



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO,
A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS
PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DEL SISTEMA
RESPIRATORIO DEL CERDO Y SU PAPEL EN LA
RESPUESTA INMUNE**

Por:

María Guadalupe López Robles

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Diciembre, 2014

APROBACIÓN

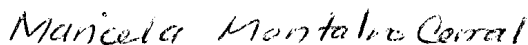
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María Guadalupe López Robles, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



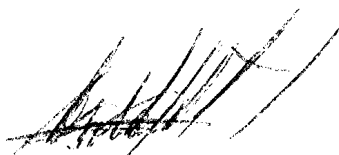
Dr. Jesús Hernández López
Director de Tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Asesora



Dra. Maricela Montalvo Corral
Asesora



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesora



Dr. Ramón Miguel Molina Barrios
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo económico para la realización del presente trabajo de investigación y la obtención del grado de Doctor en Ciencias.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Jesús Hernández, Dra. Maricela Montalvo Corral, Dra. Verónica Mata, Dra. Gabriela Ramos y Dr. Ramón Molina, gracias por su apoyo, disponibilidad y por haber enriquecido este trabajo con su valiosa experiencia.

Por su apoyo técnico a la Q.B. Mónica Reséndiz Sandoval.

A Héctor Galindo Murrieta, Verónica Araiza Sánchez, Laura García Cruz y Argelia Marín Pacheco por su asistencia en trámites y servicios de docencia.

A Karla Gabriela Robles Bernal y Marovi Cortez Guzmán por su asesoría en servicios computacionales.

Al personal de la biblioteca, Luis Francisco Conde Ortiz, Gerardo Reyna Cañez y Fernando Alejo Leyva Livshin, por su disponibilidad y trato amable en todo momento.

A Manuel de Jesús Hernández por su apoyo técnico.

A Dios por darme la oportunidad de vivir, cumplir metas personales y profesionales, pero sobre todo por darme con quién compartirlas.

A mis amigos del laboratorio de inmunología por los momentos inolvidables y por su valiosa amistad: Mary, Mony, Erika, Lily, Karina, Edgar, Alexel, Chava, Elí, Héctor, Ana y Doc. Espero que nuestra amistad siga creciendo con el tiempo.

A todas aquellas personas de CIAD que de alguna u otra manera han estado conmigo durante mi estadía en este lugar que fue mi segundo hogar durante 9 años.

A mi familia; mis padres, Artemiza y Fidencio; mis hermanos y cuñadas, Martín y Nora, Luis y Lupita; mis sobrinos, Martín, Ángela, Fernanda, Amí, Sofía y Luisito. Por su apoyo incondicional, cuidados, cariño y paciencia.

A mi familia política; mi suegros, María Inés y Gregorio; mis cuñadas y cuñados, Goyo y Rocío, Susana y José, Mónica y Rigoberto, Horacio; a mis nuevos sobrinos, Valeria, Riguito, Andrea, Goyito, Luisito, Inés y Sofía. Por su apoyo y por recibirme en su familia con tanto cariño.

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), a través del proyecto 160315 de la convocatoria C0008-2011-01 ANR Francia-CONACyT (Convocatoria Conjunta de Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación Bilaterales México-Francia).

DEDICATORIA

*A las dos personas
que me han enseñado
el verdadero significado
de la palabra
AMOR*

Mis Rodrigos

Los amo

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE TABLAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1.Células Dendríticas (DCs)..... | 4 |
| 2.1.1. Receptores y Poblaciones de DCs..... | 6 |
| 2.1.2. Generalidades de las Células Presentadoras de Antígeno en el Cerdo | 8 |
| 2.1.3. El Papel de las Células Presentadoras de Antígeno en Infecciones Virales | 12 |
| 2.2.El Papel de las Células Dendríticas Ante el PRRSV..... | 13 |
| 2.2.1. Síndrome Reproductivo Y Respiratorio Porcino..... | 13 |
| 2.2.2. Etiología del PRRS | 14 |
| 2.2.3. Mecanismo de Infección del PRRSV y Respuesta Inmune..... | 15 |
| III. HIPÓTESIS | 19 |
| IV. OBJETIVOS | 20 |
| 4.1.General..... | 20 |
| 4.2.Particulares..... | 20 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 5.1.Caracterización Fenotípica y Funcional de las APCs de Pulmón de Cerdo..... | 21 |
| 5.1.1. Animales | 21 |
| 5.1.2. Obtención del Pulmón y de las Células Presentadoras de Antígenos | 21 |
| 5.1.3. Anticuerpos y Citometría de Flujo..... | 23 |
| 5.1.4. Aislamiento de Células MHC-II ⁺ por MACS | 25 |
| 5.1.5. Aislamiento de Linfocitos de Sangre Periférica (PBLs)..... | 26 |
| 5.1.6. Reacción Leucocitaria Mixta (MLR) | 26 |
| 5.1.7. Ensayo de Internalización de Antígenos | 27 |
| 5.2.Evaluación de la Susceptibilidad de las APCs de Pulmón de Cerdo al PRRSV..... | 27 |

| | | |
|--|---|----|
| 5.2.1. | Inoculación con el PRRSV | 27 |
| 5.2.2. | Evaluación de la Replicación Viral | 28 |
| 5.2.3. | Evaluación de Apoptosis y Necrosis en las Células Infeccionadas..... | 28 |
| 5.3. | Análisis Estadístico..... | 29 |
| VI. | RESULTADOS | 30 |
| 6.1. | Caracterización Morfológica, Fenotípica y Funcional de las APCs de Pulmón de Cerdo..... | 30 |
| 6.1.1. | Morfología de L-Cs, LN-Cs y PAMs..... | 30 |
| 6.1.2. | Caracterización Fenotípica de las Células Presentadoras de Antígeno de Pulmón | 31 |
| 6.1.3. | Reacción Leucocitaria Mixta por las L-Cs, LN-Cs y PAMs | 35 |
| 6.1.4. | Capacidad de Internalización de Antígenos por las APCs Pulmonares | 36 |
| 6.1.5. | Producción de Lisozima por las APCs | 37 |
| 6.2. | Evaluación de la Susceptibilidad de las APCs de Pulmón de Cerdo al PRRSV | 38 |
| 6.2.1. | Replicación Viral | 38 |
| VII. | DISCUSIÓN | 43 |
| VIII. | CONCLUSIÓN..... | 50 |
| XI. | REFERENCIAS | 51 |
| ANEXO | | 59 |
| Artículo en proceso de publicación..... | | 59 |
| Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system | | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 1. Origen, localización, desarrollo y maduración de las poblaciones de células presentadoras de antígeno. | 6 |
| 2. Subpoblaciones de células presentadoras de antígenos en el pulmón de ratón | 7 |
| 3. Células dendríticas caracterizadas en el cerdo..... | 9 |
| 4. Mecanismo de respuesta inmune contra virus..... | 13 |
| 5. Estructura de una partícula de PRRSV y su genoma | 15 |
| 6. Mecanismo de respuesta inmune durante una infección por PRRSV <i>in vitro</i> | 18 |
| 7. Estructura celular y morfología de L-Cs, LN-Cs and PAMs. | 30 |
| 8. Presencia de células contaminantes..... | 31 |
| 9. Determinación de las poblaciones de APCs | 33 |
| 10. Niveles de expresión de los marcadores en las poblaciones de APCs | 34 |
| 11. Caracterización fenotípica de las poblaciones de APCs | 35 |
| 12. Habilidad de las APCs para inducir linfoproliferación en la reacción leucocitaria mixta | 36 |
| 13. Habilidad de internalización de las APCs..... | 37 |
| 14. Producción de lisozima por APCs..... | 38 |
| 15. Replicación del PRRSV en APCs de pulmón..... | 39 |
| 16. Caracterización fenotípica de las poblaciones de APCs inoculadas con el PRRSV | 40 |
| 17. Habilidad de las APCs inoculadas con el PRRSV para inducir linfoproliferación en la reacción leucocitaria mixta | 41 |
| 18. Replicación del PRRSV en APCs de pulmón..... | 42 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|---------------|
| 1. Expresión de marcadores en las APCs | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza de una vía
APC: Células presentadoras de antígenos
ASFV: Fiebre Macrófagos alveolares pulmonares porcina africana
BAL: Lavado bronqueoalveolar
BM-DC: Células dendríticas derivadas de médula ósea
cDC: Células dendríticas convencionales
CLR: Receptores de lectina tipo C
CNA: Células no adherentes
DAMP: Patrones moleculares asociados a daño
DC: Células dendríticas
FMO: Fluorescencia menos uno
FSC: Tamaño de las células
IFN: Interferón
L-C: Células presentadoras de antígeno de pulmón de cerdo
L-DC: Células dendríticas de pulmón
LC: Células de Langerhans
LN-C: Células presentadoras de antígeno de linfonodo mediastinal
LN-DC: Células dendríticas de linfonodo mediastinal
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
MLR: Reacción leucocitaria mixta
Mo-DC: Células dendríticas derivadas de monocitos
NIPC: Células productoras naturales de interferón
NLR: Receptores tipo NOD
NSP: Proteínas no estructurales
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PAM: Macrófagos alveolares pulmonares
PBL: Linfocitos de sangre periférica
PCV2: Circovirus porcino tipo 2
pDC: Células dendríticas plasmocitoides
PP: Placas de Peyer
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
PRRS: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino
PRRSV: Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino
RLR: Receptores de helicasas
SR: Receptores scavenger o basureros
SSC: Complejidad de las células
TGEV: Virus de la gastroenteritis transmisible
Th: Células T cooperadora
TLR: Receptores de tipo Toll
Tregs: Células T reguladoras

RESUMEN

Las células presentadoras de antígenos (APCs), están ubicadas estratégicamente en todos los sitios con alta exposición a antígenos, como el sistema respiratorio. Las APCs más importantes en el sistema respiratorio son las células dendríticas (DCs) de pulmón, las DCs de linfonodos y los macrófagos alveolares pulmonares (PAMs). Sin embargo, aún en la actualidad, es difícil discriminar entre DCs y macrófagos en muchas especies, esto debido a que no se han descrito marcadores fenotípicos exclusivos para cada población. En el cerdo, la información disponible acerca de las APCs asociadas al sistema respiratorio es escasa. Por esta razón ha sido una tarea difícil la caracterización de las DCs pulmonares, así como su rol en la inmunopatología de las enfermedades respiratorias en el cerdo. El objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípica y funcionalmente las poblaciones de APCs de pulmón (L-Cs) y compararlas con otras células presentadoras de antígeno asociadas al tracto respiratorio porcino; así como la susceptibilidad de las L-Cs, APCs de linfonodo mediastinal (LN-Cs) y PAMs al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Para ello, las células fueron seleccionadas en base a su tamaño y su complejidad y la población de APCs con el fenotipo MHC-II^{high}CD172a⁺ fue seleccionada. En esta población, se evaluó la expresión de los marcadores CD1a, CD163, CD206, CD16 y CD11R3, así como su funcionalidad en base a sus habilidades de internalización de antígenos, reacción leucocitaria mixta y capacidad de producción de lisozima. Para la evaluación de la susceptibilidad, las APCs fueron inoculadas con la cepa del PRRSV NVSL-9587 con un MOI de 0.1 y se incluyeron controles sin virus (mock); y se analizó la replicación, fenotipo, MLR y apoptosis. Los resultados muestran que los receptores CD1a, CD163 y CD206 fueron expresados diferencialmente entre L-Cs, LN-Cs y PAMs, sugiriendo el fenotipo MHC-II^{high}CD172+CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻ para las L-Cs y MHC-II^{high}CD172+CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺ para las LN-Cs. Adicionalmente, se observaron indicios de que el PRRSV podría estarse replicando y afectando el fenotipo y funcionalidad en las L-Cs. En conclusión, se logró caracterizar a las

APCs del sistema respiratorio del cerdo y se observó preliminarmente la infección por PRRSV en las L-Cs.

Palabras clave: Células presentadoras de antígenos, cerdo, células dendríticas, sistema respiratorio, pulmón, PRRSV.

ABSTRACT

Antigen-presenting cells (APCs) are strategically located in all anatomic sites with high antigen exposure such as the respiratory system. The most important APCs in the respiratory system are pulmonary dendritic cells (DCs), mediastinal lymph node DCs and pulmonary alveolar macrophages (PAMs). However, it is still difficult to discriminate among DCs and macrophages in many species because the lack of exclusive phenotypic markers. In swine, limited information regarding APCs associated with the respiratory system is available. For that reason, it has been difficult the characterization of pulmonary DCs, as well as their role in the immunopathology of the respiratory diseases in swine. The aim of this study was to determinate the morphologic, phenotypic and functional characterization of the pulmonary APCs and compares them with other antigen presenting cells associated to the respiratory tract in pig, as well as to determine susceptibility to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) of APCs from the lung (L-Cs), mediastinal lymph node (LN-Cs) and PAMs. To achieve these objectives, the cells were first analyzed based on the forward scatter and side scatters profiles y the MHC-II^{high}CD172a⁺ cells were selected as the APCs. In this population the expression of CD1a, CD163, CD206, CD16 and CD11R3 was evaluated. The functionality in these populations was assessed through uptake abilities, and mixed leucocyte reaction (MLR) assays, as well as through lysozyme production. For the susceptibility to PRRSV, APCs were first inoculated with the PRRSV NVSL-9587 at MOI of 0.1 and controls without virus (mock) were included. Then, replication of the virus, cell phenotype, MLR assay, apoptosis and necrosis were assessed in pulmonary APCs. These results showed that the receptors CD1a, CD163 and CD206 were differentially expressed among L-Cs, LN-Cs and PAMs, suggesting the phenotype MHC-II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻ for L-Cs and MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺ for LN-Cs. The functional characteristics of L-Cs and LN-Cs were different from those of PAMs, confirming that L-Cs and LN-Cs resemble specialized APCs. Additionally, was

observed that the PRRSV might be replicate and affect phenotypic and functional properties of L-Cs. In conclusion, we present the characterization of APCs of the porcine respiratory system and a preliminarily the infection of PRRSV in L-Cs was observed.

Keywords: Antigen-presenting cells, porcine, dendritic cells, respiratory system, lung, PRRSV.

I. INTRODUCCIÓN

Las células presentadoras de antígenos (APC) tienen un papel importante en la respuesta inmune; activan, coordinan y regulan la respuesta inmune adaptativa. Entre las APC, destacan las células dendríticas (DCs), las cuales reconocen señales de alerta ante la presencia de los patógenos, los internalizan, procesan y presentan a los linfocitos T vírgenes. Además por co-estimulación y la liberación de citocinas pro o anti-inflamatorias, influyen en la polarización de la respuesta inmune adaptativa, ya sea a T cooperadora (Th) 1, Th2 o T reguladoras (Tregs), entre otras (Kapsenberg, 2003). El tipo de respuesta depende básicamente de las señales de peligro presentes en el patógeno; estas son reconocidas como firmas moleculares de los microorganismos que se exhiben como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son reconocidos por las DCs a través de diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Tang et al., 2012).

Conocer las características fenotípicas de las DCs proporciona información sobre sus funciones especializadas. Sin embargo, en las investigaciones realizadas sobre DCs de tejidos de cerdo no se ha definido un criterio estándar para su caracterización; esto se debe a que hasta el momento no se conocen marcadores que se expresen exclusivamente en las DCs (Bimczok et al., 2005; Haverson et al., 2000; Loving et al., 2007; Makala et al., 1998; Ondrackova et al., 2010; Soerensen et al., 2005). Summerfield et al. (2003), identificaron DCs de sangre en base a la expresión de CD172a, combinándolo con CD4 y CD14; Jamin et al. (2006) las caracterizaron por el fenotipo CD172a⁺CD11R1⁺. En el intestino, Bimczok et al. (2005), identificaron DCs por la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) y las clasificaron en subpoblaciones en base a la expresión de CD11R1 y

CD172a. En piel, las DCs dermales se caracterizaron por expresar MHC-II^{high}CD172a^{+/-}CD163^{+/-} y las dermales MHC-II^{high}CD172a⁺CD163⁻ (Bautista et al., 2002; Marquet et al., 2011). DCs de linfa aferente mostraron el fenotipo MHC-II^{high}CD172a^{+/-}CD163^{+/-} y mediante este sistema fue posible la identificación de sub-poblaciones (Marquet et al., 2011). El CD172a es un marcador usado como base en la caracterización de DCs porcinas, sin embargo debe ser combinado con otros marcadores debido a que también se expresa en células MHC-II⁻, como los eosinófilos (Bimczok et al., 2005). La característica más conocida en las DCs es la expresión de MHC-II^{high} (Steinman, 1991) y las DCs de cerdo no son la excepción. La combinación de estos dos marcadores, CD172a y MHC-II, parece ser una base confiable para la caracterización de DCs porcinas.

