

# **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR CD205 PORCINO Y  
ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR EN TEJIDOS  
LINFOIDES Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

POR:

**LILIAN KAREM FLORES MENDOZA**

TESIS APROBADA POR LA:

**COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE 2010

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Lilian Karem Flores Mendoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Jesús Hernández López

Director de Tesis



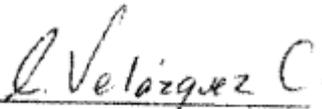
Dra. Verónica Mata Haro

Asesora



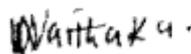
Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Asesor



Dr. Carlos Velázquez

Asesor



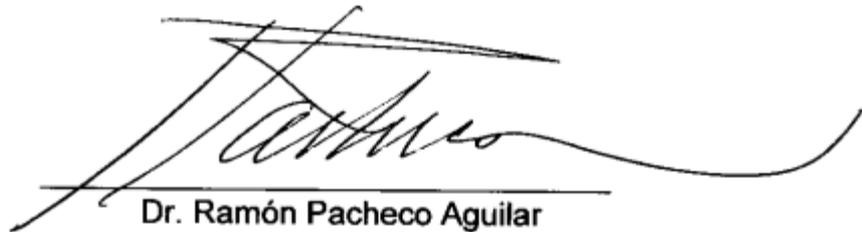
Dr. Waithaka Mwangi

Asesor

## **DECLARACION INSTITUCIONAL**

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco Aguilar', written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

**Dr. Ramón Pacheco Aguilar**  
**Director General del CIAD, A.C.**

## **AGRADECIMIENTOS A LOS SERVICIOS DE APOYO**

Por su participación y asistencia técnica en el trabajo de laboratorio: a las **Q. B. Mónica Reséndiz Sandoval, Q. B. Karina Espinoza Villalba y M. en C. Lucila Rascón Durán.**

Asistencia editorial y revisión de manuscritos: **M en C. Adriana Bolaños Villar.**

Asistencia de servicio de cómputo: **Karla Gabriela Robles Bernal.**

Asistencia en trámites y servicios de docencia: **Héctor Galindo Murrieta, Verónica Araiza Sánchez, Laura García Cruz y Argelia Marín Pacheco.**

## CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| Resumen .....                                  | viii |
| Introducción general .....                     | 1    |
| Integración del trabajo de investigación ..... | 7    |
| Hipótesis .....                                | 10   |
| Objetivo general .....                         | 10   |
| Objetivos particulares .....                   | 10   |

### **Capítulo 1**

Células presentadoras de antígeno: procesamiento y presentación de antígenos.

### **Capítulo 2**

Caracterización del receptor CD205 porcino.

### **Capítulo 3**

Desarrollo y caracterización de un anticuerpo monoclonal que reconoce al receptor CD205.

### **Capítulo 4**

Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv):  
escribiendo una historia.

## **Capítulo 5**

Vacunación en cerdos.

## RESUMEN

Las células dendríticas son importantes en la respuesta inmune. El reconocimiento de antígenos a través de ciertos receptores presentes en células dendríticas aumenta la activación y modulación de la respuesta inmune. El CD205 es un receptor que favorecen la presentación de antígenos y por su importancia se utiliza en terapias anti-cancerígenas y desarrollo de vacunas en modelos murinos y humanos, principalmente. Este receptor no ha sido descrito en cerdos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el receptor CD205 porcino y desarrollar un anticuerpo monoclonal anti-CD205 para su uso posterior en el desarrollo de nuevas vacunas en cerdos. Se obtuvo la secuencia completa del receptor CD205 porcino y el análisis de aminoácidos mostró 12 dominios extracelulares, un dominio de fibronectina tipo II, un dominio rico en cisteínas y 10 dominios de reconocimiento de carbohidratos. Además, en la región intracelular se encontraron dos secuencias de aminoácidos importantes debido a que potencialmente favorecen la internalización del receptor y su transporte a vesículas ricas en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). Estas secuencias se encuentran altamente conservadas en todas las especies para las que se ha reportado la secuencia de este receptor, lo que sugiere su importancia en la función del CD205. El análisis filogenético de esta proteína reveló una homología de 89% con bovinos, 87% con humano, 78% con ratón y solo un 49% con gallo, entre otros analizados. Se determinó la expresión relativa del receptor utilizando PCR en tiempo real, y se encontró mayor expresión en células de Langerhans,

mientras que en células dendríticas derivadas de monocitos en estado maduro e inmaduro fue baja. En tejidos, el timo presentó mayor expresión, seguido de ganglios inguinales y mesentéricos. Por otra parte, se obtuvo una proteína recombinante del dominio CTDL-5 del receptor CD205 con la cual se generó un anticuerpo monoclonal. El análisis de citometría mostró que este anticuerpo reconoce poblaciones celulares en ganglios linfáticos (mesentéricos, inguinales, amígdalas y timo) y células dendríticas derivadas de monocitos. Estas poblaciones se caracterizaron por la expresión alta de MHC-II, CD172a y CD14, lo que es compatible con el fenotipo de células dendríticas. En todos los ganglios analizados el reconocimiento del anticuerpo fue mayor al 20% mientras que en timo fue del 5%. La expresión de CD205 en células dendríticas derivadas de monocitos inmaduras fue de 19%, y tras la maduración con LPS se incremento un 10%. También se observó que la expresión del receptor aumentó hasta un 28% en DCs maduras infectadas con el virus del PRRS. La expresión del receptor fue confirmada mediante la detección de la proteína en ganglios mesentéricos y amígdala por inmunotransferencia, donde se observó que el anticuerpo anti-CD205 reconoce una banda de 200 kDa aproximadamente. El conocimiento de las características del receptor CD205 porcino y el desarrollo de un anticuerpo monoclonal anti-CD205 permitirá el desarrollo de nuevas vacunas para cerdos.

## **INTRODUCCION GENERAL**

Las células dendríticas (DCs) juegan un papel muy importante en el sistema inmune porque son las mejores células presentadoras de antígenos capaces de capturar, procesar y presentar a linfocitos T vírgenes. En consecuencia, activan y modulan la respuesta adaptativa. Las DCs expresan un amplio repertorio de receptores que favorecen la captura de antígenos. Sin embargo, solo unos cuantos son capaces de aumentar la presentación antigénica. Entre este tipo de receptores destaca el CD205, el cual logra incrementar la presentación de antígenos hasta más de 100 veces. Este receptor pertenece a la familia de lectinas tipo C tipo II que en la región N terminal cuenta con un dominio rico en cisteínas, seguido de un dominio de fibronectina tipo II, múltiples dominios de reconocimiento de carbohidratos, una corta región transmembranal y una pequeña región citoplasmática. La región citoplasmática cuenta con dos regiones funcionales: una que favorece la internalización del antígeno y otra región relacionada con el reciclaje del receptor internalizado a vesículas del endosoma tardío las cuales contienen una gran cantidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II). El uso de este receptor se ha extendido en estudios donde un antígeno determinado es dirigido a células dendríticas a través del CD205, lo cual favorece la presentación de antígenos y en consecuencia la activación y proliferación de linfocitos T CD4 y la producción de IFN- $\gamma$ . En el cerdo, existen muchas enfermedades para las cuales no hay una vacuna eficaz para su

prevención o control, por lo que el estudio de este receptor abre una nueva línea de investigación y desarrollo de nuevas vacunas para esta especie.

Debido a la importancia del receptor CD205 en el desarrollo de la respuesta inmune, y la problemática actual en el desarrollo de vacunas contra enfermedades porcinas, este trabajo caracterizó el receptor CD205 porcino para su uso en el desarrollo de vacunas. En primer lugar, se describió la secuencia completa del receptor CD205 porcino, ya que no había sido definida. El receptor se amplificó a partir de timo utilizando diferentes juegos de iniciadores que amplificaron fragmentos del gen hasta completar la secuencia. Los resultados mostraron que el receptor CD205 consta de 5171 nucleótidos que codifican para una proteína de 1721 aminoácidos. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró 12 dominios extracelulares, un dominio inicial que contiene varias cisteínas, posteriormente un dominio de fibronectina tipo II y posteriormente 10 dominios de reconocimiento de carbohidratos. Se desconoce el ligando natural de este receptor, sin embargo, el análisis de aminoácidos señaló que posee la secuencia de reconocimiento de manosa (Glu-Pro-Asn) en el dominio CTDL-2, al igual que el receptor de manosa de la misma familia. Además se encontró la secuencia de aminoácidos de reconocimiento de galactosa (Gln-Pro-Asp) en el dominio CTDL-7, ambos dominios de reconocimiento han sido reportados como no funcionales para otras especies. Se identificaron 13 sitios potenciales de glicosilación distribuidos 7 de ellos en los dominios CTDL-6 al CTDL-8. Por otra parte, el receptor CD205 cuenta con una región transmembranal que atraviesa una sola vez la membrana en los

aminoácidos 1671-1693 y posteriormente una región citoplasmática corta la cual contiene dos secuencias de aminoácidos que llevan a cabo las funciones que caracterizan a este receptor primeramente la secuencia FSSVRYQ que media la internalización y posteriormente la triada de aminoácidos ácidos EDE la cual media la unión del receptor a vesículas que contienen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad MHC-II que favorecen la presentación de antígenos en las otras especies. Se evaluó la relación filogenética del receptor con otras especies y se encontró una homología muy alta con la mayoría de las especies analizadas que va desde el 85% para bovino, seguido de un 82%, 81% y 80% con el caballo, humano y mono, respectivamente; mientras que la identidad más baja fue con el gallo con un 49%. Esta característica sugiere una función de gran importancia en las células que lo expresan.

Una vez obtenida la secuencia del receptor se procedió a evaluar su expresión a nivel de transcritos en diferentes ganglios y células porcinas utilizando PCR en tiempo real. Los resultados muestran que todos los tejidos linfoides analizados (mesentérico, inguinales, sublingual, timo y bazo) expresaban el receptor CD205, el timo presentó la mayor expresión seguido de los ganglios mesentéricos. Mientras que en las células evaluadas solo las de Langerhans expresaban el receptor de manera similar a los ganglios linfáticos. En el caso de las células dendríticas derivadas de monocito (Mo-DCs) maduras e inmaduras, la expresión fue de 60 y 100 veces menor, respectivamente, comparada con las células de Langerhans.

La segunda etapa del trabajo consistió en desarrollar un anticuerpo monoclonal anti-CD205 y evaluar la distribución del receptor en diferentes células y tejidos. Se generó una proteína recombinante del dominio CTDL-5, se escogió este dominio por no presentar ninguna homología con otro receptor tipo lectina a diferencia del resto de los dominios que son similares a diferentes dominios presentes en otros receptores tipo lectinas presentes en otras células como monocitos, macrófagos y asesinas naturales. La proteína tuvo un tamaño aproximado de 30 kDa y fue generada utilizando un sistema de expresión eucarionte en células HEK-293. Esta proteína fue utilizada para inmunizar ratones durante un período de 6 semanas, al final los ratones fueron sacrificados y las células del bazo fueron fusionadas con células del mieloma P3x63-*Ag8653*, utilizando polietilenglicol. Esta fusión celular se mantuvo en cultivo durante 10-15 días, bajo factores de selección en el medio de crecimiento (Hipoxantina-Aminopterina-Timina), con la finalidad de que las células no fusionadas dejaran de crecer y aquellas fusionadas permanecerían vivas. A partir de estos cultivos se hicieron diluciones limitantes, y en aquellos donde se observó crecimiento, los sobrenadantes fueron evaluados por ELISA para determinar especificidad a la proteína recombinante CTDL-5. Posteriormente, los hibridomas con reconocimiento fueron clonados nuevamente por dilución limitante y los nuevos sobrenadantes seleccionados fueron probados por citometría de flujo para determinar el reconocimiento en poblaciones celulares. De esta manera se seleccionaron dos clones: 1.F6F6 y 2.B3B8. Ambas clones fueron probadas por inmunodetección en un ensayo de manchas para determinar especificidad hacia la

proteína recombinante CTDL-5. Posteriormente determinó el isotipo de los anticuerpos, la clona 1.F6F6 fue IgG2b, mientras que la clona 2.B3B8 fue IgG2a. Posteriormente se analizó la reactividad de estos anticuerpos en amígdala, timo y ganglios mesentéricos, inguinales, subinguinales, además de células dendríticas derivadas de monocito y células de Langerhans. Este análisis se realizó por citometría, seleccionando las células en de mayor tamaño y complejidad, características de células dendríticas, y se evaluaron los siguientes marcadores de superficie: CD14, CD172a y MHC-II. Las poblaciones celulares evaluadas presentaron el siguiente fenotipo: CD14<sup>+</sup> CD172a<sup>alto</sup> MHC-II<sup>alto</sup>, patrón de expresión que concuerda con células dendríticas. Todos los tejidos y células evaluadas expresaron el CD205 que reconoce el anticuerpo monoclonal. Los ganglios mesentéricos presentaron la mayor expresión (28%), seguido de amígdala (20%), mientras que en timo solo se observó un 4% de reconocimiento. En las Mo-DCs inmaduras la expresión fue del 18%, y aumento al 28% en Mo-CDs maduras, tras el estímulo de maduración. Para el caso de células de Langerhans la expresión fue la más grande de entre todas las poblaciones analizadas con un 60% de expresión. Cabe mencionar que los resultados anteriormente descritos fueron utilizando la clona 1.F6F6, pues en todos los casos el reconocimiento con la clona 2.B3B8 no fue mayor de 4% en ninguna de las poblaciones analizadas. Este anticuerpo reconoce una banda fue de alrededor de 200 kDa, tamaño esperado para este receptor. Este reconocimiento fue en células de ganglios linfáticos y de células dendríticas derivadas de monocitos.

En conclusión, esta tesis describe la caracterización del receptor CD205 porcino a través de la secuencia de aminoácidos y la homología del receptor con otras especies. Además, se determinaron los dominios que existen en el receptor porcino y se encontraron sitios altamente conservados involucrados principalmente en las funciones de internalización y presentación que lo caracterizan. Además se generó un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor CD205 en células dendríticas presentes en ganglios linfáticos y derivadas de monocitos, así como células de Langerhans. El uso de este anticuerpo y/o hibridoma en el desarrollo de vacunas para porcinos es muy prometedor, ya que existe la posibilidad de dirigir los antígenos directamente a las células dendríticas.

## **INTEGRACION DEL MANUSCRITO DE TESIS**

La información derivada de esta investigación se sintetizó en capítulos con formato de artículo que fueron ordenados, de acuerdo a los objetivos particulares.

En el **capítulo 1 "Células presentadoras de antígeno: procesamiento y presentación de antígenos"**, Silva-Campa Erika, Flores-Mendoza Lilian, Hernández J. Este capítulo describe la importancia de las células dendríticas en el procesamiento de antígenos, así como en el proceso de presentación y activación de los linfocitos. Es decir, la influencia de las células dendríticas en la modulación de la respuesta inmune. Este capítulo está enfocado a destacar el papel de las células dendríticas en la presentación de antígenos. Este capítulo fue publicado en el libro *Inmunología Veterinaria*, capítulo 7 con el título procesamiento y presentación de antígenos: Cita del libro: **Gutiérrez Pabello, José Ángel (2010). *Inmunología Veterinaria*. (1<sup>ra</sup> edición) Ed. Manual Moderno.pp 343.**

En el **capítulo 2 "Caracterización del receptor CD205 porcino"**, Flores-Mendoza Lilian, Sotelo-Mundo R., Mwangi W, Hernández J. Describen los resultados de la caracterización del receptor CD205 porcino detallando la secuencia

de aminoácidos del receptor y los dominios presentes en la proteína, así como las regiones conservadas y la relación filogenética entre especies para este receptor. Además se describe la expresión relativa del receptor CD205 en tejidos y células porcinas. Artículo publicado, referencia: **Characterization of porcine CD205. Flores-Mendoza L, Sotelo-Mundo RR, Dawson H, Mwangi W, Hernández J. Dev Comp Immunol. 2010 34(7):715-21.**

En el **capítulo 3: "Desarrollo y caracterización del anticuerpo monoclonal anti-CD205 porcino"**, Flores-Mendoza Lilian, Velázquez Carlos, Waithaka M, Hernández J. Describen el desarrollo de un anticuerpo anti-CD205, el cual reconoce una proteína de aproximadamente 200 kDa que reconoce células con fenotipo y distribución de células dendríticas presentes en ganglios linfáticos. Este capítulo se presenta en la forma de manuscrito en preparación que será sometido a consideración de la revista: Dev Comp Immunol bajo el título **"Developmental and characterization of a porcine anti-CD205 monoclonal antibody"**.

En el **capítulo 4 "Vacunación en cerdos"**. Flores-Mendoza Lilian, Silva-Campa Erika, Hernández J. Presenta una descripción de los principios básicas de la vacunación y su importancia en el control de la enfermedades de los cerdos. También describe aquellas vacunas que se usan actualmente en cerdos para el control de las principales enfermedades. Este capítulo fue publicado en el libro

Inmunología Veterinaria, capítulo 21 con el título Vacunación en cerdos: Cita del libro: **Gutiérrez Pabello, José Ángel (2010). *Inmunología Veterinaria*. (1<sup>ra</sup> edición) Ed. Manual Moderno.pp 343.**

En el **capítulo 5 "Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia"**. Flores-Mendoza Lilian, Hernández J. Hace una revisión sobre las diferentes vacunas que se han desarrollado contra el virus PRRS y analiza las ventajas y desventajas de las mismas. Describe los mecanismos básicos de estas vacunas en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz y duradera. Este capítulo fue publicado en la Revista Veterinaria México, Referencia: **Flores-Mendoza, Lilian; Hernández, Jesús. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. 2010. Vet Mex 41(2):139-159.**

## **Hipótesis**

El receptor CD205 se expresa en células dendríticas porcinas de diferentes tejidos y es altamente conservado entre diferentes especies

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Caracterizar el receptor CD205 porcino y generar un anticuerpo monoclonal que reconozca células dendríticas en tejidos linfoides y generadas *in vitro*.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la secuencia completa que codifica para el receptor CD205 porcino.
2. Caracterizar la expresión del receptor CD205 en los principales ganglios y células de piel.
3. Desarrollar un anticuerpo monoclonal contra el receptor CD205 porcino.
4. Determinar la expresión en poblaciones celulares de tejidos linfoides y de células dendríticas derivadas de monocitos.

# Capítulo

# 1

**Células presentadoras de antígenos: procesamiento y presentación de antígenos.**

## RESUMEN

Las células presentadoras de antígenos (CPA) son aquellas que favorecen la captura, procesamiento, presentación y activación de los linfocitos T. Las más importantes son las células dendríticas debido a su función única de activar a linfocitos T vírgenes, logrando modular y dirigir la respuesta inmune. Además poseen otras características que las convierten en las mejores CPA. Las células dendríticas para realizar las funciones de reconocimiento y captura cuentan con una gran variedad de receptores, que les permiten interactuar con un sin número de patógenos a través del reconocimiento de ciertos patrones moleculares. Esta característica es incomparable respecto a las otras CPA (macrófagos y células B). Una vez capturado el patógeno, las células dendríticas poseen una inigualable maquinaria enzimática que digiere de una manera muy eficaz los patógenos obteniéndose de esta digestión fragmentos peptídicos que tienen gran afinidad con las moléculas del MHC-I y II. En comparación con las enzimas digestivas de los macrófagos las de las células dendríticas no son tan potentes, sin embargo esto es una ventaja pues se crean fragmentos del tamaño idóneo para que sean ensamblados a las moléculas del MHC I y II. Las células dendríticas poseen la característica de que una vez que el patógeno es procesado a antígenos pequeños se expresan en su superficie una gran cantidad (mayor en proporción que el resto de las CPA) de moléculas de MHC-I y II unidas a un péptido específico del antígeno procesado el cual será reconocido a través del TCR presente en linfocitos T por la

interacción MHC-péptido-TCR. A demás de estas características las células dendríticas expresan moléculas como el CD80, CD86, CD40, las cuales logran la activación de linfocitos T, mediante el estímulo de otras moléculas presentes en los linfocitos. Todo esto en conjunto hace de las células dendríticas las mejores células presentadoras de antígeno capaces de detectar antígenos, internalizarlos a la células y procesarlos a péptidos pequeños para que sean presentados a través de las moléculas del MHC clase I y II.

# Procesamiento y presentación de antígenos

Erika Silva-Campa, Lilian Flores-Mendoza, Jesús Hernández

La función de la respuesta inmune innata es eliminar aquellos antígenos que logran superar los mecanismos inespecíficos de defensa (p. ej., piel, mucosas, microbiota intestinal, entre otros). El conjunto de células y proteínas solubles involucradas en la respuesta innata logran en gran medida eliminar o limitar las infecciones de la mayoría de los patógenos. Sin embargo, muchos de ellos y sobre todo los de mayor virulencia no logran ser eliminados. Es en estos casos donde el desarrollo de la respuesta adaptativa es fundamental, la acción concertada de las células involucradas en ambas respuestas (macrófagos, células NK, linfocitos T y B) y los productos derivados de ellas (citoquinas y anticuerpos) logran la eliminación del patógeno. El inicio de la respuesta adaptativa está restringida a un proceso de reconocimiento-presentación que involucra a células especializadas, las cuales reconocen, capturan, procesan y presentan antígenos en un contexto adecuado a los linfocitos T CD4 y CD8. Estas células especializadas se conocen en conjunto como células presentadoras de antígeno.

Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés: *antigen presenting cells*) son atraídas al sitio de inflamación y son activadas por el antígeno que ha inducido la inflamación. Una vez en este sitio son capaces de interactuar con el antígeno a través de la expresión de una gran variedad de receptores presentes en su superficie. Posteriormente, se lleva a cabo la internalización y el procesamiento de antígeno, el cual involucra la fragmentación del antígeno a péptidos. Los péptidos se unen a moléculas especializadas conocidas como moléculas del complejo

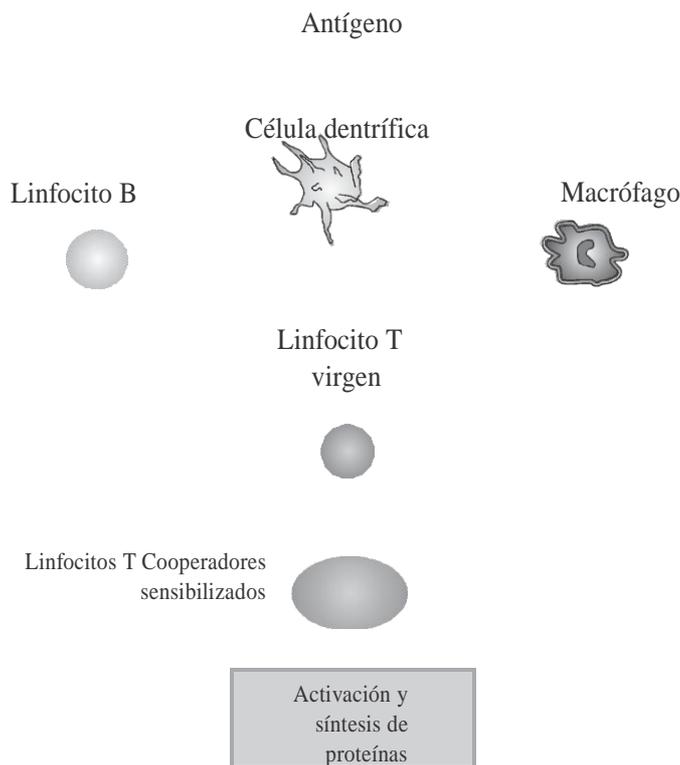
mayor de histocompatibilidad (MHC) que se expresan en la superficie de las APC y son reconocidas por los linfocitos T. Existen dos tipos de moléculas de MHC: clase I y clase II (MHC-I y MHC-II, respectivamente) y cada una de estas moléculas expresan péptidos derivados de proteínas. Además de las moléculas de MHC, las APC también pueden presentar antígenos lipídicos a través de la expresión de moléculas CD1. Los antígenos pueden ser exógenos, en decir, aquellos que son internalizados a la célula provenientes de los espacios extracelulares, y se asocian a las moléculas MHC-II. El otro tipo son los antígenos endógenos, los cuales son sintetizados dentro de la célula y se asocian a las moléculas de MHC-I. La mayoría de las células nucleadas expresan moléculas de MHC-I, es decir, son capaces de procesar y presentar a estos antígenos endógenos. Sin embargo, no todas las células presentan antígenos en el contexto de MHC-II, sólo tres tipos celulares pueden hacerlo, los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. Estas tres últimas son conocidas como células presentadoras de antígenos profesionales, y de todas ellas las más efectivas con las células dendríticas

## CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS PROFESIONALES

La importancia de las células presentadoras de antígeno profesionales radica en su capacidad de iniciar y modular la respuesta inmune; de manera específica, para la correcta activación de los linfocitos vírgenes. Dentro de las APC, las células dendríticas tienen la mayor habilidad para activar este tipo de linfocitos debido a la gran variedad de

receptores que expresan, los cuales favorecen la internalización y presentación antigénica. Sin embargo, los macrófagos (MØ) y los linfocitos B, también son capaces de interactuar con linfocitos vírgenes, pero en menor medida, debido a la expresión limitada de receptores y moléculas de coestimulación (figura 7-1).

