

RESPUESTA CELULAR FRENTE AL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA

DR. D. JOSÉ CARLOS GÓMEZ VILLAMANDOS (*)

Discurso de Ingreso como Académico de Honor en la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinaria de Andalucía Oriental, Rector Magnífico y ex Rector de la Universidad de Jaén, Ilmo. Sr. Secretario General de Universidades de la Junta de Andalucía, Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Sevillana de Ciencias Veterinaria, Ilmos. Srs. Académicos, queridos compañeros y amigos. Quiero que mis primeras palabras sean para expresar mi más profundo agradecimiento al Excmo. Sr. Presidente y a los Ilmos. Srs. Académicos por distinguirme con el nombramiento de Académico de Honor de esta Real Academia, a la que me siento estrechamente unido por mi profesión como veterinario y por la gran cantidad de buenos amigos que forman parte ella. Pero además, y desde un punto de vista institucional, son numerosas las colaboraciones que existen entre esta Real Academia y la Universidad de Córdoba, especialmente con nuestra Facultad de Veterinaria, una relación en la que el Excmo. Sr. D. Antonio Marín ha jugado y juega un papel fundamental. Y nunca podré olvidar que fue en este salón, y en un acto de la Academia, donde tuve mi último acto público como Vicerrector, días antes de iniciar el camino que me llevaría, meses más tarde, a ser elegido Rector de la Universidad de Córdoba. Y permítanme también expresar mi gratitud al Prof. Rafael Jordano, que

* Dr. en Veterinaria. Rector Magnífico de la Universidad de Córdoba.

ha aceptado dar respuesta a mi discurso de ingreso. Estoy convencido de que sus palabras estarán guiadas por la amistad más que por la objetividad.

Ante el reto de realizar este discurso, me planteé abordar un tema relacionado con la política y gestión universitaria, que tantas opiniones viene generando en los últimos tiempos en la sociedad, en los medios de comunicación y también en el ámbito de la política nacional. Pero, he preferido, para hacer honor a tan alto honor que recibo, abordar un tema propio de la profesión veterinaria, un tema en el que nuestro grupo de investigación ha venido trabajando desde 2003 y gracias al cual hemos formado nuevos doctores y doctoras. Así, me incliné por hablarles de la Diarrea vírica bovina (DVB), de su importancia para la ganadería y, sobre todo de las respuestas inmune e inflamatoria que frente a ella desarrollan los animales, y que pese a estar ampliamente distribuida en el mundo, presentaba y presenta grandes incógnitas en cuanto a su patogenia. Una enfermedad producida por un Pestivirus, al igual que la Peste porcina clásica, sobre la que habíamos realizado aportaciones significativas, especialmente sobre su patogenia, considerando que serían extrapolable nuestros descubrimientos de la una en la otra, algo que en poco tiempo pudimos ver que no sucedía.

DIARREA VÍRICA BOVINA. ASPECTOS GENERALES

La Diarrea Vírica Bovina (DVB) es una enfermedad de distribución mundial que desde 2007 se encuentra dentro de las 116 enfermedades de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal. El 60% de la cabaña de ganado vacuno de la Unión Europea se considera infectado, originando importantes campañas de erradicación en Alemania, Luxemburgo, Irlanda y Suiza, país este último en el que la enfermedad volvió a aparecer en 2014 pese a que el 99% de la cabaña se consideraba libre de la enfermedad. En España, se considera que el 50% de las explotaciones tienen animales persistentemente infectados y 90% han tenido contacto con el virus, considerándose una enfermedad endémica.

El virus de la DVB (vDVB) está clasificado dentro de la familia *Flaviviridae*, género Pestivirus, género en el que también se encuadran el virus de la Peste porcina clásica y el de la Enfermedad de la frontera. Los pestivirus son virus pequeños, de 40-60 nm de diámetro. Tienen una cápsida icosaédrica, simple y de naturaleza proteica y una envoltura, siendo virus que se inactivan fácilmente con desinfectantes habituales, perdiendo su infectividad a 37°C durante unos 4 días, y si la temperatura es de 56°C la pierden en 45 minutos aproximadamente.