En el caso de una infección pulmonar, las DCs del sistema respiratorio y los macrófagos serían las células más expuestas; por eso son de gran interés en el estudio de diversas enfermedades en el cerdo, por ejemplo el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) (Mateu and Diaz, 2008; Summerfield and McCullough, 2009). Sin embargo, la mayoría de los estudios en donde se evalúa la susceptibilidad de las DCs al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) se han realizado *in vitro*, con DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) o de médula ósea (BM-DCs) (Flores-Mendoza et al., 2008; Silva-Campa et al., 2010; Silva-Campa et al., 2009; Silva-Campa et al., 2012; Wang et al., 2007; Wongyanin et al., 2010) y solo un estudio se ha realizado en DC de pulmón (L-DCs) de cerdo (Loving et al., 2007). En la investigación realizada por Loving et al. (2007), se aislaron células pulmonares en base a la expresión de CD11c y aparentemente no se obtuvo una población pura de L-DCs, ya que se sabe que este marcador no se presenta solo en las DCs (Lacal et al., 1988). Por lo anterior, los resultados obtenidos no fueron concluyentes y es muy importante continuarlos, pero para el estudio de las enfermedades respiratorias del cerdo, primeramente es necesaria la caracterización adecuada de las DCs de pulmón y otras APCs respiratorias.

La identificación y caracterización de las poblaciones de las APC del sistema respiratorio en el cerdo contribuirá a una mejor comprensión de su participación en la inmunopatología de las enfermedades respiratorias porcinas como el PRRS. Por ello, en este trabajo de tesis se identificaron y caracterizaron las poblaciones de APC de pulmón y linfonodo mediastinal de cerdo y además se evaluó la susceptibilidad de las APCs al PRRSV.

II. ANTECEDENTES

La presentación de antígenos, es un proceso realizado por células especializadas llamadas células presentadoras de antígenos (APCs). En este proceso, las APCs internalizan a los antígenos para procesarlos y presentarlos a los linfocitos T para activar la respuesta inmune adaptativa (Hamilos, 1989). Además de la presentación, estas células expresan en su membrana celular moléculas de co-estimulación y secretan citocinas; esto también es muy importante para el proceso de activación (Angel et al., 2009). Actualmente, se sabe que una gran variedad de células puede llevar a cabo la función de presentación de antígenos, como las DCs, los macrófagos o los linfocitos B; sin embargo, las APCs por excelencia son las DCs (Steinman, 1991).

2.1. Células Dendríticas (DCs)

En términos generales las DCs están clasificadas en dos grupos: las DCs convencionales (cDCs) y las DCs plasmocitoides (pDCs), también llamadas productoras naturales de interferón (NIPCs). Las cDCs son de origen mieloide y se caracterizan por su capacidad eficiente de presentar antígenos; en cambio las pDCs son de origen linfoide y se especializan en la producción de interferones (IFNs) tipo I (α y β) (Summerfield and McCullough, 2009). Los precursores mieloides, migran a través del torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos donde se diferencian en células de Langerhans (LCs), en presencia de TGF- β , o en células intersticiales en presencia de IL-4. Las DCs

diferenciadas permanecen inmaduras en los tejidos hasta que un estímulo antigénico induce su activación y migración hacia ganglios linfáticos, en los cuales adquieren características de células maduras (Vremec and Shortman, 1997). Los progenitores de las DCs linfoides, entran al timo para alojarse y desarrollarse en la médula tímica, en la unión corticomedular o viajan directamente hacia los órganos linfoides secundarios y se desarrollan en DCs (Saunders et al., 1996).

Las DCs, por sus funciones clave en el reconocimiento y presentación de antígenos, así como en la activación, coordinación y regulación de la respuesta inmune adaptativa, están situadas estratégicamente como centinelas del sistema inmune en los sitios con mayor exposición antigénica, tales como la piel, el intestino, el bazo y el pulmón (Figura 1). En el sistema respiratorio, las DCs de pulmón (L-DCs), las DCs de linfonodos mediastinales (LN-DCs) y los macrófagos alveolares pulmonares (PAMs) tienen un rol fundamental en la activación de la respuesta inmune. En humanos, las L-DCs presentan una morfología típica con dendritas, expresión abundante de MHC-II, aunque muestran baja expresión de moléculas de co-estimulación; su capacidad de activación en la reacción leucocitaria mixta (MLR) es alta (Cochand *et al.*, 1999; Demedts *et al.*, 2005). En ratón, se han detectado tres subpoblaciones de L-DCs y LN-DCs, la clasificación se basó en la expresión de CD8 y CD45RA. Después de tres días de infección con influenza, se observó que las LN-DCs CD8⁺, fueron las mejores para presentar antígenos vía MHC-I, pero no se pudo discriminar si estas fueron residentes del linfonodo o reclutadas de pulmón (Belz *et al.*, 2004). Las células que predominan en el lavado bronqueoalveolar (BAL) de humanos son los PAMs, las cuales, comparadas con células de parénquima pulmonar, inducen baja proliferación de linfocitos (Weissler *et al.*, 1986).

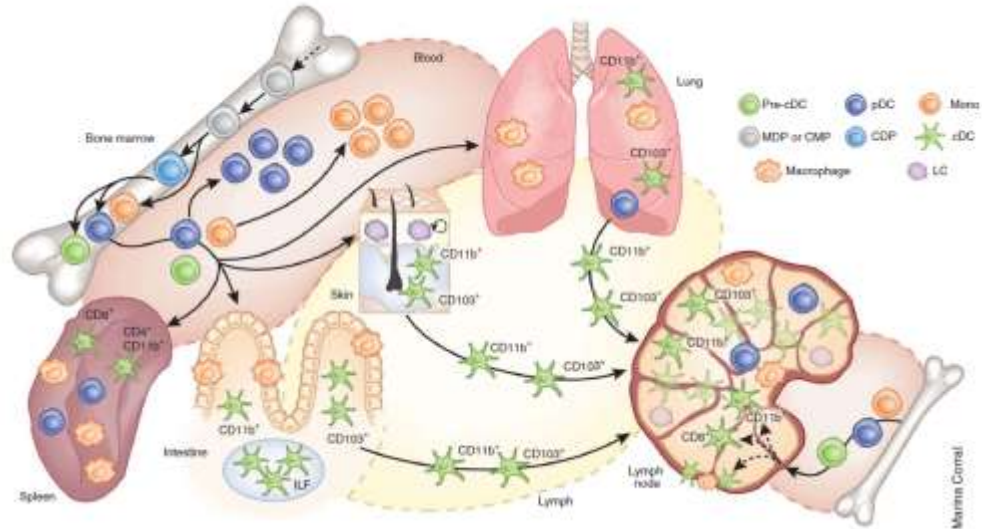


Figura 1. Origen, localización, desarrollo y maduración de las poblaciones de células presentadoras de antígeno del ratón (Satpathy et al., 2012).

2.1.1. Receptores y Poblaciones de DCs

Las APC expresan una amplia variedad de receptores, muchos de los cuales se expresan diferencialmente en las DCs. Por ejemplo, entre los PRRs se encuentran los receptores de tipo Toll (TLR), de lectina tipo C (CLR), scavenger o basureros (SRs), de helicasas (RLR), NOD (NLR), entre otros (Hardison and Brown, 2012). Estos receptores reconocen las señales de peligro en los patógenos (PAMPs) y también pueden reconocer ligandos endógenos, como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los cuales pueden ser proteínas de choque térmico, productos de degradación de la matriz extracelular, células apoptóticas y el contenido intracelular de las células necróticas (Li et al., 2001; Tang et al., 2012).

La expresión diferencial de receptores en la superficie de las APC les confiere habilidades específicas y en algunas especies permite discriminar entre DCs, macrófagos y linfocitos B. En el ratón se han detectado en la dermis cuatro sub-poblaciones de DCs: 1) $CD207^-CD11b^+RALDH^{+/-}$, conforman la mayoría de las células dermales, participan principalmente en la presentación de antígenos virales a células T $CD4^+$ y en la inducción de hipersensibilidad por

contacto; las células RALDH⁺ activan la inducción de Tregs; 2) CD207⁺CD103⁺, intervienen en la presentación cruzada de proteínas propias expresadas en la piel y de antígenos virales a células T CD8⁺ y CD4⁺, así como en la inducción de hipersensibilidad por contacto; 3) CD207⁺CD103⁻, estas células corresponden a las células de Langerhans (LCs) que van migrando hacia linfonodos, presentan antígenos virales a células T CD4⁺ e inducen hipersensibilidad por contacto; 4) CD207⁻CD11b⁻, estas representan la minoría de las DCs de la dermis (Guilliams et al., 2013). También se han detectado dos sub-poblaciones de L-DCs: 1) CD11b^{high}CD11c⁺CD103⁻ y 2) CD11b^{low}CD11c⁺CD103⁺, así como otras poblaciones de APCs en el pulmón (Figura 2).

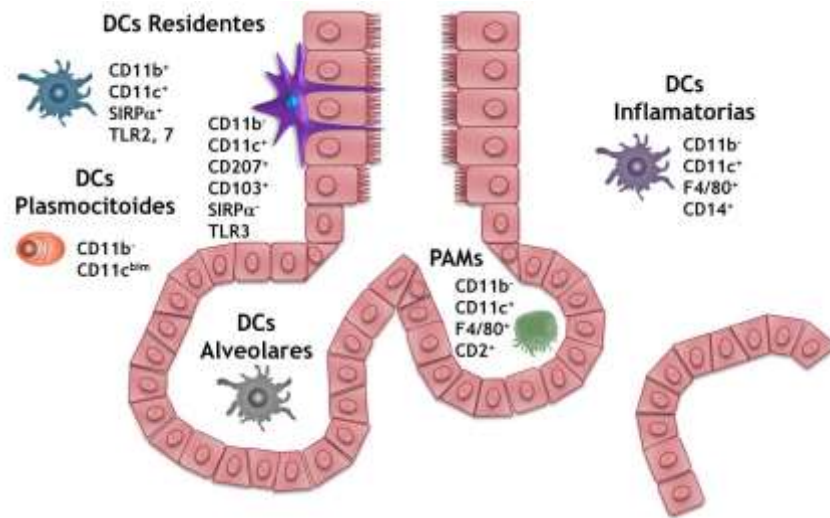


Figura 2. Subpoblaciones de células presentadoras de antígenos en el pulmón de ratón (Chen et al., 2006; Lambrecht and Hammad, 2012).

En el humano también se han encontrado sub-poblaciones de DCs en diferentes tejidos. Por ejemplo se han detectado 2 en pulmón: 1) CD1c⁺CD11c⁺CD14⁻HLA-DR⁺, esta población representa a las cDCs, expresión moléculas de co-estimulación como CD80/86 en niveles elevados y poseen una capacidad elevada para inducir proliferación de linfocitos T; 2) CD123⁺CD11c⁻CD14⁻HLA-DR⁺, estas células corresponden a las pDCs, ya que producen altas cantidades de IFN-α en respuesta a un ligando de TLR7 (Masten et al., 2006).

En órganos linfoides de cerdo se han identificado cDCs y pDCs, las cuales tienen los fenotipos CD172a⁺ CD11R1⁺ CD1^{+/-} CD80/86^{+/-} y CD172a⁺ CD4⁺ CD1^{+/-} CD80/86^{+/-}, respectivamente (Jamin et al., 2006). Además, recientemente se propuso una clasificación para las DCs de cerdo en base a la expresión de los receptores CD163, CD172z, CD11R3, CD16, CD206, CD207, CD209 y CadM1. Con este sistema, se identificaron 4 sub-poblaciones de DCs en epidermis, dermis y ganglio linfático iliaco de cerdo (Marquet et al., 2011). Esta clasificación de sub-poblaciones de DCs podría ser empleada para homologar la caracterización de DCs en diversos tejidos del cerdo.

La presencia de subpoblaciones celulares en la misma área anatómica es favorecida por la variedad de receptores que presentan. Estas células convergen en tiempo y espacio, y comparten funciones para proteger la integridad de los tejidos. En humano y ratón se han realizado una amplia variedad de estudios, pero en el sistema respiratorio del cerdo se conoce muy poco sobre de la presencia de diferentes subpoblaciones y de sus funciones específicas.

2.1.2. Generalidades de las Células Presentadoras de Antígeno en el Cerdo

Las células dendríticas, como la principal APC, han sido descritas en el cerdo; sin embargo, dado a que no existe un marcador que sea expresado exclusivamente por las DCs, es difícil establecer un criterio definitivo para su caracterización (Figura 3). Summerfield et al. (2003), identificaron DCs de sangre en base a la expresión de CD172a, combinándolo con CD4 y CD14. Las cDCs fueron identificadas con el fenotipo CD172a⁺CD4⁻CD14⁻, y mostraban una expresión MHC-II^{high}CD11R2⁺CD80/86⁺CD1^{+/-}CD16^{+/-}. Jamin et al. (2006), caracterizaron a las cDCs por el fenotipo CD172a⁺CD11R1⁺, las cuales expresaban MHC-II^{high}CD80/86^{+/-}CD1^{+/-}. Las células pDCs o productoras naturales de interferón (NIPCs) también se han caracterizado en el cerdo (Jamin et al., 2006; Summerfield et al., 2003). Las pDCs se distinguen por el

CD172a, de esta forma se identificaron 4 subpoblaciones (Figura 3): CD163⁻CD172a⁻, CD163^{high}CD172a⁺, CD163⁺CD172a⁺ y CD163⁻CD172a⁺ (Marquet et al., 2011). En DCs de linfa aferente, se detectó que las cuatro subpoblaciones de DCs de piel migraron, pero la subpoblación CD163⁻CD172a⁻ fue la que mayormente migró y además presentó la capacidad de transportar cuerpos apoptóticos. Estos resultados son similares a lo que se han descrito previamente en ratón, oveja y humano (Bonifaz et al., 2002; Epardaud et al., 2004; Idoyaga et al., 2008; Segura et al., 2012). Además la subpoblación de DCs dermales CD163^{high}CD172a⁺ presenta baja capacidad migratoria, lo que sugiere que estas células, aparentemente son principalmente residentes. Esto podría indicar, que en el cerdo, así como en otras especies, la distribución diferencial de las subpoblaciones de DCs porcinas se relaciona con su funcionalidad. Sin embargo, en una revisión publicada recientemente, se cuestionó fuertemente la propuesta de Marquet et al. (2011), debido a que no existe certeza de que las células CD163⁺ o CD163^{high} sean DCs o macrófagos (Mair et al., 2014). Por lo anterior es necesario perfeccionar este sistema de clasificación de DCs.

El CD163 es un receptor necesario para la infección de la célula blanco por el PRRSV (Calvert et al., 2007). Las células blanco del PRRSV son los macrófagos alveolares (AM) inmaduros y se ha demostrado *in vitro* que también infecta a Mo-DCs o BM-DCs, pero no ha sido demostrado *in vivo*. Si se analiza la expresión de CD163 en las DCs aisladas de cerdo, podría ser de gran importancia para el esclarecimiento de la inmunopatología de enfermedades tan importantes como el PRRS.

