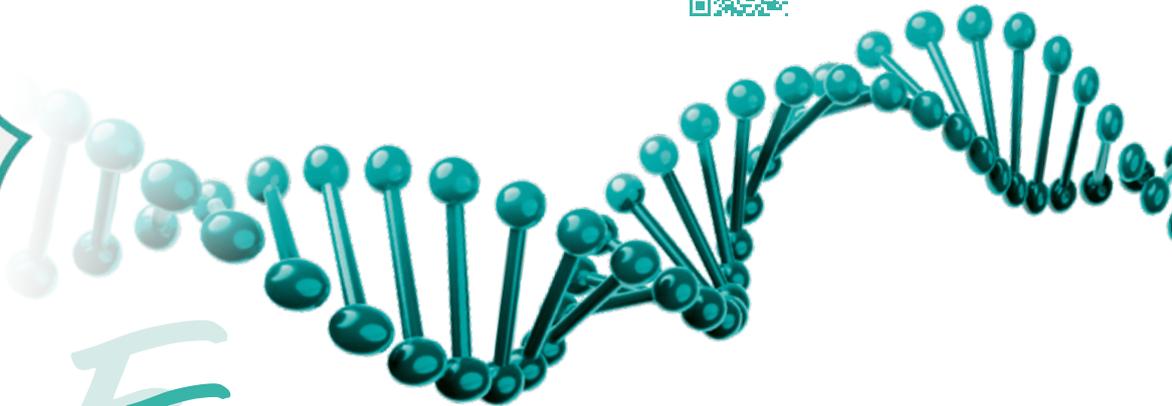
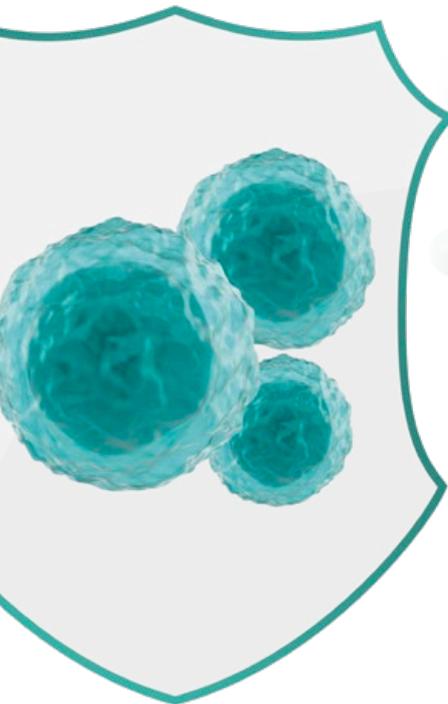


IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE CÉLULAS LINFOCITARIAS PARA MEJORAR LA ROBUSTEZ Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN CERDOS

Descarga el PDF



EE

El contexto actual de industrialización y globalización de la producción porcina, con el movimiento de animales y productos de origen animal, facilita la aparición y propagación de patógenos endémicos y emergentes que causan importantes pérdidas económicas en el sector. Estos factores, unidos al desarrollo de las resistencias antimicrobianas y la necesidad de desarrollar sistemas de producción más sostenibles, hacen necesario reorientar los actuales esquemas de selección genética para incorporar nuevos caracteres como los relacionados con la robustez y resiliencia animal.

En este escenario, los caracteres de inmunidad se consideran parámetros relevantes para medir la inmunocompetencia (capacidad de producir una respuesta inmunitaria normal), de los animales¹.



Maria Ballester y Raquel Quintanilla
Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA-Torre Marimón



Email: maria.ballester@irta.cat

INMUNOCOMPETENCIA Y FACTORES DE INMUNIDAD

Los caracteres de inmunidad pueden dividirse en los dos componentes principales del sistema inmunitario:

- Inmunidad innata o natural
- Inmunidad adquirida o adaptativa

INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata está compuesta por **elementos no específicos** y constituye la **primera línea de defensa del organismo**.

Reconoce una amplia gama de patógenos a través de un conjunto restringido de **receptores de reconocimiento de patrones** conocidos como **PRRs** que **se unen a moléculas PAMPs** (patrones moleculares asociados a patógenos) expresadas por el patógeno.

Entre otros componentes, las **células *Natural Killer* (células NK)** o **asesinas naturales**, las **células dendríticas**, los **monocitos** y las **células T gamma delta (células T $\gamma\delta$)** son ejemplos de células que formaran parte de la inmunidad innata.

ALGUNAS DE ESTAS CÉLULAS, COMO LAS CÉLULAS T $\gamma\delta$, PUEDEN FUNCIONAR DE PUENTE ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

CÉLULAS T $\gamma\delta$

Las células T $\gamma\delta$ constituyen una alta proporción de linfocitos en la sangre periférica porcina y tienen el potencial de **combinar respuestas innatas y adaptativas gracias a la expresión de sus receptores TCR o genes *WC1*** que pueden tener una función híbrida.

- Un mayor reclutamiento de células T $\gamma\delta$ cuando los animales se vacunan a una edad temprana parece correlacionarse con una mayor eficacia vacunal (revisado en²).
- Dentro de la población de células T $\gamma\delta$ existen **subpoblaciones que se distinguen por la expresión de sus genes *WC1* y correlacionan con la capacidad de responder a patógenos particulares²**, lo que hace de estas células un **fenotipo interesante** a ser estudiado a nivel genético.