El vDVB presenta dos genotipos (tipos 1 y 2), que encuadran a 17 subtipos del vDVB tipo 1 (1a-q) y 3 del vDVB tipo 2 (2a-c), poniendo de manifiesto la gran diversidad genética de este virus debida a que su genoma está constituido por una cadena simple de ARN. El vDVB tipo 1 es el más frecuente en Europa, alrededor del 90%, mientras que en América del Norte la distribución de ambos genotipos ronda el 50%. En España se han detectado cepas de genotipo 2 en Galicia y Cornisa Cantábrica.

Dependiendo de la acción del virus sobre cultivo de células epiteliales, las diferentes cepas del vDVB, independientemente del genotipo, se pueden clasificar en dos biotipos: citopático y no citopático, característica que depende de la proteína no estructural NS3 del virus, que en el caso de las cepas no citopáticas se presenta como NS2/3, y que no determina la virulencia de la cepa. Las cepas citopáticas provienen de la mutación (por inserción de secuencia celular, duplicación o delección de genes, cambios en nucleótidos, etc) de cepas no citopáticas, siendo ambas cepas antigénicamente idénticas, una característica clave en el desarrollo de la Enfermedad de las mucosas.

Las cepas de vDVB genotipo 1 no citopáticas son las más abundantes, más del 70% en la naturaleza, siendo las responsables de las formas clínicas agudas y de las infecciones persistentes por el vDVB. Hay que señalar que las cepas no citopáticas son inductoras de un efecto citopático, asociado a vacuolización citoplasmática y muerte celular, en las células infectadas *in vivo*. Existe un tercer biotipo, el infocitopático, poco frecuente y de una elevada virulencia.

El vDVB también participa en el establecimiento de diversos síndromes y complejos patológicos, afectando, además del aparato digestivo originado la diarrea que le da nombre a la enfermedad, al aparato reproductor, respiratorio, circulatorio, inmunológico, musculoesquelético, piel y sistema nervioso central, lo que ha determinado que se le denomina como la "enfermedad de múltiples caras". En esa variabilidad intervienen, como elementos determinantes, la cepa del vDVB, el estado immune del animal, el estado de gestación en el caso de las hembras y las condiciones ambientales.

Entre las enfermedades en las que participa la DVB, hay que resaltar el Complejo respiratorio bovino (CRB), proceso multifactorial que origina importantes pérdidas económicas en el sector a nivel mundial. En el CRB intervienen diferentes factores, influyendo el estado sanitario del animal, el medioambiente y diferentes agentes patógenos, entre los que se encuentra el vDVB como factor predisponente al inducir estados de inmunodepresión que favorecen las infecciones secundarias. La patogenia de dichos estados de inmunosupresión no ha sido concretada.

DIARREA VÍRICA BOVINA AGUDA

En el desarrollo de la DVB aguda se establece un cuadro clínico caracterizado por una hipertermia bifásica (una primera fase moderada, alrededor de los 3 días post infección y una segunda elevada sobre los 7 días post infección), coincidiendo con el establecimiento y el pico de viremia ambas fases. Los animales desarrollan diversas manifestaciones clínicas, cuya intensidad varía de ligera a intensa dependiendo de la virulencia del virus. Entre estas manifestaciones destacan, por ser más constantes, la descarga serosa en ojo y ollares y la diarrea, que se suelen presentar entre las dos fases hipertérmicas, resolviéndose en días posteriores.

Los animales desarrollan una panleucopenia temprana, coincidente con el primer pico de fiebre y la instauración de la viremia, recuperando los valores de linfocitos y monocitos en sangre a partir de los 10-12 días post infección. En el caso de los linfocitos, y con la excepción de un incremento muy temprano de los linfocitos CD4+, todas las subpoblaciones sufren una caída de sus valores en sangre que se recuperan coincidiendo con la desaparición de la sintomatología clínica. Este estado de leucopenia podría favorecer las infecciones secundarias por bacterias (neutropenia) y virus (monocitopenia y linfopenia), así como comprometer la respuesta frente al vDVB (caída de linfocitos CD4+ y CD8+).