Los MØ y células dendríticas se encuentran como centinelas ubicados en las principales entradas de microorganismos, como lo es la piel (cuando pierde su integridad) y mucosas (respiratoria, gastrointestinal, urogenital). Una vez que las APC entran en contacto con señales de daño (inflamación) de los patógenos, aumenta su eficiencia en la captura, transporte intracelular y degradación del antígeno, así como el tráfico intracelular de las moléculas del MHC-I y II. Estos procesos inducen cambios en la expresión de moléculas de superficie en las APC, que favorecen la migración de estas células a los ganglios linfáticos, lugar donde se encuentran los linfocitos vírgenes. Además de las moléculas de migración, se aumenta la expresión de moléculas de



**Figura 7-1.** Células presentadoras de antígenos: células B, macrófagos (MØ) y células dendríticas (DC). Las DC son las APC que poseen mayor habilidad de activación de los linfocitos T vírgenes; lo anterior, debido a sus características de ubicación anatómica y capacidad de migración, así como la variedad de receptores que expresan, enzimas involucradas en la degradación del antígeno y la expresión de moléculas de presentación y coestimulación.

coestimulación que son de gran importancia para las APC. Con todos estos cambios las APCs pueden presentar antígenos a los linfocitos T y lograr su activación, induciendo proliferación celular y diferenciación a linfocitos efectores capaces de eliminar a los patógenos.

## RECONOCIMIENTO Y CAPTURA DE ANTÍGENOS MEDIADO POR LAS APC

Los mecanismos que utilizan las APC para la captura de los antígenos son: 1) macropinocitosis, 2) fagocitosis y 3) endocitosis mediada por receptores. En el caso de este último mecanismo, las APC utilizan diferentes receptores expresados en su membrana. Los linfocitos B utilizan su receptor Ig, mientras que los MØ y DC cuentan con una mayor variedad de receptores. Los de mayor importancia para MØ son los receptores de manosa, Scavenger y receptores Fc (CD64, 32 y 23). Mientras que para las DC destacan los receptores tipo Toll (TLR 1-9, dependiendo de la especie), receptores tipo lectina (DEC-205, DC-SIGN, CD207, etc.) y receptores Fc (CD64, 32 y 23) entre otros.

La macropinocitosis es un proceso en el que se captan grandes volúmenes de fluidos extracelulares en donde se encuentran pequeñas partículas solubles. Mientras que la fagocitosis es un proceso que involucra la internalización de partículas mayores a través de la invaginación de la membrana o formación de pseudópodos. La fagocitosis en MØ y DC se lleva a cabo para un amplio rango de partículas como lo son células apoptóticas, microbios, partículas inertes o liposomas. La fagocitosis puede inducirse por algunos receptores involucrados en la endocitosis como los receptores FcR, del complemento y del lectinas tipo C.

La endocitosis mediada por receptores involucra la captura de macromoléculas a través de la formación de vesículas de clatrina, las cuales son recluidas en los sitios de reconocimiento de los receptores al antígeno a través de señales inducidas por los mismos receptores. Este mecanismo tiene varias ventajas sobre los anteriores, una de ellas es que la captura de antígenos se hace más rápida y eficiente pues pueden inducir la presentación de antígenos aun cuando estos receptores se encuentren en bajas concentraciones. Además, la captura de antígenos mediada por receptores induce la activación de ciertas funciones en las

las APC, las cuales pueden variar dependiendo de la célula aún con el mismo receptor. Un ejemplo son los receptores Fc $\gamma$ , que para el caso del linfocito B actúa inhibiendo la internalización del complejo anticuerpo-antígeno, mientras que en M $\emptyset$  y DC induce la internalización y presentación de los antígeno unido a anticuerpos. Otros receptores como los tipo Toll, además reconocer al antígeno favorece la expresión de citoquinas que favorecen la polarización de una respuesta efectora. El resultado final del reconocimiento de antígenos vía receptores es la activación de las APC, que en el caso de las DC se conoce como proceso de maduración.

## LINFOCITOS B COMO CÉLULAS PRESENTADORAS

Los linfocitos B, como se mencionó anteriormente, no son las mejores células presentadoras, sin embargo, logran acoplar su función primaria de producción de anticuerpos al proceso de presentación de antígenos. Estas células se caracterizan por una pobre o nula internalización del antígeno vía macropinocitosis o fagocitosis. La captura de antígenos en estas células se lleva a cabo por endocitosis mediada por los receptores de Ig. La unión de los antígenos a estos receptores favorece la internalización antígeno-receptor y regula la expresión de moléculas de MHC-II, así como la unión de los antígenos a estas moléculas. Con todo lo anterior se logra la estimulación de linfocitos T, sin embargo la estimulación es bidireccional: los linfocitos T secretan citoquinas que favorecen producción de anticuerpos en los linfocitos B. Una de las desventajas de los linfocitos B como APC es que no se encuentran localizados en áreas de ingreso de antígenos; para que se lleve el reconocimiento de antígenos requieren que M $\emptyset$  (una población especial con baja actividad fagocítica) o DC “acarreen” los antígenos para que lleguen de manera intacta (sin procesar) a los ganglios linfáticos, sitios donde se encuentran los linfocitos B.

## MACRÓFAGOS COMO CÉLULAS PRESENTADORAS

Los macrófagos (M $\emptyset$ ) son células fagocíticas, cuya función principal es participar en la respuesta inna-

ta fagocitando al microorganismo y lograr su “destrucción” a través de vacuolas líticas que contienen proteasas lisosomales y agentes oxidantes. Una de las principales características de esta célula como APC es su extraordinaria capacidad de fagocitosis, que le permite internalizar más de 50% de su área de superficie en una captura. Los M $\emptyset$  también pueden internalizar al antígeno por macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores. Debido a su condición de célula fagocítica, los M $\emptyset$  cuentan con una amplia variedad de enzimas líticas que degradan al antígeno, pero esta degradación es exhaustiva y cerca de 99% del antígeno es degradado, mientras que sólo 1% es utilizable en la presentación de antígenos.

Otra característica importante de los M $\emptyset$  como APC es la expresión de MHC-I y MHC-II, así como moléculas de coestimulación, las cuales son reguladas por citoquinas inflamatorias o productos bacterianos. Sin embargo, la expresión de estas moléculas (en especial MHC-II) comparada con la expresión en linfocitos B o células dendríticas, es de forma significativa menor incluso en M $\emptyset$  activados. La baja expresión de MHC-II y la degradación exhaustiva, explica al menos en parte por que los M $\emptyset$  son menos eficientes en la presentación de antígenos que las otras APC. Sin embargo los M $\emptyset$  están presentes en un gran número en los sitios de infección e inflamación crónica donde pueden contribuir a la estimulación de los linfocitos T.

## CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas están amplia y estratégicamente distribuidas en todo el cuerpo, en ganglios linfáticos, piel y mucosas donde se encuentran como centinelas. Tienen una capacidad inigualable para internalizar y procesar antígenos, y cuentan con una alta expresión de moléculas coestimuladoras. Lo anterior les permite la activación de los linfocitos T vírgenes y dirigir la diferenciación y polarización a un tipo específico de respuesta (humoral, celular, o supresora). La capacidad de las DC para modular o dirigir la respuesta inmune las hace esenciales para iniciar una respuesta específica.

## Poblaciones de células dendríticas

Existen varias subpoblaciones de DC las cuales difieren en origen, localización y función. Existen

Existen dos grandes poblaciones de DC mieloides y linfoides. Las DC mieloides generan dos subpoblaciones: las células de Langerhans (localizadas en epidermis y mucosas) y las DC intersticiales (en órganos como corazón, pulmón, tracto gastrointestinal y riñón), ambas derivadas de monocitos. La otra población son las linfoides, también conocidas como DC plasmocitoides, las cuales se encuentran en sangre y órganos linfáticos. Las DC mieloides son potentes presentadoras de antígenos capaces de activar linfocitos vírgenes e iniciar la inmunidad adaptativa. En cambio las DC plasmocitoides no son capaces de llevar a cabo la activación de linfocitos vírgenes, sin embargo son un componente esencial de la inmunidad innata, debido a su capacidad de producir citocinas, de modo principal interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), la cual participa en la activación de células NK y otras funciones de la respuesta innata. Aun cuando existen diferencias entre ambos tipos de DC hay cierta flexibilidad funcional, no está claro cómo se lleva a cabo este mecanismo de plasticidad, sin embargo se cree que está relacionado con las grandes cantidades de IFN- $\alpha$  producido por las DC plasmocitoides. Se han descrito DC mieloides (derivadas de monocito) para varias especies de animales, tal es el caso del cerdo, perro, gato, caballo, bovino, gallo, ratón, entre otros. Sin embargo las DC linfoides han sido descritas, menos en especies como ratón, cerdo, bovino y perro, lo cual no significa que no

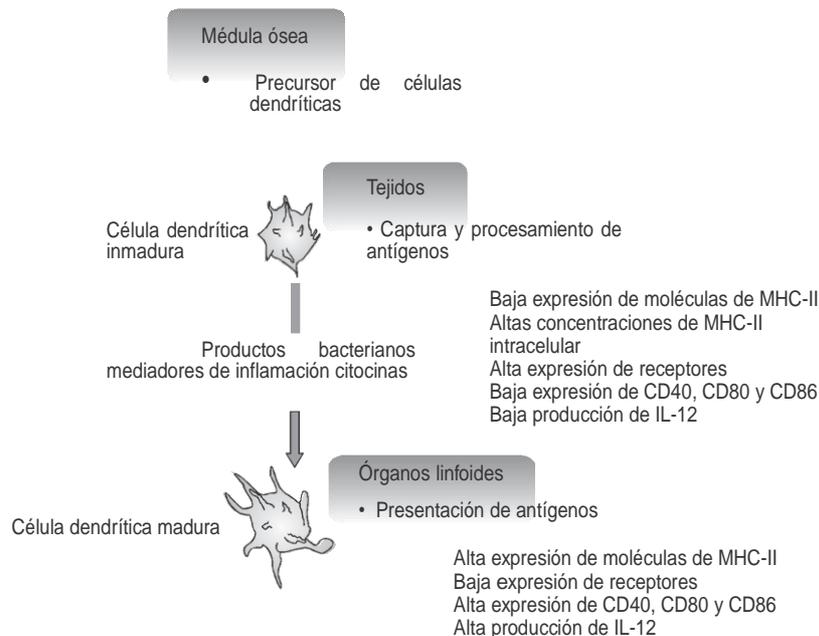
existan si no que no han sido tan estudiadas como las mieloides.

Además de las poblaciones de DC, existe otra división que se aplica en estas células basadas en su estado de maduración (inmadura y madura). Cada una de ellas tiene una función importante y diferente en el proceso de presentación. Las DC inmaduras son eficientes en la captura y procesamiento del antígeno, mientras que las DC maduras se especializan en la presentación de antígenos (figura 7-2).

## Células dendríticas inmaduras

Los precursores de la DC migran a varios tejidos o ganglios linfáticos, donde se diferencian a células dendríticas inmaduras con una alta capacidad fagocítica. Una vez que se encuentran con un antígeno, éste es capturado vía macropinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores. Una de las características más importantes de las DC inmaduras es la gran variedad de receptores que expresan, los cuales incluyen receptores de citocinas (IL-1R, TNFR) y quimiocinas. Así como receptores de reconocimiento, como los Fc, tipo Toll, de lectinas tipo C, etc. Esta gran variedad le da un amplio espectro de reconocimiento de patógenos.

La maduración de las DC está inducida y regulada por otros factores además del antígeno, uno de los más importantes es el microambiente. En el caso



**Figura 7-2.** Las células dendríticas tienen dos estados de maduración: DC inmaduras y maduras. Las características funcionales y ubicación dependen de este estado de maduración.

de un tejido dañado y/o inflamado se secretan una gran variedad de factores que inducen la maduración de las DC. Dentro de estos factores se encuentran citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ), defensinas (derivadas de neutrófilos), productos de mastocitos, moléculas de separación sulfato que se une al receptor TLR4 en DC inmaduras, todos estos factores inducen la maduración de DC inmaduras.

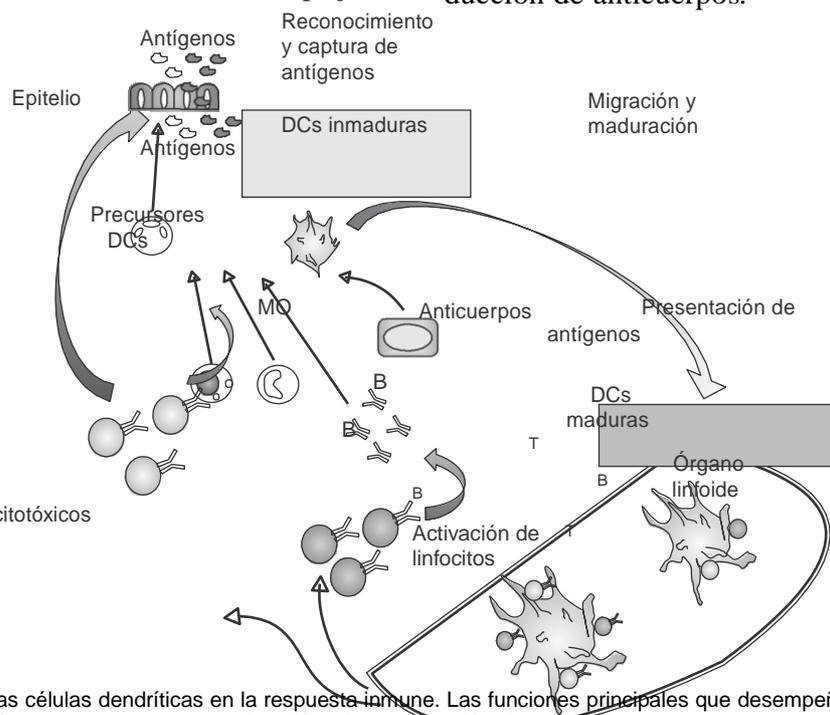
## Células dendríticas maduras

Una vez capturado el antígeno, las DC migran hacia los órganos linfoides a través de un gradiente de concentración de quimocinas (principalmente CCL20 y CCL19) y la expresión de ciertos receptores en las DC inducidos por el antígeno. El reconocimiento del antígeno y demás factores involucrados en la maduración inducen cambios dirigidos a la pérdida de receptores útiles en la captura de antígeno y a la mayor expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación de antígeno; estos cambios son conocidos como maduración.

Durante la maduración se lleva a cabo el procesamiento del antígeno para expresar péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I o II (MHC I/II) o CD1. Esta unión depende de la naturaleza del antígeno, los de origen proteico se unen a MHC I o II, y los de naturaleza lipídica se unen a CD1. El reconocimiento de estos complejos

(antígeno-MHC), así como de las señales coestimuladoras producidas por las DC dan lugar a la activación de los linfocitos T vírgenes específicos para el antígeno (figura 7-3). Además de estas señales, las DC secretan citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- $\alpha$  generando un microambiente necesario para una respuesta inmune específica. La razón por la que las DC maduras son APC con mayor capacidad de activar a los linfocitos T vírgenes es la expresión de moléculas de MHC y las moléculas de coestimulación. La unión entre las DC y los linfocitos T no es sólo mediada por la unión TCR-péptido-MHC, si no que es reforzada por la unión de ciertas lectinas tipo C, como DC-SING, LFA-1, las cuales actúan favoreciendo el contacto célula-célula, lo cual asegura la activación de los linfocitos si las demás señales están presentes.

La acción final de una DC es estimular a los linfocitos para que realicen sus funciones efectoras y el antígeno sea eliminado. Para lograr este objetivo, las DC dirigen la respuesta de anticuerpos o celular a través de la producción de citocinas, que dependerá de la naturaleza del antígeno. El microambiente que forman las citocinas secretadas, inducen que los linfocitos T cooperadores (Th) polaricen su respuesta. Esta polarización puede ser de tipo Th1 y favorecer la respuesta mediada por células, sobre todo linfocitos T citotóxicos (CTL) y de algunos fagocitos como M $\phi$ , o Th2 para favorecer la producción de anticuerpos.

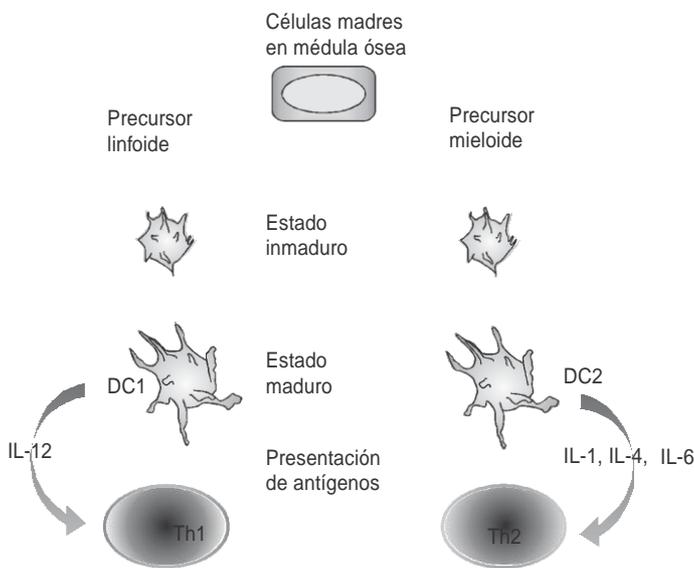


**Figura 7-3.** Importancia de las células dendríticas en la respuesta inmune. Las funciones principales que desempeñan las DC son la de reconocimiento y captura del antígeno, procesamiento y migración y la presentación de antígenos.

©  
Edi  
ori  
El  
m:  
nu:  
m:  
der  
o  
Fot  
cop  
ar  
sin  
aut  
riza  
ión  
es  
un  
deli  
o

La diferenciación de los linfocitos T cooperados a Th1 o Th2 está determinada por el tipo de DC que induzca su maduración. Las DC que inducen la diferenciación de los linfocitos T a Th1 se conocen como DC1, mientras que las que inducen la diferenciación a Th2 son las DC2. La principal citocina secretada por las DC para inducir una respuesta Th1 en linfocitos es la interleucina 12 (IL-12). Mientras que la ausencia de esta citocina y la presencia de IL-1, IL-4 e IL-6 estimula la polarización de la respuesta a Th2 (figura 7-4). El perfil de citocinas de las DC está de manera estrecha ligado al estímulo inducido por el antígeno durante el reconocimiento. Por ejemplo, un antígeno determinado que es reconocido por el receptor tipo Toll 4 o 7 en las APC, inducen la expresión de la IL-12, favoreciendo la respuesta tipo Th1, mientras que la unión de otros antígenos a sus receptores favorece una respuesta Th2.

En suma, las DC regulan la activación de los linfocitos T mediante tres señales: 1) el reconocimiento del antígeno unido al MHC, 2) la coestimulación inducida por las moléculas CD80, CD86 y CD40L, y 3) la señal mediada por las citocinas que polariza la respuesta.



**Figura 7-4.** Las DC se originan de un precursor común que se encuentra en médula ósea, el cual se diferencia en un precursor mioide y uno linfoide. Estos precursores se diferencian en células dendríticas inmaduras, las cuales tras su maduración presentan antígenos a linfocitos T. Distintas poblaciones de DC inducen la polarización de células T a Th1 (IL-12) y Th2 (IL-1, IL-4 e IL-6) con base en su perfil de citocinas.

## RUTAS DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

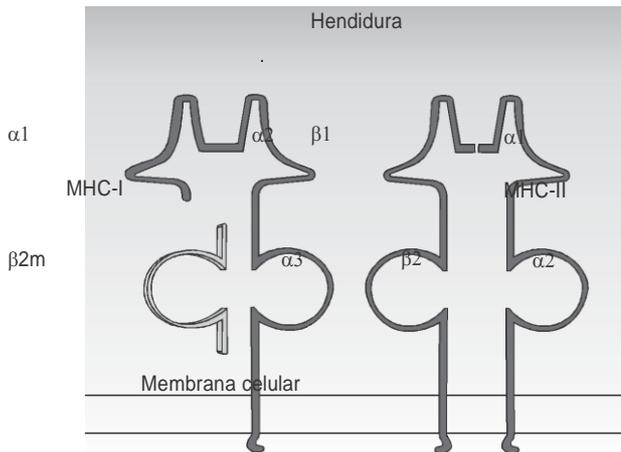
Dependiendo de las características del antígeno y la vía de entrada en las APC, es la ruta por la cual será presentado el antígeno asociado a las moléculas presentadoras de antígenos. Existen tres vías de procesamiento y presentación representadas por los tipos de moléculas a los que se asocia el antígeno. Aquellos de origen proteico se asocian a moléculas de MHC clase I y II, mientras que los antígenos lipídicos se asocian a moléculas CD1. Estas moléculas comparten tres características estructurales: Hendidura, dominio inmunoglobulina (Ig) y dominios transmembranaral-citoplásmatico. La conformación que adoptan en la región extracelular forma lo que se conoce como hendidura, que es el sitio de unión del péptido seguido por un dominio Ig. Además se encuentran ancladas a la membrana por los dominios transmembranaral y citoplásmatico. Las moléculas del MHC en los mamíferos presentan en esencia la misma estructura y función.

## PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EXÓGENOS POR LA VÍA DEL MHC-II

La activación de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> o cooperadores está restringida a las moléculas de MHC-II. Por lo tanto, son activados sólo por las APC, en especial DC, debido a que estas últimas son capaces de modular el tipo de respuesta de los linfocitos T cooperadores, hacia Th1 y Th2.

Desde el punto de vista estructural, las moléculas del MHC-II están formadas por un dímero de dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente; una cadena alfa (32-34 kD) y una cadena beta (29-32 kD). Ambas cadenas presentan dos segmentos ( $\alpha 1-\alpha 2$  y  $\beta 1-\beta 2$ , de manera respectiva). La hendidura de unión del péptido está formada por los extremos terminales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de ambas cadenas. Los segmentos  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  se pliegan en dominios Ig, el punto de unión para el CD4 se encuentra en el segmento  $\beta 2$ . Las moléculas de MHC-II se anclan a la membrana celular mediante una secuencia de 25 aminoácidos hidrófobos continuos a las regiones Ig de cada cadena que atraviesan la membrana, seguido por una región de aminoácidos básicos localizados en el citoplasma (figura 7-5).