INMUNIDAD ADAPTATIVA

A diferencia de las células del sistema inmunitario innato, las células del sistema inmunitario adaptativo (células B y T) pueden proporcionar **memoria inmunológica** tras una respuesta inicial mediada por múltiples receptores específicos de antígenos que están presentes en patógenos.

El sistema inmunitario tiene un alto grado de **variación interindividual** que está controlado por factores genéticos y ambientales. **No obstante, las células inmunitarias, sobre todo las adaptativas, están muy determinadas por la genética del organismo.**

Estudios genéticos han estimado **heredabilidades moderadas-altas para distintos tipos celulares del sistema innato** (ej. células NK y T $\gamma\delta$) **y adaptativo** (ej. linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B) en cerdos en diferentes condiciones, lo que sugiere que **estos caracteres podrían seleccionarse y obtener un progreso genético.**

EN BUSCA DEL SANTO GRIAL DE LA ROBUSTEZ Y RESISTENCIA GENÉTICA A ENFERMEDADES

En un estudio previo de nuestro grupo, resultado del **proyecto IMMUPIGEN** (AGL2016-75432-R), se estudió la arquitectura genética de un total de **30 caracteres relacionados con la salud animal** en 432 animales de una línea comercial Duroc de la empresa Selección Batallé que comprendían:

- Fenotipos de inmunidad
- Fenotipos hematológicos
- Fenotipos de estrés



Los principales resultados mostraron que muchos de estos caracteres estaban determinados a nivel genético y que por tanto existe la **posibilidad de seleccionar genéticamente los fenotipos de inmunidad** para obtener **poblaciones porcinas más robustas y resistentes a enfermedades³.**

DETERMINACIÓN GENÉTICA DE FENOTIPOS CELULARES DE INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

Teniendo en cuenta el papel relevante que juegan los linfocitos en el control de numerosos patógenos porcinos, en el presente artículo mostraremos los resultados obtenidos sobre la determinación genética de fenotipos celulares de inmunidad innata y adaptativa, incluyendo las células T $\gamma\delta$ debido a su doble papel en ambas inmunidades.

Para ello, se aislaron las **células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)** de un total de 391 animales sanos (machos y hembras) de 8 semanas de vida del proyecto IMMUPIGEN.

INMUNOFENOTIPADO

El inmunofenotipado se realizó utilizando diferentes anticuerpos para **marcar diferentes subpoblaciones de linfocitos**, cuantificándose mediante citometría las siguientes subpoblaciones celulares (**Figura 1**):

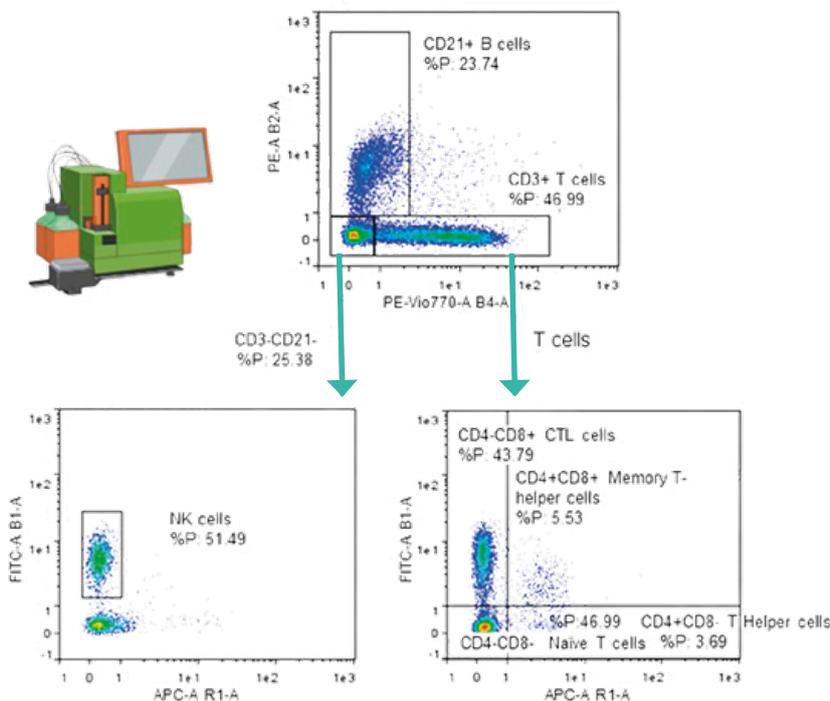


FIGURA 1

Cuantificación mediante citometría de las diferentes subpoblaciones de linfocitos.

LINFOCITOS B (CD21⁺)

Participan en la inmunidad humoral y se encargan de producir los anticuerpos.

CÉLULAS NK (CD3⁻ CD21⁻ CD8⁺)

Forman parte del sistema inmunitario innato y actúan destruyendo las células infectadas.