La linfopenia coincide, a nivel tisular, con la desaparición, más o menos intensa, de linfocitos en los órganos linfoides primarios y secundarios como consecuencia de un proceso de apoptosis acelerado e intenso de linfocitos en dichas estructuras que ha sido demostrado mediante la técnica de TUNEL, inmunodetección de caspasa 3 y microscopía electrónica de transmisión. La apoptosis, o muerte celular programada, fue descrita inicialmente como un proceso fisiológico de renovación celular y tisular, siendo posteriormente comprobado que su alteración, ya sea por exacerbación o inhibición, es un mecanismo presente en numerosos procesos patológicos, siendo especialmente estudiada en las infecciones víricas. En el caso de la DVB, la apoptosis, atribuida inicialmente a la acción directa del virus sobre los linfocitos, está ocasionada por la alteración del microambiente folicular debido a la infección de las células reticulares y células dendríticas, las cuales sufren la acción directa del virus y modifican tanto la expresión de sus moléculas de adhesión como la biosíntesis de mediadores químicos, como es el caso de la IL7, cuyo correcto funcionamiento es necesario para el desarrollo de los linfocitos, que al verse alterado conduce a la apoptosis de estas células, originando estructuras linfoides prácticamente sin linfocitos, lo que es especialmente llamativo en las placas de Peyer y en el timo, estando también presente en el resto de órganos linfoides. Este mecanismo inductor de la apoptosis difiere del

descrito para la Peste porcina clásica, producida por otro pestivirus, en la que son los mediadores químicos liberados por los macrófagos los responsables de la misma.

Las lesiones que acompañan a la DVB aguda no son significativas, con ligera hiperemia de las estructuras linfoides, más acusada generalmente a nivel intestinal, y ligero aumento de tamaño de los nódulos linfoides regionales. Con la excepción de los macrófagos, que aumentan su número en los órganos diana y son la principal célula infectada, no se observan cambios inflamatorios significativos. Esto coincide con los cambios observados en la producción de las proteínas de fase aguda, con incremento en los niveles de haptoglobina y amiloide A sérica, indicativos del establecimiento de un proceso inflamatorio, aunque los incrementos de estas proteínas se observan a partir de la fase media de la enfermedad.

Las citoquinas proinflamatorias tienen un importante papel en la respuesta inmune innata. Los estudios realizados sobre estas citoquinas en la DVB arrojan resultados diversos dependiendo de las cepas utilizadas y, especialmente, de si los estudios se realizan *in vitro* o *in vivo*. Así, la ausencia en el establecimiento de una respuesta inflamatoria intensa está asociada a un desfase en la producción de citoquinas proinflamatorias que impide el efecto sinérgico de las mismas. Así, mientras que el TNF- α experimenta un incremento sérico al principio de la enfermedad, la gran otra citoquina proinflamatoria, la IL-1, no lo hace hasta pasado el periodo febril, existiendo en esa fase niveles muy bajos de TNF- α . Por otro lado, existe un incremento en la producción de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10, y también se ha comprobado que los macrófagos infectados con cepas no citopáticas del vDVB muestran una disminución en la expresión de CC- y CXC-, moléculas que participan en el reclutamiento de las células inmunes al punto de infección.

Por otro lado, en las fases iniciales de la forma aguda de la enfermedad se instaura una respuesta inmune tipo 1, determinada por el incremento en la producción de las citoquinas que la caracterizan. Esta respuesta inmune no tiene la capacidad de frenar la diseminación orgánica del virus, produciéndose la viremia alas 24-48h posteriores al establecimiento de esta respuesta inmune. La respuesta inmune innata o inespecífica puede influenciar el desarrollo de la infección por el vDVB, siendo las células que conforman esta respuesta infectadas por el virus, como sucede con los monocitos, macrófagos o células dendríticas. Algunos autores atribuyen a la acción directa del virus sobre los polimorfonucleares neutrófilos la alteración funcional de estas células durante la DVB aguda, incluyendo la disminución en su capacidad bactericida, en su quimiotactismo y en su citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

La acción del vDVB sobre los macrófagos *in vitro* origina, independientemente de que la cepa sea citopática o no citopática, una disminución en la capacidad de respuesta inflamatoria de estas células, existiendo diferencias dependientes del biotipo en la producción de algunas citoquinas, como es el caso de los interferones (IFN) tipo 1, que tienen una respuesta escasa en el caso de cepas no citopáticas, citoquinas que tienen un importante papel en la defensa del organismo frente a virus.

