.” *Review of Animal Pathology and Biology* 7: 5–23.
- Sánchez-Cordón, P. J., T. Jabbar, D. Chapman, L. K. Dixon, & M. Montoya. 2020. “Absence of Long-Term Protection in Domestic Pigs Immunized with Attenuated African Swine Fever Virus Isolate OURT88/3 or BeninΔMGF Correlates with Increased Levels of Regulatory T Cells and Interleukin-10.” *J Virol* 94: 350–370.
- Sánchez-Cordón, P. J., B. Vidaña, A. Neimanis, A. Núñez, E. Wikström, and D. Gavier-Widén. 2021. *Understanding and Combatting African Swine Fever*. Wageningen Academic Publishers.
- Sánchez-Torres, C., P. Gómez-Puertas, M. Gómez-del-Moral, F. Alonso, J. M. Escribano, A. Ezquerro, & J. Domínguez. 2003. “Expression of Porcine CD163 on Monocytes/Macrophages Correlates with Permissiveness to African Swine Fever Infection.” *Archives of Virology* 148 (12): 2307–23.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., L. Mur, J. C. Gomez-Villamandos, & L. Carrasco. 2015. “An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever.” *Journal of Comparative Pathology* 152 (1): 9–21.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., E. Tabares, E. Salvador, & A. Ordas. 1982. “Semipurified Structural Viral Protein for the Detection of ASF Antibodies by the Indirect ELISA.” *Curr Top Vet Med Anim Sci* 22: 214–22.
- Schenkel, J. M., K. A. Fraser, L. K. Beura, K. E. Pauken, V. Vezys, & D. Masopust. 2014. “T Cell Memory. Resident Memory CD8 T Cells Trigger Protective Innate and Adaptive Immune Responses.” *Science* 346 (6205): 98–101.

- Schenkel, J. M., K. A. Fraser, V. Vezys, & D. Masopust. 2013. "Sensing and Alarm Function of Resident Memory CD8⁺ T Cells." *Nature Immunology* 14 (5): 509–13.
- Schlafer, D. H., J. W. McVicar, & C. A. Mebus. 1984. "African Swine Fever Convalescent Sows: Subsequent Pregnancy and the Effect of Colostral Antibody on Challenge Inoculation of Their Pigs." *American Journal of Veterinary Research* 45 (7): 1361–66.
- Schoppmeyer, Rouven, Renping Zhao, He Cheng, Mohamed Hamed, Chen Liu, Xiao Zhou, Eva C. Schwarz, et al. 2017. "Human Profilin 1 Is a Negative Regulator of CTL Mediated Cell-Killing and Migration." *European Journal of Immunology* 47 (9): 1562–72.
- Sereda, A. D., A. S. Kazakova, V. V. Dmitrenko, & D. V. Kolbasov. 2022. "Search for Additional Tests for Immunobiological Evaluation of the Candidate Vaccines against African Swine Fever." *PloS One* 17 (5): e0265819.
- Simón-Mateo, C., G. Andrés, F. Almazán, & E. Viñuela. 1997. "Proteolytic Processing in African Swine Fever Virus: Evidence for a New Structural Polyprotein, Pp62." *Journal Virol* 71: 5799–5804.
- Simón-Mateo, C., G. Andrés, & E. Viñuela. 1993. "Polyprotein Processing in African Swine Fever Virus: A Novel Gene Expression Strategy for a DNA Virus." *EMBO J* 12: 2977–87.
- Slauson, D. O., & J. M. Sánchez-Vizcaino. 1981. "Leukocyte-Dependent Platelet Vasoactiveamine Release and Immune Complex Deposition in African Swine Fever." *Vet Pathol* 18 (6): 813–26.
- Soudja, S. M., C. Chandrabos, E. Yakob, M. Veenstra, D. Palliser, & G. Lauvau. 2014. "Memory-T-Cell-Derived Interferon- γ Instructs Potent Innate Cell Activation for Protective Immunity." *Immunity* 40 (6): 974–88.
- Steyn, D. G. 1932. "East African Virus Disease in Pigs. 18th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry, Onderstepoort, Pretoria/Union of South Africa, Department of Agriculture." *Department of Agriculture. Department of Agriculture*, 99–109.
- Stone, S. S., & W. R. Hess. 1967. "Antibody Response to Inactivated Preparations of African Swine Fever Virus in Pigs." *Am J Vet Res* 28 (123): 475–81.
- Suárez, C., G. Andrés, A. Kolovou, S. Hoppe, M. Salas, P. Walther, & Jacomine Krijnse L. 2015. "African Swine Fever Virus Assembles a Single Membrane Derived from Rupture of the Endoplasmic Reticulum." *Cellular Microbiology* 17 (11): 1683–98.
- Sun, E., L. Huang, X. Zhang, J. Zhang, D. Shen, Z. Zhang, Z. Wang, et al. 2021a. "Genotype I African Swine Fever Viruses Emerged in Domestic Pigs in China and Caused Chronic Infection." *Emerging Microbes & Infections* 10 (1): 2183–93.
- Sun, E., Z. Zhang, Z. Wang, X. He, X. Zhang, L. Wang, W. Wang, et al. 2021b. "Emergence and Prevalence of Naturally Occurring Lower Virulent