La vía de presentación de antígenos a través de las moléculas de MHC-II, inicia con el ensamblaje



**Figura 7-5.** Esquema de la estructura de las moléculas de MHC-I y MHC-II. El esquema ilustra las diferentes regiones de las moléculas de MHC. Los dominios que forman la hendidura de unión al péptido son:  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en las moléculas de clase 1.  $\alpha 1$  y  $\alpha 1$  en las moléculas de clase 2. Seguido por un dominio tipo Ig ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , en forma respectiva) para finalizar con el dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

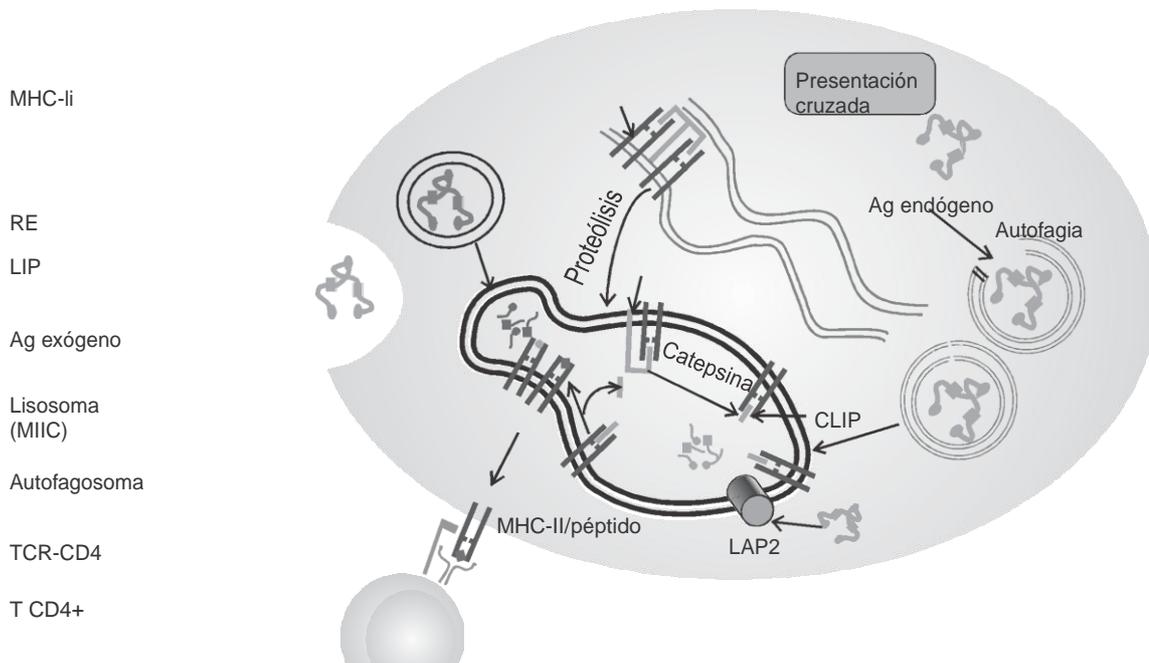
de dichas moléculas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE). Las moléculas de MHC-II están asociadas a una cadena invariante (Ii), la cual le confiere protección para que no interaccione con péptidos o proteínas (propias) en el compartimiento prelisosomal. El complejo MHC-II/Ii deja el RE y viaja a través del aparato de Golgi (mediante un péptido señal presente en la cadena Ii), hasta el compartimiento del MHC-II (MIIC) en el lisosoma. De modo posterior la cadena Ii es degradada por la acción de enzimas proteolíticas (familia de la cathepsina), y como producto final de la degradación se obtiene el péptido Ii asociado a clase II (CLIP, por sus siglas en inglés: *class II-associated Ii peptide*). CLIP ocupa la hendidura de unión y es liberado cuando es asociado un péptido de mayor afinidad. El intercambio peptídico es catalizado por las moléculas tipo chaperonas HLA-DM/H2-M y HLA-DO/H2-O (en humano o ratón respectivamente). Las proteínas exógenas provenientes de patógenos, ganan acceso al MHC-II mediante fagocitosis o endocitosis. También las proteínas endógenas pueden ganar acceso al MHC-II mediante autofagia, proceso por el cual son degradados componentes celulares mediante los lisosomas. Los péptidos de longitud apropiada que serán ensamblados en la hendidura del MHC-II son de 10 a 16 aminoácidos y son generados por las proteasas del lisosoma, incluidas cathepsinas y asparagina endopeptidasas. Al final el complejo formado por el MHC-II/péptido proveniente de

un antígeno es transportado a la membrana celular y reconocido por el receptor de células T (TCR) específico del linfocito T CD4+. Una característica importante es que el correceptor CD4 del linfocito se une de forma selectiva a las moléculas de MHC-II en el dominio  $\beta 2$ , es por ello la restricción hacia esta vía (figura 7-6).

## PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ENDÓGENOS POR LA VÍA DEL MHC-I

La expresión de moléculas de MHC-I está presente en todas las células nucleadas, quienes en forma constante están presentando antígenos propios en su superficie. Este es un mecanismo de control que utilizan las células que con frecuencia están siendo monitoreadas por linfocitos T citotóxicos CD8+ o células asesinas naturales (NK) en busca de antígenos no propios. En las moléculas de MHC-I se asocian péptidos provenientes de proteínas sintetizadas por la célula. Cuando una célula es infectada por patógenos intracelulares como son los virus, éstos empiezan a replicarse utilizando la maquinaria celular (ribosomas) y es allí donde entran en contacto con las moléculas de MHC-I.

A nivel estructural, las moléculas de MHC-I están formadas por dos cadenas polipeptídicas, unidas de forma no covalente. Una cadena alfa o cadena pesada (44-47 kD) y una subunidad de 12 kD denominada  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2m$ ). La cadena alfa está formada por tres segmentos ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), el plegamiento de los segmentos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman la hendidura de unión para el péptido y el segmento  $\alpha 3$  se pliega para formar un dominio Ig; este segmento contiene un sitio de unión para el correceptor CD8 de los linfocitos T. Las moléculas de MHC-I se anclan en la membrana celular mediante una extensión de 25 aminoácidos hidrófobos, seguidos por un polipéptido de alrededor de 30 aminoácidos básicos localizados en el citoplasma, quienes interactúan con los fosfolípidos de la cara interna de la membrana celular. La cadena  $\beta 2m$  forma a su vez un dominio Ig que interactúa con el segmento  $\alpha 3$  de la cadena pesada. Sin embargo, la interacción entre estas cadenas es inestable, por tanto requieren de la unión del péptido a la hendidura formada por  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Dicha unión fortalece la interacción entre las cadenas  $\alpha 3$  y  $\beta 2m$ , quienes a su vez incrementan la unión del péptido. Por lo tanto, sólo el complejo formado por las moléculas de MHC-I unidas al pép-



**Figura 7-6.** Vía de presentación por MHC-II. En esta vía se presentan por lo general antígenos que son fagocitados o endocitados por las células presentadoras de antígenos. Los antígenos son transportados hasta el lisosoma para ser degradado, donde son asociados a las moléculas de MHC-II presentes en el MIIC. El complejo formado por la molécula de MHC-II y el péptido son transportados hasta la membrana celular donde son reconocidos por los linfocitos T CD4+.

tido son presentadas en la superficie de la célula, debido a que es la forma estable (figura 7-5).

Los péptidos asociados a moléculas de MHC-I son generados en el citosol por degradación de proteínas mediante proteasas citosólicas o por el proteosoma. Los péptidos que se producen son transportados hacia el RE mediante un sistema especializado de transporte denominado transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP por sus siglas en inglés: *transporter associated with antigen processing*).

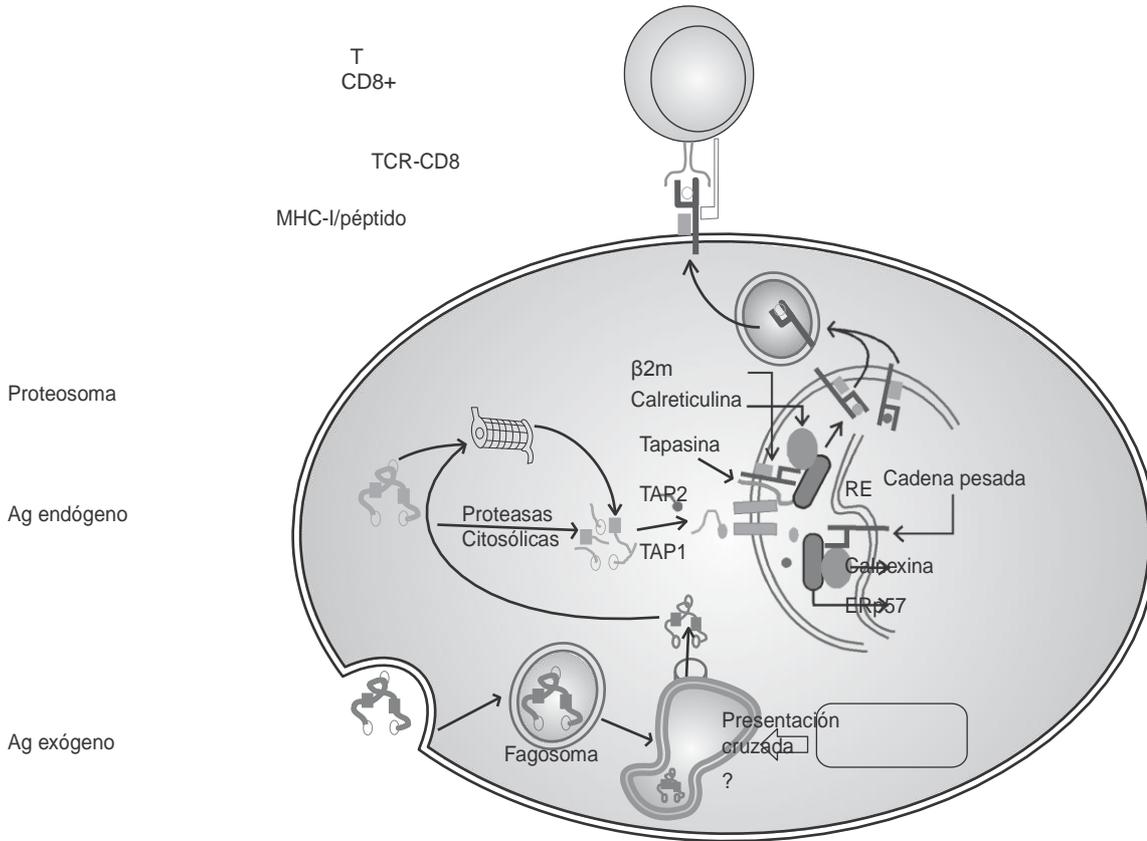
El complejo formado por TAP1 y TAP2 se encuentra asociado a la membrana del RE y conduce la translocación de los péptidos hacia el interior del RE, donde son cortados por aminopeptidasas para formar péptidos de 8 a 10 aminoácidos, los cuales se unirá a las moléculas de MHC-I.

El ensamblaje de la cadena pesada del MHC-I y la  $\beta 2m$  recién sintetizadas en el RE con el péptido es coordinado por el complejo formado por las proteínas TAP y varias chaperonas residentes del RE, tales como calnexina, calreticulina y tapasina. La calnexina y calreticulina se asocian al dímero formado por la cadena pesada del MHC-I y la  $\beta 2m$  vacías (sin péptido), que a su vez se encuentran asociadas con la tapasina.

Esta última forma un vínculo entre el dímero y las moléculas TAP que favorecen el ensamblaje del péptido. Al final, una vez formado el complejo MHC-I/péptido (forma estable) es liberado de la tapasina, con ello puede salir del RE hacia el aparato de Golgi y ser transportado hacia la superficie celular mediante vesículas (figura 7-7).

## PRESENTACIÓN CRUZADA

Como ya se ha mencionado, los antígenos exógenos son presentados de preferencia asociados a moléculas de MHC-II y los endógenos en MHC-I. Sin embargo, los linfocitos T CD8 pueden responder ante antígenos exógenos y los CD4 ante antígenos endógenos. Las células dendríticas y macrófagos pueden llevar a cabo un fenómeno denominado presentación cruzada, donde antígenos exógenos pueden ser unidos a moléculas de MHC-I y antígenos endógenos a moléculas de MHC-II. Los antígenos exógenos que son internalizados mediante fagocitosis o endocitosis pueden ser retrotraslocados hacia el citosol y ganar acceso a la vía de MHC-I (figura 7-7). Por otra parte, existen dos vías por las cuales proteínas endógenas pueden ganar acceso a



**Figura 7-7.** Vía de presentación por MHC-I. Los antígenos proteicos que se presentan por esta vía provienen del citosol (proteínas propias o patógenos intracelulares como virus). La formación del complejo MHC-péptido se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, para ser transportada hacia la membrana de la célula, donde es reconocido por linfocitos TCD8+.

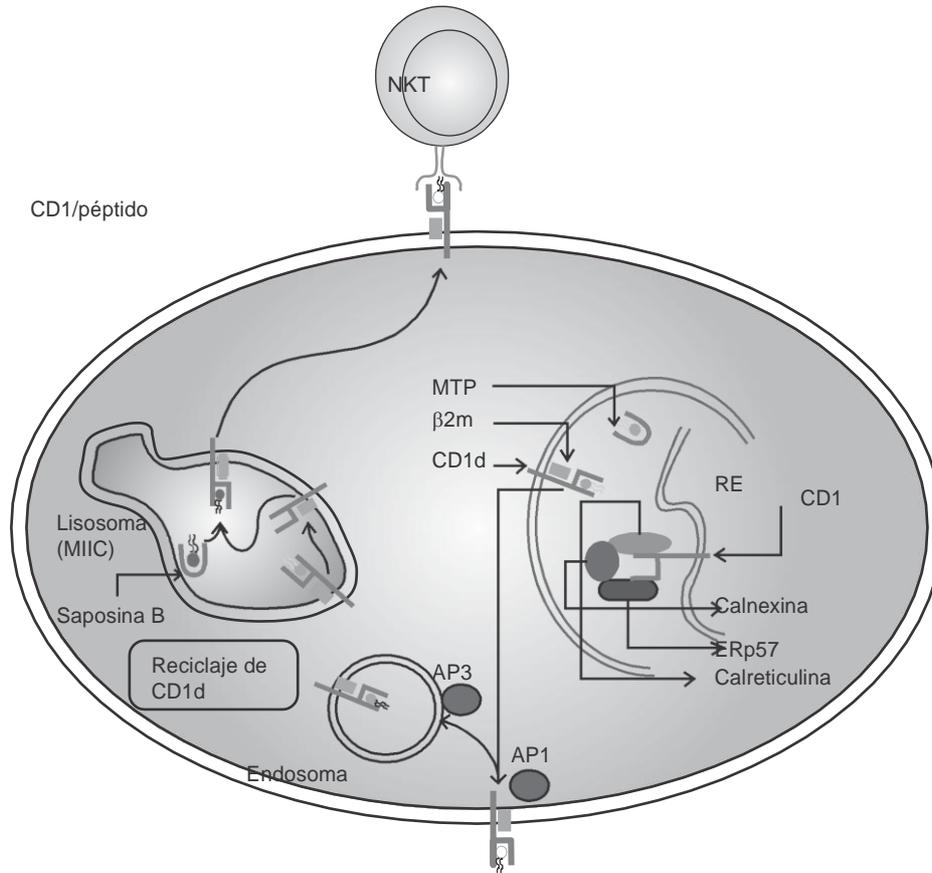
los lisosomas: mediante autofagia (macroautofagia) y mediada por chaperonas. En la primera, las proteínas solubles son envueltas por un autofagosoma que de modo posterior se fusiona con el lisosoma, de esa manera las proteínas son procesadas y asociadas a moléculas de MHC-I. La otra vía es dependiente de las chaperonas Hsc70, quienes transportan a proteínas o péptidos solubles dentro del compartimiento MHC-II, transportando las proteínas a través del conducto formado por la proteína asociada a la membrana del lisosoma 2 (LAMP2) (figura 7-7).

## PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS LIPÍDICOS POR LA VÍA CD1

La identificación de la vía de presentación de antígenos a través del CD1, representa un mecanismo por el cual los linfocitos T pueden reconocer de manera específica antígenos lipídicos o glicolípidos. En humano se han identificado cinco isoformas (CD1a-CD1e), mientras que en ratón sólo se expresa CD1d

y en el cual se han reportado dos isoformas (CD1b y CD1c). Las proteínas CD1 se clasifican en dos grupos con base en la homología de su secuencia polipeptídica. El grupo 1 está conformado por las moléculas CD1a, b, c y el grupo 2 por la proteína CD1d. En las moléculas del grupo 1 se unen glicolípidos de origen endógeno y exógeno, y son reconocidos por varios tipos de células T (por ejemplo, linfocitos T: citotóxicos CD8+, CD4-CD8- y  $\gamma/\delta$ ). Una característica importante es que los antígenos asociados a moléculas CD1d son reconocidos de manera estricta por células NK.

La estructura de las moléculas CD1 está formada por una cadena pesada y se asocia de manera no covalente con una cadena ligera de  $\beta 2m$ . El polipéptido de la cadena pesada está formado por tres segmentos ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), contiene además un péptido señal que le ayuda a permanecer en la membrana del RE. La hendidura de unión al antígeno es formada por las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  orientada hacia el lumen del RE. Es seguido por el dominio  $\alpha 3$  que termina en una cadena de 6 a 10 aminoácidos, quienes forman una protuberancia del lado del



**Figura 7-8.** Vía de presentación por CD1. Los antígenos lipídicos (lípidos isoprenoides, esfingolípidos y fosfatidilinosítoles) son asociados a moléculas de CD1. En este esquema se presenta la vía del CD1d, donde el lípido (propio) se asocia con la molécula CD1 en el RE, de forma posterior es transportado hacia la membrana. Además, existe un reciclaje de esta molécula hacia el lisosoma (MIIC) donde se da el recambio del lípido (antígeno), para ser presentado en la membrana y reconocido por células NK.

citoplasma. El CD1 tiene una estructura muy parecida a las moléculas de MHC-I (figura 7-5). La asociación de las moléculas de CD1 al antígeno tiene lugar en los diferentes compartimentos o estadios de la ruta endocítica. La ruta completa para la asociación de los lípidos a las diferentes moléculas de CD1 (a, b, c, b y e) aún no se conoce con exactitud. El mecanismo por el cual los lípidos son cargados a las moléculas de CD1d ha sido descrito como modelo para la presentación de antígenos por las moléculas CD1. Se ha propuesto que los lípidos son unidos a las

moléculas de CD1d en el RE, tal vez mediado por la proteína transportadora de triglicéridos microsomales (MTP, por sus siglas en inglés: *microsomal triglyceride transfer protein*). Después, el complejo es trasladado hacia la membrana celular y reciclado por endocitosis. El endosoma tardío se fusiona con los lisosomas y es donde se da el intercambio de lípidos. El tráfico del complejo CD1 asociado al lípido, desde RE hacia la membrana celular y de modo posterior reciclados para fusionarse con el lisosoma, es mediado por un grupo de proteínas adaptadoras conocidas como AP1, AP2, AP3 y AP4 (figura 7-8).

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

**Guermónprez P, Valladeau J, Zitvogel L *et al*:** Antigen presentation and T cells stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;621–667.

**Moody DB, Porcelli AS:** Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nature Reviews Immunology.* Vol 3. 2003;11-22.

**Münz C:** Autophagy and antigen presentation. *Cellular Micro-biology.* 2006;8(6):891–898.

**Strawbridge AB, Blum JS:** Autophagy in MHC class II antigen processing. *Current Opinion in Immunology.* 2007;87-92.

**Trombetta ES, Mellman I:** Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23: 975–1028.

**Wearsch P, Cresswell P:** Antigen processing and presentation. *Nature Review immunology.* Poster. 2000

# Capítulo 2

## Caracterización del receptor CD205 porcino

---

Characterization of porcine CD205. Flores-Mendoza L, Sotelo-Mundo RR,  
Dawson H, Mwangi W, Hernández J. Dev Comp Immunol. 2010.  
34(7):715-21.

## RESUMEN

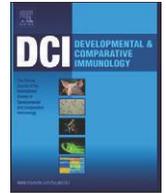
El receptor CD205 tiene un papel importante en la respuesta inmune, debido a que participa en la captura de antígenos y posteriormente facilita la interacción entre el antígeno endocitado (péptidos) y las vesículas del endosoma tardío que contienen las moléculas de presentación MHC-II. La expresión de este receptor está prácticamente restringido a células dendríticas y células epiteliales del timo y aun cuando macrófagos, células B y T, pueden expresarlo los niveles son extremadamente bajos. Este receptor ha sido caracterizado en varias especies de animales y se ha utilizado con gran éxito para promover respuestas específicas contra un antígeno determinado. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el receptor CD205 porcino y los niveles de expresión a nivel de ARNm en diferentes células y tejidos involucrados en la respuesta inmune. Los resultados obtenidos muestran que la secuencia completa del receptor está formada de 5172 pb, las cuales fueron amplificadas por PCR convencional a partir de cDNA de timo. Este gen codifica a una proteína de 1723 aminoácidos, con una estructura de 12 dominios extracelulares, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, este tipo de estructura es similar a la reportada para otras especies como humano, bovino, ratón, entre otros. Se distinguen entre estos dominios secuencias de aminoácidos que reconocen algunos carbohidratos sin embargo, no son funcionales. Además se distinguen en la región citoplasmática secuencias de aminoácidos altamente conservadas que inducen las funciones de internalización y reciclaje de moléculas a las vesículas del endosoma tardío. El receptor CD205 muestra una identidad del 85%, 83% y 81% con el bovino, humano y ratón respectivamente. Además se identificó la expresión relativa del receptor a nivel de transcrito de ARNm por RT-PCR en células y

tejidos porcinos. Respecto a esto se encontró que el timo fue el tejido con mayor expresión relativa en comparación a la expresión de ganglios inguinales, mesentéricos, sublinguales y el bazo. En los que respecta a las células evaluadas se generaron células dendríticas derivadas de monocito en estado inmaduro y maduro, además de células de Langerhans. Estas últimas expresaron en mayor proporción el receptor, mientras que la expresión en células dendríticas fue mínima. La caracterización del receptor CD2905 porcino contribuye al entendimiento del papel de este receptor en la respuesta inmune así como el desarrollo de estrategias novedosas para el direccionamiento de antígenos a células dendríticas en cerdo.



Contents lists available at ScienceDirect

# Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)

Short communication

## Characterization of porcine CD205

Lilian Flores Mendoza<sup>a</sup>, Rogerio R. Sotelo Mundo<sup>a</sup>, Harry Dawson<sup>b</sup>,  
Waithaka Mwangi<sup>c</sup>, Jesús Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera a la Victorias Km. 0.6, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>b</sup> Diet, Genomics, and Immunology Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD, United States

<sup>c</sup> Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX, United States

### article info

#### Article history:

Received 6 January 2010  
Received in revised form 18 February 2010  
Accepted 18 February 2010  
Available online 5 March 2010

#### Keywords:

CD205  
C type lectin receptors  
Swine

### abstract

Dendritic cells express a type cell surface receptor, CD205 that plays a role in antigen capture and delivery to the endocytic pathway. Besides DCs, high CD205 expression is also detected on thymic epithelial cells but B cells, macrophages, and T cells have limited or no expression. CD205 has been characterized in several animal species except swine. The aim of this work was to characterize porcine CD205 and mRNA expression on different cells and tissues involved in immune responses. A complete porcine CD205 sequence of 5175 bp was obtained from porcine thymus cDNA by PCR gene walking strategy and this gene encoded a protein of 1723 amino acids. The multi domain structure reported for murine, human, and bovine CD205 was also conserved in porcine with an overall amino acid identity of 74, 81, and 85%, respectively. Quantitative RT PCR analysis of the CD205 mRNA profiles in normal porcine tissues and cells showed that thymus and Langerhans cells expressed the highest levels. Further characterization of porcine CD205 will lead to better understanding of the role of this receptor and development of contemporary strategies for antigen targeting to DCs in swine.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dendritic cells (DCs) are phenotypically heterogeneous professional antigen presenting cells (APCs) distributed throughout the body where they play a key role in the innate and adaptive immunity against microbial pathogens and cancerous cells [1]. The DCs are the most specialized APCs in the immune system capable of optimal priming of naïve T cells to become antigen specific effectors and memory T cells [2,3]. The DCs capture, process, and present antigens to T cells in the context of major histocompatibility (MHC) molecules, and are endowed with a variety of receptors such as b2 integrins [4], Fc receptors [5], and C type lectin receptors [6] for capturing antigens [7]. CD205 is a C type lectin receptor expressed on interdigitating DCs in T cell zones of secondary lymphoid tissues, bone marrow derived DCs, and Langerhans cells, and CD205 expression increases with DC maturation [8,9]. The CD205 receptor is a type I transmembrane protein with a short cytoplasmic domain and its extracellular domain contains one ricin type beta trefoil (RICIN) domain, one fibronectin type II (FNII) domain, and ten C type lectin like domains (CTLDs) [6,10–12]. The CTLDs of the closely related mannose receptor family bind sugars like mannose, fucose

and N acetylglucosamine [13,14]. However, no specific ligand for CD205 has been identified and analysis of its sequence predicts that none of its CTLDs retains sugar binding capacity [6,15]. Recent work suggests that the CD205 C type lectin like domains 3–4 and 9–10, recognize ligands expressed during apoptosis and necrosis of multiple cell types [16].