En el caso de la DVB podría ser su ausencia una de las principales causas del establecimiento de animales persistentemente infectados, al no inducirse la producción de este tipo de IFNs en las madres gestantes cuando son infectadas, a diferencia de lo que sucede en infecciones postnatales que dan lugar a DVB aguda, en las que se produce una elevada, aunque transitoria, respuesta de IFN tipo 1, con disminución de mediadores supresores de la respuesta de los linfocitos T, como es el caso del TGF- β . Las cepas citopáticas del virus inducen una fuerte respuesta de IFNs en el feto y en las infecciones oronasales, a diferencia de lo que sucede con las no citopáticas, lo que podría ser la causa de que las cepas citopáticas quedan confinadas a la zona de entrada del virus, dificultando su difusión orgánica. En el caso de las cepas no citopáticas, no sólo la respuesta de IFNs es débil, sino que hay estudios que demuestran que son resistentes a la acción del IFN cuando la infección es intrauterina, sin afectar a su capacidad de respuesta frente a otros virus que pudieran afectar a las células infectadas por el vDVB.

La acción del vDVB sobre las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, monocitos/macrófagos y linfocitos B) disminuiría la capacidad de respuesta inmune innata. Así, los macrófagos infectados sufren una reducción en la expresión de receptores para Fc y C3, necesarios para la actividad fagocítica, y un porcentaje escaso de células expresan las moléculas presentadoras de antígeno MHCII y CD80/86.

DIARREA VÍRICA BOVINA E INFECCIONES SECUNDARIAS.

La panleucopenia, la apoptosis de las estructuras linfoides y la alteración de la respuesta inflamatoria son un escenario perfecto para que se produzcan infecciones secundarias en animales con DVB aguda. Pero estos animales, una vez superada la fase aguda de la enfermedad y desaparecida la viremia, recuperan los valores de leucocitos en sangre y las estructuras linfoides se pueblan de linfocitos, lo que haría pensar en que el estado de inmunosupresión es transitorio, algo que realmente no sucede, siendo frecuentes las infecciones secundarias una vez que los animales que han sufrido DVB aguda vuelven a estar clínicamente sanos.

El estudio de las diferentes poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune ha demostrado la existencia de cambios importantes en estas células que se mantienen una vez superada la fase clínica de la DVB. Así, y tras la inoculación de herpesvirus bovino tipo 1 (HBo-1) a animales que han superado la DVB, se observa que estos animales presentan un estado proinflamatorio que exagera la respuesta inflamatoria, siendo esta de mayor intensidad clínica y lesional en comparación a la que experimentan los animales sanos inoculados con HBo-1. En este estado proinflamatorio juegan un papel clave los macrófagos, que sintetizan en mayor cantidad, y por un mayor número de estas células, citoquinas como el TNF- α , dando lugar a niveles séricos de proteínas de fase aguda de la inflamación (amiloide A y fibrinógeno) muy elevados en comparación a los observados en animales sanos.

Por otro lado, en los animales que han sufrido DVB se observa una disminución en el inmunomarcaje frente a FoxP3 tanto en la médula como en la corteza tímica, incrementándose progresivamente, tras la inoculación con HBo-1, hasta valores similares a los de los animales sanos con HBo-1. La proteína FoxP3 se une a regiones de ADN e induce cambios en la expresión de genes que regulan el sistema inmune, siendo fundamental su participación en la correcta producción y funcionamiento de los linfocitos T reguladores. La disminución de FoxP3 supone una disminución en los mecanismos de control de la respuesta inmune y de la respuesta inflamatoria, pudiendo favorecer el desarrollo de esta última ante determinados estímulos.