LINFOCITOS T (CD3⁺)

Participan en la inmunidad mediada por células (inmunidad celular) e incluyen:

- **Linfocitos T citotóxicos o CTL** (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺): reconocen y destruyen las células infectadas por patógenos.
- **Linfocitos T cooperadores o T helper** (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻): estimulan la activación de los linfocitos B para producir anticuerpos y activan otras células mediante la secreción de citoquinas.
- **Linfocitos T de memoria (memory T-helper)** (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻): responden de forma rápida a un antígeno tras una exposición previa.
- **Linfocitos T naive** (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻): responden a nuevos patógenos con los que el organismo no ha tenido contacto previo.

PARA EL MARCAJE DE LAS CÉLULAS T $\gamma\delta$ SE UTILIZÓ UN ANTICUERPO ESPECÍFICO: MAC320

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

DISTRIBUCIÓN Y CORRELACIÓN FENOTÍPICA

Una vez generados los fenotipos celulares, se realizó un primer análisis descriptivo para evaluar su distribución y correlación fenotípica entre las diferentes subpoblaciones celulares.

HEREDABILIDAD Y CORRELACIÓN GENÉTICA

Posteriormente se obtuvieron las estimas de heredabilidad y correlación genética.

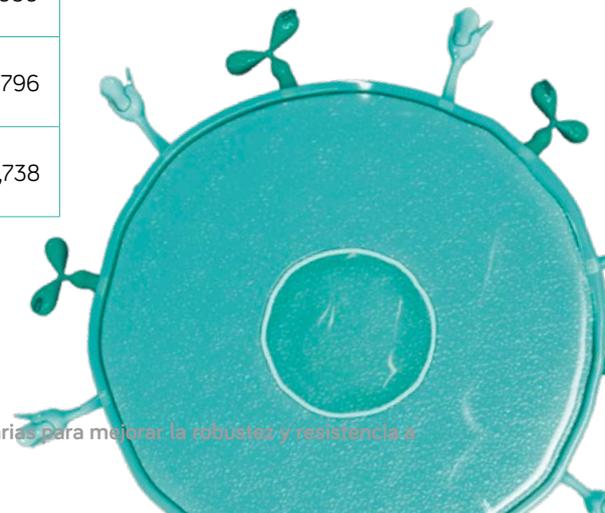
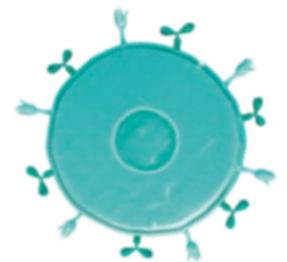
La **Tabla 1** muestra algunos estadísticos descriptivos, así como las estimas de heredabilidad de las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

TABLA 1.

Estadísticos descriptivos y valores de heredabilidad (h^2) para los caracteres de inmunidad celular.

FENOTIPO (% PBMCs*)	MEDIA	SD	CV	H ²	SE	CI95
LINFOCITOS T	43,81	9,19	0,21	0,771	0,152	0,473 - 1,070
Células CTL	19,41	8,52	0,44	0,563	0,155	0,259 - 0,868
Células T de memoria	3,18	2,79	0,88	0,841	0,161	0,526 - 1,157
Células T <i>helper</i>	1,84	0,95	0,52	0,470	0,148	0,181 - 0,759
Células T naive	19,37	8,23	0,43	0,481	0,144	0,198 - 0,764
Células <i>Natural Killer</i> (NK)	14,16	6,12	0,43	0,361	0,165	0,036 - 0,685
LINFOCITOS B	21,22	7,84	0,37	0,558	0,168	0,228 - 0,887
Células T CD4 ⁺	5,02	3,25	0,65	0,725	0,159	0,413 - 1,036
Células T CD8 ⁺	22,59	9,49	0,42	0,487	0,158	0,178 - 0,796
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-	-	-	0,462	0,141	0,186 - 0,738

*Proporciones de las diferentes subpoblaciones linfocitarias respecto a las células PBMCs.



Los **linfocitos T** fueron la población más abundante, representando un **43,8%** de los PBMCs.

Entre las subpoblaciones de linfocitos T, las **células CTL y naive** fueron las más abundantes (~19% cada una), mientras que las **células helper** junto con las **células de memoria** representaron el **5% de los PBMCs**.

Los **linfocitos B** representaron un **21,2%**, mientras que el **14,16%** de los PBMCs fueron **células NK**.

EN CUANTO A LAS CORRELACIONES FENOTÍPICAS CABE DESTACAR QUE SE ENCONTRÓ UNA CORRELACIÓN MUY ALTA ENTRE LAS CÉLULAS T $\gamma\delta$ Y NAIVE, LO QUE INDICARÍA QUE UN GRAN PORCENTAJE DE ESTA ÚLTIMA POBLACIÓN CORRESPONDE MAYORITARIAMENTE A CÉLULAS T $\gamma\delta$

PARÁMETROS GENÉTICOS

En cuanto al determinismo genético de estos caracteres, cabe destacar las **altas heredabilidades estimadas para las células T de memoria y la abundancia relativa de las células T**, estimándose heredabilidades medias-altas para el resto de fenotipos (Tabla 1). La **heredabilidad más baja** se estimó para la abundancia relativa de **células B**, resultado similar al descrito en humanos, donde se demuestra que **los linfocitos B** estarán más influenciados por factores ambientales⁴.