El fenotipo de las DCs de pulmón (L-DCs) y de linfonodos mediastinales (LN-DCs) ha sido escasamente estudiado y además se desconoce qué tan eficientes podrían ser estas células, para activar la respuesta inmune y si se encuentran organizadas en subpoblaciones. En algunos estudios se han descrito algunas características fenotípicas de las L-DCs (Loving et al., 2007; Marquet et al., 2011; Ondrackova et al., 2010; Soerensen et al., 2005). En el epitelio alveolar, las L-DCs tienen una morfología estrellada y expresan S-100

(Soerensen et al., 2005). Una población enriquecida de L-DCs CD11c⁺ muestra una estructura compleja y granular, expresa CD80/86, CD172a y CD1. Además, más del 50% presenta expresión de MHC-II y CD16, y una pequeña fracción de células son CD14⁺ (Loving et al., 2007). Sin embargo, en humanos se ha observado que el receptor CD11c no es exclusivo de las DCs (Lacal et al., 1988) y que la mejor característica fenotípica que describe a las DCs es la expresión de MHC-II^{high} (Steinman, 1991). Es posible que la población de DCs CD11c⁺ que se describió previamente no esté integrada completamente por DCs (Loving et al., 2007). En el caso de las LN-DCs porcinas, se desconocen sus características funcionales y fenotípicas. Por todo lo anterior, es necesaria una mejor caracterización de las L-DCs y LN-DCs de cerdo, con ello se podrá complementar el estudio de la respuesta inmune en enfermedades respiratorias del cerdo.

Las células de lavado bronqueoalveolar (BAL-Cs) porcino son 90-97% PAMs, los cuales han sido descritos en una variedad amplia de estudios (Basta et al., 2000; Berndt and Muller, 1997; Chitko-McKown et al., 1991; Ganter and Hensel, 1997; Morton and Bertram, 1988). El tamaño de los PAMs es de $16.1 \pm 4.8 \mu\text{m}$, con un citoplasma granular y núcleo grande (Chitko-McKown et al., 1991). Los PAMs CD172a⁺ son MHC-II^{high}, y al ser comparadas con otras células se ha observado que los PAMs poseen habilidades linfoproliferativas y fagocíticas bajas (Basta et al., 2000; Chitko-McKown et al., 1991). Los PAMs porcinos, son células con características morfológicas y funcionales conocidas, por ello pueden ser empleadas como un punto de referencia en el estudio de las L-DCs y las LN-DCs.

La expresión de CD11R1 ha sido empleada en el cerdo como un marcador para diferenciar a las DCs; sin embargo, no todas las DCs expresan CD11R1 y células de otro tipo podían ser positivas a este marcador, como monocitos, macrófagos y neutrófilos (Bimczok et al., 2005; Dominguez et al., 2001). Adicionalmente, no se han detectado diferencias funcionales entre las subpoblaciones de DCs positivas o negativas a este marcador (Jamin et al.,

2006). En contraste, el CD172a se expresa en todas las DCs caracterizadas en el cerdo (Bautista et al., 2002; Bimczok et al., 2005; Haverson et al., 1999; Summerfield et al., 2003). Por otra parte, aunque hay indicios de que en el cerdo hay una subpoblación de DCs CD172a⁻, estas células podrían especializarse en la internalización de cuerpos apoptóticos y no en la activación de la respuesta inmune (Marquet et al., 2011). Por ello, se podría suponer que el CD172a, combinado con otros marcadores, podría ser un buen marcador para caracterizar poblaciones de DCs de cerdo. Dado que el MHC-II es una molécula para presentación de antígenos y el CD172a es un marcador pan-mielocítico para el sistema monocito/mononuclear en el cerdo (Bautista et al., 2002; Bimczok et al., 2005; Ezquerro et al., 2009; Haverson et al., 1999), la selección de células MHC-II^{high}CD172a⁺ podría ser una estrategia adecuada para la detección de DCs en el cerdo.

2.1.3. El Papel de las Células Presentadoras de Antígeno en Infecciones Virales

La interacción que existe entre las APCs y los virus, está relacionada con la capacidad de la célula de responder adecuadamente promoviendo una respuesta inflamatoria, o bien, el virus sea capaz de interferir con su función y con ello evadir al sistema inmune. En la respuesta contra virus, las DCs deben producir citocinas pro-inflamatorias como interferones tipo I (α y β), TNF- α e IL-12; expresar altos niveles de moléculas de co-estimulación como el CD80/86, moléculas de presentación de antígeno como el MHC-I y II (Kapsenberg 2003) (Figura 4). Sin embargo, existen algunos virus que interactúan con células del sistema inmune innato e interfieren con la inducción de la respuesta antiviral de la DC. Por ejemplo, se sabe que una proteína del virus de la fiebre porcina africana (ASFV) interfiere con la vía de señalización del TLR3 y suprime la inducción de IFNs. Las cepas más virulentas tienen mayor capacidad de suprimir los IFNs y otras citocinas pro-inflamatorias (de Oliveira et al., 2011). El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) impide la inducción de IFNs mediada por TLR9

(Vincent et al., 2005). Proteínas no estructurales (NSPs) del PRRSV se asocian a los factores reguladores de interferones (IRF) 3 e IRF7, los cuales son factores de transcripción que forman parte de la vía de señalización para la producción de IFNs (Honda and Taniguchi, 2006). Mediante este mecanismo, el PRRSV suprime la señalización y producción de IFNs (Beura et al., 2010; Calzada-Nova et al., 2010). Ante infecciones virales, la activación de la respuesta inmune depende de la coordinación adecuada de las células del sistema inmune innato para activar a células efectoras. Cuando los virus interfieren con la inducción de la inmunidad innata se pueden obtener como resultado infecciones virales difíciles de eliminar, como sucede con las mencionadas anteriormente.

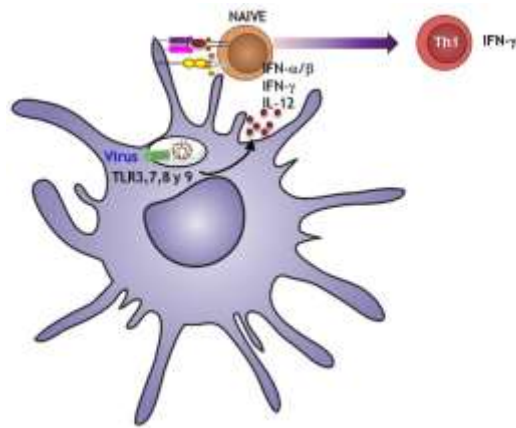


Figura 4. Mecanismo de respuesta inmune contra virus (Kapsenberg, 2003; Tang et al., 2012).

2.2. El Papel de las Células Dendríticas Ante el PRRSV

2.2.1. Síndrome Reproductivo Y Respiratorio Porcino

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad infecciosa de los cerdos más importante desde el punto de vista económico y se encuentra distribuida en todo el mundo (Neumann et al., 2005). En Estados Unidos, las pérdidas económicas a causa del PRRS son de 560 millones de dólares al año aproximadamente. Esto debido a la elevada mortalidad y a la

baja ganancia diaria de peso en los cerdos (Pitkin et al., 2009). La enfermedad tiene una gran variedad de manifestaciones clínicas. En cerdas gestantes y de remplazo produce fallas reproductivas (caracterizadas por abortos tempranos, mortinatos, momias y nacidos débiles). En los cerdos de producción de granjas comerciales se observa disminución en la ganancia diaria de peso y problemas respiratorios como anorexia, letargia, disnea e hiperemia (Music and Gagnon, 2010). Los animales que cursan con PRRS pueden estar predispuestos a infecciones secundarias por *Streptococcus suis* tipo II, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, coronavirus e influenza (Diao et al., 2005). Estos agentes pueden complicar la infección y ocasionar lesiones más severas y por ende un mayor impacto económico en la industria porcícola (Fraile et al., 2009).

2.2.2. Etiología del PRRS

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es causado por el virus PRRS (PRRSV). El virus presenta un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, mide 50-65 nm de diámetro, 15 kb de longitud y es envuelto. Se clasifica en el orden de los Nidovirales, familia Arteriviridae, genero *Arterivirus*. Existen 2 genotipos del PRRSV, el europeo (EU, Lelystad o tipo I) y el norteamericano (NA, VR-2332 o tipo II), a nivel de nucleótidos tienen una identidad del 55-70% entre ellos (Wang et al., 2009). Aunque éstos poseen similitudes biológicas e inmunológicas y una organización genómica casi idéntica, ambas cepas son genética y antigénicamente diferentes. Además, dentro de los mismos genotipos hay una considerable diversidad genética (Music and Gagnon, 2010), lo cual influye en la respuesta inmune protectora inducida por vacunas del PRRSV. Por esta razón no existe una vacuna 100% efectiva para su prevención (Vanhee et al., 2009).

El genoma del PRRSV se compone de 10 marcos de lectura abierta (ORF). Los ORFs 1a y 1b codifican 14 poliproteínas no estructurales de la

replicasa viral (Nsp1-Nsp12). Los ORFs 2a, 2b y del 3 al 7 codifican las proteínas estructurales del virus; la glicoproteína 2 (GP2), de envoltura (E), GP3, GP4, GP5, GP5a, proteína de membrana (M) y la de la nucleocápside (N), respectivamente (Figura 5) (Wang et al., 2009). Los datos disponibles hasta la fecha sugieren que todas las proteínas del virus son esenciales para su replicación e infectividad. Su virulencia es multigénica, pues reside en proteínas estructurales y no estructurales (Music and Gagnon, 2010).

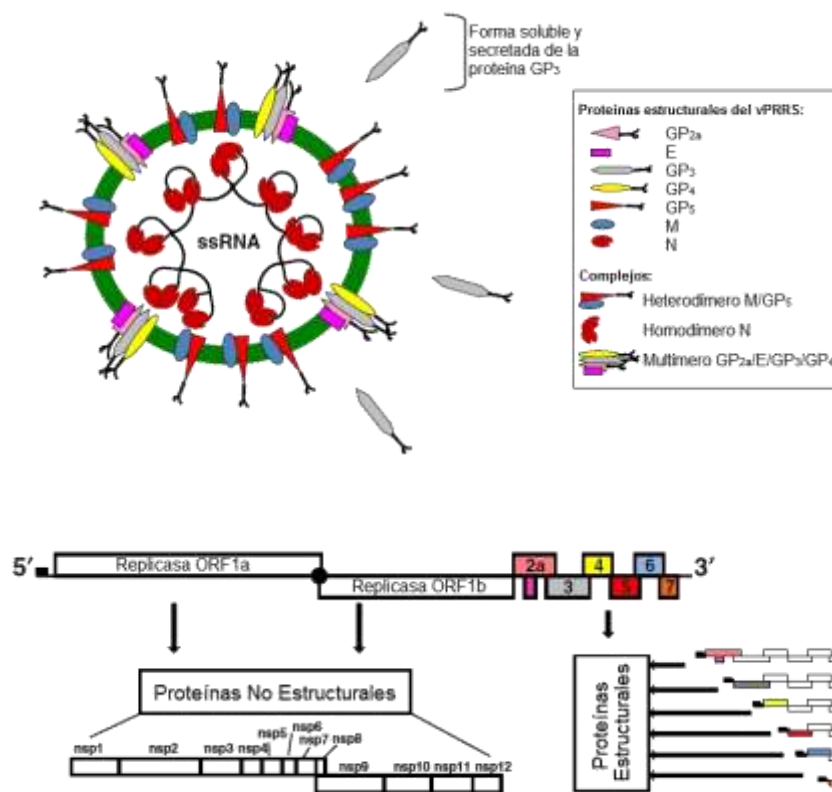


Figura 5. Estructura de una partícula de PRRSV y su genoma (Music and Gagnon, 2010).

2.2.3. Mecanismo de Infección del PRRSV y Respuesta Inmune

Por su variación genética, el PRRSV es uno de los temas más desafiantes en la virología veterinaria y sobre su respuesta inmune se sabe poco (Mateu and Diaz, 2008). Hasta la fecha no se han identificado todas las

regiones en el genoma del PRRSV que determinan su virulencia (Wang et al., 2008). Se ha evidenciado que ciertas proteínas del virus podrían tener un papel importante en la patogénesis y regulación de la respuesta inmune del cerdo. La GP5, es una proteína glicosilada y es codificada por el ORF5, la región más variable del genoma del PRRSV. A esta proteína van dirigidos los anticuerpos neutralizantes y participa en la apoptosis de la célula blanco (Music and Gagnon, 2010). Algunas Nsps, pueden inhibir la activación del promotor del IFN- β , principalmente Nsp1 seguida por Nsp2, Nsp11 y Nsp4 (Beura et al., 2010). La Nsp11 bloquea la vía de señalización del IRF3, lo que provoca la inhibición de la producción de IFN tipo I (Sun et al., 2009).

Las células blanco principales del PRRSV son los PAMs inmaduros. El virus entra a las células a través de un mecanismo de endocitosis mediada por los receptores celulares: sialoadhesina, heparan sulfato, CD163 y CD151. Cuando el virus entra a la célula interfiere con su mecanismo y altera su funcionamiento. Por ejemplo, suprime la fagocitosis, liberación de radicales de oxígeno y de TNF, llevando a la célula finalmente a su muerte por apoptosis y necrosis (Lewis et al., 2007). El virus en los macrófagos produce una falla en su capacidad de liberar al ion súper óxido y provoca que la cantidad de PAMs se reduzca a los 7 días después de adquirir la infección. En la circulación sanguínea se observan cambios de corta duración, con una disminución de linfocitos, monocitos y neutrófilos hasta por 4 días después de la infección. Lo anterior se ha asociado con otros problemas respiratorios (Yoon et al., 1996).

Se ha demostrado la especificidad del PRRSV en diversas células de linaje monocito/macrófago. El virus tiene mayor afinidad por macrófagos inmaduros que por macrófagos maduros, aunque los monocitos son menos susceptibles a la infección por el PRRSV comparados con los PAMs (Lewis et al., 2007). También se ha observado que el PRRSV puede multiplicarse en DCs, pero esto ha sido demostrado solo en Mo-DCs y BM-DCs generadas *in vitro* (Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Wang et al., 2007). El PRRSV afecta la activación de las Mo-DCs, disminuye la expresión del

complejo principal de MHC-I, MHC-II y de CD80/86; con esto evita que se dispare la respuesta inmune adaptativa (Flores-Mendoza et al., 2008; Loving et al., 2007). Sin embargo, estos resultados no han podido ser confirmados en L-DCs. Hasta la fecha, solo hay un estudio publicado donde se ha evaluado la susceptibilidad de las L-DCs al PRRSV y los resultados obtenidos fueron contradictorios a lo observado en estudios *in vitro*; aparentemente no hubo una replicación del virus en las L-DCs, pero si se alteró la expresión del IFN- β a las 12 h después de la infección (Loving et al., 2007). El IFN- β , pertenece a los IFNs de tipo I, estas citocinas son críticas para el control innato de la replicación viral, así como para la activación adecuada de la respuesta inmune adaptativa; induce la maduración de DCs y actúa como factor de sobrevivencia para linfocitos T (Bonjardim, 2005). Los resultados obtenidos por Loving et al. (2007), podrían ser un indicio de que el PRRSV infecta a L-DCs, sin embargo se necesitan más estudios para comprobarlo.

La capacidad moduladora del PRRSV es una de las limitantes más importantes cuando se pretende establecer la respuesta inmune (Figura 6). El virus suprime la expresión de MHC de clase I y II (Wang et al., 2007). También puede aumentar la expresión de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica y células dendríticas maduras (Flores-Mendoza et al., 2008; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003). La IL-10 en presencia de TGF- β induce células T reguladoras (Tregs) que favorecen la replicación viral y se relaciona con la inducción de apoptosis en PAMs de cerdo (Labarque et al., 2003). Se ha observado que el PRRSV reduce la expresión de receptores CD25 en células T, el cual es importante para la proliferación de éstas (Charerntantanakul et al., 2006). Esto podría reducir la capacidad de eliminación de patógenos por los macrófagos y de las APC para activar a las células T CD4⁺. En una infección por PRRSV la respuesta innata es ineficiente para la eliminación del virus y poco efectiva en la activación de la respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune celular es muy importante para la eliminación del PRRSV. Hay evidencia de que el PRRSV puede modular el sistema inmune del

cerdo durante las primeras semanas de infección (Flores-Mendoza et al., 2008; Mateu and Diaz, 2008). En una infección por este virus, hay proliferación baja de células productoras de IFN- γ y TNF- α que aparecen después de 2 semanas post infección (Charentantanakul et al., 2006; Diaz et al., 2006). Esto podría deberse a la presencia de mecanismos de regulación activados por el virus. Recientemente se ha demostrado que PRRSV induce células T reguladoras CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ virus-específicas *in vitro* e *in vivo* (Jingwen et al., 2011; Silva-Campa et al., 2009; Silva-Campa et al., 2012; Wongyanin et al., 2009). Las Mo-DCs infectadas con PRRSV inducen Tregs productoras de TGF- β e IL-10 con capacidad supresora de linfocitos T (Silva-Campa et al., 2009). Para que haya una inducción de Tregs es necesaria la presencia de TGF- β e IL-10. Se sabe que las DCs infectadas con PRRSV *in vitro* producen IL-10 (Flores-Mendoza et al., 2008), pero hasta el momento se desconoce si también producen TGF- β y si además esto puede suceder *in vivo*.