Los linfocitos T reguladores liberan TGFB1 para inhibir la acción de otros linfocitos T. Así, esta citoquina impide la proliferación dependiente de IL-1 e IL-2 y la activación de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ quiescentes. Además, el TGFB1 puede inhibir la secreción y la actividad de otras citoquinas, como el IFN- γ , el TNF- α y varias interleuquinas, y disminuir la expresión de receptores de citoquinas, como el de la IL-2, para suprimir la actividad de las células inmunes. En definitiva, juega un papel retromodulador de la respuesta inmune y de la inflamación, que, en el caso de animales que han sufrido DVB aguda, se ve disminuido como lo demuestra el menor número de células inmunomarcadas frente a TGFB1 en estos animales en comparación a animales sanos, ambos enfrentados a HBo1. Por otro lado, esta disminución en TGFB1 dificultaría la diferenciación de los linfocitos T reguladores y favorecería la apoptosis linfocitaria.

La infección por HBo-1 en animales sanos induce una respuesta inmune tipo 1 caracterizada por un temprano y elevado incremento en la síntesis de IFN- γ y, posteriormente, de IL-12, respuesta que es más tardía y de menos intensidad en los animales que han sufrido DVB. Estas diferencias, unidas a alteración en la capacidad

de respuesta de los linfocitos citotóxicos, puede ser una de las causas que determinen que mientras que en los animales sanos inoculados con el HBo-1 este es indetectable mediante técnicas inmunohistoquímicas y no se detectan sincitios celulares inducidos por el HBo-1, en los animales con DVB ocurre lo contrario.

El estudio de la expresión de moléculas de las células que participan en la respuesta inmune demuestra que los animales que han sufrido DVB ven alterada la expresión de varias de ellas. Se observa disminución en la expresión de CD25, necesaria para la respuesta inmune tipo 1, y de CD11B y CD80, que participan en la activación de linfocitos y en la presentación y reconocimiento de antígenos.

El papel que desarrolla el vDVB como favorecedor del CRB ha sido estudiado por nuestro grupo mediante la inoculación del HBo-1 a animales sanos y a animales que han superado la fase clínica de la DVB aguda y en los que la viremia ha desaparecido. La lesión pulmonar originada por la inoculación del HBo-1 consiste en un infiltrado mononuclear e intensas alteraciones vasculares consistentes en una intensa coagulación intravascular en capilares desde el inicio de la enfermedad, con depósitos de fibrina y agregados plaquetarios. La naturaleza de las lesiones es similar tanto en animales sanos como en animales que han superado la DVB, pero en estos últimos son más intensas y su instauración es más temprana tras la inoculación del HBo-1. Estas diferencias están asociadas al diferente comportamiento de las poblaciones de macrófagos presentes en el pulmón, que juegan un papel clave en el desarrollo de diferentes procesos patológicos gracias a su capacidad de secretar mediadores de la inflamación que influyen en el comportamiento del lecho vascular y la circulación de la sangre. Este es el caso del óxido nítrico, de las prostaglandinas y de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. El óxido nítrico y las prostaglandinas son potentes vasodilatadores, y esta última, además, tiene la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria. Su síntesis es inducida, respectivamente, por óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2)

La capacidad de inducir un estado procoagulante del vDVB y del HBo-1 ha sido descrita en estudios *in vitro* y se ha comprobado que se desarrolla en animales infectados por estos virus, demostrándose un efecto sinérgico entre ambos virus en animales que han sufrido DVB y posteriormente se infectan de HBo-1. Los fenómenos vasculares pulmonares previamente descritos podrían estar originados, según la triada de Virchow, por tres mecanismos: a) daño endotelial; b) enlentecimiento de la circulación sanguínea; c) ambiente procoagulante. Se ha descartado que la acción directa del virus sobre el endotelio, o sobre las plaquetas, sea el origen de la activación de estas y el desencadenamiento de la microtrombosis. Por el contrario, se ha demostrado que

durante la infección por HBo-1, ya sea en animales sanos o en animales que han sufrido DVB, los macrófagos sintetizan y liberan citoquinas proinflamatorias y promotoras de cambios en la coagulación sanguínea, aunque con diferencias sustanciales según se trate de animales sanos o animales con DVB.