- African Swine Fever Viruses in Domestic Pigs in China in 2020.” *Science China. Life Sciences* 64 (5): 752–65.
- Takamatsu, H., M. Denyer, A. Lacasta, C. Stirling, J. Argilaguët, C. Netherton, C. Oura, C. Martins, & F. Rodríguez. 2013. “Cellular Immunity in ASFV Responses.” *Virus Research* 173 (1): 110–21.
- Takamatsu, H., M. S. Denyer, C. Stirling, S. Cox, N. Aggarwal, P. Dash, T. E. Wileman, & P. V. Barnett. 2006. “Porcine Gamma delta T Cells: Possible Roles on the Innate and Adaptive Immune Responses Following Virus Infection.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112 (1–2): 49–61.
- Tran, X., Thi Thu P. Le, Q. Nguyen, Ty Do, V. Nguyen, C. G. Gay, M. V. Borca, & D. Gladue. 2021. “African Swine Fever Virus Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L Efficiently Protects European and Native Pig Breeds against Circulating Vietnamese Field Strain.” *Transboundary and Emerging Diseases*, September, e497–504.
- Trautwein, G. 1988. “Pathology and Pathogenesis of the Disease.” In *Developments in Veterinary Virology*, 27–54.
- Valdeira, M. L., & A. Geraldès. 1985. “Morphological Study on the Entry of African Swine Fever Virus into Cells.” *Biology of the Cell* 55 (1–2): 35–40.
- Vincent, A. L., W. Ma, K. M. Lager, B. H. Janke, R. J. Webby, A. García-Sastre, & J. A. Richt. 2007. “Efficacy of Intranasal Administration of a Truncated NS1 Modified Live Influenza Virus Vaccine in Swine.” *Vaccine* 25 (47): 7999–8009.
- Wang, X., J. Wu, Y. Wu, H. Chen, S. Zhang, J. Li, T. Xin, et al. 2018. “Inhibition of CGAS-STING-TBK1 Signaling Pathway by DP96R of ASFV China 2018/1.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 506 (3): 437–43.
- Wardley, R. C., & P. J. Wilkinson. 1980. “Lymphocyte Responses to African Swine Fever Virus Infection.” *Research in Veterinary Science* 28 (2): 185–89.
- WOAH, 2021 “*World Organisation for Animal Health*”, Último acceso octubre de 2022, <www.woah.org>
- Wu, L., B. Yang, X. Yuan, J. Hong, M. Peng, J. Chen, & Z. Song. 2021. “Regulation and Evasion of Host Immune Response by African Swine Fever Virus.” *Frontiers in Microbiology* 12
- Yáñez, R. J., J. M. Rodríguez, M. L. Nogal, L. Yuste, C. Enríquez, J. F. Rodríguez, & E. Viñuela. 1995. “Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus.” *Virology* 208 (1): 249–78.
- Yao, Y., M. Jeyanathan, S. Haddadi, N. G. Barra, M. Vaseghi-Shanjani, D. Damjanovic, R. Lai, et al. 2018. “Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity.” *Cell* 175 (6): 1634-1650.e17.