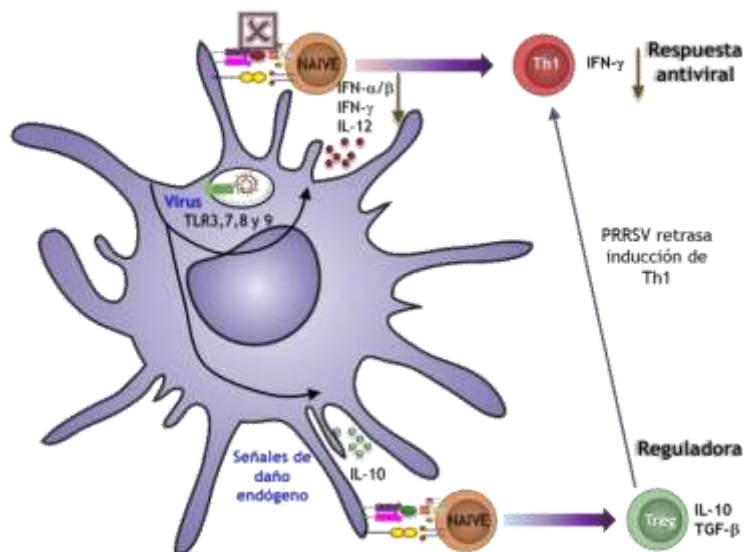


Figura 6. Mecanismo de respuesta inmune durante una infección por PRRSV *in vitro* (Flores-Mendoza et al., 2008; Silva-Campa et al., 2009; Wang et al., 2007; Wongyanin et al., 2010).

III. HIPÓTESIS

Las células presentadoras de antígeno del sistema respiratorio porcino presentan diferencias en la expresión de sus marcadores y sus funciones, lo permite distinguir L-Cs, LN-Cs y PAMs.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Caracterizar fenotípica y funcionalmente las poblaciones células presentadoras de antígeno de pulmón y compararlas con otras células presentadoras de antígeno asociadas al tracto respiratorio porcino.

4.2. Particulares

1. Caracterizar fenotípicamente las subpoblaciones de células presentadoras de antígeno de pulmón de cerdo (L-Cs), de linfonodo mediastinal (LN-Cs) y macrófagos alveolares de pulmón (PAMs).
2. Evaluar la capacidad de internalización antígenos de las L-Cs, LN-Cs y PAMs.
3. Determinar la capacidad de las L-Cs, LN-Cs y PAMs para activar a los linfocitos.
4. Determinar si las L-Cs y LN-Cs son susceptibles al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Caracterización Fenotípica y Funcional de las APCs de Pulmón de Cerdo

5.1.1. Animales

Se trabajó con quince cerdos sanos de 4-12 semanas de edad (n=15), provenientes de una granja libre de PRRSV y por RT-PCR del suero se comprobó que los animales no estuvieran infectados. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. con accesos *ad libitum* al alimento y agua.

5.1.2. Obtención del Pulmón y de las Células Presentadoras de Antígenos

El protocolo de obtención de las L-Cs se basó en reportes previos donde se aislaron L-Cs de cerdo y otras especies, se realizó con modificaciones menores (Calder *et al.*, 2004; Loving *et al.*, 2007; Stumbles *et al.*, 1998). La eutanasia se realizó en una sala de necropsias; primero, para insensibilizar al cerdo se le colocaron electrodos detrás de cada oreja (240V a 2A), luego se conectaron a la electricidad y se mantuvieron por 20 segundos; después de la insensibilización, se introdujo un cuchillo bajo del miembro anterior izquierdo para hacer un corte en la vena cava craneal y desangrar al cerdo, este paso debe realizarse dentro de los 20 segundos posteriores a la insensibilización

para evitar el sufrimiento del animal. Este método cumple con los estatutos establecidos en la NOM-033-ZOO-2010 para el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Inmediatamente después de la eutanasia, se expusieron las vísceras torácicas, antes de cortar se pinzó la tráquea y el esófago, y con otra pinza la vena cava caudal, esto con el objetivo de evitar la contaminación del pulmón. La arteria pulmonar se sujetó con otra pinza, y se insertó una cánula para lavar la vasculatura con 200 mL de buffer de fosfatos (PBS) frío 8.1mM con pH 7.2, estéril y suplementado con 100 IU de penicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y 1 mg/mL anfotericina B (Gibco Laboratories, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA), para drenar se cortó la aorta. Los pulmones fueron retirados posteriormente, colocados en 200 mL de PBS frío y transportados a un ambiente estéril. Para obtener los PAMs, las vías respiratorias se lavaron con 100 mL de PBS estéril, al menos cuatro veces o hasta que el líquido se observó claro. Los PAMs se concentraron por centrifugación a 1100 rpm a 15 °C por 10 min y se almacenaron a 4 °C hasta su uso en medio RPMI-1640 suplementado con 2 µM L-glutamina, 1 µM piruvato de sodio, 0.05 µM 2-mercaptoetanol, 100 UI de penicilina, 1 µg/mL de anfotericina B (todos de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco Laboratories, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA), este medio se denominó RPMI-1640 completo.

Cada lóbulo pulmonar se separó de la tráquea y bronquios, se cortó en trozos pequeños y se incubó en 100 mL de RPMI-1640 con 2% de SFB, 100 µg/mL de colagenasa tipo 1 (Worthington Biochemical Corp, Freehold, NJ, USA), 2 µg/mL de desoxirribonucleasa I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y HEPES 20 mM, en un agitador orbital (Lab-Line[®], modelo 3525) a 150 rpm y 37 °C durante 90 min. Las células liberadas se colectaron del sobrenadante y se lavaron dos veces con RPMI-1640, posteriormente se fraccionaron mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque densidad 1.077 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) en una centrífuga Benchtop (Modelo Allegra-6R) 1400 rpm durante 20 min a 4 °C. Las células mononucleares se colectaron con una pipeta Pasteur y se lavaron 2 veces por 10 min a 1200 rpm a 15 °C. Para

eliminar la población de macrófagos intersticiales y obtener las L-Cs, las células obtenidas se cultivaron durante la noche en medio RPMI-1640 completo en botellas de 75 cm² a una concentración de 5 x 10⁶/mL. Pasado el tiempo de cultivo, las células no adherentes (CNA) se retiraron gentilmente de la botella y la botella se lavó 2 veces con 10 mL de PBS estéril. Las CNA se lavaron 2 veces con RPMI-1640 y se resuspendieron en RPMI-1640 completo. La viabilidad de las células se evaluó con azul de tripán (Strober, 2001), las células vivas representaron rutinariamente más del 80% del total de las CNA. Además de la obtención de L-Cs y PAMs, se aislaron las LN-Cs de los linfonodos mediastinales siguiendo el mismo protocolo, excepto el paso con el gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.

5.1.3. Anticuerpos y Citometría de Flujo

La evaluación de los receptores celulares se hizo con 5 x 10⁵ células por tubo en 200 µL de PBS con 0.1% de FBS para bloqueo y este buffer se usó en cada lavado. Este es un protocolo validado y empleado en varios estudios (Kaddoum et al., 2010; Landrigan et al., 2011). Se hicieron tinciones cuádruples o quíntuples, en el primer paso se agregó uno de los siguientes anticuerpos a diluciones establecidas previamente: anti-CD11R3 (reconoce la cadena alfa de la integrina beta 2 porcina, clona 2F4/11); anti-CD16 (receptor FcγIII, clona G7) de AbDSerotec (Oxford, UK); CD1a (molécula de presentación para antígenos no proteicos, clona 76-7-4; VMRD, NC, USA); anti-CD206 (receptor de manosa, clona 122D2.08; Dendritics, Lyon, France). Todos los anticuerpos fueron incubados a 4 °C por 30 min y se lavaron 2 veces con PBS/FBS 0.1% por 10 min a 1200 rpm a 15 °C. En un segundo paso, se agregó un anticuerpo anti-ratón (H+L) producido en cabra, conjugado con Alexa Fluor[®] 488 (A11001; Invitrogen, CA, USA), se incubó a 4 °C por 30 min y se lavó 2 veces de la misma manera que en el paso anterior. Luego, las células fueron incubadas con anti-MHC-II (molécula de presentación para antígenos de origen proteico, clona H42A; VMRD) conjugada con R-PE Cy7 (LNK112PECY7; AbDSerotec, Oxford,

UK) y anti-CD172a (proteína reguladora de señales alfa, clona 74-22-15; VMRD) conjugada con R-PE (LNK022RPE; AbDSerotec, Oxford, UK). Además, las células se incubaron con anti-CD163 (receptor del complejo haptoglobina-hemoglobina, clona 2A100/11; AbDSerotec, Oxford, UK) conjugado con Zenon[®] Alexa Fluor[®] 647 Mouse IgG1 Labeling Kit (Z25008; Molecular Probes[®], Invitrogen, CA, USA). La reactividad cruzada del anticuerpo anti-CD206 con el cerdo se demostró previamente (Marquet et al., 2011). Finalmente las células fueron resuspendidas en 200 ml de PBS/FBS 0.1%.

En los tres primeros experimentos, se realizó la exclusión de células muertas con el kit para evaluación de viabilidad Fixable Viability Dye eFluor[®] 450 (65-0863; eBioscience, CA, USA), y el porcentaje de células muertas fue de ~30%; como se esperaba, una alta proporción de las células muertas quedaba fuera de la región seleccionada FSC/SSC (> 90%); por esa razón se decidió analizar la información sin la exclusión de células muertas y se comparó con la exclusión. Se observó que no hubo diferencias en el análisis, por ello se decidió omitir la exclusión de células muertas en los siguientes experimentos. Se usaron los siguientes controles de isotipo para ratón: IgG1 (clona P3) conjugado con R-PE (LNK022RPE); IgG2a (clona eBM2a) conjugado con Zenon[®] Alexa Fluor[®] 488 Mouse IgG2a Labeling Kit (Z25102; Molecular Probes[®], Invitrogen, CA, US); e IgG2b (clona eBMG2b) conjugado con Zenon[®] Alexa Fluor[®] 488 Mouse IgG2b Labeling Kit (Z25202, Molecular Probes[®], Invitrogen, CA, US), todos los controles de isotipo fueron de eBioscience (CA, USA). Los controles de isotipo fueron preparados combinando en un solo tubo todos los anticuerpos de control de isotipo y su reactividad fue probada en las tres poblaciones de células. Adicionalmente, se usaron controles de fluorescencia menos uno (FMO) en cada experimento y con cada tipo de célula. El empleo de controles FMO permite establecer la región donde se analizan los marcadores positivos. Los controles FMO empleados fueron: un tubo con el anticuerpo anti-MHC-II^{RPE-Cy7} para definir la región de la población a estudiar, y otro tubo con los anticuerpos anti-MHC-II^{RPE-Cy7} y anti-CD172a^{RPE} para definir la región de los histogramas en donde se analizarían los niveles de expresión y porcentaje de

los marcadores. Para evaluar la posible contaminación con macrófagos, linfocitos T y B, se usaron los anticuerpos anti-CD14 (receptor de LPS, clona MIL2) de AbDSerotec (Oxford, UK), anti-CD3 (receptor de la subunidad épsilon del complejo de TCR, clona PPT3) y anti-CD79 α (receptor de la cadena alfa asociada al BCR, clona HM57), los últimos dos de Abcam (MA, USA). La reactividad cruzada de la clona HM57 con el cerdo fue probada previamente (Jones et al., 1993), y dado que este anticuerpo reconoce un epítipo intracelular, el marcaje se hizo permeabilizando a las células usando BD Cytotfix/CytopermTM Kit (554714; BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. El análisis se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto II con el Software FACSDiva (BD/Pharmingen, CA, USA). En cada tubo, se colectaron 30,000 eventos en la región seleccionada en base al tamaño y la complejidad (FSC/SSC). Las figuras traslapadas se realizaron mediante un método previamente descrito (Weber and Fehse, 2009). La configuración de los láseres y de los detectores del equipo permiten el uso combinado de los fluorocromos empleados (Maecker and Trotter, 2009). Además, en cada experimento y para cada tipo de célula se utilizaron controles de compensación adecuados.

5.1.4. Aislamiento de Células MHC-II⁺ por MACS

En algunos experimentos se obtuvieron las L-Cs, LN-Cs y PAMs MHC-II⁺ mediante la tecnología MACS. Se decidió obtener células MHC-II⁺ debido a que es un marcador que solo se encuentra en APCs y el CD11R3 se ha observado en células polimorfonucleares de cerdo MHC-II⁻ (Bimczok et al., 2005; Dominguez et al., 2001). Primero las células se marcaron con el anticuerpo de ratón anti-MHC-II y se incubaron a 4 °C por 30 min, luego se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS/FBS 2%. Después se agregó el anticuerpo anti-ratón acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, CA, USA) y se incubaron a 4 °C por 30 min, seguido de 2 lavados con PBS/FBS 2%. Finalmente, la fracción positiva se seleccionó en una columna LS (Miltenyi Biotec, CA, USA), siguiendo

las recomendaciones del proveedor. Las células obtenidas fueron contadas y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI-1640 completo. La pureza fue analizada por citometría de flujo (BD FACSCanto II) y la pureza de las MHC-II⁺ representó rutinariamente 50-80% de la población total. Las células MHC-II⁺ enriquecidas por MACS se utilizaron en los ensayos de funcionalidad y de infección con el PRRSV.

5.1.5. Aislamiento de Linfocitos de Sangre Periférica (PBLs)

Se colectó sangre periférica de cerdos en tubos con heparina (Becton-Dickinson, BD, San Jose, CA), se eliminaron las células polimorfonucleares mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, se centrifugaron a 1600 rpm por 30 min a 4 °C. Las células mononucleares de sangre periférica se lavaron 3 veces en RPMI y se resuspendieron en medio RPMI-1640 completo. Las células se cultivaron a 37 °C en un ambiente de 5% de CO₂ por 4 h. Posteriormente, las células no adherentes se cosecharon y se lavaron 2 veces con PBS. Los PBLs se resuspendieron en RPMI-1640 completo a una concentración de 1×10^7 células/mL.

5.1.6. Reacción Leucocitaria Mixta (MLR)

Para el ensayo de MLR, 3 mL de PBLs (3×10^7 células) fueron teñidas con carboxifluorescein succinimidil éster (CFSE) a una concentración final de 1 μ M. En una placa de 96 pozos (Costar, MA, USA), se cultivaron durante 72 h por duplicado los PBLs teñidos (5×10^5 por pozo) con L-Cs, PAMs y L-DCs MHC-II⁺ aisladas por MACS a diferentes relaciones (1:5, 1:10, 1:50 and 1:100). La proliferación celular fue cuantificada en el citómetro BD FACSCanto II y analizada con el Software FACSDiva (BD/Pharmingen, CA, USA).