The CD205 receptor has been characterized for several species including human, mice, sheep, and cattle. In mice, CD205 is predominantly expressed on DCs and cortical thymic epithelial cells [17]. In contrast, human CD205 is expressed at relatively high levels on myeloid blood DCs and monocytes, at moderate levels on B cells and at low levels on NK cells, plasmacytoid blood DC and T cells [18]. In mice, there is higher CD205 expression on Langerhans cells than dermal DC and in humans significantly higher levels of CD205 expression has been detected on nasal mucosal myeloid dendritic cell compared to oral mucosal DCs [19,20]. High levels of CD205 expression is evident on a heterogeneous population of bovine DCs in afferent lymph but the antigen is expressed at a lower level by B cells in PBMCs [12]. In addition, bovine CD205+ cells are evident in the skin and the gut epithelium. In sheep, CD205 expression has been detected on a major DC population in ileum and rectum [21]. The broad CD205 expression on heterogeneous DCs in lymphoid tissues and mucosal surfaces in different species suggests that it plays a critical role in DC function. The aim of this work was to

\* Corresponding author. Tel.: +52 662 280 0010; fax: +52 662 289 2400x294.  
E-mail address: [jhdez@ciad.mx](mailto:jhdez@ciad.mx) (J. Hernández).

characterize porcine CD205 by obtaining the complete sequence of the receptor and determine the mRNA expression in cells and tissues.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning of porcine CD205

Total RNA was isolated from porcine thymic tissue using RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and eluted from the column with RNase Free water (Ambion). One hundred microgram of total RNA was reverse transcribed in a 20  $\mu$ l reaction using Superscript II with 80 Units RNase Out and 1  $\mu$ g of Oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen). Reverse transcription was carried out at 42 °C for 55 min followed by 72 °C for 15 min and a further 37 °C for 20 min after adding 4 U RNase H. The cDNA was stored at -80 °C until used.

Alignment of the cDNA sequence encoding human, mouse, and bovine was used to determine consensus regions exceeding 17 nucleotides to design primers that were used in PCRs to amplify different regions of the porcine CD205 gene from thymic cDNA. Half a microgram of cDNA was used as template with 10  $\mu$ M of forward and reverse primers in amplifying porcine CD205 in a final volume of 50  $\mu$ l. The PCR amplification conditions were 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 50–58 °C (specific for each forward and reverse primers) for 30 s, 72 °C for 100 s and a final extension step of 72 °C for 10 min. Oligonucleotide sequences were also used to design primers nested within the 5' and 3' ends of the untranslated regions of the cDNA (UTR). For the amplification of the 5' UTR we used a DNA walking Speed Up kit II following the manufacturer's instructions (Seegene). For the first reaction, 50 ng of cDNA was used, 10  $\mu$ M of DW APC1 (primer provided by manufacturer), 5  $\mu$ M of specific primer (CD205 DW 1R), 10  $\mu$ l of 2x SeeAmp<sup>TM</sup> APC<sup>TM</sup> Master Mix II, and DEPC water for a final volume of 20  $\mu$ l. A second reaction was performed using the purified first PCR products (3  $\mu$ l) and 10  $\mu$ l of DW2 APCN (primer provided by manufacturer), and 5  $\mu$ l of specific primer (CD205 DW 2R), 10  $\mu$ l of 2x SeeAmp<sup>TM</sup> APC<sup>TM</sup> Master Mix II and distilled water for a final volume of 20  $\mu$ l. A third PCR reaction was performed using the second PCR products and 5  $\mu$ M of UniP2 (primer provided by manufacturer), 5  $\mu$ M of specific primer (CD205 DW 3R), 10  $\mu$ l of 2x SeeAmp<sup>TM</sup> APC<sup>TM</sup> Master Mix II and distilled water for a final volume of 20  $\mu$ l. The PCR primers used to amplify regions of the porcine CD205 from cDNA are listed in Table 1. All the amplified fragments were purified and cloned using the TOPO TA cloning system the University of Arizona. These

contiguous fragments were used to assemble a porcine CD205 cDNA sequence. The sequence was deposited in the GenBank with the accession number GQ420669.

### 2.2. Predicted structural and functional analysis

A phylogenetic tree comparing the predicted porcine CD205 protein with putative full length amino acid sequences of known CD205 proteins was generated using Clustal X (v2.0.11 European Bioinformatics Institute). The alignment was compared by Bayesian Markov chain Monte Carlo algorithms employing a strict molecular clock model and a chain length of 10,000,000 using BEAST v1.5.1 software in auto optimize mode [22]. Two independent runs of 2500 interactions were generated. The output was used to generate a consensus tree using Genious Pro (v4.7.4 Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Calculated posterior probability of monophylogeny is displayed on the nodes. Potential N linked and O linked glycosylation sites were predicted using random forest algorithm and pairwise pattern algorithm (Glycosylation Prediction Program (GPP), <http://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/>). The CD205 functional domains were predicted using the SMART architecture program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [23].

### 2.3. Cells and tissues

Single cell suspensions were prepared from the spleen, thymus, and lymph node (mesenteric, inguinal, and subinguinal) tissues of euthanized pigs. Monocytes were isolated from PBMCs by panning. Briefly, harvested PBMCs were seeded in Petri dishes at 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml in 10 ml and kept at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Adherent monocytes were collected using Accutase (Sigma). Monocyte derived DCs were generated according to Carrasco et al. [24]. Briefly, monocytes were cultured in DMEM containing recombinant porcine GM-CSF and IL-4 (20 ng/ml of each, Biosource) for 5 days at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator with replacement of half of the culture medium on day 2. Langerhans cells were obtained from overnight cultures of cut porcine skin layers (0.1–0.15 mm thick) as previously described by Bautista et al. [25]. Cut skin layers (0.1–0.15 mm thick) from euthanized pigs were incubated in culture medium overnight and Langerhans cells that separated from the skin were collected and isolated over Ficoll–Hypaque gradient.

### 2.4. Quantitative real-time PCR evaluation of CD205 expression profile in porcine lymphoid tissues

The expression profile of porcine CD205 in lymphoid tissues and cells was quantified by quantitative real-time PCR. Briefly, total RNA was extracted from cells and lymphoid tissues using the RNeasy kit (Qiagen) and cDNA was generated as described in the cloning of porcine CD205 above. The CD205 mRNA profiles in lymphoid tissues were quantified by quantitative real-time PCR using the Full velocity<sup>®</sup> SYBER<sup>®</sup> Green QRT-PCR Master mix (Stratagen). One hundred nanograms of cDNA was used in PCR reactions in amplifying the C terminal portion of pCD205 or the housekeeping gene (peptidylpropyl isomerase A, PPIA), using 20 nM each of the following primers: 205 Fwd 5' TAGATGGGCAAGTGTGGTGGAGT 3', 205 Rvs 5' CTTTCCAAGAGACTTTCCAGTAGCCA 3' and PPIA Fwd 5' GCCATGGAGCGCTTTGG 3', PPIA Rvs 5' TTATTAGA TTTGTCCACAGTCAGCAAT 3'. Real-time PCR was performed in One Step ABI PCR system (Applied Biosystems), and a melt (dissociation curve) was performed at the end of each run to confirm the absence of primer dimers. Data analysis of samples from cells and tissues were normalized against values

Table 1

| Primer name | Position of 5' end in reference sequence | Primer sequence          |
|-------------|--|--------------------------|
| CD205 1F    | 52                                       | GATGACGACAGGCTGCCTGA     |
| CD205 1R    | 920                                      | GCTTGTGGTCTGACCATCC      |
| CD205 2F    | 798                                      | AATAATCAAGGAGCTGATTTACTG |
| CD205 2R    | 1581                                     | TAACAGGTTTCTCCATGTCTC    |
| CD205 3F    | 2217                                     | GATTTACAAGGATCCTGGCAA    |
| CD205 3R    | 2857                                     | ATTTTTCACAGATGAAGGGCA    |
| CD205 4R    | 3560                                     | TCAAGATGATGAACCTCAACTT   |
| CD205 5F    | 3817                                     | GATGATGCTTACTGAGTGC      |
| CD205 5R    | 4177                                     | CAAAATTTATGCTTCTTCTTCTGG |
| CD205 6F    | 4707                                     | GTCCATCACGATGCCAGCAG     |
| CD205 6R    | 5612                                     | AAGGTAGATGCCTCTTCTTCTGG  |
| CD205 7R    | 93                                       | CTCCTCATGCTGCTTCTTCTGG   |
| CD205 8R    | 163                                      | CTGTGTTTTATTGACGATGGR    |
| CD205 DW 1R | 708                                      | GCTTCTTTCCAAGAAAGAGCTG   |
| CD205 DW 2R | 450                                      | GAAATTCACAAGGTCTCCATT    |
| CD205 DW 3R | 246                                      | TGGGTTTGGTTATGTCTAGG     |

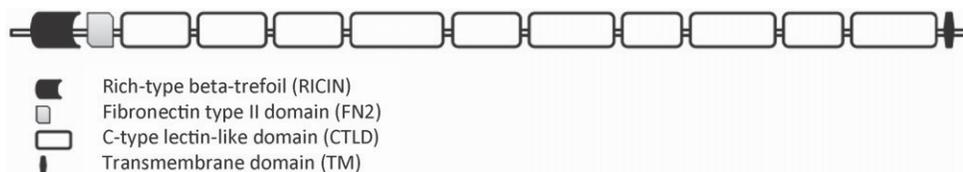


Fig. 1. Domain organization of CD205 protein predicted by SMART analysis.

the housekeeping gene, PPIA, and expressed  $_{as} 2^{-ACT}$ .

### 3. Results and discussion

The assembly of porcine CD205 yielded a 5175 bp cDNA sequence containing the entire predicted coding region. A schematic representation of the CD205 domains is illustrated in Fig. 1. The translated open reading frame of porcine CD205 is predicted to encode a 1723 amino acid protein (Fig. 2). Sequence analysis revealed that porcine CD205 was homologous to other species. The overall identity with bovine, equine, human, rhesus monkey, and mouse CD205 was 85, 82, 81, 80, and 74%, respectively (Fig. 1). Chicken CD205 exhibited only 49% amino acid identity to porcine CD205.

Thirteen potential N linked glycosylation sites were identified at amino acids 176, 345, 378, 494, 530, 866, 935, 1077, 1104, 1226, 1393, 1594, and 1643. The molecular weight of the human protein is 205 kDa due to 7 kDa of N linked carbohydrates [26]. Amino acids 452–455 of porcine CTLD 2 encode a conserved Glu Pro Asn (EPN) motif that is essential for mannose recognition in other C type lectins. This motif is conserved in human, equine, and rhesus CTLD 2 but not in bovine, mouse or chicken, and is likely to be non functional as only the CTLD 7 of chicken CD205 contains a Trp-Asn-Asp (WND) motif essential for  $Ca^{2+}$  binding. None of the CD205 sequences encode a Gln Pro Asp (QPD) motif essential for galactose recognition. Amino acids 1671–1693 of porcine CD205 encode the transmembrane region. Amino acids 1703–1708 of porcine CD205 encode a conserved FSSVRY motif that is responsible for initial clathrin coated pit mediated endocytosis. Amino acids 1713–1715 of porcine CD205 encode a conserved acidic EDE triad motif that potentially targets CD205 to late endosomes.

The evolutionary relationship between several CD205 homologues/orthologues is shown in Fig. 3. This relationship showed five branches; porcine and bovine CD205 form a separate clade, horse in other group, human and monkey in other group and mouse and chicken in separate groups (Fig. 3).

Quantitative RT PCR was used to determine the mRNA levels of CD205 in porcine cells and tissues. Monocytes isolated from PBMC by plastic adherence were more than 95% pure as determined by CD14 surface staining (data not shown). Monocyte derived dendritic cells (DCs) were obtained and confirmed by morphology and of porcine surface to be  $CD14^{low}$ ,  $MHC^{low}$ , and  $CD80/86^{low}$  (data not shown). Langerhans cells isolated from skin were shown to be  $CD14^{-}$ ,  $CD1^{+}$ ,  $MHC^{high}$ , and  $CD80/86^{high}$  (data not shown). Analysis of CD205 expression on these cells showed that Langerhans cells had the highest CD205 mRNA levels compared to monocytes and DCs (Fig. 4). In porcine tissues, the relative expression of CD205 mRNA was higher in the thymus followed by the lymph nodes (mesenteric LN and inguinal LN).

The CD205 molecule is an important DC antigen receptor and has been described in many species including human, mouse, monkey, horse, and chicken, because of the importance in the immune response and its potential of use in the targeting of antigens directly to DCs [26–29]. However, porcine CD205 has not been previously described. In this work we obtained the complete sequence

CD205 from thymus. Phylogenetic analysis revealed that the porcine CD205 protein was most closely related to bovine CD205. We then evaluated the relative expression of this receptor in different lymphoid tissues and cells; high expression was detected in thymus followed for mesenteric and inguinal lymph nodes, and Langerhans cells had the highest expression of all the cell types analyzed.

The cDNA sequence of the porcine CD205 indicates a putative mature type 1 transmembrane protein comprising a 32 amino acid signal sequence, 1640 amino acids in the extracellular regions, 22 amino acids in the transmembrane domain and 31 amino acids in the cytoplasmic tail. These characteristics are similar to all reported amino acid sequence for human, mouse, bovine, monkey, horse, etc [10–12,30,8,31,32]. The extracellular region of CD205 is composed of 12 protein domains, a ricin type beta trefoil (RICIN) domain, a fibronectin type II domain and 10 CTLD (Fig. 1). This arrangement of protein domains is characteristic of members of the CD205 and macrophage mannose receptor families [13,15]. These receptors bind carbohydrates on glycoproteins ligands and internalize them, but the specific ligand for CD205 is unknown. There are two distinct motifs on CD205 orthologues responsible for endocytosis and intracellular trafficking, and these motifs are conserved on porcine CD205 protein. A tyrosine (Y1707) containing motif is responsible for internalization through clathrin coated pits and next to it there are three acidic residues (EDE) that mediate localization to the late MHC II rich endosomes for processing and presentation to murine T cells [11,26]. The high level of conservation among the amino acid sequence of porcine, bovine, mouse, human, horse, and monkey CD205, particularly with this motif related with the internalization and trafficking of the molecule, suggests that this function is conserved across species. Although the specific ligand for CD205 receptor is not yet known, the amino acid sequence analysis of this receptor indicates some homology with the mannose receptor in the carbohydrate recognition domains. However CD205 does not contain the key amino acid motifs necessary for calcium coordination and sugar binding suggesting that it might have a unique ligand if there is one.

Similar to humans, mice, and bovine, porcine CD205 is highly expressed in the thymus [8,11,12,31,33]. The expression of CD205 on lymphoid organs and skin (Langerhans cells) was previously evaluated using flow cytometry and three major DCs populations were identified ( $CD4^{+} CD8^{-} CD205^{-}$ ,  $CD4^{-} CD8^{-} CD205^{-}$ , and

$CD4^{+} CD8^{+} CD205^{+}$ ). The expression of CD205 in these cells could be high, moderate or low. But the expression of CD205 using real time PCR only has been evaluated on immature and mature DCs [34] using monocytes as the reference point of comparison. This approach is not very reliable because monocytes do not express this receptor and comparisons will not be equivalent. We expected differential expression of this receptor on different lymphoid tissues but the relative expression that we found by real time PCR was very high almost similar to the level expressed on thymus, this expression can be attributed to the large number of DCs located in these tissues. The distribution of this receptor on lymphoid organs and non lymphoid organs of mouse, human, and bovine (only thymus) has been accomplished using commercial monoclonal antibodies [10–12,18]. Despite the relatively high interspecies



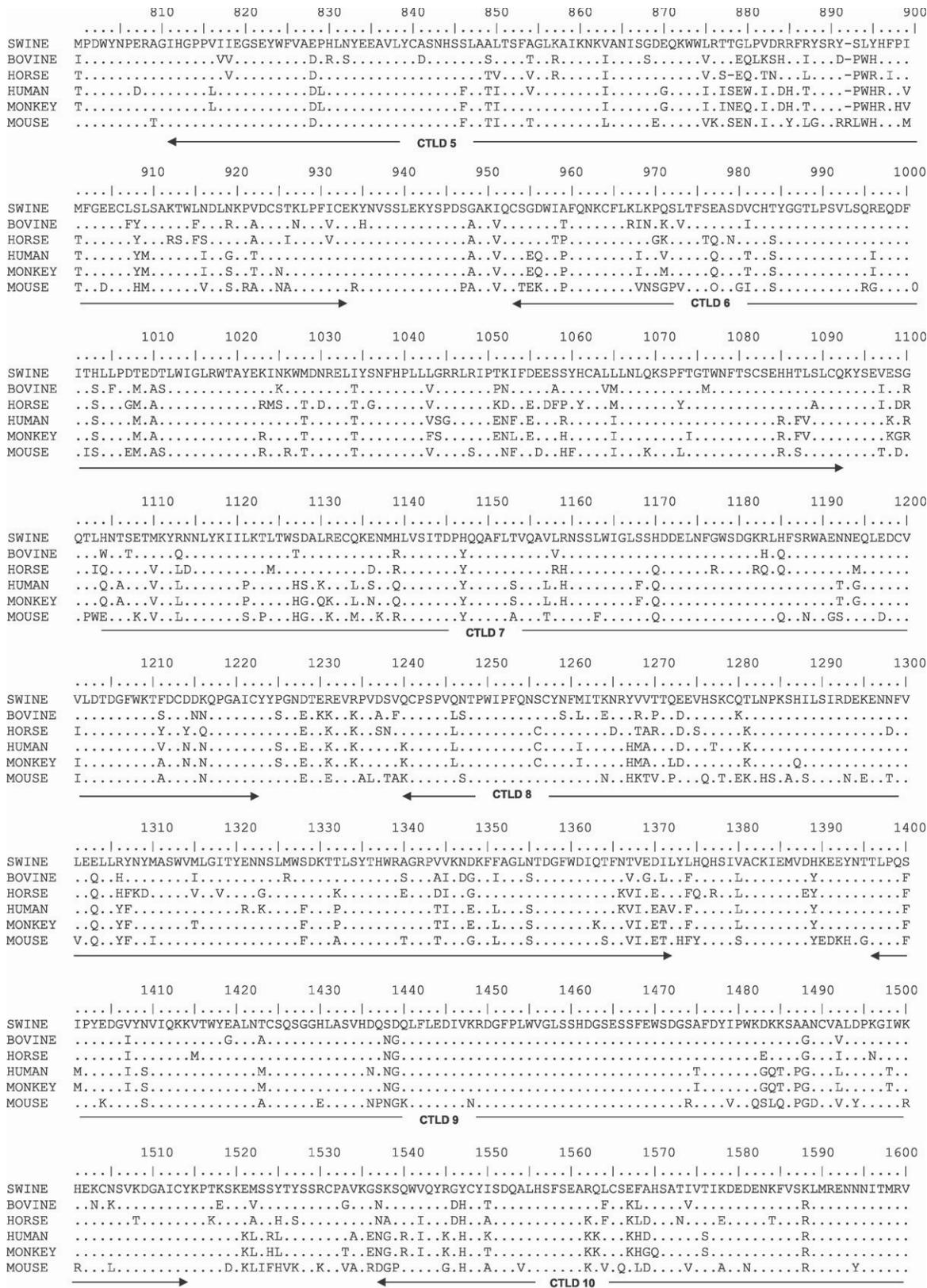


Fig. 2. (Continued)

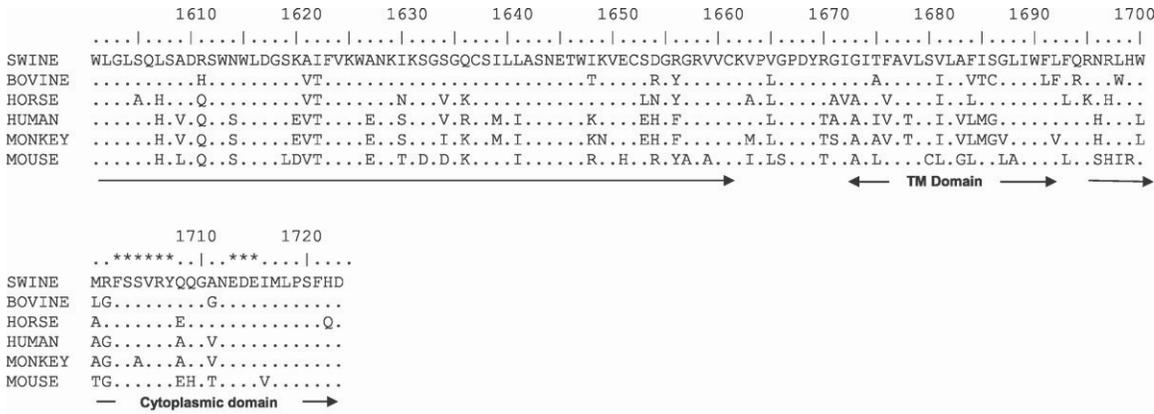


Fig. 2. (Continued).

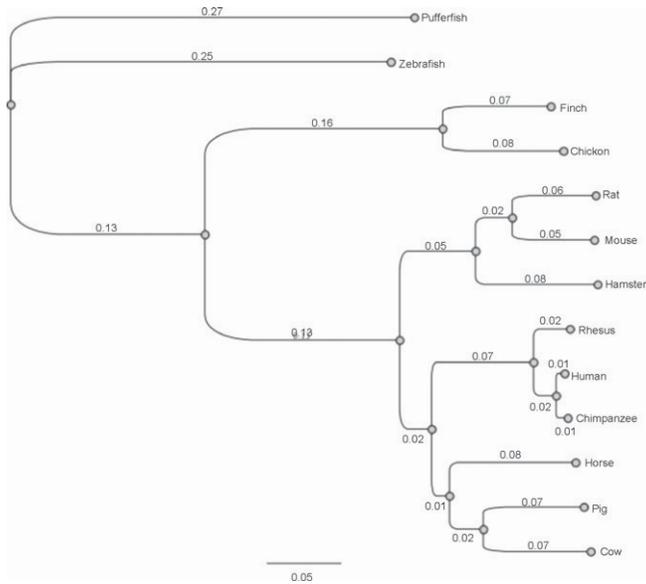


Fig. 3. Phylogenetic tree of vertebrate CD205 homologues/orthologues. Bayesian estimation of the evolutionary relationship among predicted sequences was estimated as described in Section 2. One of the two runs is displayed. Calculated posterior probability of monophyloeny is displayed on the nodes. The bar represents 5% estimated phylogenetic divergence. Sequences used in the construction are: Rat (XP\_001068965), Mouse (NP\_038853), Cow (NP\_001001158), Horse (XP\_001492711), Pig (this paper), Rhesus Monkey (XP\_001093552), Human (NP\_002340), Zebra Finch, Chicken (NP\_001032925), Hamster (Q920P9), Pufferfish (BAH59415), Zebrafish (XP\_695257), and Chimpanzee (XP\_515851).

homology of the protein, several commercially available antibodies to human, bovine or mouse CD205 do not recognize porcine CD205 by flow cytometry or IHC (Hernández, unpublished observations; Dawson, unpublished observations).