- Zhang, J, F. Rodríguez, M. J. Navas, M. Costa-Hurtado, V. Almagro, L. Bosch-Camós, E. López, et al. 2020. "Fecal Microbiota Transplantation from Warthog to Pig Confirms the Influence of the Gut Microbiota on African Swine Fever Susceptibility." *Scientific Reports* 10 (1): 17605.
- Zhang, R., Y. Huang, C. Bao, Y. Jung, J. Xu, Y. Qian, & J. Dai. 2019. "Epidemiology of African Swine Fever and Analysis of Risk Factors of Its Spread in China: An Overview." *Chinese Journal of Virology* 35 (03): 512–22.
- Zhenzhong, W., Q. Chuanxiang, G. Shengqiang, L. Jinming, H. Yongxin, Z. Xiaoyue, L. Yan, et al. 2022. "Genetic Variation and Evolution of Attenuated African Swine Fever Virus Strain Isolated in the Field: A Review." *Virus Research* 319 (198874): 198874.
- Zsak, L., Z. Lu, T. G. Burrage, J. G. Neilan, G. F. Kutish, D. M. Moore, & D. L. Rock. 2001. "African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Are Novel Macrophage Host Range Determinants." *Journal of Virology* 75 (7): 3066–76.
- Zsak, L., Z. Lu, G. F. Kutish, J. G. Neilan, & D. L. Rock. 1996. "An African Swine Fever Virus Virulence-Associated Gene NL-S with Similarity to the Herpes Simplex Virus ICP34.5 Gene." *J Virol* 70 (12): 8865–71.
- Zuckermann, F. A., & R. J. Husmann. 1996. "Functional and Phenotypic Analysis of Porcine Peripheral Blood CD4/CD8 Double-Positive T Cells." *Immunology* 87 (3): 500–512.

APÉNDICES

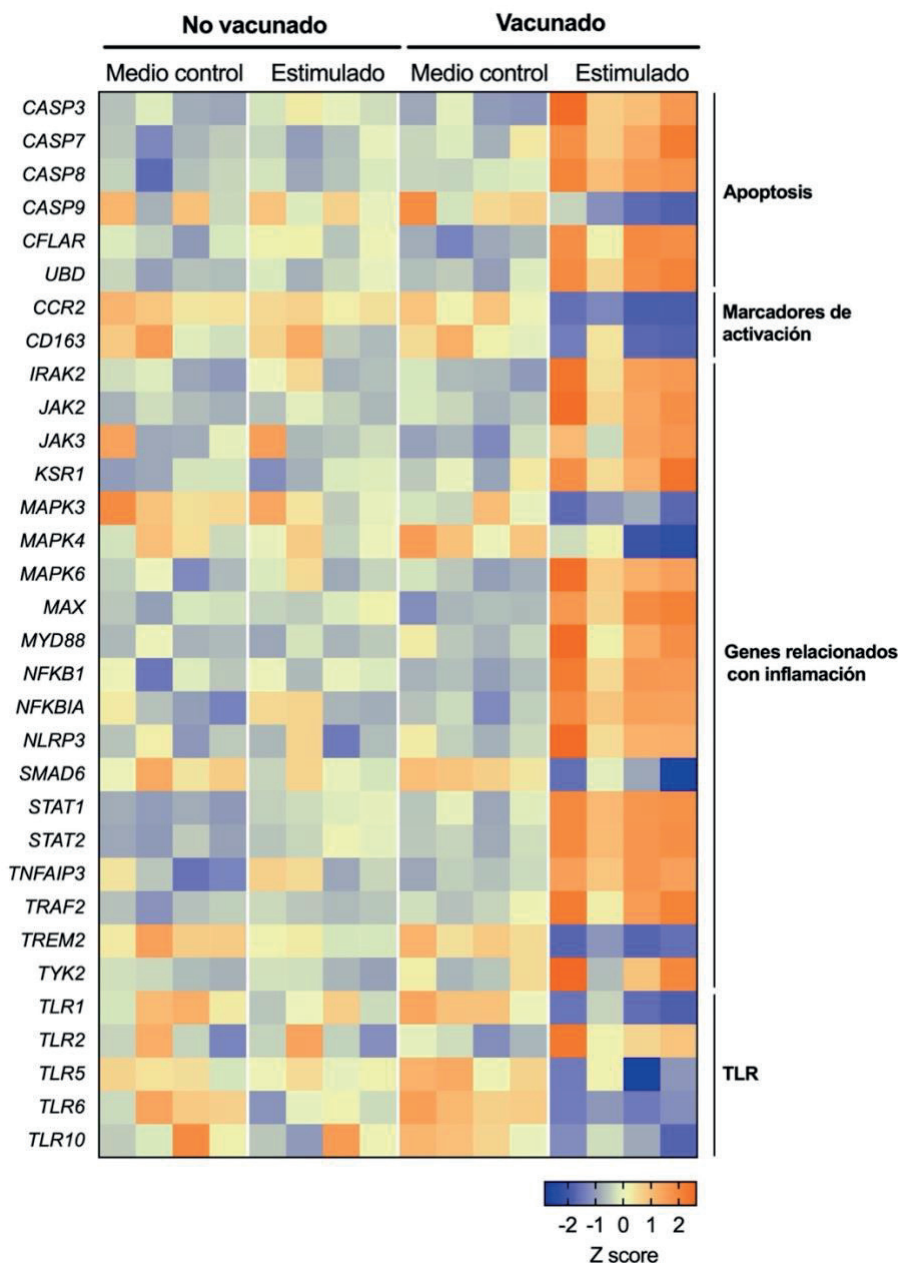


Figura S1. El Análisis de los genes DEs tras la estimulación *in vitro* de PBMC de animales vacunados. muestra una respuesta de tipo Th1 junto con una respuesta inflamatoria. *Heatmap* donde se muestran los niveles de expresión normalizados para los genes DE derivados del RNA-seq medidos como log2CPM (cuentas por millón, representados en formato logarítmico en base dos) (extensión de la Figura 16).