El estudio de los mediadores proinflamatorios que se liberan en el pulmón demuestran que no existe un efecto sinérgico entre el TNF-a y la IL-1 para el establecimiento de un ambiente procoagulante en los animales que han sufrido DVB, en los que la síntesis a nivel pulmonar y sistémico se produce una vez avanzada la infección con HBo-1, y con posterioridad a la aparición de agregados plaquetarios y microtrombos, con la que coincide una ligera producción de TNF-a por las diferentes poblaciones de macrófagos pulmonares.

Al profundizar en los mecanismos inductores de la microtrombosis en estos animales, se comprueba que la expresión de iNOS sufre un descenso brusco, y dado el papel de este mediador para limitar la extensión y la duración de la activación y agregación plaquetaria, unido al incremento ligero en la síntesis de TNF-a, crearía un estado proagregatorio de plaquetas en una fase temprana de la inoculación con HBo-1. Estos cambios coinciden con un enlentecimiento en la circulación capilar originado por el incremento de tamaño de los macrófagos intravasculares pulmonares por su intensa actividades fagocítica y secretora, cambio circulatorio que favorecería la agregación plaquetaria y microtrombosis.

Como respuesta a este estado, se produce un incremento en la enzima COX-2, con actividad vasodilatadora, pero esta respuesta es incapaz de frenar el proceso de coagulación intravascular y el daño que origina. Por otro lado, el enlentecimiento del flujo sanguíneo y el incremento en la permeabilidad vascular facilitarían la diapédesis de leucocitos al parénquima pulmonar, favorecido por la síntesis de IL-1 en esta fase, dado el papel de las citoquinas proinflamatorias en el incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio.

Los mecanismos desencadenados por el vDVB y el HBo-1 tendrían de esta forma un efecto sinérgico en la patogenia de las lesiones pulmonares descritas, alterando la homeostasis pulmonar al favorecer el establecimiento de un microambiente proinflamatorio y procoagulante mediado por las poblaciones de macrófagos del pulmón.

PRESENTE Y FUTURO

Para concluir permítanme, en mi condición de Rector, de investigador, pero sobre todo de ciudadano, una reflexión sobre la importancia estratégica para un país que supone la investigación en su conjunto y el no desperdiciar nuestro capital humano. En la situación de crisis en la que nos encontramos desde hace unos años los diferentes gobiernos, tanto central como autonómicos, y el sector productivo han optado por disminuir de una forma sensible la financiación de la investigación, a diferencia de lo que ha sucedido en países centroeuropeos, que han apostado por la investigación y la transferencia como motores del desarrollo social y económico. Esta disminución, amén de reducir la capacidad investigadora de cada grupo y del país, ha llevado a que nuestros jóvenes abandonen la carrera científica o vayan a otros países (muestra de ello es nuestro grupo, todos se encuentran fuera) sin expectativa, y esto es lo realmente grave, de retorno en las condiciones adecuadas, rompiéndose la imprescindible cadena de transmisión entre las diferentes generaciones que conforman los grupos. Y la pérdida de esos eslabones, a menos que seamos capaces de remediarla, será la más grave situación a la que tendremos que enfrentarnos, supondrá un retroceso en la investigación y en el desarrollo competitivo de nuestro país, un país que actualmente, y pese a todo, es la décima potencia mundial en investigación e incrementa año tras año su excelencia y calidad. El que todos seamos conscientes de la situación y seamos capaces de difundirlo a nuestro entorno, sensibilizando a la sociedad y a nuestros gobernantes, es necesario para dar una respuesta efectiva.

AGRADECIMIENTOS Y BIBLIOGRAFIA

Se indican las principales publicaciones que hemos realizado sobre el tema y sirven de base a esta presentación. Sin el trabajo, el compromiso y la constancia de los diferentes miembros del equipo de investigación sobre DVB nada habría sido posible. Mi más sincera gratitud y reconocimiento a cada uno de ellos.

Molina V, Risalde MA, Sanchez-Cordon PJ, Pedrera M, Romero-Palomo F, Luzzago C and Gomez-Villamandos JC, (2013). Effect of infection with BHV-1 on peripheral blood leukocytes and lymphocyte subpopulations in calves with subclinical BVD. *Research in Veterinary Science*: 95(1), 115-122.