The cytoplasmic domain of CD205 has two amino acid motifs that can induce the internalization and delivery of ligands to the MHC II rich endosomal compartments [11,26]. A tyrosine based motif induces the internalization of the CD205 ligand complex via clathrin coated pits, and trafficking through late endosome and lysosomes, and back to the cell surface is mediated by an acidic EDE amino acid triad motif [11,26]. The CD205 can also deliver antigens into the MHC class I presentation pathway, suggesting that CD205 receptor mediated endocytosis may be coupled to a mechanism that promotes cross presentation [27].

CD205 has been utilized for antigen targeting to enhance T cell priming [9,26]. Antigens can be targeted to DCs in vivo to elicit antigen specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses when injected into mice [10,17,18,21]. Depending on the presence or absence of an additional activation signal (i.e. CD40 agonist), CD205 antigen targeting can result in either immunostimulatory or immunoregulatory effects, respectively. The targeting of antigens to DCs cell in vivo provides a tool to enhance induction of immune responses against antigens and to treat diseases.

In summary, cloning of porcine CD205 demonstrates that it is a highly conserved molecule between species (human, mouse, bovine, and pig). The predicted sequence is consistent with its role as an antigen uptake receptor. The domains most conserved were mainly those predicted to perform primary functions of internalization and trafficking to MHC II rich endosomes. The CD205 receptor

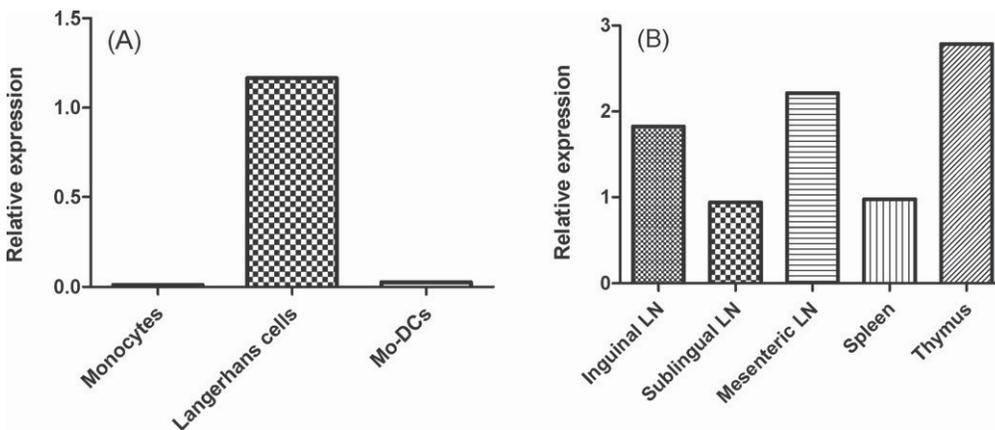


Fig. 4. mRNA expression of CD205 on cells and lymphoid tissues. Relative expression of CD205 was analyzed by real time PCR using the Full velocity<sup>®</sup> SYBER<sup>®</sup>Green. The relative expression was determined on cells (A) and lymphoid tissues (B). Langerhans cells had a higher relative expression of CD205 than monocytes and Mo DCs. The highest relative expression in lymphoid tissues was observed in the thymus, followed by mesenteric and inguinal lymphoid nodule. The relative expression was calculated using 2<sup>-ΔCt</sup> and normalized against the housekeeping gene PPIA.

is expressed in lymphoid, non lymphoid organs and Langerhans cells but at very low levels in monocytes and monocyte derived DCs. The biological role of CD205 and its broad expression on DCs shows its potential as an immunomodulatory target for vaccines and immune based therapies. Characterization of anti CD205 antibodies will lead to better understanding of the role of this receptor and development of contemporary strategies for antigen targeting to DCs in swine.

## Acknowledgments

This work was supported by SEP CONACYT project No. 82850 and TAMU CONACYT program.

## References

- [1] Moll H. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol* 2003;5:493–500.
- [2] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271–96.
- [3] Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5:296–306.
- [4] van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, Altin JG. Targeting dendritic cells with antigen containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res* 2004;64:4357–65.
- [5] Deo YM, Graziano RF, Repp R, van de Winkel JG. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R directed immunotherapies. *Immunol Today* 1997;18:127–35.
- [6] Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:77–84.
- [7] Tacke PJ, Torensma R, Figdor CG. Targeting antigens to dendritic cells in vivo. *Immunobiology* 2006;211:599–608.
- [8] Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Inaba K, Steinman RM. Tissue distribution of the DEC 205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC 145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 1995;163:157–62.
- [9] Trumppfeller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4<sup>+</sup> T cell immunity in mice with anti dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 2006;203:607–17.
- [10] Kato M, Neil TK, Clark GJ, Morris CM, Sorg RV, Hart DN. cDNA cloning of human DEC 205, a putative antigen uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics* 1998;47:442–50.
- [11] Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC 205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151–5.
- [12] Gliddon DR, Hope JC, Brooke GP, Howard CJ. DEC 205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. *Immunology* 2004;111:262–72.
- [13] Taylor PR, Gordon S, Martinez Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 2005;26:104–10.
- [14] Taylor PR, Martinez Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:901–44.
- [15] Llorca O. Extended and bent conformations of the mannose receptor family. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1302–10.
- [16] Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC 205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* 2009;46:1229–39.
- [17] Kraal G, Breeel M, Janse M, Bruin G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986;163:981–97.
- [18] Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, et al. Expression of human DEC 205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* 2006;18:857–69.
- [19] Allam JP, Niederhagen B, Bucheler M, Appel T, Betten H, Bieber T, et al. Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 2006;61:166–72.
- [20] Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001;167:741–8.
- [21] Akesson CP, Mc LPC, Espenes A, Aleksandersen M. Phenotypic characterisation of intestinal dendritic cells in sheep. *Dev Comp Immunol* 2008;32:837–49.
- [22] Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007;7:214.
- [23] Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5857–64.
- [24] Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S, et al. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 2001;104:175–84.
- [25] Bautista EM, Gregg D, Golde WT. Characterization and functional analysis of skin derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:131–48.
- [26] Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC 205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 2000;151:673–84.
- [27] Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC 205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 2004;199:815–24.
- [28] Bozzacco L, Trumppfeller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC 205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8<sup>+</sup> T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1289–94.
- [29] Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res* 2005;65:7007–12.
- [30] Maruyama K, Akiyama Y, Cheng J, Nara Ashizawa N, Hojo T, Sasaki K, et al. Hamster DEC 205, its primary structure, tissue and cellular distribution. *Cancer Lett* 2002;181:223–32.
- [31] Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, et al. Tissue distribution of the DEC 205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC 145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol* 1995;163:148–56.
- [32] Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM. DEC 205, a 205 kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC 145: purification, characterization, and N terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 1995;165:302–11.
- [33] Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, et al. A monoclonal antibody to the DEC 205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol* 2000;61:729–38.
- [34] Butler M, Morel AS, Jordan WJ, Eren E, Hue S, Shrimpton RE, et al. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205 DCL 1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology* 2007;120:362–71.

# Capítulo

## 3

### Desarrollo y caracterización del anticuerpo anti-CD205 porcino

## **RESUMEN**

El receptor CD205 dirige los antígenos que reconoce a vesículas donde se encuentran las moléculas de MHC-II, con cual favorece la presentación de antígenos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un anticuerpo monoclonal anti-CD205 y caracterizar la distribución de este receptor en diferentes tejidos y células dendríticas. A partir de la secuencia descrita del receptor se produjo una proteína recombinante del dominio CTDL-5 y se utilizó para inmunizar ratones y producir el anticuerpo monoclonal. Se obtuvo un anticuerpo del isotipo IgG1a que reconoce células en diferentes tejidos linfoides y en células dendríticas derivadas de monocitos. Para analizar la expresión de las células que expresan el CD205, se analizó la expresión del CD14, CD172a y MHCII. El anticuerpo tiene un isotipo de IgG1a y reconoce una proteína de aproximadamente 200kDa. El anticuerpo tiene un reconocimiento de alrededor del 25% en ganglios mesentéricos, inguinales, sublinguales y amígdalas, sin embargo, presenta una expresión menor al 5% en timo. Este anticuerpo también reconoce células dendríticas derivadas de monocito en estado inmaduro y maduro, con un aumento en la expresión de alrededor del 10 % tras el estímulo de maduración inducido con LPS. La expresión del anticuerpo anti-CD205 en ganglios y en células dendríticas está directamente relacionado con la expresión de la moléculas CD172a la cual es expresada con células mieloides, que por tamaño se puede deducir que son células dendríticas. El desarrollo de un anticuerpo monoclonal capaz de

reconocer el receptor CD205 en cerdos abre posibilidades de aplicar nuevas terapias que en otros modelos han tenido buenos resultados, en estas terapias se utiliza el anticuerpo anti CD205 unido a proteínas antigénicas.

## **Developmental and characterization on a porcine anti-CD205 monoclonal antibody**

Lilian Flores-Mendoza <sup>a</sup>, Carlos Velazquez <sup>b</sup>, Jocelyn Bray <sup>c</sup>, Leo Njongmeta <sup>c</sup>, Waithaka Mwangi <sup>c</sup>, and Jesús Hernández <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México;

<sup>b</sup>Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México;

<sup>c</sup>Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, Texas.

\* Corresponding author:

Jesús Hernández, Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6. Hermosillo, Sonora, C.P. 83000, México.

Phone +52 662 280 0010; e-mail address: [jhdez@ciad.mx](mailto:jhdez@ciad.mx), [jhdez@ciad.mx](mailto:jhdez@ciad.mx)

## Abstract

The CD205 receptor is a C-type lectin endocytic receptor and behaves as an antigen uptake/processing receptor for dendritic cells (DC). We had previously reported the molecular characterization of the receptor and its expression on lymphoid tissue, monocyte-derived dendritic cells and isolated Langerhans cells. The aim of this work was to investigate the distribution of this receptor on dendritic cells. We generated a monoclonal antibody anti-CD205 isotype IgG2a, which recognizes an epitope of the domain CTDL-5, this antibody detects a band of around 200 kDa by western blot on tonsil, mesenteric and inguinal lymph nodes cells. To analyze the expression of CD205 we select a population with phenotype CD14<sup>+</sup>, CD172a<sup>high</sup> and MHC-II<sup>high</sup> characteristic of dendritic cells to relate the anti-CD205 expression in this population. The results of flow cytometry show an expression about 30% of this receptor in mesenteric lymph nodes, followed by tonsil and inguinal lymph nodes with approximately 24%, while thymic expression does not reach 5%. Besides, the expression of CD205 on monocyte derived dendritic cells in immature state was 20%, this rate increases after a maturation stimulus (LPS) to 30%. While skin-isolated dendritic cells about 60% of the population expressed the receptor. The development of a monoclonal antibody capable of recognizing the CD205 receptor in pigs opens up possibilities of applying new therapies in pigs, using the anti-CD205 antibody bound to protein antigen, these strategies have been successful in other models.

Key words: dendritic cells, C-type lectin receptors, CD205.

## INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are specialized antigen presenting cells (APCs) that play an important role in the control of T cell immunity. Several DCs populations are known but the general functions are capture, process and present antigens to T cells in the context of major histocompatibility (MHC) molecules [1]. The DCs express receptors which are involved in the recognition and uptake of antigens, key points to achieve its activation and balance immune responses. These receptors are called PRRs (pattern-recognition receptors), the two most important groups are Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors (CLRs) [2]. The TLRs receptors induce intracellular signaling cascades after recognition of antigens which induce maturation and activation of DCs resulting on activation of the immune responses. On other hand CLRs receptors are important for recognition and internalization of antigens into intracellular compartments present in DCs, promoting processing and presentation of antigens on MHC class I and II molecules [3, 4]. Exist different groups of CLRs classified according to their domain structure (domain of recognition of carbohydrate-binding) and vary widely in ligand recognition [5]. CLRs expressed on DCs are dectin-1, CD-205, DC-SIGN, etc, which all belong to different groups [6]. One unique C-type lectin receptor, CD205 expressed on interdigitating DCs in T cell zones of secondary lymphoid tissues, bone marrow-derived DCs, and Langerhans cells, and CD205 expression increases with DC maturation.[7]. The CD205 receptor is a type-I transmembrane protein with a short cytoplasmic domain and its extracellular domain contains one cysteine-rich (CR) domain, one fibronectin type-II (FNII) domain, and ten C-type lectin-like domains (CTLDs) [4, 8-10]. The CD205 belongs to the mannose receptor (MR) family for the similitude of the CTLDs, although the MR ligands are well known (sugars like mannose, fucose, and N-

acetylglucosamine) no specific ligand for CD205 has been identified, an amino acid analysis of the receptor shows that no exist sites of recognition for these carbohydrates [11, 12]. However recent studies show that CTDLs 3-4 and 9-10 recognize ligands expressed during apoptosis and necrosis [13].

The CD205 receptor has been characterized for several species including human, mice, cattle and recently swine. In mice, CD205 is predominantly expressed on cortical thymic epithelia cells and there is a high expression on Langerhans cells than dermal DC. In contrast, human CD205 is expressed at relatively high levels on myeloid blood DCs and monocytes, at moderate levels on B cells and at low levels on NK cells, plasmacytoid blood DC and T cells [14]. In bovine, high levels of CD205 expression is evident on a heterogenous population of DCs in afferent lymph but is expressed at a lower level by B cells in PBMCs, while CD205<sup>+</sup> are evident in the skin and the gut epithelium [8]. In sheep, CD205 expression has been detected on a major DC population in ileum and rectum [15]. In swine, CD205 is expressed in lymphoid organs (mesenteric, inguinals and sublingual) and non lymphoid organs (thymus and spleen) as well as a high expression on Langerhans cells and low expression on monocytes [16]. Even when the expression of CD205 is variable in populations of DCs in the periphery the CD205 expression on DCs in lymphoid tissues in different species suggests an important role in DC function.

The roles of CD205 in antigen uptake, processing and presentation have however been well characterized and are relied on the use of monoclonal antibodies(anti-CD205) when any antigen is targeted to DCs by conjugation to an anti-CD205 antibody, the antigen is endocytosed, processed, and presented on both MHC class II and MHC class I molecules with high efficiency [17, 18]. The endoplasmatic domain of CD205 is responsible these effect, a tyrosine based motif

(FSSVRY) is responsible for initial clathrin-coated pit-mediated endocytosis, while an acidic triad motif (EDE) targets CD205 to late endosomes/early lysosomes, allowing endocytosed antigen to reach the vesicles rich on molecules of MHC class II [19].

The use of anti-CD205-antigen as therapeutic reagents has generated great interest for the ability of CD205 to deliver antigen to DCs for presentation on MHC class II and cross presentation on class I. When antigen is delivered to DCs *in vivo* via CD205 without an inflammatory stimulus, tolerance to the antigen is induced [17, 20]. But when a maturational stimulus is used with anti-CD205-antigen, specific responses could be watched, antigen-specific CD4 and CD8 T cells [17, 20]. This kind of response has resulted in vaccination against HIV antigens and cancer antigens in murine models [7, 18, 21].

CD205-mediated targeting of antigens to DCs is therefore a potential useful strategy for vaccine design and induction of enhanced protective immune responses against infectious diseases of food animals. The aim of this work was obtain is to develop a monoclonal antibody against porcine CD205 for future studies that include antigens coupled to the antibody as potential therapies for various diseases, as none of which are commercially available recognizes the porcine CD205 despite high homology between species of this receptor.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice and cell lines**

C3H/HeJ mice were used at 6–8 wk of age were maintained under specific pathogen free conditions and used under institutional guidelines. The cellular P3x63-Ag8653 line were cultured on complete media consisting on consisting of DMEM (Invitrogen Life Technologies, GIBCO)

supplemented with 10% heat inactivated FCS (Invitrogen Life Technologies, GIBCO), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen Life Technologies) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### **Isolation of PBMCs and tissues**

The spleen, thymus, and lymph node (mesenteric, inguinal and subinguinal) tissues were obtained from euthanized swine these tissues were macerated and the cells were collected on complete DMEM. Peripheral blood from pathogen-free pigs was collected into heparincoated collection tubes (Becton-Dickinson, BD), diluted 1:2 with DMEM (GIBCO), overlaid on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 500xg for 20 minutes. PBMCs were washed three in DMEM, and resuspended in complete DMEM. Monocytes were depleted by adherence.

### **Generation of monocyte-derived Dendritic Cells**

Dendritic cells (DCs) were generated as previously reported [22]. Briefly, freshly isolated PBMCs were placed in tissue culture flasks and incubated overnight at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> to allow monocytes to adhere. Non-adherent cells (lymphocytes) were removed by washing with DMEM and frozen for use in co-culture experiments. Adherent cells were cultured in complete DMEM containing 20 ng/mL of recombinant porcine GM-CSF (rpGM-CSF) and 20 ng/mL of recombinant porcine-interleukin (rpIL-4) (R&D Systems) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were incubated for 5 days with cytokine-containing medium replacement on day 3. Immature DCs were harvested on day 5 using cell dissociation enzyme-free Hank's-based buffer (GIBCO) and resuspended in complete DMEM. Mature DCs were induced with LPS 2ng/mL for 2 days of culture.

### **Skyn-isolated dendritic cells**

Normal porcine thinly cut split skin (0.3-0.4 mm) was obtained from pigs sacrificed. The split-skin was floated on complete DMEM medium and cultured in plastic Petri dishes. After 24 h of culture, the skin was removed and the medium containing the non-adherent migrated cells was harvested. These cells were spun down, counted, and used for determination of expression of the anti-CD205 by flow cytometry or relative expression by RT-PCR

### **Expression of a porcine CD205 CTDL5 fragment**

To generate protein for immunization of mice, an extracellular fragment of the CD205 receptor (CTDL5) was amplified by PCR using the primers pCD205F (5'-ATAGATCTCGGATCCTGGCAATGGAGT -3') and pCD205 R (5'-GAGATCTTTGGGCAACTTGGTACTACAGTC -3'), which introduced *Bgl II* and *BamH I* restriction sites at the 5' and 3' ends of the fragment, respectively, based on the reported sequence for porcine CD205, the CTDL5 was amplified [16]. The DNA fragment was sub-cloned into pCMV eukaryotic expression vector that has been modified to carry a human CD5 secretory signal sequence and a FLAG tag epitope to generate a construct designated pCMVCD6-CTDL5-FLAG. Three clones were sequenced and one good clone was used to generate endotoxin-free DNA (Gigaprep Kit, Qiagen) which was then used to transfect human embryonic kidney (HEK) 293 Free-Style cells using 293 Fectin transfection reagent (Invitrogen). Protein expression by the 293 Free-style cells was evaluated by immunocytometric analysis using the anti-FLAG M2 antibody (Sigma) and the expressed protein was recovered by affinity purification using anti FLAG-M2 agarose beads (Sigma). The protein was eluted from the column using low pH buffer and fractions containing the protein were pooled and concentrated using ultrafiltration

membranes (Millipore). The recombinant pCD205 protein was characterized on a 10% SDS-PAGE and storage to -20°C until immunization.

## **Production of anti porcine-CD205 MAbs**

### *Immunization*

Four male C3H/HeJ mice were immunized intraperitoneally with the recombinant protein CTDL-5. The first immunization was injected with 50 µgr of protein in 0.2 mL of CFA (Freud's Complete Adjuvant). Subsequent boost injections with 0.25 µgr of protein in 0.2 mL of IFA (Freud's Incomplete Adjuvant) were carried on 8 days later and then at 10-days intervals. Serum titers were detected by ELISA method after each booster. When a high titer was detected a final booster was done with 25µg recombinant protein in 0.2 mL of PBS 1x. The mice were sacrificed and their splenocytes prepared for fusion with mouse myeloma cells (*P3x63-Ag8653*) according to [23].

### Cell fusion

The mice with the highest polyclonal antibody titer was sacrificed, and splenocytes were fused with myeloma cells P3x63-Ag8.653 using polyethylene glycol (PEG 1500). The fused cells were propagated in hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) medium, plated in 96-well microculture plates at final concentration of 1 cell/mL. Supernatants of growth positive cells may be tested for mAb production as soon as the cells grow out.

### Hybridoma selection and subcloning

At 12 to 15 d after cell fusion, culture supernatants were screened for the presence of antibodies that recognized the recombinant protein CTDL-5 by ELISA. Then these positive clones were

transferred to 24-well plates. Seven days later, these multiclones were screened again for confirming. Once identified positive colonies were cloned by limiting dilution at final concentration of 1 cell/mL. The supernatants in this time were screened for the presence of antibodies by flow cytometry on thymic cells (the methodology is described in other section).

#### *Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

The coating antigen and MAb concentrations were optimized. To each well of a 96-well plate was added coating antigen solution (recombinant protein CTDL-5) in carbonate buffer (pH 9.6), and the mixture was incubated at 4 °C overnight. The plate was washed with washing buffer three times and added with 200 µL/well of blocking buffer, followed by the incubation at 37 °C for 1 h. After the blocking solution was removed and the plate was washed three times, 100 µL of supernatants was added to each well followed by the addition and incubated at 37 °C for 1 h. The plate was washed another three times, and goat anti-mouse IgG-HRP (1:5000, 50 µL /well) was added, followed by the incubation for 1 h at 37 °C. The plate was washed three times again, the substrate solution was added (50 µL /well), and then the plate was incubated for another 15 min at 37 °C. The color development was halted by adding stopping solution (50 µL/well). The absorbance was measured at 450 nm wavelength and corrected by a blank reading. Preimmune serum was carried as a negative control. A modified indirect ELISA was used to determine the MAb class and subclass.

Isotypes of the produced MAbs were determined by using Mouse Immunoglobulin isotyping kit (Hy-clone Labs, Inc., Logan, Utah) according to the manufacture's instruction.

#### *Purification of the MAb by affinity chromatography using protein-G or A*

The affinity-chromatography steps were at 4°C, the culture of the clones selected by the cloning was centrifuged at 1000g for 10 minutes. The supernatant was purified using protein A or G-sepharose (SIGMA) depending of the isotype of the antibody. First the column was washed with HCl 1mM, Glycine 0.1M pH 2.5 and PBS (Phosphate buffer solution) 1x pH 7.2 until neutralizing it. After wash the supernatant was applied at a flow rate of approx. 30ml/h and an another wash with PBS 1x for clean the column of serum proteins of t the supernatant. The bound antibody was eluted with glycine 0.1 M pH 2.5 on fifteen fractions ans neutralized with Tris 1 M pH 8. The eluted protein was concentrated was concentrated by ultrafiltration with an Amicon PM10 membrane or were pooled and dialyzed against PBS 1x PH 7.2.The antibody was quantified by Bradford (Sigma).