Tabla S1. Materiales clave

Anticuerpos	Fuente	Identificador
Peroxidase-conjugated rabbit anti-Pig IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich	Cat: A5670
Purified mouse anti-pig IFN γ (Clone P2G10)	BD Biosciences	Cat: 559961
Biotin-labelled mouse anti-pig IFN γ (Clone 559958)	BD Biosciences	Cat: 559958
PE-conjugated mouse anti-pig IFN γ (Clone P2G10)	BD Biosciences	Cat: 559812
Pacific Blue-conjugated mouse anti-human TNF α (Clone MAb11)	BioLegend	Cat: 502920
FITC-conjugated anti-pig CD8 α (Clone 76-2-11)	BD Biosciences	Cat: 551303
PerCP-Cy5.5-conjugated mouse anti-pig CD4 α (Clone 74-12-4)	BD Biosciences	Cat: 561474
PE-Cy7-conjugated mouse anti-pig CD3 ϵ (Clone BB23-8E6-8C8)	BD Biosciences	Cat: 561477
APC-conjugated rat anti-pig $\gamma\delta$ TCR (Clone MAC320)	BD Biosciences	Cat: 561482
eFluor450-conjugated mouse anti-human/pig perforin (Clone dG9)	eBioscience	Cat: 48-9994-42
Mouse anti-CD172a (IgG1, Clone BA1C11)	Hybridoma	Provided by J. Domínguez
Mouse anti-SLAII/DR (IgG2b, Clone 1F12)	Hybridoma	Provided by J. Domínguez
Mouse anti-CD163 (IgG1, Clone:2H12/BM)	Hybridoma	Provided by J. Domínguez
APC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG1	Jackson ImmunoResearch	Cat: 115-135-205
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG2a	Jackson ImmunoResearch	Cat: 115-165-207
FITC-conjugated mouse anti-pig CD14 (Clone MIL2)	Bio-Rad	Cat#MCA1218GA
PE-conjugated mouse anti-CD79a (Clone HM47)	eBioscience	Cat#12-0792-42
Reactivos y kits	Fuente	Identificador
LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	Cat: L34955
LIVE/DEAD™ Fixable Red Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	Cat: L34972
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich	Cat: T0440
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), Insoluble	Sigma-Aldrich	Cat: 613548
Cytokine & Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex™ Panel 1	Invitrogen	Cat: EPX090-60829-901
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	Cat: P8139
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Cat: I9657
Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug	BD Biosciences	Cat: 555028
Phytohemagglutinin-M (PHA-M)	Sigma-Aldrich	Cat: 11 082 132 001
TRIZOL™ Reagent	Invitrogen	Cat:15596026

RNeasy Mini Kit	Qiagen	Ref: 74106
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Cat: 79254
Chloroform	Sigma-Aldrich	Cat: 372978
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	Cat: 5067-1511
Prime Script RT reagent Kit	Takara	Cat: RR036A
Tween 20	Sigma-Aldrich	Cat: P9416
Hydrogen peroxide solution	Sigma-Aldrich	Cat: H1009
Protein A, HRP conjugate	Millipore	Cat: 18-160
Acetate Buffer	Sigma-Aldrich	Cat: S7899
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich	Cat: 227056
Reactivos y kits	Fuente	Identificador
Methanol	Merck	Cat: 1.06018.2500
RPMI-1640 medium	Corning	Cat:10-040-CV
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Lonza	Cat: BE12-614F
Phosphate-buffered saline (PBS)	Lonza	Cat: BE17-516F
L-glutamine	Gibco	Cat: 25030081
Fetal Calf Serum	Corning	Cat: 5535-016-CV
Penicillin-Streptomycin	Gibco	Cat:15140122
Gentamicin	Sigma-Aldrich	Cat:1397
Nystatin	Sigma-Aldrich	Cat: N9150
β -mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Cat: M3148
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich	Cat: 10771
Recombinant DNase I, RNase-free	Roche	Cat: 4716728001
Collagenase type IV	Gibco	Cat: 17104019
Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v3.1	10x Genomics	Cat: 1000121
Single Index Kit T Set A	10x Genomics	Cat: 1000213
MAD Nasal™ Intranasal Mucosal Atomization Device	Teleflex	Cat: MAD110

Tabla S2. Secuencias y características de los cebadores utilizados en el ensayo de microfluidic qPCR.