5.1.7. Ensayo de Internalización de Antígenos

Para los ensayos de endocitosis y fagocitosis, se determinó la internalización de dextrán y látex, respectivamente, en 1×10^6 células/mL. El ensayo se realizó con L-Cs, PAMs y LN-Cs MHC-II⁺ aisladas por MACS. El dextrán (marcado con isotiocianato de fluoresceína) de 0.5 μm (FD70, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) fue agregado a una concentración final de 400 $\mu\text{g/mL}$. El látex (marcado con naranja fluorescente poliestireno carboxilato-modificado) de 0.5 μm (L5530, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) fue agregado a una concentración de 3.7×10^8 perlas/mL. Las células fueron incubadas 1 h a 37 °C y para evaluar la internalización específica, se emplearon tubos con células tratadas bajo las mismas condiciones pero incubados por 1 h a 4 °C. Luego se lavaron tres veces con PBS frío 0.1% SFB y se marcaron con anti-MHC-II para analizar la capacidad de internalización de antígenos por las células MHC-II^{high}. Se analizaron por citometría de flujo y para evaluar las uniones no específicas de partículas de dextrán o látex, los porcentajes positivos en las células incubadas a 4 °C fueron restados de los porcentajes obtenidos en las células incubadas a 37 °C (Loving et al., 2007).

5.2. Evaluación de la Susceptibilidad de las APCs de Pulmón de Cerdo al PRRSV

5.2.1. Inoculación con el PRRSV

Las L-Cs, LN-Cs y PAMs MHC-II⁺ aisladas por MACS se inocularon con la cepa americana NVSL-9587 del PRRSV (Proporcionado amablemente por el Dr. Fernando Osorio de la Universidad de Nebraska), con un MOI de 0.1 (una partícula viral por cada diez células) y se incluyeron controles sin virus (mock) de 0.1 como control negativo. Se inocularon 1×10^6 células con 1×10^5 partículas virales (PV) y se incubaron por 1 hora a 37 °C, las células se lavaron con medio RPMI-1640 frío para retirar el virus no-adherido y se incubaron a 7

°C a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h), donde se estuvieron obteniendo células y sobrenadantes de cada tiempo para evaluar replicación viral, fenotipo, funcionalidad, apoptosis y necrosis.

5.2.2. Evaluación de la Replicación Viral

En una placa de 96 pozos se cultivaron células MARK-145 en un volumen de 100 μ L por pozo y se dejaron adherir toda la noche, hasta obtener una monocapa celular con una confluencia del 80%. Después se hicieron diluciones décuples seriadas de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de las células inoculadas con el PRRSV y se incluyeron como control negativo a células tratadas con mock y como control positivo a virus NVSL-9587 con una concentración viral previamente establecida (1×10^7 Log₁₀ CCID₅₀/mL). Primero, se pusieron 20 μ L de cada dilución por pozo y posteriormente se agregaron 80 μ L de medio a cada pozo para dejar un volumen final de 200 μ L. Las células se cultivaron a 37 °C por 72 h, y la placa se revisó cada 24 h para detectar el efecto citopático.

5.2.3. Evaluación de Apoptosis y Necrosis en las Células Infectadas

Se evaluó la capacidad del PRRSV para inducir apoptosis, en las L-Cs, LN-Cs y PAMs utilizando el Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (POAF, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), siguiendo las recomendaciones del proveedor (Pujhari et al., 2014). En las células tratadas con mock y MOI 0.1 a las 0, 24, 48 y 72 h después de la infección. Se tomaron 2×10^5 células por tiempo, se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS y se resuspendieron en 100 μ l de buffer de unión 1X y se les agregó 1 μ L de Anexina V y 2 μ L de yoduro de propidio. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se agregaron 100 μ l del buffer de captura y se analizó por citometría de flujo.

5.3. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para la evaluación de los niveles de expresión de los receptores se hicieron tres experimentos independientes ($n=3$) y las diferencias estadísticas de medias fueron determinadas por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Para los análisis de la MLR se realizaron tres experimentos independientes por duplicado ($n=3$), las habilidades de internalización de antígenos y de producción de lisozima fueron evaluadas en tres experimentos independientes simples ($n=3$) y para determinar las diferencias entre las medias se les aplicó el test de Tukey. Para los experimentos de infección de las APCs con PRRSV, se realizaron tres experimentos independientes ($n=3$) y se evaluaron por Bonferroni las diferencias estadísticas entre la cantidad de partículas virales por células y tiempos; los niveles de expresión de receptores en las células infectadas y no infectadas; así como los análisis de viabilidad. Para los análisis de la MLR en las células con MOI y mock se hicieron tres experimentos independientes por duplicado ($n=3$) y se determinaron las diferencias entre las medias por Tukey. Todos los análisis se realizaron en el software PRISM 5.02 (GraphPad, San Diego, CA) con un nivel de confianza del 95%.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización Morfológica, Fenotípica y Funcional de las APCs de Pulmón de Cerdo

6.1.1. Morfología de L-Cs, LN-Cs y PAMs

En las poblaciones enriquecidas por MHC-II⁺ se evaluó la morfología por microscopía óptica. En la figura 7A se observa que las L-Cs poseen un núcleo grande, escaso citoplasma y dendritas cortas. Las LN-Cs fueron similares pero exhibieron una morfología dendrítica característica (Figura 7B). Las PAMs mostraron gránulos abundantes en el citoplasma y aparentan ser más grandes que las DCs (Figura 7C). En conclusión, las imágenes obtenidas muestran que las poblaciones de L-Cs, LN-Cs y PAMs presentaron una morfología característica.

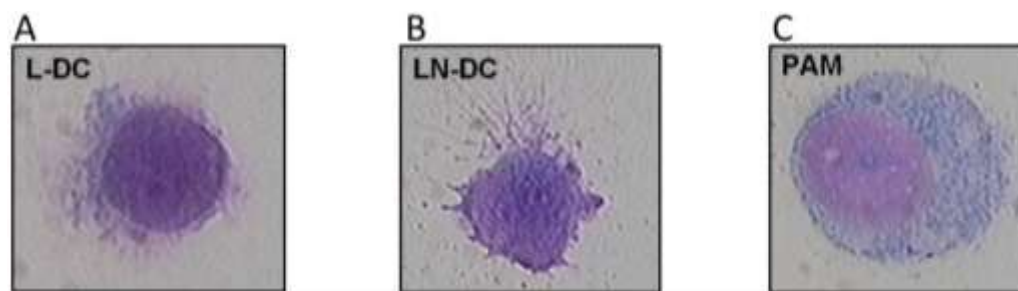


Figura 7. Estructura celular y morfología de L-Cs, LN-Cs and PAMs. Células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs, A), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs, B) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs, C) fueron separados por la expresión de MHC-II mediante la tecnología MACS, fueron teñidas con Giemsa y la morfología fue evaluada por microscopía óptica (100x); se seleccionó una célula representativa de cada población.

6.1.2. Caracterización Fenotípica de las Células Presentadoras de Antígeno de Pulmón

El porcentaje de células contaminantes se determinó en las células MHC-II⁺ enriquecidas por MACS (L-Cs, LN-Cs y PAMs). Primero las L-Cs, LN-Cs y PAMs fueron analizadas en base a su tamaño (FSC) y su complejidad (SSC) y se definió una población de células grandes y complejas. En esta población se evaluó la presencia de células contaminantes mediante la expresión de marcadores celulares; CD14 para macrófagos; CD3 para linfocitos T y CD79 α para linfocitos B (Figura 8). Se observó que el porcentaje de células MHC-II⁺CD14⁺ fue bajo en las L-Cs y en las LN-Cs ($\leq 5.7\%$); como era esperado, el mayor porcentaje de células MHC-II⁺CD14⁺ fue detectado en los PAMs. Por otra parte, el porcentaje de células MHC-II⁺CD3⁺ fue bajo en las tres poblaciones ($\leq 1.8\%$). La evaluación de las células MHC-II⁺CD79 α ⁺ fue realizada en células permeabilizadas y se detectó una baja cantidad de estas células en las tres poblaciones ($\leq 1.7\%$). Estos resultados podrían indicar que en las células de pulmón y linfonodos obtenidas en este estudio tienen una baja cantidad de linfocitos T y B contaminantes, y que la mayoría de macrófagos intersticiales fueron eliminados por la adherencia.

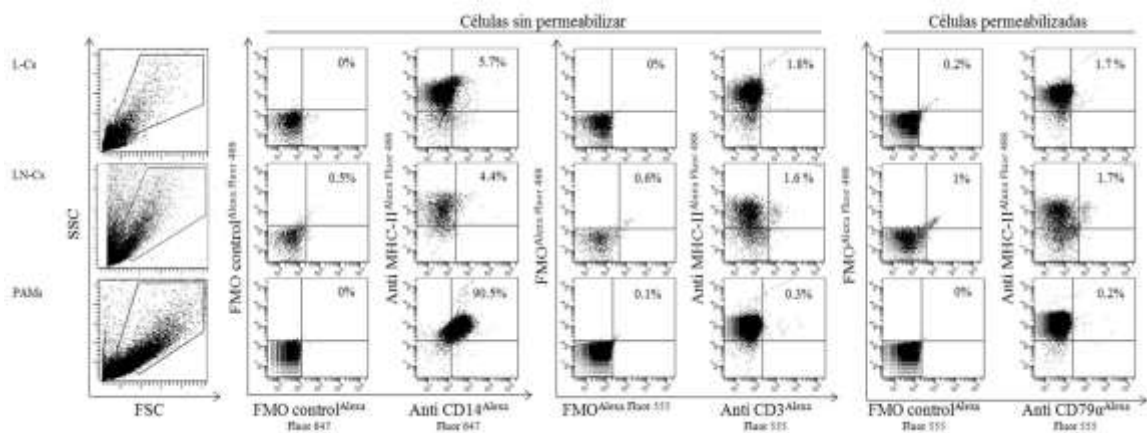


Figura 8. Presencia de células contaminantes. Células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs) MHC-II⁺ enriquecidas por MACS, fueron analizadas en base a su tamaño (FSC) y complejidad (SSC). La expresión de CD3 y CD14 fue evaluada en células MHC-II⁺ sin permeabilizar; CD79 α fue evaluado en células MHC-II⁺ permeabilizadas. Esta imagen representa un experimento independiente de un total de 3 con resultados similares (n=3).

Para la caracterización fenotípica de las APCs de pulmón, primero se seleccionaron las células grandes y complejas (FSC/SSC), y a esta población se le analizó la expresión de MHC-II y CD172a, para seleccionaron las células MHC-II^{high}CD172a⁺ en L-Cs, LN-Cs y PAMs (Figura 9). Una vez seleccionada la población de interés, se le evaluó la expresión de CD163, CD1a, CD206, CD11R3 y CD16. En la figura 10 se muestra un experimento representativo de la expresión de receptores en cada población de APCs pulmonares y las diferencias estadísticas entre estos receptores se presentan en la figura 11 y la tabla 1 (Media \pm EEM). Se detectaron diferencias ($p < 0.05$) entre las poblaciones de APCs para los porcentajes de expresión de CD163, CD1a y CD206 (Figura 11 y tabla 1). Las L-Cs y los PAMs mostraron los porcentajes más elevados de células CD163⁺; sin embargo, los PAMs presentaron los niveles de expresión más altos (Figura 10) y fueron diferentes de las L-Cs y de las LN-Cs ($p < 0.001$). Los porcentajes de células CD1a⁺ fue bajo en L-Cs y PAMs (Figuras 10 y 11, tabla 1), mientras que las LN-Cs mostraron las cantidades más altas de células CD1a⁺ ($p < 0.001$). El porcentaje de células CD206⁺ fue alto y distribuido similarmente en las LN-Cs y los PAMs, en contraste con las L-Cs que expresaron los niveles más bajos de este marcador ($p < 0.01$; Figuras 10 y 11). En general, los porcentajes de células CD11R3⁺ y CD16⁺ fueron detectados en niveles que fueron de moderados a altos, pero sin significancias estadísticas entre las 3 poblaciones de APCs; sin embargo, se observó una tendencia de mayor proporción de células CD11R3⁺ y CD16⁺ en los PAMs. Estos resultados demuestran que existen diferencias fenotípicas entre las 3 poblaciones de APCs analizadas y que éstas se relacionan con su distribución anatómica y esto podría sugerir que también poseen diferencias funcionales.

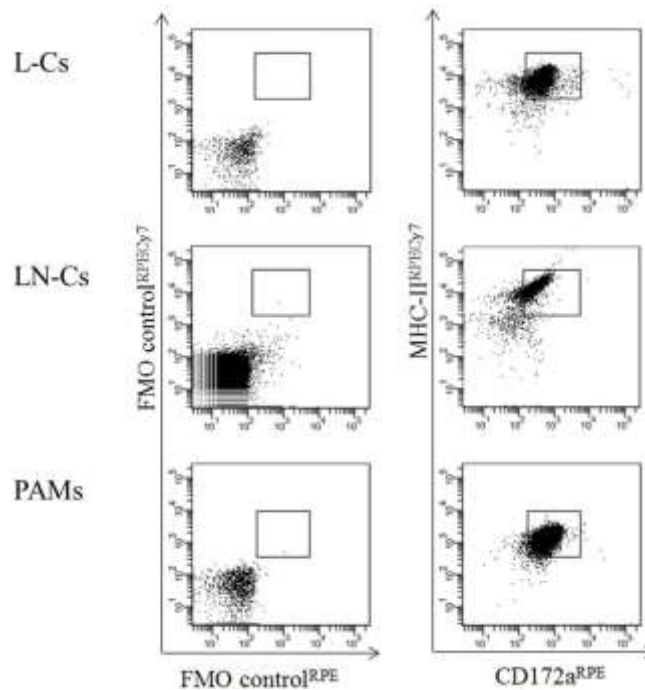


Figura 9. Determinación de las poblaciones de APCs. Las células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs) fueron analizadas en base a la expresión de MHC-II^{high} y CD172a+. Esta imagen representa un experimento independiente de un total de 4 con resultados similares (n=4).

Tabla 1. Expresión de marcadores en las APCs

| Poblaciones | CD163 | CD1a | CD206 | CD11R3 | CD16 |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| L-Cs ^A | 94.5 ± 2 ^a | 8.8 ± 2.7 ^b | 4.8 ± 1.4 ^b | 46.1 ± 6.7 | 50.4 ± 13.2 |
| LN-Cs ^B | 29.4 ± 3.6 ^b | 88.1 ± 10.3 ^a | 80.5 ± 6.3 ^a | 66.5 ± 23 | 66 ± 21.1 |
| PAMs ^C | 99.8 ± 0.1 ^a | 3.2 ± 0.3 ^b | 54 ± 12 ^a | 69.9 ± 19.3 | 72.7 ± 15.7 |

^ACélulas presentadoras de antígenos de pulmón

^BCélulas presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales

^CMacrófagos alveolares pulmonares

Los números indican las medias y los EEM de 3 experimentos independientes

Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey

Las literales representan diferencias de los niveles de expresión entre las poblaciones celulares