### **Dotblot and Western**

For western blot analysis, cells o different tissues (thymus, mesenteric and inguinal nodules) ( $5 \times 10^5$ ) were lysed in 100  $\mu$ l of RIPA 1x and a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science) for 20 minutes at 4°C with strong agitation each 5 minutes. After incubation the cells were pelleted and the supernatant was recollected and storage at -20°C. For electrophoresis the samples were boiling in sample buffer, resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), and probed with anti-CD205 clones. For Dot blot the recombinant protein of CTLD-5 was fixed on nitrocellulose membrane. For Dot blot and western blot the nitrocellulose membrane was blocked with 1% of BSA in PBS 1x for 1 hour, washed 5 times with PBS 1x and incubated with the antibodies (clones: 1.F6F6, 2.B3B8 and negative and positive controls) and incubated 2 hours at 3 $\mu$ grs/mL each and washed 5 times with PBS 1x and incubated with goat anti mouse Ig G-HRP 1:7500.

Finally the dots and the immunoreactive bands were revealed by horseradish peroxidase conjugate kit (BioRad).

### *Flow cytometry*

For detection of specificity of the clones 1.F6F6 and 2.B3B8 we used flow cytometry analysis of monocytes-derived dendritic cells, thymocytes, mesenteric, tonsil, subamxilar and inguinal lymphatic nodules were obtained from healthy swine and were suspended in cold PBS with 0.1% (w/v) BSA (SIGMA) and  $1 \times 10^6$  cells were stained for 2 hours at 4°C with each clone and 30 minutes with the commercial antibody. The antibodies used were a CD172a, MHC II, CD1 at a dilution of 1:200. Cells were washed with excess volume of cold PBA 0.1% and stained with Alexa-Fluor 488 conjugated goat anti mouse Ig G H+L (Invitrogen, molecular probes), and subjected to flow cytometry using a FACSCalibur (BD Bioscience). Appropriate isotype control of mAbs was used for negative controls. For detecting CD205 expression on different population we detect only the CD172a<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> that in swine are dendritic cells and express CD205. The data were analyzed using CellQuest (BD Bioscience).

## **RESULTS**

### *Recombinant CTDL-5 protein expression*

We previously reported the complete sequence of porcine CD205 [16] and the analysis of the CD205 sequence revealed an unique domain (CTDL-5) with no homologous sequence in other C-type lectin receptors present in others kinds of cells like natural killer cells (NK). This unique fragment, corresponding to residues 810-925 was amplified from thymic epithelial cell by PCR

using primers with flanking restriction enzyme sites. The PCR products were inserted into the vector pCR2.1 from the kit TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) and big amounts of plasmid was obtained from transform *E.coli* cells, and it was purified and used for obtain and insert the CTDL-5 domain into the multiple clonation site of pCMV II vector using these restriction sites; this fused the CTDL-5 domain to a CD6 signal sequence and a FLAG sequence. The CD6 sequence inserted permits the exit of the protein from the HEK-293 cells, while the FLAG sequence permit the detection of transfected cells with the plasmid and the purification of the protein in a posterior stages. The vector pCMV-CD6-CTDL5-FLAG and the empty vector were used to transfect HEK 293 cells. The expression of the protein in the cells was corroborated through a staining using the anti-FLAG M2 peroxidase antibody (SIGMA) and also verified that the vector sequence was in frame with the signal sequence (Figure 1). The protein obtained was analyzed by electrophoresis SDS-PAGE 10% obtaining an expected size of approximately 30 KDa (Figure 1).

#### *Production and characterization of Monoclonal antibody of CD205*

At 4 weeks after cell fusion, the hybridoma cell lines secreting anti-CD205 antibody were screened by ELISA. From this analysis 18 MAbs directed against the recombinant protein CD6-CTDL-5-FLAG were selected for subcloning at least three times using the limiting dilution method. The selected hybridomas could be directed to any domain of the complete recombinant protein CD6, CTDL-5 or FLAG for its nature and the selection method (ELISA) that use the recombinant protein like antigen and for this reason another ELISA was made with the supernatants selected using an irrelevant protein made it with the same system for discard the MAbs for CD6 or FLAG, 10 hybridomas were discarded. Another selection was made using flow

cytometry for discriminate those antibodies that have not recognition of the CD205 receptor in a native structure on cells, using the supernatants and thymic cells. We selected a population on thymus on basis to size and granularity beside the expression of surface molecules that are expressed for porcine dendritic cells like MHC-II and CD172a. Only two clones were recognized in thymic cells with a low recognition less than 10%. The clones were 1.F6F6 and 2.B3B8 and were cultures and the supernatant were purified and concentrated for specificity and expression analysis. The isotypes of MAbs were IgG2b (1.F6F6) and Ig2a (2.B3B8), and the concentrations of immunoglobulin were 0.22 and 0.85  $\mu\text{g/ml}$ , respectively after the purification by affinity chromatography using protein G or A. We did a SDS-PAGE 10% electrophoresis for detect two chains of an antibody and the concentrated antibodies were tested for specificity by dot blot using the recombinant protein CTLD-5 like antigen. Both antibodies recognized the recombinant protein using a concentration of 1  $\mu\text{g}$  and we use an irrelevant antibody purified with the same system to reproduce the conditions of synthesis and purification of the clones and used for negative control. This irrelevant antibody did not recognize the recombinant protein, were also tested sera from immunized and not immunized mice, we just observe a light spot in the immune sera. However when we used the clones 1.F6F6 and 2.B3B8 a higher spot was observed, both clones had the same intensity of stain produced what might indicate a similar recognition of both antibodies (Figure 3).

#### *Western blot*

As further confirmation of the presence of CD205 on the various lymph nodes and in monocyte-derived DC (MoDC), we performed western blot analysis to detect CD205 protein. We detected a single band of  $\sim 200$  kDa when used the antibody anti-CD205 clone 1.F6F6 however when we

used the clone 2.B3B8 we do not detect any band. The band of around 200 kDa was detected in all cell preparations tested except on thymus. Detection of the CD205 band was specific because when we used an irrelevant antibody or the immune and no immune sera any band is detected. Activation of MoDC using LPS increased the band of ~200 kDa markedly.

### ***Expression of the receptor CD205 on different tissues and dendritic cells***

#### *Flow cytometry*

The antibody anti-CD205 was used for determinate the expression of this receptor on thymus, mesenteric, tonsil, inguinal, submaxilar lymph nodes and monocyte derived dendritic cells. The evaluation was made with the same restriction of population in basis of anatomical location, size, granularity and markers expression. The receptor CD205 expression was 18.3% and 27.9% for tonsil and mesenteric lymph node, respectively. The expression of the surface markers was about 40% for CD172a and 59.6% for MHC-II for both lymph nodes. For thymus the expression was very low for CD205 2.5% and 8.4% for CD172a and 35.7% for MHC-II. This variation which could indicate a dependence on the expression of these two markers respects the CD205. For thymus the low expression could be due to the large number of lymphocytes present, because the epithelial cells are the positive for these receptor and are in lower proportion.

For the monocyte derived dendritic cells (Mo-DC) both of the antibodies (clones 1.F6F6 and 2.B3B8) had recognition in fact the clone 2.B3B8 was higher than 1.F6F6 in immature and mature Mo-DC. For the 1.F6F6 the expression was 6.9% and 16.3% for immature and mature Mo-DC respectively. While for 2.B3B8 the expression was 10.5% and 28.3 % for immature and mature Mo-DC respectively. The expression of the surface markers had a normal behavior the MHC-II increased with the stimuli of LPS of 79.4% to 85.7% and the CD172a do not had a

significant decrease for 65.2% to 62.4%. Other marker was evaluated for these cells CD14, these increased the expression of 31.5% to 44.5%.

For dendritic cells isolated from skin the expression of CD205 with the clone 1.F6F6 was higher respectively Mo-DCs and lymph nodes, the expression was 60% and the expression for the others receptors was similar to Mo-DCs a exception for CD14 with 1.5% but this is a characteristic of dendritic cells of skin.

## **DISCUSSION**

Recently it has been described the use of the CD205 receptor as a strategy for the targeting of an antigen to dendritic cells thereby modulating the immune response. However, none of commercial antibodies against CD205 are able to recognize the receptor on swine. Previously we described the porcine sequence and the aim of this work was develop a monoclonal antibody with recognition of CD205 receptor for subsequent use in pigs therapies. We did a recombinant protein for the CTDL-5 domain of the CD205 receptor in a eukaryotic system, with this protein we immunized mice for the production of antibodies, two hybridomas were selected for recognize the recombinant protein and thymic cells and then we evaluated the expression of this receptor on lymph nodules and dendritic cells.

We analyzed the amino acid sequence of the CD205 receptor and compared with reported sequence for this receptor in other species. The analysis showed that most of the domains had a great homology with lectin receptors of natural killer cells and macrophages, mainly. We select the domain CTDL-5 that had the lowest homology with other lectin receptors. Despite all the

antibodies reported anti-CD205 are directed at the extracellular Fibronectin type II domain [1] there are studies that shows that other domains are also able to recognize the CD205 receptor present on dendritic cells. Specifically, [14] produced an mAb that recognize the human CD205 receptor on myeloid dendritic cells, natural killer cells, etc. the IgG producing hybridomas was direct specifically to CTDL-1/2 fusion proteins. Shrimpton *et al.* (2009) found that the antibodies against the conjugation of domains CTDL-3/4 and CTDL-9/10 have recognition of apoptotic thymocytes by epithelial cells. The principal reason for an antibody against CD205 had not detection would not be have “hidden” the motive of recognition. However Llorca (2008) analyzed the three-dimensional structure of the receptors in the mannose receptor family and found that can exist in at least two configurations: an extended conformation with the N-terminal cysteine-rich domain pointing outwards from the cell membrane and a bent conformation where the N-terminal domains fold back to interact with C-type lectin-like domains at the middle of the structure. Then for these reasons we decide direct the antibody against CD205 to the CTDL-5 domain.

After obtaining the recombinant protein mice were immunized for obtain producer hybridomas for anti-CD205 antibody. At the final of ELISA evaluation 8 potential clones were obtained which were evaluated by cytometry to determine specificity on thymocytes cells, because in previous work we found that thymus had the highest relative expression of this receptor. However when we analyzed the cytometry results of specificity we found a very low positive cells less than 10%. Despite this low recognition of the antibody we found clearly two positive clones that recognize a define population of cells. These clones were 1.F6F6 and 2.B3B38. Noting the low recognition rates of anti-CD205 receptor in thymus we thought was due to evaluating the supernatant containing the antibody and the concentration at which he stood was low. When we

perform the purification and concentration of the antibody and we evaluated the expression on lymph nodes (mesenteric, inguinal, submaxilar, tonsil and thymus) and monocyte derived-dendritic cells and on lymph nodules cells, we observed the same situation on thymus the expression was very low in comparison with mesenteric and tonsil. The reason of this low expression could be because the receptor is expressed on epithelial thymic cells but the majorities cell on thymus are thymocytes and the proportion is very low. Is important to note that thymocytes (Thy<sup>+</sup> T lymphocytes ) express this receptor but the expression is restricted only to apoptotic or necrotic cells [13] and the expression of this receptor on live thymocytes is very low with the anti CD205 (directed to CTDL/2), some similar situation maybe occur with our anti-CD205 (directed to CTDL-5), because when we evaluated a thymus cell in a when the 60% were apoptotic and fixed with BFA we found a recognition of 80% of positive cells (Data not showed) similar with the reported by Shrimpton *et al.*, (2009). However we restricted the expression on CD205 to live cells and we ensure that 95% of cells were alive for starting the staining. CD205 receptor expression in thymus found by other authors in humans and mice [1, 9] , can be connected directly to the domain of the receptor to which the antibody was directed, where antibodies that have recognition in the thymus were directed to the fibronectin type II domain.

The high relative expression had been found in thymus previously [16] contrast with the results found in this work where the expression of cd205 by cytometry on thymus is very low. This could be explained with some information reported by Shrimpton *et al.*, (2009) which shows that the increased expression of the receptor by apoptosis on thymocytes is not associated with de novo synthesis of the protein, which could indicate that the mRNA expression of receptor must be increased.

The expression of CD205<sup>+</sup> cell on tonsils or mesenteric lymph nodes was around 20% on a selected population in basis at the anatomic location, size, granularity and surface markers that correspond in the majorities to dendritic cells. The expression of CD205 on monocyte derived dendritic cells in swine is higher on mature dendritic cell than immature dendritic cell, which agrees with the reported. Immature human and mouse DCs generated *in vitro* from monocytes up-regulate CD205 expression [24, 25]. In humans, CD205 is evident on mature monocyte-derived DCs, but weak or no staining was noted on other PBMC [26].

The expression of the receptor CD205 is dependent of the expression of the surface markers MHC-II and CD172a present on porcine dendritic cells, for a higher expression of CD172a and MHC-II a higher expression of anti-CD205. In summary, we develop an antibody that recognized the porcine CD205 receptor (a protein of about 200 kDa) which one is expressed on lymph nodes and monocyte derived dendritic cells and its expression is related with the expression of MHC-II and CD172a. This antibody could be used for the development of strategies for antigen targeting to DCs in swine.

## **Table legends**

**Table 1. Selection of the hybridomas by ELISA.** After the fusion the selection of the hybridomas was made by ELISA using the recombinant protein against the CTDL-5 domain of the CD205 receptor and other irrelevant recombinant protein (rpGM-CSF-FLAG) for eliminate

the hybridomas against the Flag-domain of the recombinant protein. The second selection of the hybridomas was made and 4 possible clones were resulting and tested by flow cytometry.

## **Figure legends**

**Figure 1. Recombinant protein of CD205 domain CTDL-5.** A) aminoacid sequence of the domain CTDL-5 express on the vector pCMV-II, used for transfection of the 293-HEK free style. B) transfected 293-HEK free style cells. the left picture are transfected cells with the empty vector and the right picture are transfected with the pCMV-II vector containing the CTDL-5 sequence.

**Figure 2. Evaluation of the clones anti-CD205 on thymocytes cells by flow cytometry.** The supernatant of four hybridomas positive by ELISA (1.F6F6, 2.B3B8, 2.E7C9 and 3.D10C4) was evaluated in thymocytes cells only two had recognition around 5% and these hybridomas was cultured for the production and purification of antibody.

**Figure 3. Evaluation of specificity of the clones 1.F6F6 and 2.B3B8 (anti-CD205) by dot blot and western blot.** A) The specificity of the antibodies anti-CD205 were tested by dot blot with the recombinant protein CTDL-5 domain: 1) the negative control (PBS), 2) an irrelevant antibody, 3) positive control antibody anti-FLAG M2, 4) and 5) the hybridomas 1.F6F6 and 2.B3B8, respectively and 6) the immune serum of immunized mice. B) Specificity of the clones in mesenteric lymph node: 1) negative control, PBS 1x, 2) the clone 1.F6F6, a band around 200 kDa was observed, 3) with the clone 2.B3B8 any band was detected, and 4) an irrelevant antibody.

**Figure 4. Distribution of the CD205 on lymphatic tissues.** Evaluation of the distribution of the receptor Cd205 on thymus, tonsils and mesenteric lymph node. The phenotype of the evaluated

cells suggests was dendritic cells present in this tissues and express the receptor CD205 to exception of thymus with a very low expression.

**Figure 5. Distribution of CD205 on dendritic cells.** evaluation of CD205 expression on monocyte-derive dendritic cells (immature and mature) and skin isolated dendritic cells. the expression of the receptor on skyn-isolated dendritic cells was very high around 60%, while on Mo-DCs was lower aroud 20%, similar to lymph nnodes, an increases after maturation of the cells with LPS around 30%.

Table 1.

| First selection hybridomas by ELISA |          |        | Second selection hybridomas by ELISA |          |
|-------------------------------------|----------|--------|--------------------------------------|----------|
| Hybridoma                           | rpCTDL-5 | rpFLAG | Hybridoma                            | rpCTDL-5 |
| 1.C6                                | +++      | ++++   | 1.F6B6                               | ++       |
| 1.C11                               | +++      | ++++   | <b>1.F6F6</b>                        | ++++     |
| 1.D2                                | ++       | ++++   | 1.F6G10                              | ++       |
| <b>1.F6</b>                         | ++++     | +      | 2.B3B2                               | ++       |
| 1.G8                                | +++      | +++    | <b>2.B3B8</b>                        | +++      |
| <b>2.B3</b>                         | ++++     | +      | 2.B3D9.....                          | +        |
| <b>2.E7</b>                         | ++++     | +      | <b>2.E7C9</b>                        | ++++     |
| <b>2.D4</b>                         | +++      | -      | 2.E7D10                              | ++       |
| 3.B7                                | ++       | +++    | 2.D4F8.....                          | ++       |
| 3.C8                                | ++++     | ++++   | <b>3.D10C4</b>                       | ++++     |
| <b>3.D10</b>                        | ++++     | +      | 3.D10F3                              | ++       |
| 3.F5                                | ++       | ++++   | 4.D11.G3                             | ++       |
| <b>4.D11</b>                        | +++      | +      | 4.F9C9                               | ++       |
| <b>4.F9</b>                         | ++++     | +      | 7.E4D7                               | ++       |
| 5.B6                                | +++      | +++    |                                      |          |
| 5.G8                                | ++       | ++++   |                                      |          |
| 6.C3                                | ++       | ++++   |                                      |          |
| 6.F11                               | ++       | ++++   |                                      |          |
| <b>7.E4</b>                         | ++       | +      |                                      |          |

Figure 1.

**A**

YWFVAEPHLNYEEAVLYCASNHSSLAALTSFAGLKAIKNK  
VANISGDEQKWWLRTTGLPVDRRFRRYSRYSLYHFPIMFGE  
ECLSLSAKTWLNDLNKPVDCSTKLPFICEK

**B**

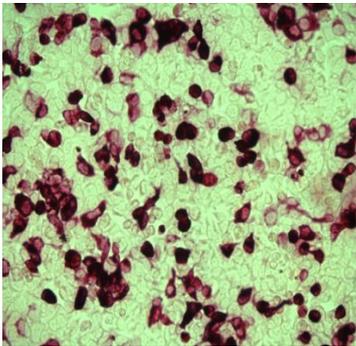
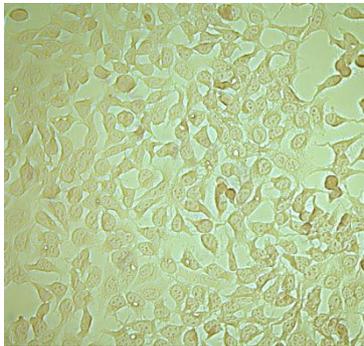


Figure 2

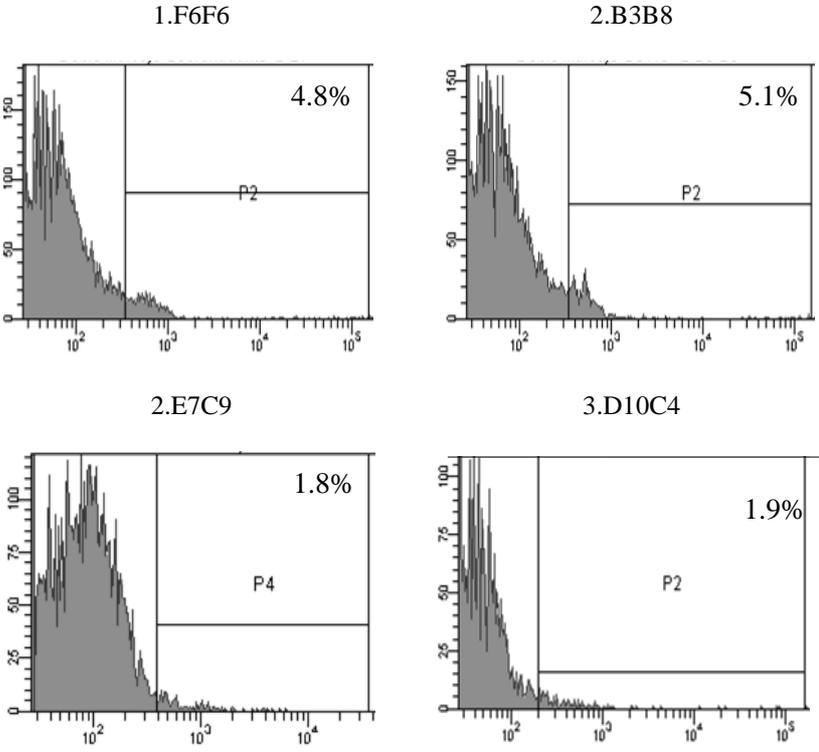
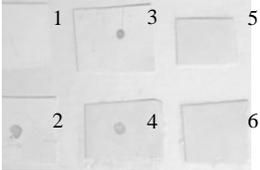


Figure 3.

**A**



**B**

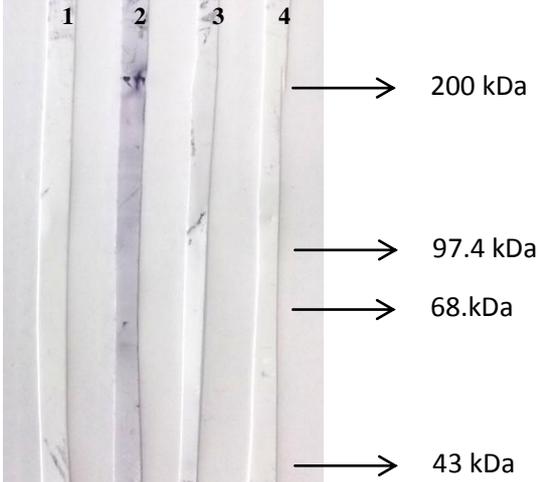


Figure 4.