Categoría genética	Gen	Número de acceso	Cebador directo	Cebador reverso	Eficiencia (%)	R2
Genes estimulados por interferón	IFI44	NM_001246205	GGAGTTGATTAAGTGTGGCATGG	AGCTTGAGTTTCACAGGCACA	105	0,995
	IFIT1	NM_001244363.1	TGACTCACAGCAACCATGAGTAATA	CAATCTCCTCCAAGACCTGT	105	0,991
	IRF7	NM_001097428	GGCACCTTCTTCCAAGAGTTGAT	GAAGCCCAGGTAGATGGTGTAG	104	0,994
	MX1	NM_214061.2	AGACAGGACCATCGGGATCTT	TTCTCGCCACGTCCACTATC	108	0,992
	MX2	NM_001097416.1	GGGAAATACGCAAAGCCCAGGAT	TCGATGAGGGTCAGGTCTGGAA	109	0,993
	OAS2	XM_021072182	TGCCTTTAAACGCACTAGGTGA	GCTGGGAGCGCAAAAATCG	101	0,995
	RSAD2	NM_213817.1	GCCAAGACATCCTTCGTGCT	ATCTTCTCATACCCGCTTCC	109	0,989
	ZBP1	NM_001123216	GGGGTTTACCAGCCAGAAGATT	GCAGTTGTTCACTCCCTCTG	107	0,993
Citoquinas	CSF1	XM_021088653.1	CTAAATGCTCCAGCCAGGATGT	CCAGGTCAAGCCAACCACAG	105	0,913
	IFNG	NM_213948.1	GAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTG	TCAGTTTCCCAGAGCTACCA	101	0,993
	IL15	XM_013978870.2	GCTCATCCCAATTGCAAAGTA	TGGACTCTTGCAAAATGACG	110	0,988
	IL2	XM_021100436.1	TTTTACATGCCAAGCAGGCTA	AATTTAGCACTCCCTCCAGAGC	103	0,995
	IL27	XM_021085893.1	TCTGAGGCTGAATCACACCTGC	GAGTCGTTCTGGGTGAGAGAGG	99	0,991
	LTA	NM_214453.1	GCTCACCTCGTTGGAGACC	AGCAGGGAGTTGTTGCTCAG	106	0,980
	TNF	NM_214022.1	ACTGCACTTCGAGGTTATCGG	TGAGACGATGATCTGAGTCCT	105	0,993
	XCL1	NM_001134345.1	GCATACACTGTGGAAGCTGTG	GAGCCCTCCTTGATGGTGTA	103	0,986
Quemoquinas y receptores	CCL2	NM_214214.1	ACCAGCAGCAAGTGTCTCTAAA	GTCCAGGTGGCTTATGGAGT	114	0,990
	CCL3L1	NM_001009579.1	GGTCTTCTCTGCACCACTTGGC	CGGCTACGAATTTGCGAGGA	111	0,988
	CCL4	NM_213779	TCCTCGCAACTTCGTGACTG	CCTTTTGGTCTGGAATACCACG G	112	0,988
	CCL8	NM_001164515.1	CTTGCTCAGCCAGATTCAAGT	ACACTGGCTGTTGGTGATT	116	0,993
	CXCL10	NM_001008691.1	TGCAGCACCATGAACCAAAG	CTGGAGAGAGGTTATCTTGGT	123	0,988
	CXCL9	NM_001114289.2	TGATTGGAGTTCAAGGAACCTT	TCTCACAAGAAGGGCTTGGG	102	0,988
Factores de transcripción y correguladores	BCL3	NM_001315716.1	ATCGACATCCTGAGGGGGAA	GATGCCGACAGAAGACCGTT	111	0,969
	CEBPB	NM_001199889.1	CTGGAGACGCAGCATAAGGT	TGCTTGAACAAGTTCCGCAG	93	0,996
	KLF5	NM_001097489.1	GGAGAAACGACGCATCCACTA	TTGTAGGGCTTCTCGCCAGTAT	98	0,981
	NFKB2	XM_021072741.1	GAACAGCCTAAGCAGCGAGG	GCCCTTCTCACTAGAGGCAC	79	0,996
Genes relacionados con inflamación	IRAK2	XM_021069319.1	AGAAGTTCGAGAGATGTTGG	AGCCCAGCAGAGTAAGATG	107	0,993
	TNFAIP3	XM_005659182.3	ATCCGACCCCTACCGTGAC	GGTGCTCTACAAGGCCTCTC	110	0,994
	UBD	NM_001160088	CTGCTGGCGTCTGTGTGATG	GGGCTTTAGGGTCTTCGAGC	104	0,990
Marcadores de activación	CD274	XM_021083736.1	TGTTGGTCATCCAGAACCAT	GGCTGCACATTTTTCCACAT	106	0,994
	CD38	NM_001243883.1	AACCGGAGCTGGGAGATAGAG	ACTGCAGGGTCTTAGAGAT	111	0,983
	CD40	NM_214194.1	CCCAGAACCACCACTTCAT	TTACCAGTTTCTGTCTGGC	106	0,994
	CD69	NM_214091.2	GTGGGGAGAGCTGAACACTG	GGATCTGTGAAGTTTGAACAGT TG	107	0,993
	GBP2	NM_001128474.1	GTTGCCTGCTGGGTTTGATTT	TCTCCCTGGCAGTTTAGGCT	105	0,994