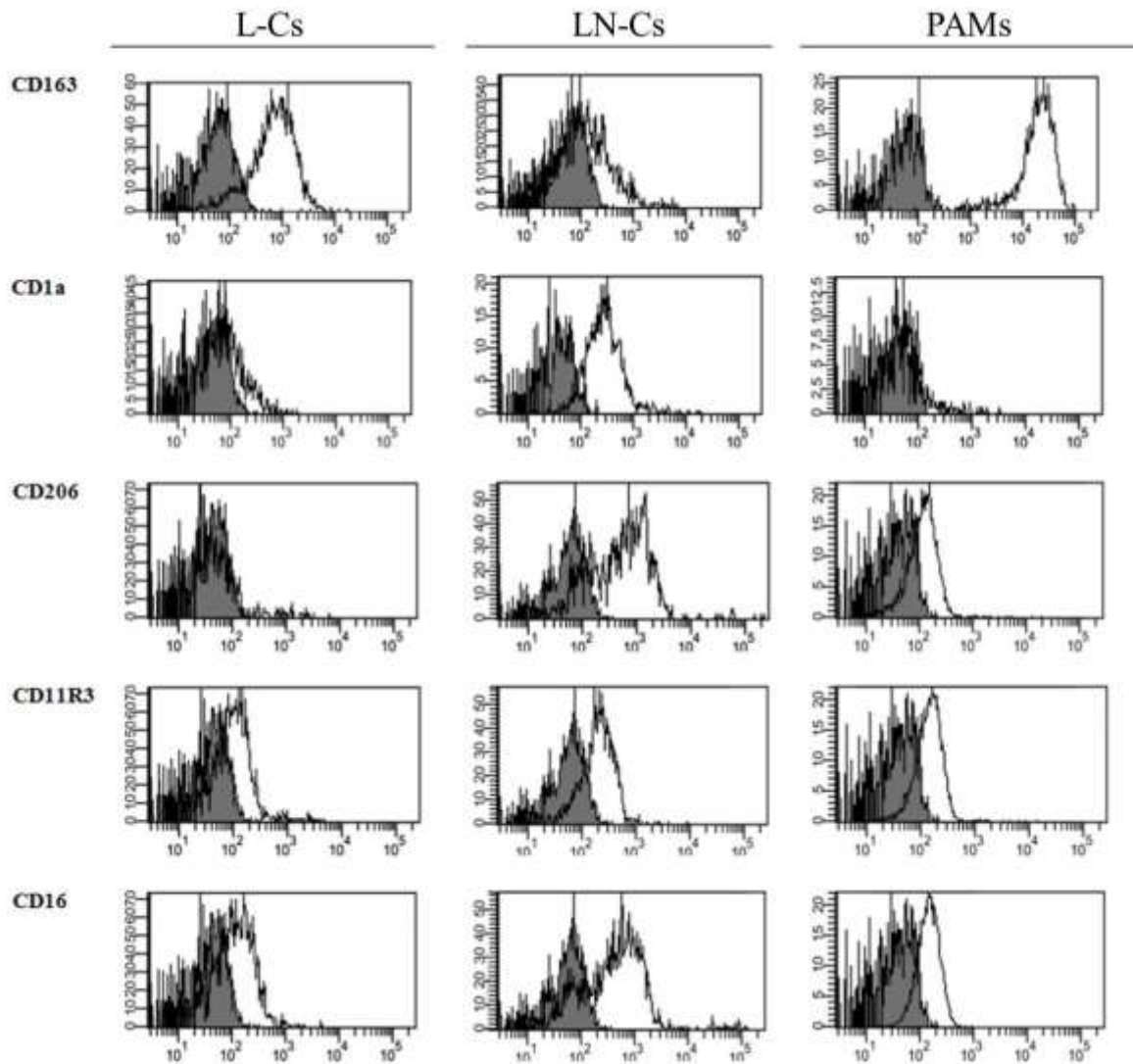


Figura 10. Niveles de expresión de los marcadores en las poblaciones de APCs. Un análisis de la expresión de receptores fue realizado en células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs). Los histogramas grises indican los controles de isotipo, los histogramas blancos indican la expresión de los marcadores evaluados. Los histogramas de cada población son los representativos de cuatro experimentos independientes (n=4).

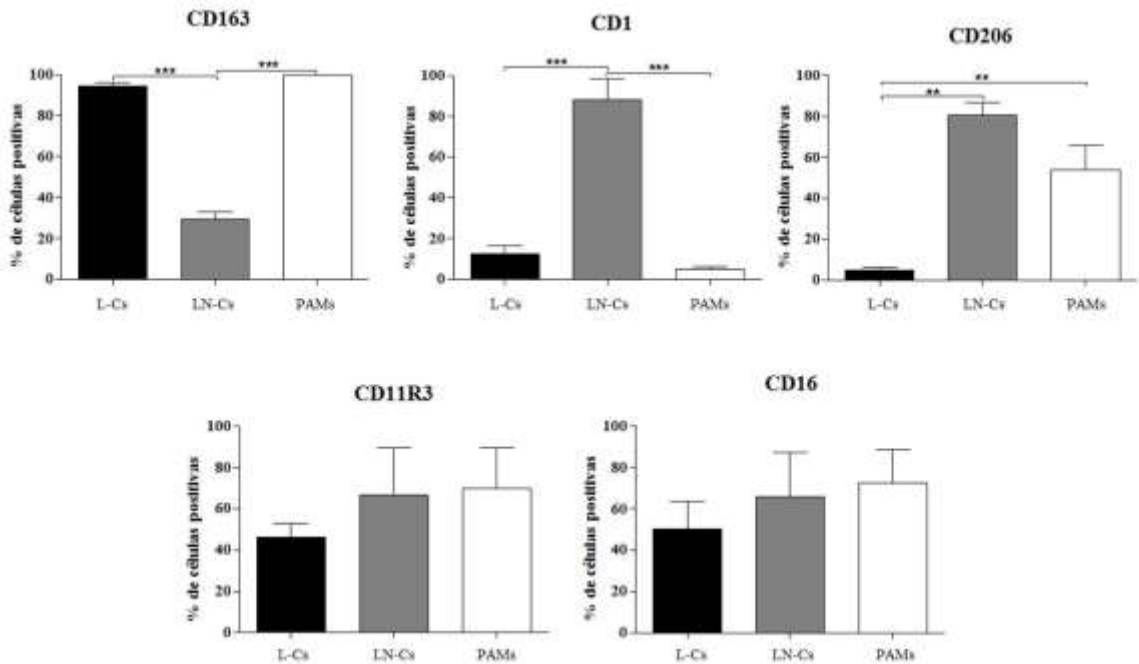


Figura 11. Caracterización fenotípica de las poblaciones de APCs. Un análisis de la expresión de receptores se realizó en las células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs, barras negras), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs, barras grises) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs, barras blancas). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se compararon por Tukey (** p < 0.01; *** p < 0.001). Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

6.1.3. Reacción Leucocitaria Mixta por las L-Cs, LN-Cs y PAMs

Los ensayos de MLR fueron realizados con células enriquecidas por MHC-II, las cuales fueron co-cultivadas a diferentes relaciones con PBLs teñidos con CFSE. Como se muestra en la figura 12, la proliferación de PBLs alogénicos fue dependiente de la relación con las APC. La mayor respuesta se observó en las células cultivadas a relaciones 1:5 (APC:PBLs). Las LN-Cs, indujeron la mayor proliferación de PBLs alogénicos, la cual fue de tres a cinco veces más alta que la inducida por las L-Cs o los PAMs, respectivamente (p < 0.001). Esta información demuestra que las LN-C, seguidas por las L-Cs tuvieron la mayor capacidad de inducir la proliferación de linfocitos alogénicos; esto podría indicar que estas células están especializadas en la presentación de antígenos.

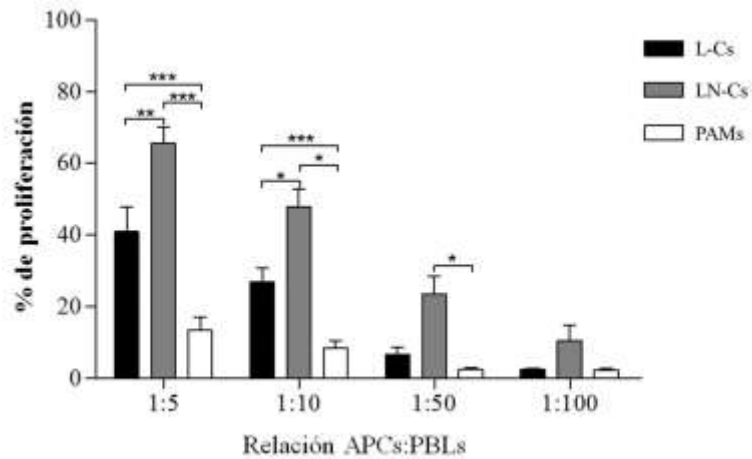


Figura 12. Habilidad de las APCs para inducir linfoproliferación en la reacción leucocitaria mixta. Para evaluar la capacidad de presentación de antígenos por las APCs de pulmón de cerdo se aislaron por MACS las células MHC-II+ se co-cultivaron por 3 días con linfocitos de sangre periférica (PBLs) alogénicos teñidos con CFSE a diferentes relaciones y en duplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

6.1.4. Capacidad de Internalización de Antígenos por las APCs Pulmonares

En APCs MHC-II⁺ enriquecidas por MACS se evaluó la capacidad de internalización de antígenos. Primero las L-Cs, LN-Cs y PAMs fueron incubadas con partículas de látex o dextrán por 1 h a 37° y se incluyeron controles incubados a 4 °C, para eliminar el efecto de adherencia sin internalización; luego, las células fueron marcadas con el anticuerpo anti-MHC-II para analizar las capacidades de internalización en las células MHC-II^{high}. En las tres poblaciones se observó un bajo porcentaje de células que internalizaron dextrán (< 16%), pero sin diferencias significativas (Figura 13A). En el caso de la internalización de partículas de látex, los PAMs fueron los que mostraron el mayor porcentaje de células con esta capacidad (p < 0.05; Figura 13B). Esta información demuestra que las L-Cs y LN-Cs tienen bajas habilidades fagocíticas.

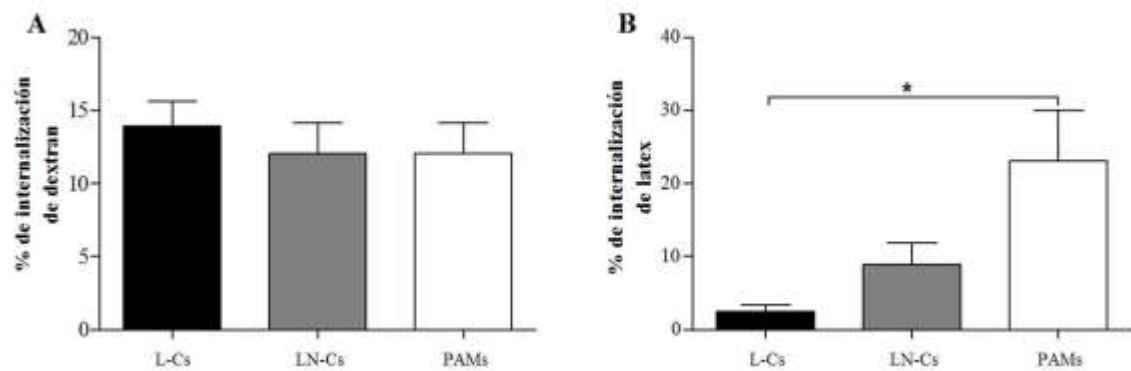


Figura 13. Habilidad de internalización de las APCs. Las células MHC-II+ enriquecidas por MACS fueron incubadas con dextrán o latex por una hora a 4° o 37 °C. La internalización de dextrán (A) o latex (B) fue analizada por citometría de flujo. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey (* p < 0.05). Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

6.1.5. Producción de Lisozima por las APCs

La lisozima es una molécula antimicrobiana abundante en células fagocíticas como macrófagos y en DCs se encuentra en bajas concentraciones. Para evaluar la habilidad de las células para producir lisozima después de fagocitar, se midió la expresión intracelular de lisozima en las células MHC-II⁺ enriquecidas por MACS. Éstas fueron co-cultivadas con partículas de látex o *P. aeruginosa* por 0, 1, 24 y 48 h. En las APCs tratadas con látex, la mayor producción de lisozima fue observada en los PAMs a las 1, 4, 24 y 48 h de cultivo (p < 0.001), seguidos por las L-Cs y por último las LN-Cs (Figura 14A). En las APCs co-cultivadas con *P. aeruginosa*, se observó un incremento en la producción de lisozima a las 1 y 24 h en los PAMs (p < 0.05). Las L-Cs y las LN-Cs mostraron una tendencia de menor expresión de lisozima y similar entre ellas (Figura 14B). Estos resultados confirman que las PAMs son células especializadas en fagocitosis.

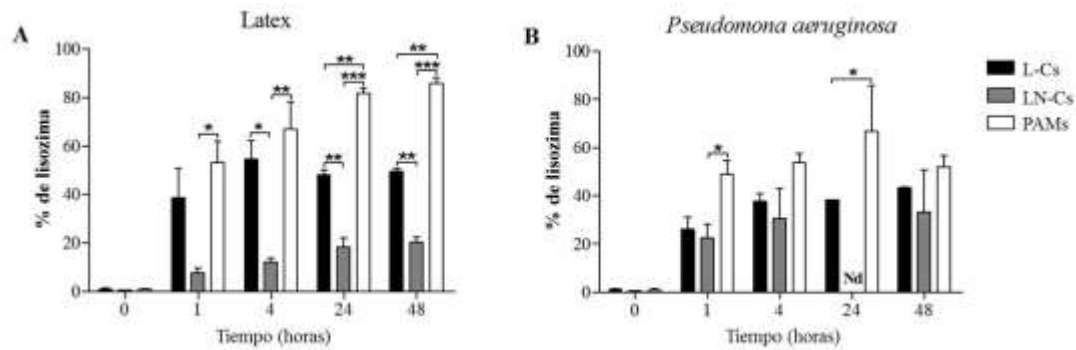


Figura 14. Producción de lisozima por APCs. Las células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs) MHC-II+ enriquecidas por MACS, fueron cultivadas con latex o *P. aeruginosa* por 0, 1, 4 y 24 h a 37 °C y la producción de lisozima fue determinada intracelularmente por citometría de flujo. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

6.2. Evaluación de la Susceptibilidad de las APCs de Pulmón de Cerdo al PRRSV

6.2.1. Replicación Viral

Para conocer si el PRRSV podría infectar a las L-Cs y LN-Cs de cerdo, primero se evaluó la capacidad que tiene el virus para replicarse en estas células, además se utilizaron PAMs como control positivo. Las células fueron inoculadas con un MOI de 0.1 y como control negativo se incluyeron células con mock, se cultivaron en las condiciones descritas y los sobrenadantes fueron obtenidos a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h). Con el fin de saber si en los sobrenadantes había partículas virales infectivas y si éstas incrementaban con respecto al tiempo, los sobrenadantes fueron utilizados para inocular células MARK-145, la cual es una línea celular permisible para la infección con PRRSV; para determinar la concentración de virus, la inoculación de las células se hizo en diluciones décuples seriadas y se incubaron por 72 h. Estas células se observaron diariamente para detectar el efecto citopático característico causado por el PRRSV en las células MARK-145 (Figura 15A); en el cual se observa la aglomeración de células redondeadas, las cuales se desprenden de la

monocapa celular. En las tres poblaciones celulares, el efecto citopático se observó desde el tiempo de 24 h, sin embargo solo en las L-Cs y en los PAMs se observó un incremento en la cantidad de partículas virales con respecto al tiempo (Figura 15B). Aunque no se observaron diferencias estadísticas con respecto al tiempo, estos resultados indican que el PRRSV aparentemente se replicó en las L-Cs pero no en las LN-Cs; para confirmarlo son necesarios más ensayos.

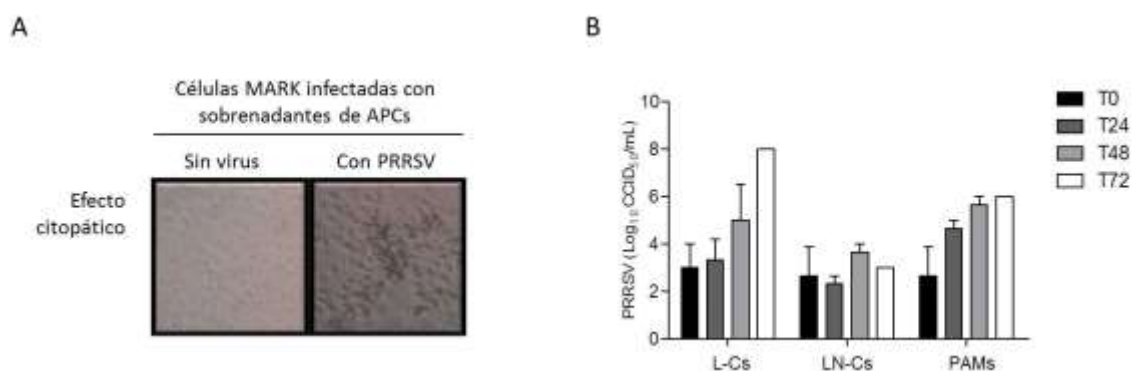


Figura 15. Replicación del PRRSV en APCs de pulmón. Células MHC-II⁺ aisladas por MACS se trataron con MOCK y un MOI de 0.1, a las 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se infectaron células MARK en diluciones decuples seriadas, se observó el efecto citopático (A) a las 0, 24, 48 y 72 h para titular al virus (B). Células presentadoras de antígenos de pulmón (L-Cs), células presentadoras de antígenos de linfonodos mediastinales (LN-Cs) y macrófagos alveolares pulmonares (PAMs). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Bonferroni. Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

Para conocer el efecto que causa la replicación del PRRSV en las APCs se evaluaron las características fenotípicas de las tres poblaciones celulares después de inocularlas con el PRRSV (Figura 16). Aunque no hubo diferencias estadísticas significativas en la expresión de marcadores entre las células con mock y con MOI 0.1, se pudieron observar comportamientos diferentes. En el caso de la expresión de MHC-II y CD172a, se vio afectada en las L-Cs y LN-Cs, donde se observó una ligera disminución en células con PRRSV con respecto a las células con mock, en los PAMs no hubo efecto aparente. Por otro lado, el receptor CD163 no mostró cambios aparentes de expresión en ninguna de las 3 poblaciones celulares. Esto podría indicar que el PRRSV está afectando las capacidades de maduración y activación de las L-Cs y las LN-Cs de cerdo.