➤ Estos resultados coinciden con estudios previos publicados en humanos y otras poblaciones porcinas, confirmando el **papel de la genética como determinante importante en los fenotipos de inmunidad celular**.

La selección de animales para producir una **buena respuesta inmunitaria** debe considerar ambos tipos de caracteres de inmunidad, tanto los innatos como los adaptativos, para evaluar las consecuencias/conveniencia de **seleccionar ambos tipos de caracteres**.

➤ Teniendo en cuenta esta premisa, el estudio de correlaciones genéticas se llevó a cabo con todos los fenotipos de inmunidad analizados en la población IMMUPIGEN: fenotipos de inmunidad innata, inmunidad adaptativa y parámetros hematológicos.

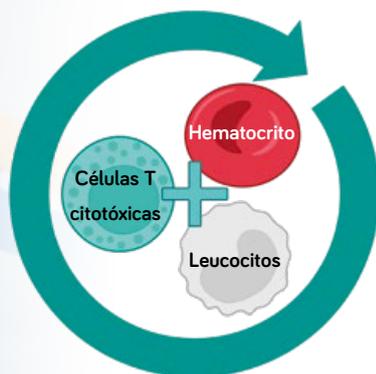
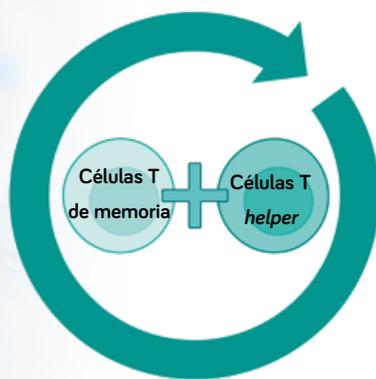
ESTUDIO DE CORRELACIONES GENÉTICAS DE FENOTIPOS DE INMUNIDAD INNATA, INMUNIDAD ADAPTATIVA Y PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

El **mapa de interacciones genéticas** mostró correlaciones positivas y negativas entre los diferentes fenotipos de inmunidad.

CORRELACIONES POSITIVAS

La proporción de células T *helper* y T de memoria se correlacionaron de forma positiva.

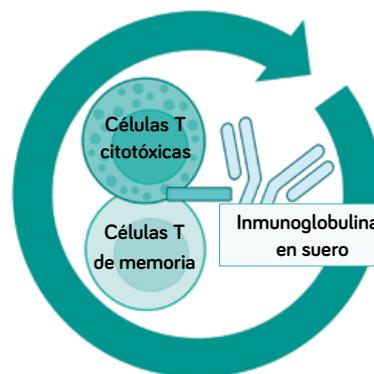
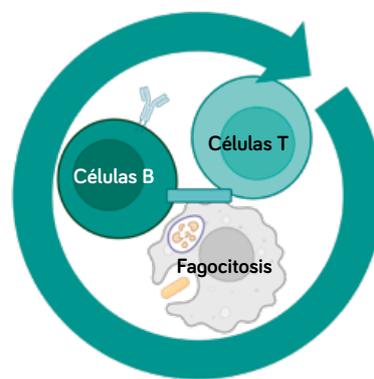
La abundancia relativa de las células T citotóxicas se correlacionó positivamente con los fenotipos hematológicos, en particular los contajes de leucocitos y hematocrito.



CORRELACIONES NEGATIVAS

Las células B mostraron una correlación negativa con las diferentes subpoblaciones linfocitarias, particularmente con el porcentaje de células T, y la capacidad de fagocitosis.

Las subpoblaciones de células T citotóxicas y T de memoria mostraron una correlación negativa con las concentraciones de inmunoglobulinas en suero.



En la **Figura 2** se muestran las **correlaciones genéticas entre varios caracteres de inmunidad**.

Cabe destacar la **falta de interacción de las diferentes subpoblaciones linfocitarias con la concentración de proteínas de fase aguda** (proteína C reactiva y haptoglobina) en sangre, permitiendo la **selección independiente de este tipo de caracteres**.