Molina V, Risalde MA, Sanchez-Cordon PJ, Romero-Palomo F, Pedrera M, Garfia B and Gomez-Villamandos JC, (2014). Cell-mediated immune response during experimental acute infection with bovine viral diarrhoea virus: evaluation of blood parameters. *Transboundary and Emerging Diseases*: 61(1), 44-59.

Pedrera M, Gomez-Villamandos JC, Romero-Trejevo JL, Risalde MA, Molina V and Sanchez-Cordon PJ, (2009a). Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine

- viral diarrhea virus genotype 1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. *Journal of General Virology*: 90(Pt 11), 2650-2659.
- Pedrerá M, Sánchez-Cordon PJ, Romero-Trejejo JL, Rivalde MA, Greiser-Wilke I, Nunez A and Gomez-Villamandos JC, (2009b). Morphological changes and virus distribution in the ileum of colostrum-deprived calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. *Journal of Comparative Pathology*: 141(1), 52-62.
- Pedrerá M, Gomez-Villamandos JC, Rivalde MA, Molina V and Sanchez-Cordon PJ, (2012). Characterization of Apoptosis Pathways (Intrinsic and Extrinsic) in Lymphoid Tissues of Calves Inoculated with Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotype-1. *Journal of Comparative Pathology*: 146(1), 30-39.
- Raya AI, Gomez-Villamandos JC, Sanchez-Cordon PJ and Bautista MJ, (2012). Virus distribution and role of thymic macrophages during experimental infection with noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus type 1. *VeterinaryPathology*: 49(5), 811-818.
- Rivalde MA, Gomez-Villamandos JC, Pedrerá M, Molina V, Ceron JJ, Martínez-Subiela S and Sanchez-Cordon PJ, (2011a). Hepatic immune response in calves during acute subclinical infection with bovine viral diarrhoea virus type 1. *VeterinaryJournal*: 190(2), e110-116.
- Rivalde MA, Molina V, Sanchez-Cordon PJ, Pedrerá M, Panadero R, Romero-Palomo F and Gomez-Villamandos JC, (2011b). Response of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in calves with subclinical bovine viral diarrhea challenged with bovine herpesvirus-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 144(1-2), 135-143.
- Rivalde MA, Molina V, Sanchez-Cordon PJ, Romero-Palomo F, Pedrerá M, Garfía B and Gomez-Villamandos JC, (2013a). Pathogenic mechanisms implicated in the intravascular coagulation in the lungs of BVDV-infected calves challenged with BHV-1. *VeterinaryResearch*: 44(1), 20.
- Rivalde MA, Molina V, Sanchez-Cordon PJ, Pedrerá M, Romero-Palomo F, et al., (2013b). Comparison of pathological changes and viral antigen distribution in tissues of calves with and without preexisting bovine viral diarrhea virus infection following challenge with bovine herpesvirus-1. *American Journal of Veterinary Research*: 74(4), 598-610.
- Rivalde MA, Molina V, Sanchez-Cordon PJ, Romero-Palomo F, Pedrerá M and Gomez-Villamandos JC, (2015). Effects of preinfection with bovine viral diarrhea virus on immune cells from the lungs of calves inoculated with bovine herpesvirus 1.1. *VeterinaryPathology*: 52(4), 644-653.
- Romero-Palomo F, Sanchez-Cordon PJ, Rivalde MA, Pedrerá M, Molina V, Ruiz-Villamayor E and Gomez-Villamandos JC, (2011). Funciones y clasificación de las células dendríticas. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*: 24(1), 167-191.
- Romero-Palomo F, Rivalde MA and Gomez-Villamandos JC, (2015a). Immunopathologic changes in the thymus of calves pre-infected with BVDV and challenged with BHV-1. *Transboundary and Emerging Diseases*, in press (doi: 10.1111/tbed.12406).
- Romero-Palomo F, Rivalde MA, Molina V, Lauzi S, Bautista MJ and Gomez-Villamandos JC, (2015b). Characterization of thymus atrophy in calves with subclinical BVD challenged with BHV-1. *VeterinaryMicrobiology*: 177(1-2), 32-42.