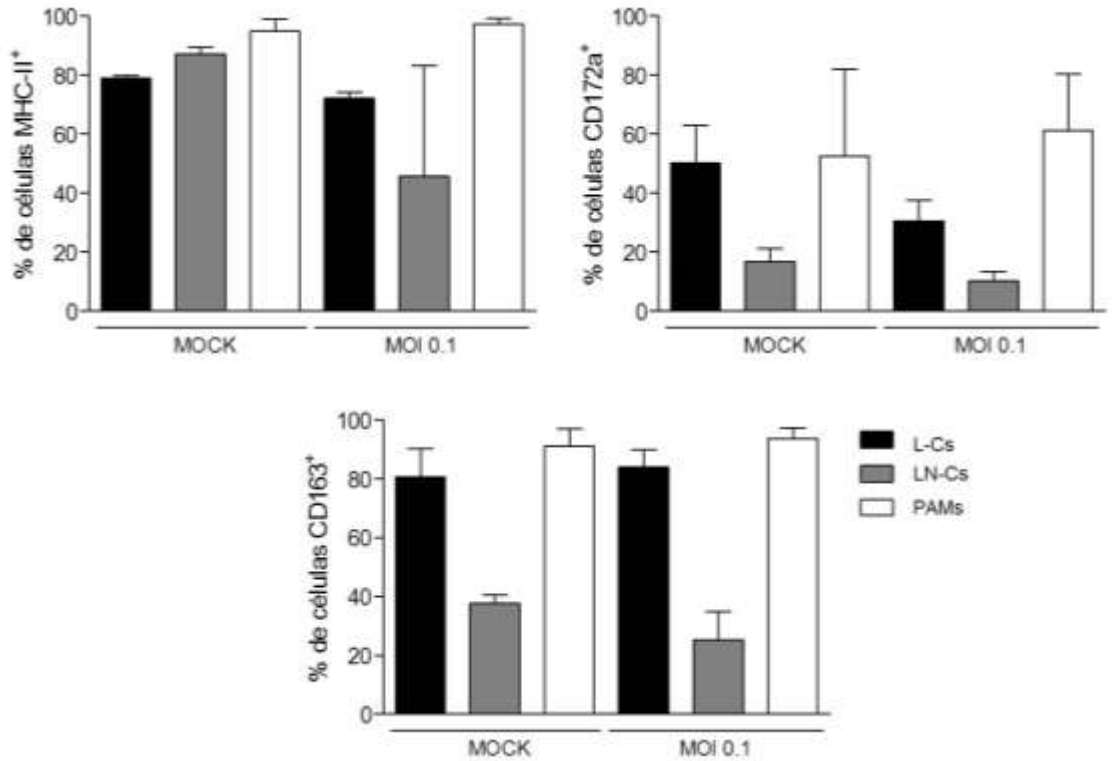


Figura 16. Caracterización fenotípica de las poblaciones de APCs inoculadas con el PRRSV. Células MHC-II⁺ aisladas por MACS se trataron con mock y un MOI de 0.1 y a las 24 h se realizó un análisis de la expresión de receptores; células de pulmón (L-Cs, barras negras), células de linfonodos (LN-Cs, barras grises) y macrófagos alveolares (PAMs, barras blancas). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Bonferroni. Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

Aunque hubo una ligera disminución en los marcadores de presentación y activación en las L-DCs y las LN-DCs, esta diferencia no fue muy notoria entre las células con mock y con MOI 0.1. Por ello, se decidió evaluar su capacidad de presentación de antígenos y saber si el virus podría estar afectando su funcionalidad. Se observó que el virus disminuye la capacidad de inducir linfoproliferación en las L-Cs y en las LN-Cs y aparentemente no hubo efecto en PAMs (Figura 17). Con estos resultados suponemos que el PRRSV podría estar afectando la capacidad de presentación de antígenos de las DCs.

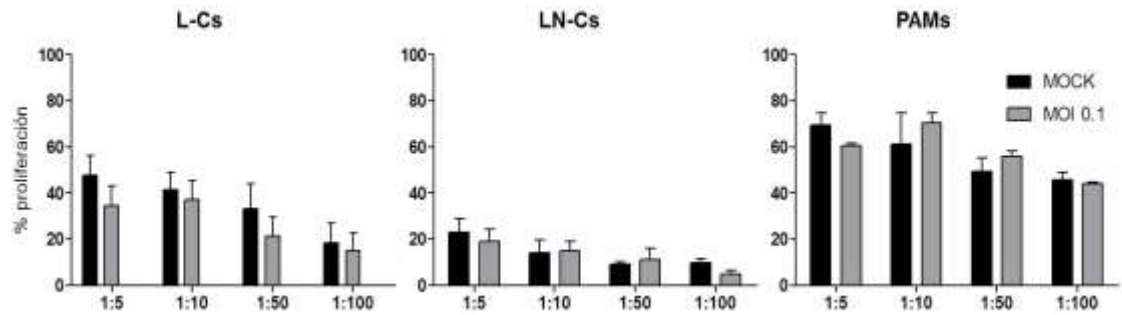


Figura 17. Habilidad de las APCs inoculadas con el PRRSV para inducir linfoproliferación en la reacción leucocitaria mixta. Para evaluar la capacidad de presentación de antígenos por las APCs MHC-II⁺ aisladas por MACS, se inocularon con el PRRSV y a las 24h de infección se co-cultivaron por 3 días con linfocitos de sangre periférica (PBLs) alogénicos teñidos con CFSE a diferentes relaciones y en duplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey. Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

Finalmente se evaluó la capacidad del PRRSV para inducir apoptosis o necrosis en las células infectadas. Para ello se evaluaron células tratadas con MOI y mock a diferentes tiempos de cultivo (0, 24, 48 y 72 h), se marcaron con Anexina V y ioduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo (Figura 18A). Las células negativas a ambos reactivos se consideraron vivas, las positivas a Anexina V fueron las células en apoptosis temprana, las que fueron positivas a ioduro de propidio en necrosis y las positivas a ambos se encontraban en apoptosis tardía. En las L-Cs con MOI se observó un incremento en la apoptosis temprana, tardía y necrosis a las 48 h de la infección, además a las 72 h también se observó un incremento en la necrosis, estos cambios fueron con respecto a lo observado en las células con mock (Figura 18B). El mismo comportamiento de incremento en apoptosis tardía y necrosis de células con MOI, fue observado en los PAMs a las 24 y 48 h después de la infección (Figura 18B). Así mismo, sucedió en las LN-Cs con MOI, pero solo con las células en necrosis a los tiempos 24, 48 y 72 h; sin embargo, en las células con mock se detectó una elevada cantidad de células en necrosis, posiblemente a esta población le afecte más el cultivo ex vivo que a las L-Cs y a los PAMs. Los resultados obtenidos muestran que el PRRSV podría estar afectando a las APCs de pulmón mediante mecanismos de apoptosis u necrosis.

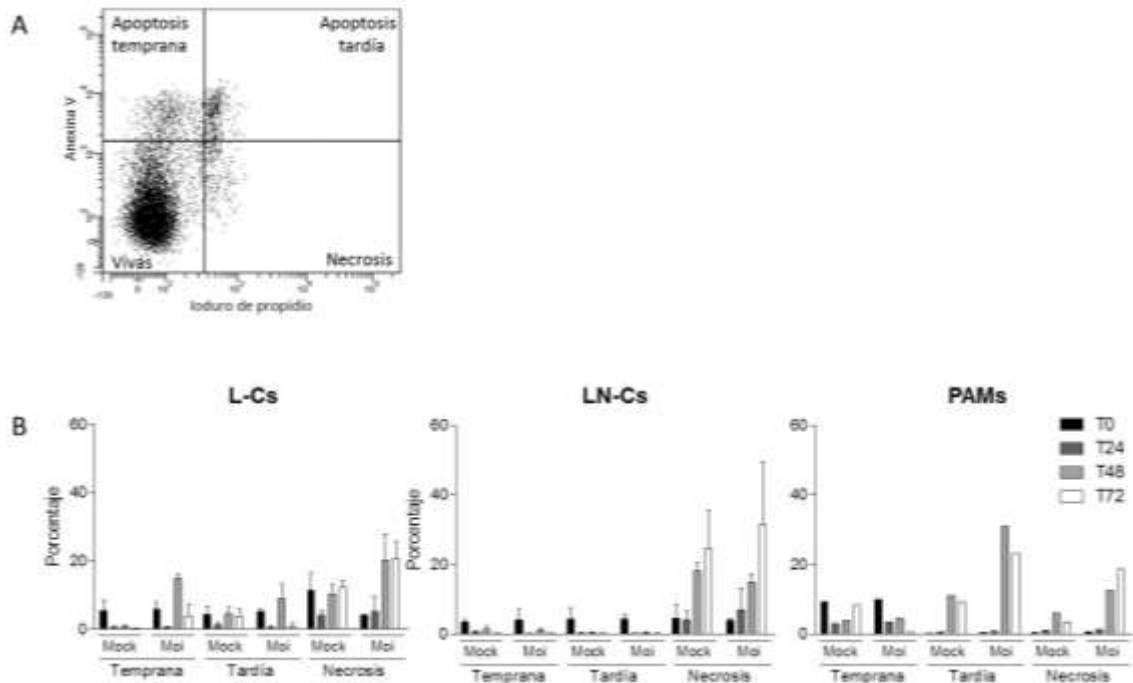


Figura 18. Inducción de apoptosis o necrosis en APCs de pulmón por el PRRSV. Células MHC-II⁺ aisladas por MACS se trataron con mock y un MOI de 0.1 y se evaluó la viabilidad de las células por el método de anexina/yoduro de propidio y las células teñidas se analizaron por citometría de flujo (A), el análisis se hizo a diferentes tiempos de la infección: 0 (T0), 24 (T24), 48 (T48) y 72 (T72) horas posteriores a la infección (B). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y las medias se compararon por Tukey Bonferroni. Las gráficas muestran las medias y los EEM de tres experimentos independientes (n=3).

VII. DISCUSIÓN

Debido a su importancia como centinelas de la respuesta inmune, las DCs de pulmón se han caracterizado en varias especies, tales como el humano, el ratón y el ovino (Cochand *et al.*, 1999; Fach *et al.*, 2006; Pollard and Lipscomb, 1990). Conocer a las APCs de pulmón es una herramienta básica de conocimiento para el estudio de inmunopatología de las enfermedades respiratorias porcinas. En el cerdo, se sabe poco acerca de las DCs del tracto respiratorio, por ello este estudio parte de la necesidad de tener una caracterización completa de las células presentadoras de antígeno de pulmón.

Debido a que la definición más común de DCs, es que son células grandes y expresan MHC-II^{high} (Marquet *et al.*, 2011; Steinman, 1991); primero se evaluaron por microscopía óptica las L-Cs, LN-Cs y PAMs MHC-II⁺ aisladas por MACS y se comprobó que la morfología de dichas células coincide con lo descrito previamente en la literatura (Bimczok *et al.*, 2005; Chitko-McKown *et al.*, 1991; Loving *et al.*, 2007). Por otra parte, el análisis de una serie de marcadores en una misma población de células puede ser de gran ayuda para tener éxito en la caracterización de poblaciones de APCs. Además de la expresión alta de MHC-II en las DCS, el CD172a es un marcador característico de células de linaje mielomonocítico (Haverson *et al.*, 2000; Steinman, 1991). En el cerdo, el CD172a es expresado por APCs de tejidos periféricos, principalmente aquellos que se encuentran en sitios de mayor exposición a patógenos, como la piel, el sistema digestivo y el sistema respiratorio (Bautista *et al.*, 2002; Bimczok *et al.*, 2005; Ezquerro *et al.*, 2009; Haverson *et al.*, 1999;

Steinman, 1991). La expresión de MHC-II y CD172a han sido ampliamente descrita en las DCs de cerdo (Bimczok et al., 2005; Bimczok et al., 2010; Marquet et al., 2011; Summerfield and McCullough, 2009). Sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, estos dos marcadores no se han empleado como base para la selección de poblaciones de DCs en el cerdo.

Por lo anterior, para el análisis fenotípico se seleccionaron las células MHC-II^{high}CD172a⁺ como la base para la identificación de las APC. De esta manera fue posible evaluar marcadores adicionales para la caracterización adecuada de estas células. Por ejemplo, se evaluó la expresión del receptor CD163 como un marcador típico de macrófagos (Fairbairn et al., 2011; Poderoso et al., 2011). Como era esperado, los PAMs presentaron el mayor nivel de expresión de este receptor, seguido por las L-Cs y finalmente las LN-Cs con baja expresión. La expresión de CD163 en las L-Cs sugiere que estas células pudieran ser macrófagos; sin embargo, existe evidencia de que hay DCs de cerdo que expresan CD163, como las generadas *in vitro* con la citocina hematopoyética Fms-similar a tirosina cinasa (Flt3L) (Guzylack-Piriou et al., 2010). Además, la expresión de CD14 y CD206 fue muy baja en las L-Cs y muy alta en los PAMs. El CD14 es ampliamente reconocido como marcador de macrófagos en el cerdo y el CD206 es expresado en macrófagos endoteliales de pulmón (Calzada-Nova et al., 2010; Facci et al., 2010; Linehan et al., 1999; Marquet et al., 2011). Esto confirma que las L-Cs y los PAMs obtenidos en el presente estudio son poblaciones celulares diferentes y que el origen de las células puede influenciar la expresión de los receptores de membrana.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las LN-Cs contrastan con lo observado por otros autores en DCs derivadas de linfa aferente de cerdo, ya que ellos describieron DCs con alta expresión de CD163 (Marquet et al., 2011); sin embargo, para el caso del CD206 son similares a los observados por Marquet et al. (2011), es decir, en ambos estudios se expresan en niveles moderados. Esto podría deberse a las diferencias en los métodos de obtención y al origen de las células, en el presente estudio se trabajó con las células

obtenidas del linfonodo mediastinal completo, donde puede haber DCs migratorias y residentes. Mientras que en el estudio de Marquet las células fueron obtenidas de linfa aferente, donde solo se encuentran DCs migratorias (Marquet et al., 2011). En otros modelos se han descrito DCs CD206⁺ residentes de linfonodo, que se encuentran en las áreas foliculares e interfoliculares y se ha observado que este marcador puede incrementarse en DCs migratorias (Linehan et al., 1999; Marquet et al., 2011; Segura et al., 2012). Otro marcador evaluado fue el CD1a, que también se presenta en DCs migratorias y se ha reportado que media la presentación de antígenos no proteicos a linfocitos T (Matsuda and Kronenberg, 2001). Además, las DCs de cerdo, especialmente las de piel expresan este marcador (Bautista et al., 2002; Jamin et al., 2006). En este trabajo, se detectó una alta proporción de células CD1a⁺ en la población MHC-II^{high}CD172a⁺ de LN-Cs, mientras que en L-Cs y PAMs fue muy baja. Aunque se sabe que una fracción de linfocitos B y macrófagos también son positivos a este receptor (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008), en el análisis de la expresión de CD79a en las LN-Cs pudimos observar < 1.7% de linfocitos B y < 4.4% de macrófagos.