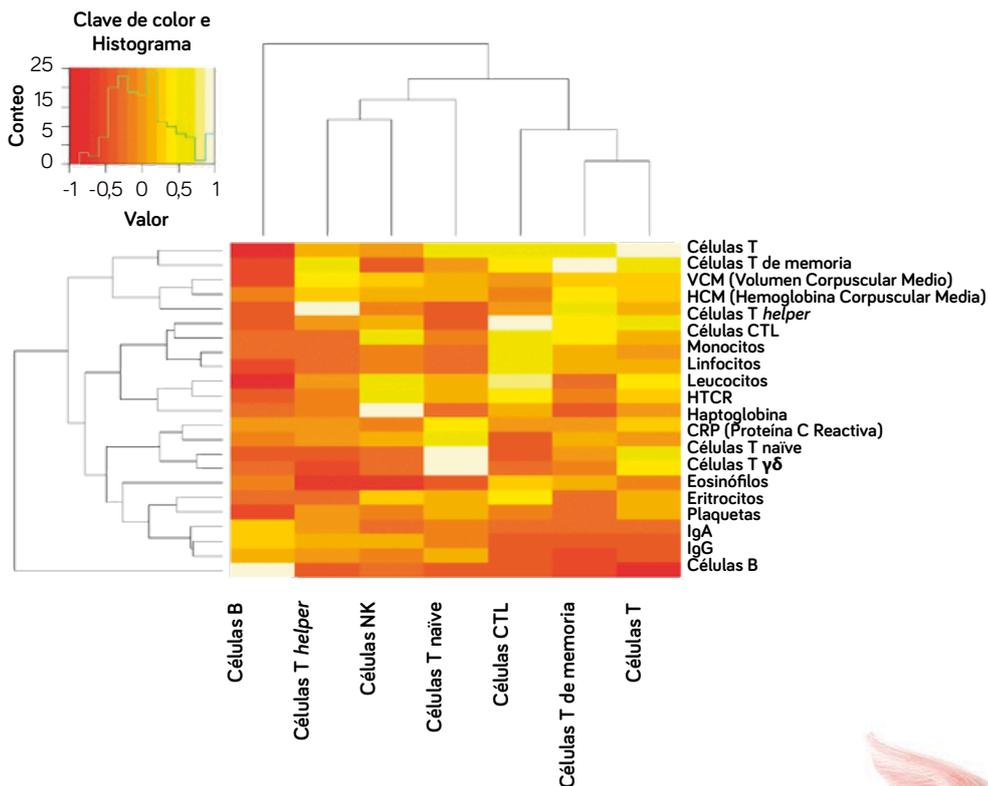


FIGURA 2

Mapa de color de correlaciones genéticas estimadas por combinación de pares entre los fenotipos de inmunidad.

El mapa de interacción genético entre los diferentes fenotipos de inmunidad sustenta la posibilidad de aplicar una **selección multicarácter para los fenotipos de inmunidad innata y adaptativa**.

- En este escenario, la posibilidad de **identificar genes candidatos, marcadores genéticos y/o biomarcadores asociados a la variación fenotípica de estos caracteres** adquiere una mayor relevancia al permitir una **selección genética más directa** para algunos de estos fenotipos.



IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS Y GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A LA VARIACIÓN DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS EN SANGRE

Con el fin de identificar regiones del genoma que pudiesen estar asociadas a la variación de los fenotipos linfocitarios, se llevó a cabo el **genotipado de todos los animales** con el chip comercial GGP Porcine HD Array de Illumina.

➤ El análisis de asociación del genoma completo (GWAS) se realizó con **42.641 polimorfismos de nucleótido único (SNPs)** distribuidos a lo largo de todo el genoma porcino y los **10 fenotipos de inmunidad celular**.

El estudio de asociación identificó un total de **32 SNPs** significativos asociados a nivel genómico con las cantidades relativas de **células T helper, T memoria y T naive/γδ**.

Estas regiones se identificaron en los **cromosomas porcinos SSC3, SSC5, SSC8 y SSCX** (Tabla 2).

TABLA 2.

Descripción de las regiones cromosómicas asociadas con los caracteres linfocitarios.

CHR	INICIO (MBP)	FINAL (MBP)	N SNPs	TOP SNPs	MAF	p-valor	FDR	CARÁCTER	GENES CANDIDATOS
3	55,60	58,34	14	rs81340900, rs81293514, rs81336780	0,49	2,18E-06	3,10E-02	Células T helper (% de PBMCs)	<i>CDBA, CD8B, CHMP3, GNLY, IGKV, RMN-D5A, SMYD1, ZAP70</i>
5	61,62	62,44	10	rs326461238	0,26	1,18E-05	8,70E-02	Células T de memoria (% de PBMCs) CD4+ T cells	<i>AICDA, CD4, CD69, CD163, MFAP5, PHC1, STYK1, TAS2Rs, KLRs, C-type lectins</i>
8	20,51	20,57	2	rs81406759, rs81406807	0,40	3,45E-05	9,80E-02	Células T helper (% de PBMCs)	<i>RBPJ, STIM2</i>
X	33,36	33,63	6	rs342772739	0,13	1,18E-06	1,20E-02	Células T naive (% de PBMCs)	<i>CYBB, ssc-mir-9786-1</i>

En estas regiones genómicas se anotaron una serie de genes candidatos relacionados con funciones de inmunidad:

SSCX

El gen **CYBB** codifica para un componente del sistema microbicida oxidasa expresado por **neutrófilos y células T**, y desempeña un papel esencial contra infecciones bacterianas y fúngicas.

SSC3

- Los genes **CD8A y CD8B** codifican para proteínas de membrana que sirven de co-receptores durante el reconocimiento de antígenos por los receptores TCR de los **linfocitos**.
- El gen **GNLY** codifica una proteína de secreción antimicrobiana presente en **células T citotóxicas y células NK**.