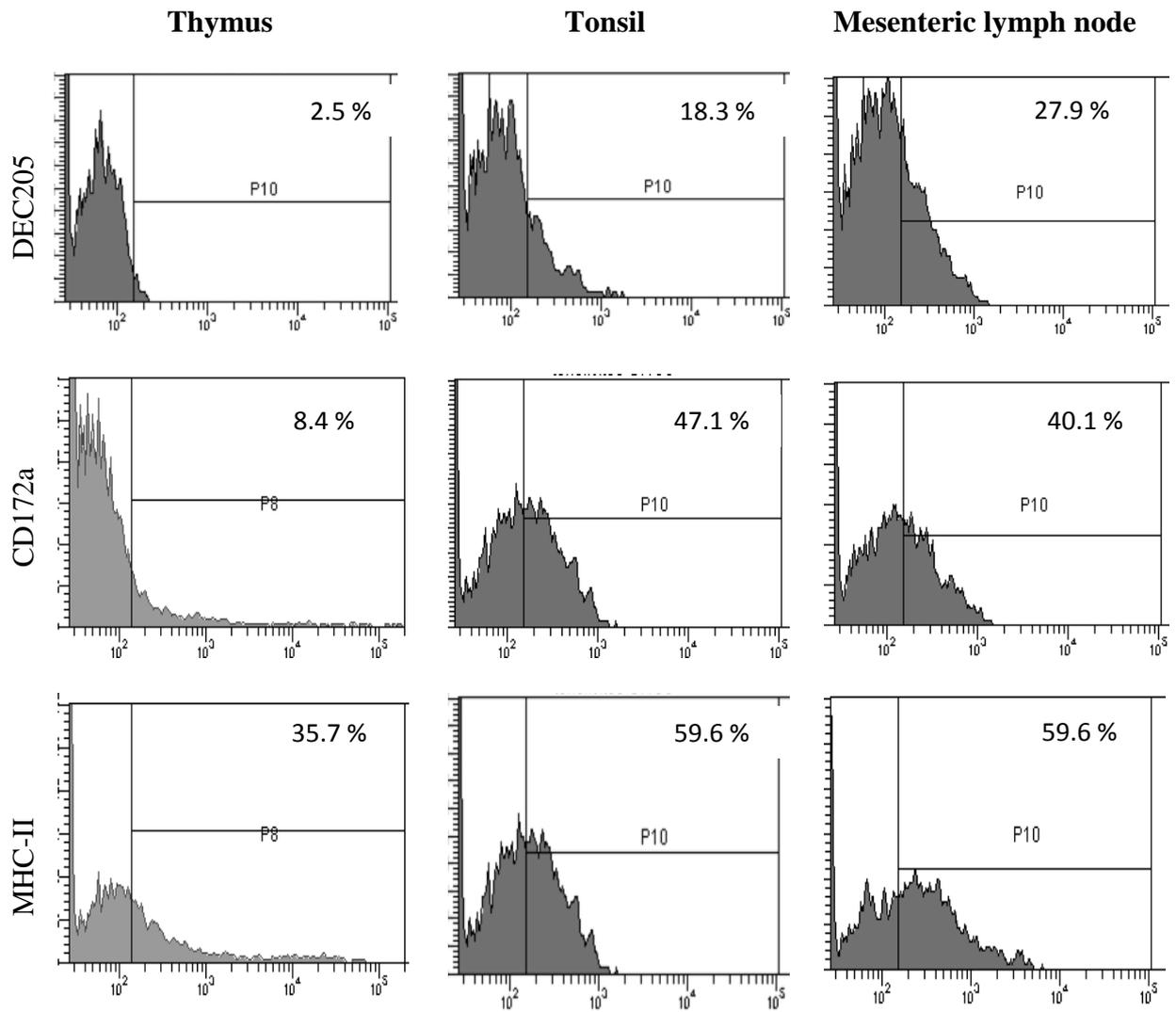
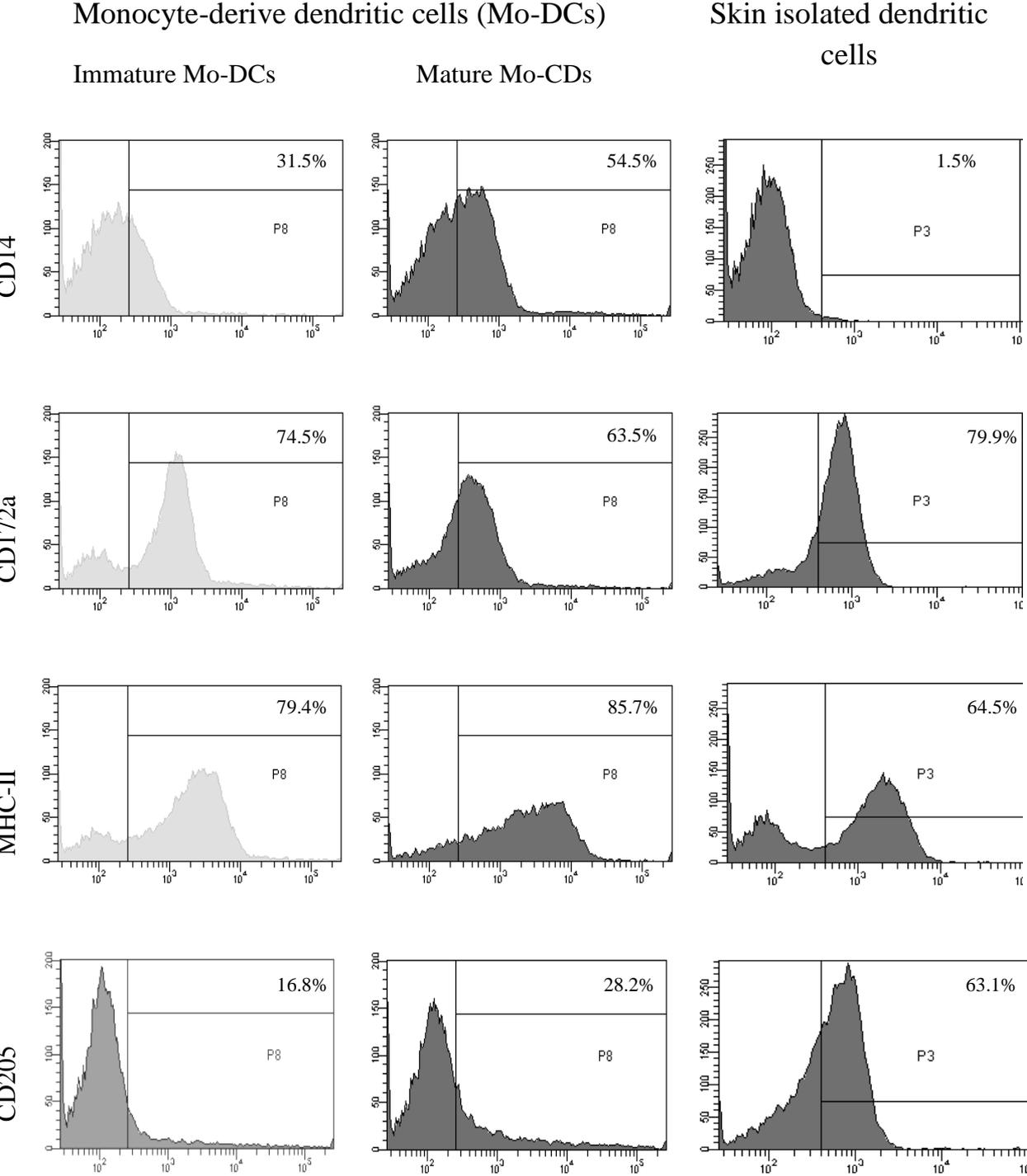


Figure 5.



## REFERENCES

- [1] Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunological reviews*. 1997;156:25-37.
- [2] Diebold SS. Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009(188):3-30.
- [3] Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Current opinion in structural biology*. 1999;9(5):585-90.
- [4] Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews*. 2002;2(2):77-84.
- [5] Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature immunology*. 2006;7(12):1258-65.
- [6] Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal*. 2005;272(24):6179-217.
- [7] Trumppheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(3):607-17.
- [8] Gliddon DR, Hope JC, Brooke GP, Howard CJ. DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. *Immunology*. 2004;111(3):262-72.
- [9] Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995;375(6527):151-5.
- [10] Kato M, Neil TK, Clark GJ, Morris CM, Sorg RV, Hart DN. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics*. 1998;47(6):442-50.
- [11] Llorca O. Extended and bent conformations of the mannose receptor family. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(9):1302-10.
- [12] Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in immunology*. 2005;26(2):104-10.
- [13] Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular immunology*. 2009;46(6):1229-39.
- [14] Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International immunology*. 2006;18(6):857-69.
- [15] Akesson CP, Mc LPC, Espenes A, Aleksandersen M. Phenotypic characterisation of intestinal dendritic cells in sheep. *Developmental and comparative immunology*. 2008;32(7):837-49.
- [16] Flores-Mendoza L, Sotelo-Mundo RR, Dawson H, Mwangi W, Hernandez J. Characterization of porcine CD205. *Developmental and comparative immunology*. 34(7):715-21.
- [17] Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(12):1627-38.
- [18] Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology*. 2000;151(3):673-84.
- [19] Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer research*. 2005;65(15):7007-12.

- [20] Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(6):769-79.
- [21] Bozzacco L, Trumfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(4):1289-94.
- [22] Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S, et al. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology*. 2001;104(2):175-84.
- [23] Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*. 1976;6(7):511-9.
- [24] Agger R, Petersen MS, Toldbod HE, Holtz S, Dagnaes-Hansen F, Johnsen BW, et al. Characterization of murine dendritic cells derived from adherent blood mononuclear cells in vitro. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;52(2):138-47.
- [25] Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *International immunology*. 2000;12(11):1511-9.
- [26] Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, et al. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Human immunology*. 2000;61(8):729-38.

# Capítulo

## 4

### Vacunación en cerdos

---

Flores-Mendoza, Lilian; Hernández, Jesús. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. 2010. Vet Mex 41(2):139-159.

## RESUMEN

El principio general de las vacunas es estimular de manera eficiente el sistema inmune e inducir una memoria inmunológica. De manera tradicional, la vacuna se define como una sustancia formada por un microorganismo completo atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente a dicho organismo. Las vacunas pueden ser aplicadas al organismo por varias rutas: intramuscular, subcutánea, intradérmica u oral. El esquema general de funcionamiento de una vacuna se basa en que una vez que el antígeno de la vacuna se encuentra dentro del hospedero, éste será reconocido por una población de células llamadas células dendríticas (DCs). Las DCs se activan y como consecuencia estimulan linfocitos B para la producción de anticuerpos y linfocitos T para la producción de citocinas (cooperadores) o actividad citotóxica (citotóxicos). Los anticuerpos se encargan de neutralizar virus, bacterias o toxinas, las citocinas regulan una respuesta inmune encaminada a la erradicación del patógeno, y la citotoxicidad elimina las células infectadas con virus o con bacterias intracelulares. Las vacunas se pueden clasificar en convencionales y de nueva generación en base a las metodologías utilizadas para su desarrollo. Las vacunas convencionales consisten en utilizar al antígeno completo o fracciones del mismo ya sea de muerto o vivo/atenuado. Mientras que las de nueva generación se basan principalmente en utilizar solo fragmentos del antígeno aplicando metodologías de ADN recombinante, vectores de expresión quimeras de proteínas antigénicas con otras que estimulen la respuesta

inmune. En el caso del cerdo, existen vacunas convencionales exitosas para ciertas enfermedades, sin embargo, esto no se presenta para la mayoría debido a que muestran desventajas evidentes como una escasa estimulación de la respuesta inmune hasta en algunos casos revestimiento de la enfermedad (donde se utilizan agentes vivos). Es por esta razón que nació la necesidad de aplicar nuevas metodologías en el desarrollo de vacunas, uno de los mejores ejemplos son las vacunas de ADN que han sido ampliamente desarrolladas, sin embargo, para algunos patógenos esto tampoco ha funcionado, y la búsqueda para una vacuna apropiada continua.

# Vacunación en cerdos

Lilian Flores-Mendoza, Erika Silva-Campa, Jesús Hernández

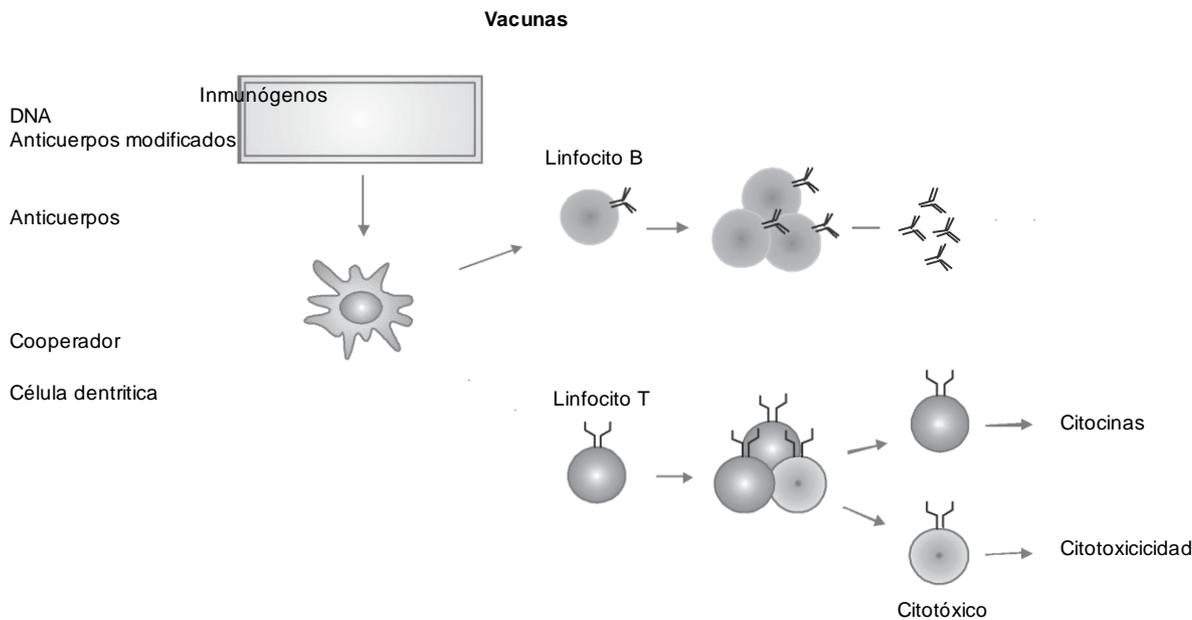
Durante el siglo pasado se demostró que la vacunación es capaz de proteger diferentes infecciones. Sin embargo, para muchas enfermedades tanto humanas como veterinarias, no existen vacunas o las que sí son poco efectivas para conferir inmunidad protectora, tal es el caso de la tuberculosis, el virus del SIDA, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), entre otros. Para muchas personas la vacunación está en su mayor parte asociada a la prevención de enfermedades ocasionadas por agentes infecciosos, pero hay otras enfermedades como el cáncer o las alergias, que no son causadas por patógenos y se pueden prevenir con la vacunación. Es obvio que este tipo de enfermedades no aplica para los cerdos, pero es importante tenerlo en mente.

Para entender cómo las vacunas logran prevenir o reducir los efectos de las enfermedades, la vacuna tradicional se puede definir como una sustancia formada por un microorganismo completo atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente a dicho organismo. El principio general de las vacunas es estimular de manera eficiente el sistema inmune e inducir una memoria inmunológica. Esto asegura que el cerdo incremente su resistencia a las enfermedades. Es por esta razón que se inoculan agentes patógenos (atenuados, muertos o fracciones) para simular el primer contacto del agente patógeno con el cerdo. Sin embargo, el reto es encontrar la “región más sensible” del patógeno, entendiendo ésta como el determinante antigénico o epítipo al cual están dirigidos todos los esfuerzos del sistema inmune. Lo anterior, es un punto que hoy en día se encuentra bajo constante investigación

por diferentes grupos de investigación. Cuando se logra caracterizar los elementos del agente infeccioso que pueden ser utilizados como epítipes, son la base para el diseño de una vacuna. Es importante señalar, que en ocasiones no es necesario identificar los epítipes, y la identificación de una parte del agente (alguna proteína del patógeno), puede ser suficiente.

Las vacunas pueden ser aplicadas al organismo por varias rutas: intramuscular, subcutánea, intradérmica u oral. Una vez que el antígeno de la vacuna se encuentra dentro del hospedero, éste será reconocido por una población de células llamadas células dendríticas (DC). Las DC se activan y como consecuencia estimulan linfocitos B para la producción de anticuerpos, o linfocitos T para la producción de citocinas (cooperadores), o la actividad citotóxica (citotóxicos). Los anticuerpos se encargan de neutralizar virus, bacterias o toxinas, las citocinas regulan una respuesta inmune encaminada a la erradicación del patógeno, y la citotoxicidad elimina las células infectadas con virus o con bacterias intracelulares. En la figura 21-1 se presenta de manera resumida los elementos del sistema inmune que son estimulados durante la vacunación.

Las vacunas pueden prepararse a base de inmunógenos, pero también pueden ser elaboradas a base de DNA o anticuerpos modificados. El reto para que una vacuna funcione de forma adecuada, es identificar los inmunógenos, DNA o anticuerpos modificados adecuados, situación que no es sencilla y se encuentra bajo una constante investigación. Los inmunógenos pueden ser virus, bacterias, parásitos u hongos, y se usan en su forma infectiva (modificada o atenuada) o inactiva. También pueden ser



**Figura 21-1.** Esquema que ilustra como las vacunas estimulan el sistema inmune. Células involucradas en la respuesta inmune frente a una vacuna o un inmunógeno. Una vacuna eficiente confiere protección mediante anticuerpos y respuesta celular tras la activación de linfocitos B y T por células dendríticas.

fracciones de estos agentes infecciosos, como proteínas de membrana, toxinas, o péptidos. Estos últimos se conocen como inmunógenos a base de subunidades. La mayoría de las vacunas que se usan en cerdos son inmunógenos a base de agentes infecciosos atenuados o inactivados, y en menor proporción a base de subunidades, estos tres tipos de vacunas son denominadas clásicas.

La principal característica de las vacunas vivas o atenuadas, es la capacidad de replicación del inmunógeno dentro del organismo huésped sin causar la enfermedad. En teoría estas vacunas son ideales pues dan lugar a una infección similar a la natural, sin embargo existe un riesgo latente de que el microorganismo vivo mantenga su actividad patógena e induzca la enfermedad. En comparación con la vacuna atenuada, en las vacunas inactivadas no existe riesgo de desencadenar la enfermedad ya que en este caso el microorganismo está muerto y conserva intactos sus subunidades proteicas responsables de la inmunidad. Sin embargo, en general la respuesta de este tipo de vacunas es menos duradera e intensa, además de necesitar en la mayoría de los casos de varias dosis para conseguir una inmunización completa. Las vacunas a base de subunidades se emplean cuando se conocen los componentes responsables de la patogenicidad de un microorganismo, son importantes inmunógenos, pero es nece-

sario obtener las proteínas purificadas o sintetizadas a nivel químico. A pesar de que la mayoría de las vacunas empleadas son clásicas, en la actualidad se trabaja en el desarrollo de vacunas capaces de desencadenar respuestas eficientes y duraderas. Una de las herramientas que en su mayor parte ha permitido este avance, es el desarrollo de la biología molecular y en particular la posibilidad de manipular el DNA.

Esta tecnología permite el aislamiento de un gen de interés a partir del microorganismo patógeno, e introducirlo en otro para obtener la proteína recombinante para su empleo como vacuna propiamente. Además de esta tecnología, el uso de la genética reversa también ha contribuido ampliamente en el desarrollo de vacunas mediante la identificación en el genoma de zonas relacionadas con fenotipos patógenos, los cuales pueden ser mutados o deletados para su empleo como vacunas. Todos estos nuevos prototipos de vacunas han sido llamados de nueva generación.

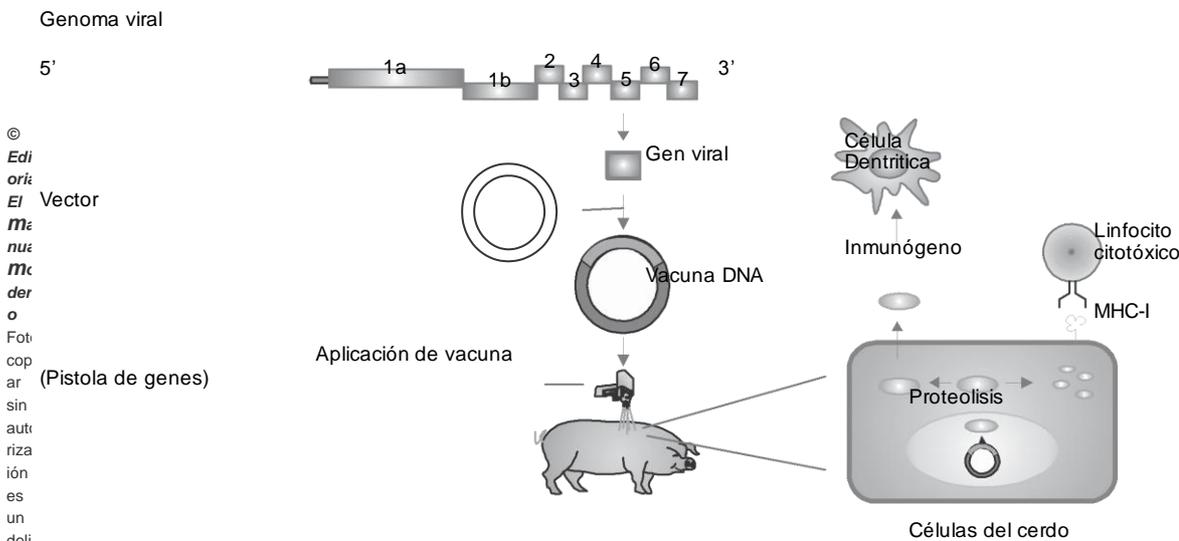
Una de las vacunas de nueva generación que en particular ha cobrado mayor auge son las vacunas de DNA. Estas vacunas se basan en la inmunización con un plásmido (DNA circular, que servirá de vehículo de la información genética), el cual contiene la información genética de uno o varios genes que codifican para proteínas inmunogénicas de deter-

minado patógeno. El plásmido actúa como un vector que permite la expresión del gen de interés en el interior de las células que son transfectadas como resultado de la inmunización (figura 21-2). La respuesta inmune generada, humoral o celular, ayuda al cerdo vacunado a contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su uso constituye una herramienta potencial en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune. Entre las ventajas que pueden atribuirse al empleo de las vacunas de DNA se puede mencionar: su capacidad para estimular una respuesta de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8 la cual no se logra con la mayoría de las actuales vacunas convencionales inactivadas o de subunidades recombinantes, además de que se obvia el empleo de vacunas vivas y las cuestiones de seguridad asociadas a este tipo de vacunación. Además de esto su bajo costo de producción y el hecho de que no requieren de cadena de frío para su distribución (dada su mayor estabilidad) son ventajas importantes en este tipo de vacunas.

Se han probado diversas rutas de inoculación del DNA plasmídico, entre ellas: intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, etcétera. La inmunización puede llevarse a cabo utilizando la inyección con aguja o con pistola de genes. Este último método garantiza una mayor eficiencia, ya que el DNA penetra al interior celular a diferencia de la inyección donde queda en el medio intersticial

y expuesto a la acción de nucleasas. Debido a ello se requieren dosis hasta 100 veces menores cuando se inmuniza con pistola de genes. Además se ha empleado la microencapsulación del DNA, lo cual estimula la respuesta inmune tanto celular como humoral. La ventaja de esta metodología es que no es necesaria la revacunación, ya que se espera que el inmunógeno sea producido de modo constante. Hay muchas vacunas de este tipo, pero en cerdos todas ellas se encuentran en fase experimental y para algunas enfermedades estos resultados son muy alentadores. Sin embargo, para otras enfermedades se han buscado nuevas estrategias de vacunación pues no se observa ningún resultado prometedor.

Además de uso de plásmidos como vectores en la expresión de proteínas antigénicas se han utilizado vectores vivos de expresión que aumentan la respuesta y que pueden funcionar como adyuvantes. Aun cuando este modelo sólo se encuentra en fase de experimentación podría ser de gran ayuda en el futuro. Se han utilizado como vectores de expresión bacterias (*Salmonella typhimurium* y el BCG de *Mycobacterium bovis*) y virus (adenovirus, virus de la viruela, entre otros). En este modelo el gen de interés del antígeno puede ser expresado en la membrana de la bacteria o en el genoma de los virus para que sea detectado por el sistema inmune del huésped o para que se replique la proteína de interés en el huésped una vez que es infectado por el virus vehículo.



**Figura 21-2.** Esquema que ilustra la generación y mecanismo de acción de las vacunas a base de DNA. En primer lugar se elige del gen que confiere protección y la inserción de dicho gen en un vector de expresión adecuado y eficiente. Posteriormente los eventos que se llevan a cabo dentro de las células del cerdo, como la traducción de la proteína, su captura y presentación, tendrán como resultado final una respuesta inmune.

---

Existen otras estrategias utilizadas como vacunas, una de ellas se basa en la utilización de anticuerpos modificados que dirigen al antígeno a un determinado grupo de células, de manera principal, células dendríticas y sus receptores. Esta estrategia es una herramienta nueva que se utiliza sólo en modelos experimentales, no en el cerdo. Consiste en utilizar anticuerpos que reconozcan receptores en las células dendríticas y que estimulen su activación y respuesta, mientras que en la región Fc se modifican para que expresen un péptido para un determinado antígeno. Una vez que el anticuerpo es inyectado por vía subcutánea, reconocerá el receptor en la célula dendrítica, será endocitado, degradado y el péptido será presentado asociado a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Al final, la DC se encargará de estimular una respuesta de linfocitos T.

En la producción porcina, es posible decir que todas las enfermedades de los cerdos (y otras especies animales domésticas) podrían prevenirse con la vacunación. Sin embargo, la limitante es que se desconocen muchos de los mecanismos inmunes relacionados con la protección frente a cada agente infeccioso en particular. Además, existe poco conocimiento sobre el tipo de inmunógeno más adecuados, el alcance y consecuencias de las vacunas a base de DNA y los anticuerpos modificados son aun un sueño en la industria porcina.