	ICAM1	NM_213816.1	GCTCCAACTTATGTCCTGCC	TTCACAGAAACGGGTGTGCC	97	0,982	
	VCAM1	NM_213891.1	ACGCTTGACGTGAAAGGAAGA	ATAATCACCCCGATGGCAGG	107	0,992	
	CCR2	NM_001001619.1	AAGAAGCAACAGACCGGGCA	CTTCGATTGTCCCACGCTG	110	0,993	
Genes referencia	de	YWHAZ	XM_005662949.2	ATTGGGCTGGCCCTAACT	GCGTGCTGTCTTTGTACTC	112	0,993
		RPL4	XM_005659862.3	AGGAGGCTGTTCTGCTTCTG	TCCAGGGATGTTTCTGAAGG	107	0,996
		GAPDH	AF017079	GTGCATTGCCAGCCGCGT	ACTGGAACATGTAGACCATGTAG T	101	0,996

Tabla S3. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo de *microfluidic quantitative PCR*.

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
BCL3	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.076	0.228	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.002	0.006	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.002	0.005	**
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.296	0.888	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000347	0.001	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.000311	0.000933	***
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00000005	0.000000749	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0000785	0.00118	**
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.393	1	ns
CCL2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.001	0.004	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000126	0.000378	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.009	0.027	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.022	0.065	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000142	0.000426	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.008	0.025	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0154	0.232	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0772	1	ns
No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.974	1	ns	
CCL3L1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.366	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.011	0.034	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000828	0.002	**
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.349	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000114	0.0000342	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.000026	0.000078	****
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	1.18E-10	1.78E-09	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	6.43E-09	9.65E-08	****
No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.828	1	ns	
CCL4	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.022	0.066	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.002	0.007	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.009	0.027	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.093	0.28	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.01	0.03	*
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.003	0.01	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0000155	0.000233	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0000182	0.000273	***
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.868	1	ns
CCL8	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.145	0.435	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.001	0.003	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.004	0.013	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.019	0.057	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000429	0.000129	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.004	0.012	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0000293	0.000439	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00925	0.139	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.97	1	ns
CCR2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.138	0.414	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.06	0.181	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.264	0.792	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.902	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000556	0.000167	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000399	0.00012	***
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00767	0.115	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0000171	0.000256	***
No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.0353	0.53	ns	
CD274	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.282	0.846	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.011	0.033	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.088	0.263	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.011	0.033	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000265	0.0000795	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.00000864	0.0000259	****
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00000826	0.000124	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.000026	0.000389	***
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.907	1	ns
CD38	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.116	0.348	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.514	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.178	0.534	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.252	0.756	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.004	0.012	*
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.159	0.477	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0272	0.408	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.836	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.996	1	ns
CD40	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.243	0.729	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.001	0.004	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.162	0.486	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.093	0.28	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000808	0.000242	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.00025	0.00075	***
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00000155	0.0000233	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00000836	0.000125	***
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.599	1	ns
CD69	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.942	1	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.002	0.006	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.024	0.071	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.432	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	6.92E-08	0.000000208	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.000301	0.000903	***
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0000294	0.000441	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.000000934	0.000014	****
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.919	1	ns
CEBPB	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.036	0.108	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.012	0.035	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.005	0.016	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.103	0.309	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000526	0.002	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.002	0.005	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0619	0.928	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.933	1	ns
CSF1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.385	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.003	0.008	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.005	0.016	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.198	0.594	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.03	0.089	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.055	0.164	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0163	0.245	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.06	0.9	ns
CXCL10	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.159	0.477	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.009	0.026	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.11	0.33	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.102	0.306	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.002	0.005	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.008	0.025	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00118	0.0177	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0862	1	ns
CXCL9	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.112	0.336	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.403	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.421	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.039	0.118	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.004	0.011	*
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.026	0.078	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0000233	0.00035	***