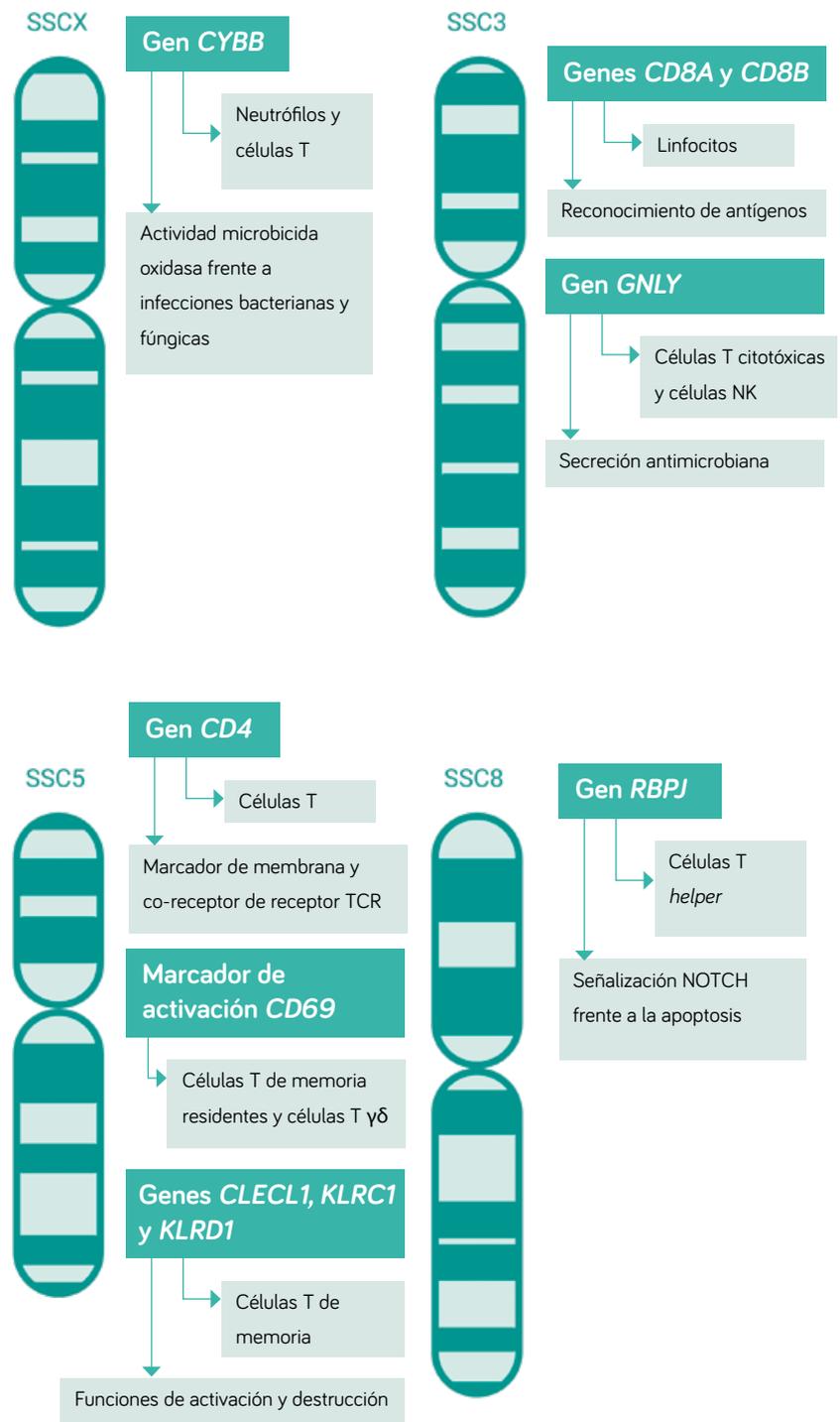
SSC5

- El gen **CD4**, principal marcador de membrana de algunas **células T**, sirve también como co-receptor para el receptor TCR.
- El **marcador de activación CD69**, expresado en **células T de memoria residentes y células T γδ**.
- Los genes **CLECL1, KLRC1 y KLRD1**, altamente expresados en las **células T de memoria** y están involucrados en su activación y función de destrucción.

SSC8

El gen **RBPJ** codifica un factor de transcripción que actúa a través de la vía de señalización NOTCH para proteger a las **células T helper** de la apoptosis.

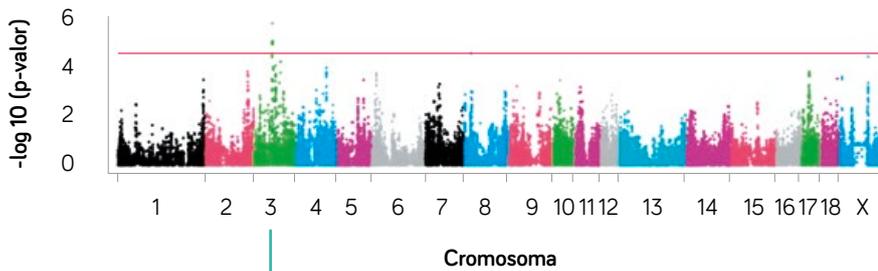
32 SNPs Y 10 GENES CANDIDATOS IDENTIFICADOS EN 4 CROMOSOMAS



Un resultado destacable de nuestro estudio fue el nivel de solapamiento entre nuestros resultados y estudios previos descritos en humanos y en otras poblaciones porcinas, identificándose las **mismas regiones genómicas y genes candidatos** para algunos de los caracteres analizados (Figura 3).

COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS GWAS EN CERDOS Y HUMANOS

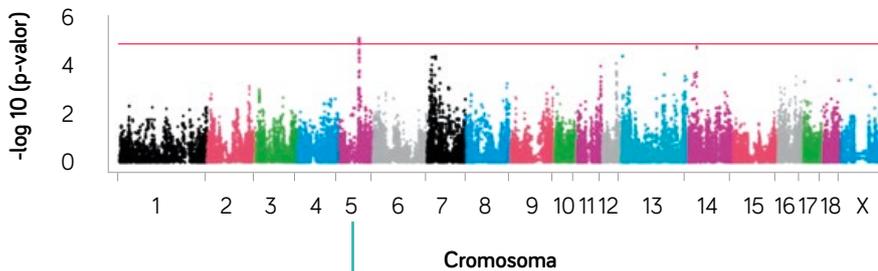
Células T helper (% de PBMCs)



Proliferación de CD4+; CD4+CD8dim AC (Orrù et al., 2013; Lagou et al., 2018; Orrù et al., 2020)

Porcentaje de leucocitos CD8+; CD8-; CD3-CD8- (Zhang et al., 2016)

Células T de memoria (% de PBMCs)



Porcentaje de leucocitos CD4+CD8+ (Lu et al., 2012)

CD4+CD8+; Células T memoria efectoras CD4+ % células T (Aguirre-Gamboa et al., 2016; Orrù et al., 2020)

Células T naive (% de PBMCs)

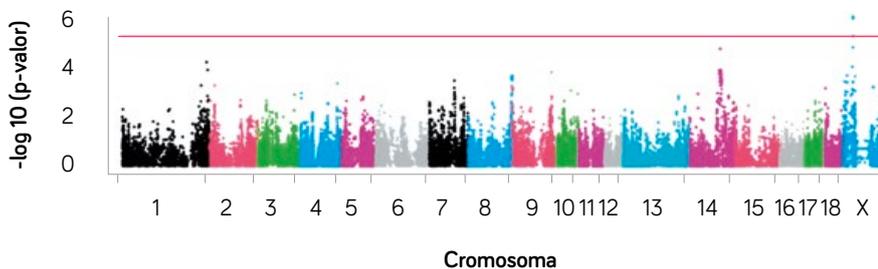
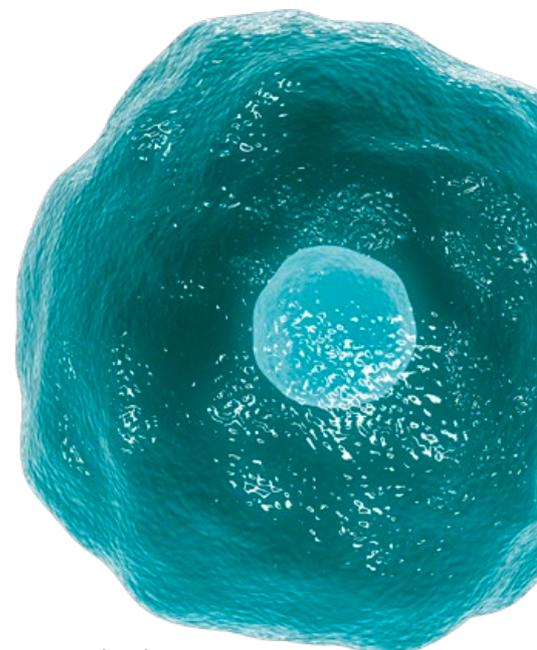


FIGURA 3

Solapamiento entre las regiones genómicas y genes candidatos de nuestro estudio con estudios previos descritos en humanos y en porcino⁵⁻⁹.