---

## **CRITERIOS PARA PROGRAMAR LA VACUNACIÓN EN CERDOS (CÓMO ELABORAR UN CALENDARIO DE VACUNACIÓN)**

---

En la elaboración de un programa de vacunación es necesario tomar en cuenta dos aspectos básicos:

- a) Enfermedades en la granja o en la región.
- b) Vacunas disponibles.

### **ENFERMEDADES EN LA GRANJA O LA REGIÓN**

Este es quizás uno de los aspectos más importantes en el diseño de un programa de vacunación: identificar el o los agentes infecciosos que afectan o ponen en riesgo los cerdos de la granja. Para deter-

minar las enfermedades endémicas de la granja, es necesario considerar el historial de la granja. Las granjas con más tiempo en actividad tienen mayores posibilidades de presentar un número superior de agentes infecciosos que las nuevas. El historial clínico y serológico serán fundamentales. Si no existe un historial serológico será necesario diseñar un muestreo para determinar la prevalencia en la granja y por área productiva. Con la información serológica y el apoyo del historial clínico, se puede suponer el tipo de agente o agentes infecciosos presentes. Sin embargo, para confirmar este supuesto, es recomendable utilizar algunas pruebas de laboratorio como el PCR o el aislamiento para confirmar su presencia. Con esta información se podrán conocer cuáles son los agentes infecciosos de la granja y que área productiva presenta el mayor riesgo. La figura 21-3, muestra de manera ilustrativa y simple un perfil serológico, en el cual se identifican los anticuerpos maternos, es decir, aquellos que han sido adquiridos durante el nacimiento. También se observa el momento en el cual se supone ocurre la infección, ya que en las siguientes semanas incrementan de nuevo los anticuerpos. Como se describió antes, esta suposición se confirma con pruebas de laboratorio más específicas que determinan la presencia del agente infeccioso. De esta manera, se concluye que de la semana 5 a 6 es un momento ideal para aplicar la vacuna. Si se aplica antes, los anticuerpos maternos podrían interferir con la eficacia de la vacuna y después ya no sería de gran utilidad en disminuir o evitar la infección. La zona geográfica donde se encuentra la granja también se debe considerar para establecer el programa de vacunación. Es posible que el agente infeccioso no se encuentre en la granja, pero sí en la región, y si no existen las condiciones básicas de bioseguridad puede resultar un riesgo.

### **VACUNAS DISPONIBLES**

Una vez identificado el agente infeccioso, el siguiente paso es elegir la mejor vacuna disponible. En el caso de los cerdos se tienen básicamente tres tipos de vacunas disponibles:

1. Vacunas a base de patógenos con capacidad infecciosa (atenuadas)
2. Vacunas a base de patógenos inactivados
3. Vacunas a base de subunidades

Prevalencia de anticuerpos anti-agente infeccioso "X"

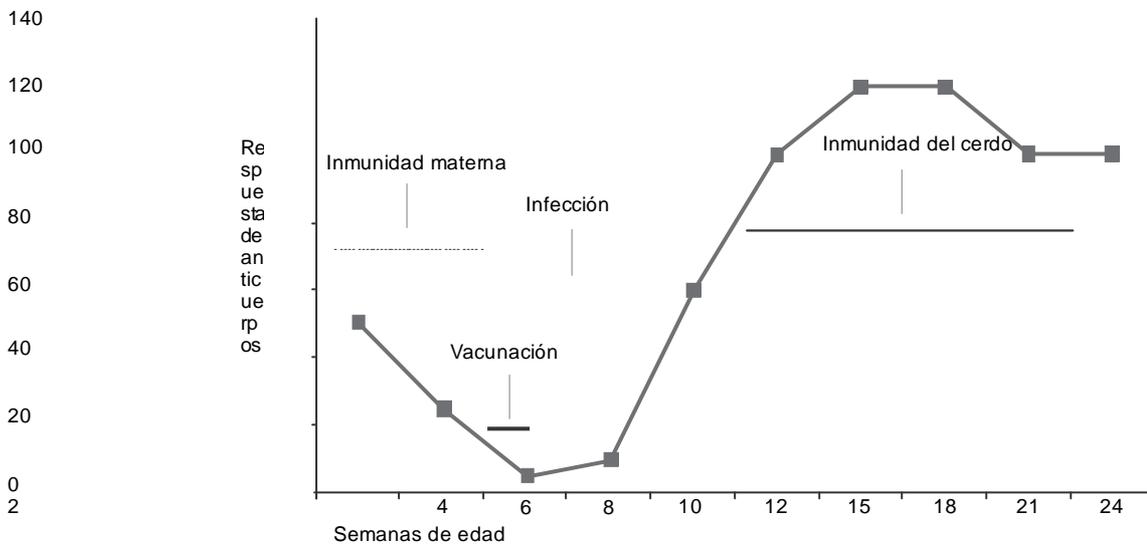


Figura 21-3. Esquema ilustrativo de prevalencia de anticuerpos en la línea de producción para determinar el momento ideal para la aplicación de una vacuna.

## Vacunas a base de patógenos con capacidad infectiva

Este tipo de vacunas se caracteriza porque el patógeno conserva su capacidad infecciosa, es decir, tiene la capacidad de replicarse e inducir cierto grado de enfermedad. En este caso el patógeno se atenúa o modifica para disminuir su agresividad. La ventaja de este tipo de vacunas es que permite mayor estimulación del sistema inmune, en especial la respuesta mediada por células (linfocitos T cooperadores y citotóxicos). Es por esta razón que este tipo de vacuna es útil en el control de las infecciones causadas por virus. Su desventaja es que en granjas o zonas de baja prevalencia, el virus vacuna puede diseminarse a otras áreas o granjas. Además, en el caso de virus con alto grado de variación genética, su eficacia se encuentra reducida en forma considerable. Por lo tanto, debe tenerse cuidado al decidir utilizar este tipo de vacunas dentro de un programa de vacunación.

## Vacunas a base de patógenos inactivados

Consisten en patógenos que han sido tratados químicamente o por calor, y han perdido su capacidad infecciosa, pero conservan sus características estructurales (proteínas, lípidos, etcétera). Su gran ventaja es que son seguras, ya que no existen riesgos para que los cerdos vacunados desarrollen la enfermedad. Su

desventaja, es que tienen menor capacidad para estimular el sistema inmune, en especial la respuesta celular y requieren de un adyuvante. Por lo general son más eficientes en estimular respuesta de anticuerpos. Estas vacunas son comunes para el control de enfermedades causadas por bacterias y virus. Por su seguridad, este tipo de vacunas son comunes dentro de los programas de vacunación de las cerdas del pie de cría, ya que la aplicación repetida asegura mejores resultados.

## Vacunas a base de subunidades

Este tipo de vacunas son muy similares a las vacunas a base de patógenos inactivados. La diferencia principal radica en que este tipo de vacunas no utiliza la totalidad del patógeno, sino sólo una parte de éste. Es común que este tipo de vacunas sea a base de toxinas o proteínas de membrana, las cuales se encuentran preparadas en un adyuvante para incrementar su inmunogenicidad. Son seguras, y si se han seleccionado los inmunógenos adecuados, pueden tener alto grado de eficacia.

## REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS QUE SE PUEDEN PRESENTAR EN LA VACUNACIÓN DE LOS CERDOS

Las reacciones secundarias que se pueden presen-

---

tan durante o después de la vacunación de los cerdos son:

- Incremento en la temperatura corporal, producto de la respuesta inmune inflamatoria.
- Diarrea, anorexia, depresión o vómito, en cerdos débiles o enfermos.
- Inflamación en el sitio de inyección que con frecuencia desaparece en los siguientes días de aplicación. Este tipo de reacciones se presenta en los cerdos más pequeños.
- Granulomas en el sitio de inyección, producto de la respuesta inmune.
- Abscesos consecuencia de jeringas contaminadas con bacterias.
- También se pueden presentar reacciones alérgicas, en los siguientes minutos a la aplicación de la vacuna.
- Se puede presentar cojera o dolor, dependiendo del sitio de aplicación.
- En cerdas gestantes se pueden presentar abortos, fetos muertos o momificados.
- En sementales se puede alterar la calidad del semen.
- Si se utiliza en combinación con inmunosupresores (p. ej., corticosteroides) la eficacia de la vacuna disminuye.
- Si se aplica en cerdos recién infectados con virus inmunosupresores, como es el caso del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), la eficacia de la vacuna disminuye.

---

## **EJEMPLOS PRÁCTICOS DE LA VACUNACIÓN EN CERDOS**

---

### **SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)**

Es la enfermedad más importante en la industria porcina nacional e internacional. Es causada por un virus que recibe el mismo nombre de la enfermedad “virus PRRS”. Esta enfermedad afecta a cerdos de todas las edades, y provoca problemas reproductivos y respiratorios. En cerdas infectadas se presentan abortos, sobre todo en el último tercio de la gestación. En cerdos en crecimiento hay problemas respiratorios que con frecuencia se asocian con otros agentes virales o bacterianos.

## **Inmunidad**

A la fecha no se conocen con certeza los mecanismos responsables del control de la enfermedad. Se ha descrito que la participación de los anticuerpos neutralizantes es básica para evitar la infección, aunque existen datos que contradicen esta teoría. En el caso de la respuesta celular, se considera que las células TCD4 productoras de IFN- $\gamma$  pueden participar en el control de la enfermedad, pero aún no existen datos contundentes al respecto. Por otro lado, se ha propuesto que la interacción entre el virus PRRS con las células dendríticas es responsable, al menos en parte, de la deficiente respuesta inmune durante las primeras semanas de infección.

## **Selección de inmunógeno**

En el mercado existen dos tipos principales de vacunas, una a base de virus vivo modificado y otra de virus inactivado. Además, en algunos casos ciertos productores utilizan autovacunas, las cuales consisten de suero virémico o bien un extracto de tejidos infectados. La vacuna de virus vivo modificado es quizás la más utilizada en la actualidad, sin embargo los resultados no son consistentes, en parte por la diversidad del virus. La vacuna de virus vivo inactivado es poco utilizada, y sus efectos son contradictorios. Las autovacunas representan una alternativa para aquellas granjas interesadas en evitar la introducción de nuevos virus. Sin embargo la principal desventaja es la posibilidad de introducir otros patógenos y causar serios problemas de salud. Si se compara el virus vivo respecto al inactivado, el primero induce una inmunidad más sólida que el segundo, aunque con una inmunidad cruzada que varía entre virus.

## **Criterios de cronograma de vacunación**

Es muy recomendable implementar un programa de vacunación en las cerdas de reemplazo, ya que a la fecha es el mejor sistema en el control del PRRS. Se recomienda utilizar virus vivo, para asegurar la inmunidad en las cerdas, sin embargo es necesario considerar las medidas de bioseguridad básicas, como el sistema todo dentro-todo fuera y un espacio en especial diseñado para este fin y alejado de la granja. La elección de utilizar virus vivo modificado o virus vivo en una preparación de autovacu-

---

depende del tipo de virus que circula en la granja, de los virus que circulan en las granjas vecinas y de la posibilidad de obtener una autovacuna segura.

Para la vacunación de los cerdos en la línea de producción, es recomendable utilizar virus vivo modificado. La vacunación en sábana 3 a 4 veces al año ha presentado resultados contradictorios, y aún no se han identificado las causas que han llevado a tener resultados inconsistentes.

## Vacunación emergente o en brote

Durante un brote de PRRS la vacunación en sábana de todo el pie de cría ha mostrado buenos resultados en general, ya que logra disminuir la circulación de virus y en consecuencia los problemas asociados al brote. Las observaciones de campo muestran que en la mayoría de los casos el uso de virus homólogo logra disminuir los problemas del brote, aunque en algunos casos se ha reportado un incremento en el número de abortos posvacunación. Por el contrario, el uso del virus vivo modificado en general es más “inocuo” que el homólogo. En términos generales, la elección de vacunación en un brote depende de la intensidad del mismo y del tipo del virus que está causando el problema.

## Riesgos de vacunación

Existen reportes que documentan brotes en granjas vecinas que usan virus vivo modificado. Sin embargo, han sido casos aislados y no hay más reportes al respecto. El virus PRRS tiene la capacidad de recombinarse y generar nuevas variantes; sin embargo, no existen evidencias contundentes que demuestren algo similar en cerdos vacunados, pero existe esta posibilidad. Como en el caso de todas las vacunas inactivadas, el uso de este tipo de vacunas en PRRS no presenta ningún riesgo pero tampoco asegura una inmunidad sólida.

## CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) afecta cerdos de todas las edades, pero es en los cerdos en crecimiento donde sus efectos son más significativos. El desmedro es quizás el signo más característico que este virus provoca, de allí que es considerado un factor fundamental en el síndrome del desgaste multisistémico posdestete. Los animales del pie de

cría son susceptibles a la infección, pero las consecuencias no están por completo claras.

## Inmunidad

Los mecanismos responsables de la inmunidad frente al PCV2 aún se desconocen. Se sabe que el PCV2 es capaz de modular la respuesta innata, de forma específica la respuesta de las células dendríticas. Además, hay evidencias que sugieren una habilidad para modular la respuesta de citocinas, incrementando la producción de IL-10. La respuesta humoral, con la respuesta de anticuerpos parece ser la responsable del control del virus, pero no se ha comprobado por completo esta hipótesis.

## Selección de inmunógeno

La proteína de la cápside codificada por el ORF2, es el antígeno del PCV2 con mayor inmunogenicidad. Esta proteína induce anticuerpos neutralizantes, así como una respuesta celular mediada por linfocitos cooperadores y citotóxicos. Otras proteínas no estructurales codificadas por los ORF1 y ORF3 son menos inmunogénicas, al menos para la respuesta humoral, ya que hay evidencias que demuestran que existen regiones inmunodominantes en proteínas codificadas por estos genes.

A nivel comercial existen dos vacunas principales, una de ellas utiliza una proteína recombinante expresada en sistema de baculovirus, y la otra un circovirus porcino tipo 1 modificado e inactivado, que expresa la el gen ORF2 del virus PCV2.

## Criterios de cronograma de vacunación

Las vacunas disponibles se recomiendan para uso en la línea de producción, con una o dos aplicaciones dependiendo de tipo de vacuna utilizada. En general, estos programas de vacunación ofrecen buenos resultados ya que disminuyen la circulación de virus y en consecuencia los efectos asociados a la enfermedad. Existen algunas experiencias en campo, que han usado este tipo de vacunas en la línea de producción con la intención de aumentar la inmunidad materna transferida a los lechones, pero aún son necesarios más estudios para evaluar sus efectos.

## Vacunación emergente o en brote

Ya que se trata de vacunas inocuas, en el sentido de que no se trata de “virus vivos”, su uso durante bro-

---

tes no representa ningún riesgo y por el contrario favorece una disminución en la circulación viral.

## Riesgos de vacunación

No se han reportado riesgos por el uso de esta vacuna. Algunas observaciones muestran efectos colaterales, pero asociados a la vacunación en sí y no por el uso de esta vacuna.

## INFLUENZA PORCINA

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria de los cerdos causada por el virus de la influenza porcina. Se encuentra distribuido ampliamente en el mundo, y los brotes se caracterizan por ser de alta morbilidad y de mortalidad menor a 5%. El virus de la influenza porcina es un agente inmunodepresor que aumenta la susceptibilidad a otras enfermedades virales y bacterianas oportunistas. También representa un riesgo zoonótico para las personas que se encuentran en contacto directo con los cerdos y además desempeña un papel crucial en la transmisión del virus de la gripe entre especies.

### Inmunidad

La inmunidad protectora frente al virus de la influenza porcina depende de elevados títulos de anticuerpos y la estimulación de la respuesta inmune celular de linfocitos cooperadores y citotóxicos. La inmunidad de anticuerpos antihemaglutinina se consideran fundamentales para evitar la infección. La actividad neutralizante de estos anticuerpos previene que se inicie la infección en la célula blanco bloqueando el sitio de unión del virus con la célula huésped. La respuesta inmune inducida por una infección protege contra la reinfección por el mismo virus u otros a nivel antigénico similares.

### Selección de inmunógeno

En el mercado existen varias vacunas para influenza porcina. Algunas son monovalentes, es decir, contienen sólo un tipo de virus: H1N1 o H3N2; sin embargo, la mayoría son bivalentes lo que significa que contienen ambos tipos de virus. En cualquiera de los casos, se trata de suspensiones de virus inactivado. Se sugiere que la aplicación se realice en la aclimatación de hembras de reemplazo y durante el último tercio de la gestación. Además de esta prác-

tica, las indicaciones de los laboratorios sugieren la aplicación de la vacuna en cerdos de producción, en destete y un refuerzo a los 15 días o al mes (PLM, 2009). Sin embargo no hay estudios que indiquen si alguna vacuna disponible en el mercado brinda protección a los cerdos ante el virus pandémico A/H1N1.

### Criterios de cronograma de vacunación

La vacunación no evita la infección, pero disminuye la secreción viral y los signos clínicos de la enfermedad. En general, son necesarias dos aplicaciones con 2 a 3 semanas de intervalo entre una y otra. Los programas de vacunación deben ser diseñados de acuerdo al estatus sanitario de cada granja, pero en general son dos los objetivos que se siguen con la vacunas contra el virus Influenza porcina: a) cuando se usa en el pie de cría lo que se busca es estabilizar la infección en esta etapa reproductiva y disminuir la circulación de virus en los lechones; b) cuando se usa en la línea de crecimiento se busca disminuir la circulación de virus y se utiliza en especial cuando se trata de algún brote, una infección endémica que requiere la eliminación del virus o en temporadas de riesgo como el invierno.

### Mycoplasma

El complejo respiratorio porcino es un padecimiento muy importante dentro de la industria porcina. Es causado por la interacción de diferentes agentes virales y bacterianos y entre estos últimos se encuentra el *Mycoplasma Hyopneumoniae* que además es responsable de la neumonía enzótica, una enfermedad respiratoria crónica de los cerdos. Además, es un importante factor que aumenta la susceptibilidad de los cerdos a otros agentes virales o bacterianos, gracias a la capacidad que tiene para modular la respuesta inmune. Su principal vía de transmisión es la aérea y el contacto directo con animales enfermos.

### Inmunidad

Una parte fundamental de la inmunidad frente al *Mycoplasma Hyopneumoniae* es la que adquieren los cerdos a través de la inmunidad materna, el calostro. El otro tipo importante de inmunidad es la que adquiere el cerdo tras una infección natural o por efecto de la vacunación. La respuesta humoral participa en la neutralización de algunos antígenos

---

bacterianos, pero se supone que la mayor participación en el control de la bacteria radica en la respuesta celular, de manera específica en las células productoras de IFN- $\gamma$ .

## Selección de inmunógeno

Las vacunas disponibles en el mercado para *Mycoplasma Hyopneumoniae* se basan de forma principal en cultivos totales de bacterias que son inactivadas, o bien en preparaciones que consisten en preparaciones membranales de las bacterias. De manera experimental, estas vacunas inducen una buena respuesta de anticuerpos frente a la bacteria. Sin embargo, la protección frente a la neumonía clínica es incompleta. La protección contra la infección es limitada y por lo general no evita la colonización de la bacteria en el tracto respiratorio. En campo, sin embargo, los efectos clínicos en una

población de cerdos vacunados frente a una población no vacunada son significativos. Esto demuestra que existen algunos mecanismos inmunológicos que la vacunación con este tipo de inmunógenos están generando que aún no se han identificado por completo.

## Criterios de cronograma de vacunación

No existe una fórmula que pueda aplicar a todas las granjas. Lo que es importante resaltar es que la vacunación en cerdas de remplazo que ingresan a la granja es fundamental, la re-vacunación en cerdas de segundo a tercer parto aumenta la inmunidad de la línea de producción, la vacunación de los sementales al menos una vez al año y la vacunación de los lechones al destete ayuda de manera significativa al control de los problemas asociados al *Mycoplasma Hyopneumoniae*.

---

## BIBLIOGRAFÍA

©  
Edi  
ori  
El  
me  
nu  
mc  
der  
o  
Fot  
cop  
ar  
sin  
aut  
riza  
ión  
es  
un  
deli  
o

**Abbas AK, Litchman AH:** *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición. Madrid, Elsevier. 2004.

**Hernández J, Ramírez H:** Características de la respuesta inmune del cerdo. En: *Temas selectos de inmunología veterinaria*. Juan Montaña Hirose (Ed.). Editorial

Manual Moderno. 2005.

**Rogan D, Babiuk LA:** Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech* 2005;24(1):159-174.

**Shams H:** Recent developments in veterinary vaccinology. *Vet J* 2005;170(3):289-299.

# Capítulo

## 5

### Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y Respiratorio porcino (PRRSv)

---

Flores-Mendoza, Lilian; Hernández, Jesús. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. 2010. Vet Mex 41(2):139-159.

## RESUMEN

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv) constituye uno de los problemas más grandes de la industria porcina. Afecta a cerdos de todas las edades, causa problemas reproductivos y respiratorios que generan pérdidas económicas millonarias. Éstas van en aumento debido a la rápida diseminación del virus y a la poca eficiencia de las vacunas comerciales para su tratamiento. Actualmente existen dos tipos de vacunas contra el PRRSV: una utiliza el virus atenuado y otra el virus inactivado. Existen en el mercado ambos tipos, tanto para cepas americanas como europeas. Aun cuando dichas vacunas disminuyen los síntomas de la enfermedad y la viremia, no evitan la infección y la protección cruzada es variable frente a virus heterólogos. Además, se ha informado que el virus vacunal puede diseminarse a otros animales susceptibles. Por esta razón muchos estudios se han orientado al desarrollo de nuevas vacunas las cuales dejan de lado los métodos convencionales en el desarrollo de vacunas e incluyen nuevas estrategias apoyándose de técnicas como el ADN recombinante, proteínas sintéticas, etc. Las vacunas desarrolladas en contra del PRRSV incluyen el uso de diferentes vectores para el desarrollo de vacunas de ADN evaluando la respuesta a varias proteínas estructurales, principalmente la glicoproteína 5, la proteína M y N. También se ha evaluado el empleo de clones infecciosos de PRRSV, así como la construcción de quimeras virales entre el virus vacunal y un virus altamente infeccioso. Todas estas estrategias no han logrado desarrollar una vacuna eficaz contra el PRRSV, por lo que aun permanece el reto para desarrollar una nueva vacuna.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández, y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto.

## **PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA**

### **Artículos con arbitraje**

1. "Characterization of porcine CD205". Flores-Mendoza L, Sotelo-Mundo RR, Dawson H, Mwangi W, Hernández J. Dev Comp Immunol. 2010 Jul;34(7):715-21.
2. "Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia". Flores-Mendoza Lilian; Hernández J. Vet. Méx. 2010 Jun: 41(2): 139-159.
3. "Developmental and caharacterization of a porcine anti-CD205 monoclonal antibody". Flores-Mendoza Lilian, Velázquez C., Mwangi W., Hernández J. Enviado a Dev Comp Immunol (2010).

### **Capítulos de Libros**

1. "Procesamiento y presentación de antígenos". Silva-Campa Erika, Flores-Mendoza Lilian, Hernández J. Inmunología Veterinaria. Capítulo 7. pp 65-76. Ed. Manual Moderno. 1<sup>ra</sup> Edición.

2. "Vacunación en cerdos". Flores-Mendoza Lilian, Silva-Campa Erika, Hernández J. Inmunología Veterinaria. Capítulo 21. pp 259-268. Ed. Manual Moderno. 1<sup>ra</sup> Edición.

### **Presentaciones en Congresos**

1. Caracterización molecular del receptor DEC-205 en cerdos y su expresión en tejidos linfáticos y células de importancia inmunológica. XIX Congreso de la Sociedad Mexicana de Inmunología. Cancún, Quintana Roo. 8-12 Marzo 2010. Poster.

### **Estancia académica**

Estancia académica en la Universidad de Texas A&M, Collage of Veterinary Medicine, Veterinaty Pathobiology, Immunolgy Laboratory, con el Dr. Waithaka Mwangi, 2008.