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00762	0.114	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.995	1	ns
GBP2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.679	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.0000466	0.00014	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.017	0.05	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.295	0.885	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000828	0.000248	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.004	0.011	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.000544	0.00817	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00433	0.065	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.82	1	ns
	ICAM1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.411	1
No_vacunado_BA71ΔCD2		No_vacunado_RPMI	6	6	0.923	1	ns
No_vacunado_Georgia2007/1		No_vacunado_RPMI	6	6	0.622	1	ns
Vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.471	1	ns
Vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_RPMI	8	8	0.031	0.093	ns
Vacunado_Georgia2007/1		Vacunado_RPMI	8	8	0.05	0.149	ns
No_vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0139	0.209	ns
No_vacunado_Georgia2007/1		Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00735	0.11	ns
No_vacunado_RPMI		Vacunado_RPMI	6	8	0.702	1	ns
IFI44	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.226	0.678	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000014	0.000042	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.002	0.007	**
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.065	0.196	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000851	0.0000255	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.007	0.022	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0334	0.5	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.294	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.581	1	ns
IFIT1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.263	0.789	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.0000144	0.0000432	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.008	0.023	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.088	0.265	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000312	0.0000936	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.005	0.014	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0986	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.505	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.685	1	ns
IFNG	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.726	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.523	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.782	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.868	1	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.025	0.075	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.136	0.408	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0303	0.455	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0411	0.616	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.992	1	ns
IL15	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.731	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.036	0.109	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.16	0.48	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.59	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000977	0.000293	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.005	0.014	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.000115	0.00172	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.000256	0.00384	**
No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.837	1	ns	
IL2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.515	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.336	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.135	0.405	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.991	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.034	0.103	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.132	0.396	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0509	0.764	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0514	0.771	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.953	1	ns
IL27	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.403	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.003	0.01	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.026	0.077	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.015	0.045	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000671	0.002	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.001	0.004	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.0000249	0.000374	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00798	0.12	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.998	1	ns
IRAK2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.109	0.327	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.136	0.408	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.408	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.035	0.106	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.037	0.111	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.442	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00111	0.0166	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0937	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.449	1	ns
IRF7	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.033	0.098	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000253	0.000759	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.024	0.071	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.059	0.178	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.002	0.007	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.014	0.043	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.325	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.857	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.532	1	ns
KLF5	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.284	0.852	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.239	0.717	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.022	0.067	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.097	0.291	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.001	0.004	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.005	0.014	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00000719	0.000108	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00375	0.0562	ns
LTA	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.483	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.197	0.591	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.136	0.408	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.428	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000424	0.001	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.009	0.027	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.000577	0.00865	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.0000476	0.000714	***
MX1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.216	0.648	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.0000245	0.0000735	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.005	0.014	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.156	0.468	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000364	0.001	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.006	0.019	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.202	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.693	1	ns
MX2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.117	0.351	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000344	0.000103	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.011	0.032	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.19	0.57	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000339	0.001	**
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.017	0.052	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.41	1	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.873	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.631	1	ns
NFKB2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.036	0.107	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.275	0.825	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.533	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.587	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000105	0.000315	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.000271	0.000813	***
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.000343	0.00515	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00699	0.105	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.879	1	ns
	OAS2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.132	0.396
No_vacunado_BA71ΔCD2		No_vacunado_RPMI	6	6	0.000245	0.000735	***
No_vacunado_Georgia2007/1		No_vacunado_RPMI	6	6	0.007	0.02	*
Vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.062	0.186	ns
Vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_RPMI	8	8	0.000916	0.003	**
Vacunado_Georgia2007/1		Vacunado_RPMI	8	8	0.034	0.103	ns
No_vacunado_BA71ΔCD2		Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.452	1	ns
No_vacunado_Georgia2007/1		Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.696	1	ns
No_vacunado_RPMI		Vacunado_RPMI	6	8	0.541	1	ns
RSAD2	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.026	0.078	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.0000464	0.000139	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.012	0.037	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.13	0.39	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.000183	0.000549	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.02	0.06	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.566	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.251	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.866	1	ns
TNF	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.824	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.623	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.478	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.66	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000107	0.0000321	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.000874	0.003	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	2.45E-09	3.67E-08	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	1.42E-08	0.00000213	****
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.575	1	ns
TNFAIP3	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.838	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.057	0.171	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.249	0.747	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.863	1	ns