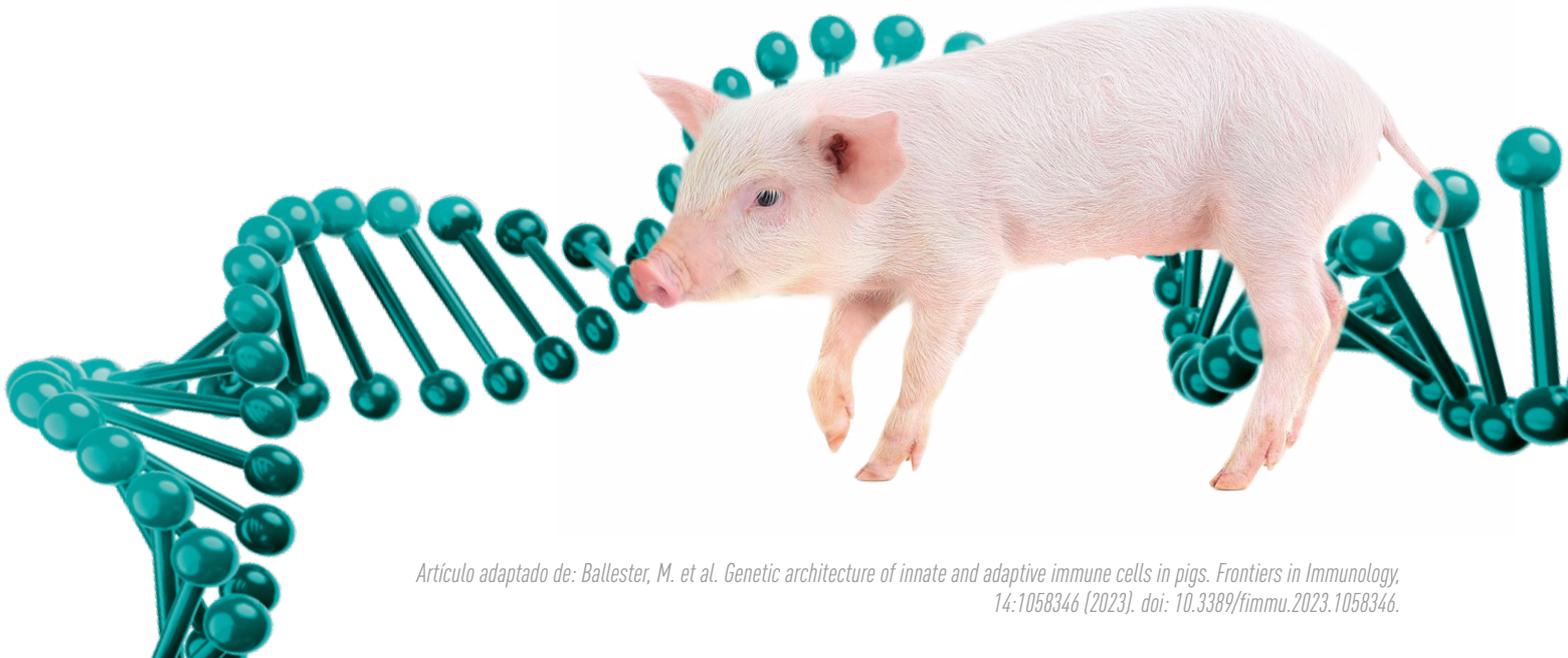
CONCLUSIONES

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CONFIRMAN EL CONTROL GENÉTICO DE LOS CARACTERES DE INMUNIDAD CELULAR EN CERDOS

Las **correlaciones genéticas** entre los diferentes fenotipos de inmunidad innata y adaptativa y los marcadores genéticos identificados para las **células T helper, T de memoria y T $\gamma\delta$** avalan la posibilidad de aplicar una **selección multicarácter efectiva** para ambos tipos de inmunidades.

Asimismo, nuestros resultados avalan la **posibilidad de seleccionar animales con distintos porcentajes de células T $\gamma\delta$** en sangre periférica con el fin **de explorar y optimizar la respuesta a diferentes vacunas**.

Por último, el solapamiento de genes para los mismos fenotipos en humanos potencia aún más el **biomodelo porcino para el estudio de enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas en humanos**.



Artículo adaptado de: Ballester, M. et al. Genetic architecture of innate and adaptive immune cells in pigs. *Frontiers in Immunology*, 14:1058346 (2023). doi: 10.3389/fimmu.2023.1058346.

BIBLIOGRAFÍA

1. Visscher AH, Janss LL, Niewold TA, de Greef KH. Disease incidence and immunological traits for the selection of healthy pigs. *A review Vet Q* (2002) 24:29–34. doi: 10.1080/01652176.2002.9695121
2. Le Page L, Baldwin CL, Telfer JC. gd T cells in artiodactyls: Focus on swine. *Dev Comp Immunol* (2022) 128:104334. doi: 10.1016/J.DCI.2021.104334
3. Ballester M, Ramayo-Caldas Y, González-Rodríguez O, Pascual M, Reixach J, Díaz M, et al. Genetic parameters and associated genomic regions for global immunocompetence and other health-related traits in pigs. *Sci Rep* (2020) 10:18462. doi: 10.1038/s41598-020-75417-7
4. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, van der Molen RG, van Rijssen E, van Cranenbroek B, et al. Differential effects of environmental and genetic factors on T and b cell immune traits. *Cell Rep* (2016) 17:2474–87. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.053
5. Orrù V, Steri M, Sole G, Sidore C, Viridis F, Dei M, et al. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell* (2013) 155:242. doi: 10.1016/J.CELL.2013.08.041
6. Lagou V, Garcia-Perez JE, Smets I, Van Horebeek L, Vandeborgh M, Chen L, et al. Genetic architecture of adaptive immune system identifies key immune regulators. *Cell Rep* (2018) 25:798–810.e6. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.09.048
7. Zhang J, Chen JH, Liu XD, Wang HY, Liu XL, Li XY, et al. Genomewide association studies for hematological traits and T lymphocyte subpopulations in a duroc × erhualian F2 resource population. *J Anim Sci* (2016) 94:5028–41. doi: 10.2527/jas.2016-0924
8. Orrù V, Steri M, Sidore C, Marongiu M, Serra V, Olla S, et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy. *Nat Genet* (2020) 52:1036–45. doi: 10.1038/s41588-020-0684-4
9. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, van der Molen RG, van Rijssen E, van Cranenbroek B, et al. Differential effects of environmental and genetic factors on T and b cell immune traits. *Cell Rep* (2016) 17:2474–87. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.053