Gen	Grupo1	Grupo2	n1	n2	p	p.adj	p.adj.signif
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.882	1	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.688	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.783	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.946	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.635	1	ns
UBD	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.44	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.000932	0.003	**
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.039	0.116	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.794	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.00000606	0.0000182	****
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.001	0.004	**
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00000166	0.0000248	****
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00000156	0.0000233	****
No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.92	1	ns	
VCAM1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.676	1	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.369	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.374	1	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.006	0.017	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.017	0.051	ns
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.254	0.762	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.00158	0.0236	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.147	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.809	1	ns
XCL1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.196	0.588	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.041	0.123	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.121	0.363	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.167	0.501	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.004	0.013	*
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.016	0.048	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.000775	0.0116	*
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.00327	0.0491	*
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.913	1	ns
ZBP1	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_Georgia2007/1	6	6	0.333	0.999	ns
	No_vacunado_BA71ΔCD2	No_vacunado_RPMI	6	6	0.0000742	0.000223	***
	No_vacunado_Georgia2007/1	No_vacunado_RPMI	6	6	0.004	0.013	*
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_Georgia2007/1	8	8	0.097	0.292	ns
	Vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_RPMI	8	8	0.0000857	0.000257	***
	Vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_RPMI	8	8	0.008	0.023	*
	No_vacunado_BA71ΔCD2	Vacunado_BA71ΔCD2	6	8	0.997	1	ns
	No_vacunado_Georgia2007/1	Vacunado_Georgia2007/1	6	8	0.785	1	ns
	No_vacunado_RPMI	Vacunado_RPMI	6	8	0.637	1	ns

Tabla S4. Los animales vacunados intranasalmente con BA71ΔCD2 no muestran ADN viral ni en suero ni en sangre. La tabla muestra los datos de CGE/ml medidos mediante qPCR del gen de la VPPA PK. Muestras obtenidas a día 0, 14 y 21 post-vacunación de animales vacunados con 10^6 UFP de BA71ΔCD2. Indet: Indetectable.

	0 dpv		14 dpv		21 dpv (0 dpd)	
	Suero	Sangre entera	Suero	Sangre entera	Suero	Sangre entera
BA71ΔCD2 10^6 UFP	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet
	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet
	Indet	Indet	Indet	Indet	2,38E+02	2,37E+02
	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet
	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet
	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet	Indet

Tabla S5. Las células de los LN submandibulares de los animales vacunados intranasalmente con 10^6 UFP de BA71DCD2 no muestran ADN detectable a 21 post-vacunación

Las células fueron estimuladas con BA71DCD2 (positive control) o con medio control previamente a la extracción del ADN y la detección mediante qPCR del VPPA. Resultados muestran las CGE/ml. Las muestras marcadas con asterisco se utilizaron para los análisis de *scRNA-seq*. Indet: Indetectable.

Grupo	CGE/ 10^6 células	
	Medio control	Estimulado
Control	Indet	2,15E+05
	Indet	1,48E+05
	* Indet	1,22E+05
	Indet	1,80E+05
	Indet	3,31E+05
	Indet	2,73E+05
BA71DCD2 10^6 UFP	6,69E+01	9,08E+04
	* Indet	1,10E+05
	3,05E+02	2,24E+05
	Indet	4,07E+05
	Indet	2,49E+05
	Indet	2,95E+05
Indet	1,79E+05	

Tabla S6. Análisis estadístico de los resultados de test exacto de Fisher comparando las proporciones de grupos celulares entre muestras.

Grupos celulares	pval	Significancia
CélulasB_Apop	0.74	ns
Células_Apop_	<0.00001	****
CélulasT_Apop	0.33	ns
CélulasB_1	<0.00001	****
CélulasB_2	<0.00001	****
CélulasB_3	0.0001	****
CélulasT_CD4_1	<0.00001	****
CélulasT_CD4_2	<0.00001	****
CélulasT_CD4_3	0.005	**
CélulasT_CD4CD8	<0.00001	****
CélulasT_CD8	0	****
cCD_1	0.2959	ns
cCD_2	0.3391	ns
CTLs	<0.00001	****
CélulasB_GC	0.019	*
CélulasT_gd	0.0003	***
Macrófagos	0.0889	ns
NK	0.9341	ns
Células_plasmáticas	<0.00001	****
Plasmablastos	<0.00001	****
CélulasT_proliferando	0.5927	ns
CTLs_proliferando	<0.00001	****