La caracterización fenotípica de las subpoblaciones de DCs proporciona pistas de sus posibles funciones. El CD206 (de manosa), es un receptor tipo lectina dependientes de calcio (tipo C; CTLR), su funcionalidad se asocia con endocitosis y presentación cruzada (Burgdorf et al., 2006; Wollenberg et al., 2002). En cambio, el CD163 es un receptores tipo scavenger (o basurero), su función más conocida es la de captar el complejo haptoglobina-hemoglobina con el fin de metabolizar su capacidad oxidante. Sin embargo, se sabe que juega un rol clave en la resolución de inflamaciones (Gordon, 2001; Peiser and Gordon, 2001). De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de marcadores en las poblaciones de APCs de pulmón de cerdo, se observó que las L-Cs mostraron el fenotipo característico MHC-II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻; las LN-DCs, MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺; y los PAMs MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻CD163^{high}CD206^{+/-}. El fenotipo de las APCs descritas en este trabajo, puede ser comparado con subpoblaciones de DCs de

cerdo descritas previamente (Marquet et al., 2011; Marquet et al., 2014). Las L-Cs se asemejan a la subpoblación de DCs dermales MHC-II^{high}CD172⁺CD163^{low}CD206⁻, mientras que las LN-Cs son comparables con las DCs de linfa MHC-II^{high}CD172⁺CD163^{low}CD206⁺ (Marquet et al., 2011). En un estudio reciente, se observó que las DCs dermales CD163^{low} en el cerdo, son comparables a las DCs pulmonares de humano con el fenotipo BDCA1⁺/CD1c⁺, debido a que tienen una alta capacidad migratoria, activan linfocitos T alogénicos CD4⁺ y CD8⁺, además inducen una respuesta tipo Th17 (Marquet et al., 2014; Schlitzer et al., 2013). Es probable que las L-Cs descritas en este trabajo tengan funciones similares a las observadas en su posible contraparte humana BDCA1⁺/CD1c⁺, así como elevadas capacidades de internalización de antígenos debido a la expresión diferencial de receptores como el CD206, pero para comprobarlo se necesitan realizar estudios comparables de funcionalidad en las poblaciones de APCs pulmonares de cerdo.

Para complementar la caracterización de las L-Cs y las LN-Cs, y conocer más acerca de ellas, se realizaron ensayos de funcionalidad, uno de ellos fue para evaluar la capacidad de las células para inducir la proliferación de linfocitos. El análisis de MLR reveló que las L-Cs tienen una capacidad de activación de linfocitos mayor que los PAMs, pero menor que las LN-DCs. Esta información es consistente con lo reportado en L-Cs CD11c⁺ por Loving et al. (2007), los autores observaron que las células indujeron mayor proliferación de linfocitos T que las DCs derivadas de monocitos o que los macrófagos derivados de monocitos. Adicionalmente, estos datos coinciden con su posible contraparte humana, las DCs BDCA1⁺/CD1c⁺ en pulmón y otros estudios con L-DCs de humano, ovino y cerdo, ya que se ha observado que tienen una capacidad elevada en la MLR (Basta et al., 2000; Cochand et al., 1999; Fach et al., 2006; Nicod et al., 1987; Schlitzer et al., 2013; Weissler et al., 1986). Sin embargo, es importante resaltar que el ensayo de MLR es un indicador de presentación de antígenos no específica y que la información obtenida es limitada. En estudios futuros, es importante que se incluyan experimentos con co-cultivos de linfocitos de cerdos inmunizados con L-DCs pulsadas con el

antígeno de interés, con esto se podrá determinar la capacidad específica de las DCs para inducir linfoproliferación.

En otro de los ensayos de funcionalidad, se evaluó la capacidad de internalización de partículas de látex y dextrán por las APCs pulmonares. En las L-Cs y LN-Cs se observó un porcentaje bajo de células que internalizan látex y la población más eficiente fueron los PAMs, lo cual es consistente con lo observado en reportes previos de L-Cs de humanos, ovinos y ratones (Cochand *et al.*, 1999; Fach *et al.*, 2006; Pollard and Lipscomb, 1990). Sin embargo, no hubo diferencias entre las poblaciones en cuanto a la capacidad de internalización de dextrán, esto puede deberse a que las células podrían estar expresando en niveles comparables algunos receptores específicos para dextrán, los cuales no fueron analizados en el presente trabajo; tales como receptores scavenger de clase A (SRA-I, SRA-II, MARCO) (Chao *et al.*, 2012; Thelen *et al.*, 2010). En estudios posteriores se deberá evaluar mayor cantidad de receptores y su papel en la internalización de antígenos.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de las APCs pulmonares para producir lisozima después de un estímulo. En los PAMs se observó un incremento en la producción de lisozima con respecto al tiempo, pero no sucedió lo mismo en las L-Cs ni en las LN-Cs. Esto era esperado, dado que los macrófagos son las células más especializadas en fagocitosis (Gordon *et al.*, 1974). Este ensayo podría ser una herramienta valiosa para la identificación de macrófagos, tal como lo propuso Siamon Gordon en el artículo de Geissmann *et al.* (2010) (Geissmann *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 1974). Estos resultados demuestran que las L-Cs y las LN-Cs de cerdo poseen bajas habilidades fagocíticas y los PAMs son las células especializadas en internalización y destrucción de antígenos. Sin embargo, estos estudios tienen que complementarse para definir el mecanismo preciso de internalización de antígenos que es utilizado por las APCs de pulmón de cerdo, esto mediante inhibidores metabólicos como: bafilomicina, brefeldina, cloroquina,

clorpromazina, cicloheximida, citocalasina D, filipina o wortmannin (Harwood et al., 2008).

Debido a la situación estratégica y su papel tan importante en la respuesta inmune del pulmón, las L-Cs podrían ser un blanco importante para el PRRSV. Sin embargo, hasta la fecha la infección de DCs por el virus solo se ha realizado con éxito en modelos *in vitro* (Flores-Mendoza et al., 2008; Loving et al., 2007; Park et al., 2008; Wang et al., 2007). En el presente estudio se evaluó de manera preliminar la capacidad infectiva del PRRSV en las L-Cs y se utilizaron como control positivo a los PAMs, ya que se sabe que son la principal célula blanco del PRRSV (Duan et al., 1997a, b). Además, debido a que en estudios *in vitro* se ha observado que el PRRSV infecta solo a células inmaduras (Flores-Mendoza et al., 2008), se incluyeron a las LN-Cs, las cuales en su mayoría parecen estar compuestas por células maduras. Como se esperaba, el virus se replicó eficientemente en los PAMs y no en las LN-DCs. Además, pudo probarse la replicación en las L-Cs; sin embargo, estos resultados contradicen lo descrito previamente por Loving et al. (2007), ya que ellos no detectaron replicación viral en estas células. Esto puede deberse a las diferencias en los métodos de obtención de L-DCs, aparentemente en el estudio mencionado no se partió de una población pura, lo que pudo haber afectado el resultado.

Además de la replicación viral, se evaluaron características fenotípicas y funcionales que podría estar afectando el PRRSV en las células infectadas. En cuanto al fenotipo, se observó una disminución en la expresión de MHC-II, lo cual coincide con lo reportado previamente en modelos de DCs *in vitro* (Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Wang et al., 2007). También se observó que la capacidad de inducción de linfoproliferación por las L-Cs fue afectada y esto podría estar relacionado con la disminución de la expresión de las moléculas de presentación de antígenos MHC-II, lo cual ha sido descrito anteriormente en Mo-DCs (Park et al., 2008). En las L-Cs infectadas con PRRSV se observó un incremento de células apoptóticas y necróticas con

respecto a las que solo tenían mock, esto también coincide con lo reportado previamente (Wang et al., 2007). Estos resultados parciales, pueden ser un indicio de que el PRRSV infecta a las L-DCs de cerdo, sin embargo serán necesarios más estudios complementarios para confirmarlo.

VIII. CONCLUSIÓN

Las APCs de pulmón de cerdo tienen diferencias fenotípicas y funcionales. Se distinguieron por mostrar un fenotipo característico de DCs: las L-Cs fueron MHC-II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻ y las LN-Cs fueron MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺, así como funciones características de células presentadoras de antígenos profesionales. En contraste, los PAMs fueron MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻CD163^{high}CD206^{+/-}, con ello mostraron el fenotipo característico de los macrófagos, así como sus funcionalidades. Por otra parte, los datos preliminares indican que el PRRSV se replicó eficientemente en las L-Cs. Sin embargo estos resultados necesitan ser complementados con pruebas más finas, tales como estudios genómicos y proteómicos.

IX. REFERENCIAS

- Angel, C.E., Chen, C.J., Horlacher, O.C., Winkler, S., John, T., Browning, J., MacGregor, D., Cebon, J., Dunbar, P.R., 2009, Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes. *Blood* 113, 1257-1267.
- Basta, S., Carrasco, C.P., Knoetig, S.M., Rigden, R.C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2000, Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 77, 177-190.
- Bautista, E.M., Gregg, D., Golde, W.T., 2002, Characterization and functional analysis of skin-derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. *Veterinary immunology and immunopathology* 88, 131-148.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., Heath, W.R., 2004, Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8670-8675.
- Berndt, A., Muller, G., 1997, Heterogeneity of porcine alveolar macrophages in experimental pneumonia. *Veterinary immunology and immunopathology* 57, 279-287.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *Journal of virology* 84, 1574-1584.
- Bimczok, D., Sowa, E.N., Faber-Zuschratter, H., Pabst, R., Rothkotter, H.J., 2005, Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *European journal of immunology* 35, 1418-1427.
- Bimczok, D., Verdonck, F., Hartig, R., Cox, E., Rothkotter, H.J., 2010, Primary porcine CD11R1+ antigen-presenting cells isolated from small intestinal mucosa mature but lose their T cell stimulatory function in response to cholera toxin treatment. *Veterinary immunology and immunopathology* 134, 239-248.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., 2002, 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* 196, 1627-1638.

- Bonjardim, C.A., 2005, Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 569-578.
- Burgdorf, S.K., Fischer, A., Claesson, M.H., Kirkin, A.F., Dzhandzhugazyan, K.N., Rosenberg, J., 2006, Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 25, 201-206.
- Calder, C.J., Liversidge, J., Dick, A.D., 2004, Murine respiratory tract dendritic cells: isolation, phenotyping and functional studies. *Journal of immunological methods* 287, 67-77.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K., 2007, CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of virology* 81, 7371-7379.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R., Zuckermann, F.A., 2010, Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Veterinary immunology and immunopathology* 135, 20-33.
- Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., Nicod, L.P., 1999, Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21, 547-554.
- Chao, Y., Makale, M., Karmali, P.P., Sharikov, Y., Tsigelny, I., Merkulov, S., Kesari, S., Wrasidlo, W., Ruoslahti, E., Simberg, D., 2012, Recognition of dextran-superparamagnetic iron oxide nanoparticle conjugates (Feridex) via macrophage scavenger receptor charged domains. *Bioconjugate chemistry* 23, 1003-1009.
- Charerntantanakul, W., Platt, R., Roth, J.A., 2006, Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral immunology* 19, 646-661.
- Chen, M., Wang, Y.H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y.J., Wang, J., 2006, Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311, 1160-1164.
- Chitko-McKown, C.G., Chapes, S.K., Brown, R.E., Phillips, R.M., McKown, R.D., Blecha, F., 1991, Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *Journal of leukocyte biology* 50, 364-372.
- de Oliveira, V.L., Almeida, S.C., Soares, H.R., Crespo, A., Marshall-Clarke, S., Parkhouse, R.M., 2011, A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). *Archives of virology* 156, 597-609.
- Demedts, I.K., Brusselle, G.G., Vermaelen, K.Y., Pauwels, R.A., 2005, Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 177-184.
- Diao, Y.X., Ding, J.B., Jiang, S.J., Cui, Z.Z., Chen, B.L., 2005, [PCR detection of PCV-2 and PRRSV in porcine pleuropneumonia samples]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45, 397-400.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2006, Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.
- Dominguez, J., Alvarez, B., Alonso, F., Thacker, E., Haverson, K., McCullough, K., Summerfield, A., Ezquerro, A., 2001, Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11 specificity. *Veterinary immunology and immunopathology* 80, 111-119.

- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997a, Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of virology* 142, 2483-2497.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997b, Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary microbiology* 56, 9-19.
- Epardaud, M., Bonneau, M., Payot, F., Cordier, C., Megret, J., Howard, C., Schwartz-Cornil, I., 2004, Enrichment for a CD26hi SIRP- subset in lymph dendritic cells from the upper aero-digestive tract. *Journal of leukocyte biology* 76, 553-561.
- Ezquerria, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., Dominguez, J., 2009, Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Developmental and comparative immunology* 33, 284-298.
- Facci, M.R., Auray, G., Buchanan, R., van Kessel, J., Thompson, D.R., Mackenzie-Dyck, S., Babiuk, L.A., Gerdt, V., 2010, A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology* 129, 396-405.
- Fach, S.J., Brockmeier, S.L., Hobbs, L.A., Lehmkühl, H.D., Sacco, R.E., 2006, Pulmonary dendritic cells isolated from neonatal and adult ovine lung tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 112, 171-182.
- Fairbairn, L., Kapetanovic, R., Sester, D.P., Hume, D.A., 2011, The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *Journal of leukocyte biology* 89, 855-871.
- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Resendiz, M., Osorio, F.A., Hernandez, J., 2008, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 15, 720-725.
- Fraile, L., Calsamiglia, M., Mateu, E., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Domingo, M., Segales, J., 2009, Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian journal of veterinary research* 73, 308-312.
- Ganter, M., Hensel, A., 1997, Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. *Research in veterinary science* 63, 215-217.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., Randolph, G.J., 2010, Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 10, 453-460.
- Gordon, S., 2001, Homeostasis: a scavenger receptor for haemoglobin. *Curr Biol* 11, R399-401.
- Gordon, S., Todd, J., Cohn, Z.A., 1974, In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 139, 1228-1248.
- Guilliams, M., Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2013, Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal immunology* 6, 464-473.
- Guzylack-Piriou, L., Alves, M.P., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2010, Porcine Flt3 ligand and its receptor: generation of dendritic cells and identification of a new marker for porcine dendritic cells. *Developmental and comparative immunology* 34, 455-464.
- Hamilos, D.L., 1989, Antigen presenting cells. *Immunologic research* 8, 98-117.
- Hardison, S.E., Brown, G.D., 2012, C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology* 13, 817-822.

- Harwood, L.J., Gerber, H., Sobrino, F., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2008, Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *Journal of virology* 82, 6379-6394.
- Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., 1999, T-cell populations in the pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics. *Immunology* 96, 66-73.
- Haverson, K., Singha, S., Stokes, C.R., Bailey, M., 2000, Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology* 101, 492-500.
- Honda, K., Taniguchi, T., 2006, IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* 6, 644-658.
- Idoyaga, J., Cheong, C., Suda, K., Suda, N., Kim, J.Y., Lee, H., Park, C.G., Steinman, R.M., 2008, Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo. *The journal of immunology* 180, 3647-3650.
- Jamin, A., Gorin, S., Le Potier, M.F., Kuntz-Simon, G., 2006, Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Veterinary immunology and immunopathology* 114, 224-237.
- Jingwen, Z., Danting, H., Xin, G., Xinna, G., Hanchun, Y., 2011, The increase of CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*
- Jones, M., Cordell, J.L., Beyers, A.D., Tse, A.G., Mason, D.Y., 1993, Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *The journal of immunology* 150, 5429-5435.
- Kaddoum, L., Magdeleine, E., Waldo, G.S., Joly, E., Cabantous, S., 2010, One-step split GFP staining for sensitive protein detection and localization in mammalian cells. *Biotechniques* 49, 727-728, 730, 732.
- Kapsenberg, M.L., 2003, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology* 3, 984-993.
- Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K., Pensaert, M., 2003, Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Veterinary research* 34, 249-260.
- Lacal, P., Pulido, R., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C., Mollinedo, F., 1988, Intracellular localization of a leukocyte adhesion glycoprotein family in the tertiary granules of human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications* 154, 641-647.
- Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2012, Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annual review of immunology* 30, 243-270.
- Landrigan, A., Wong, M.T., Utz, P.J., 2011, CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides directly costimulate mouse and human CD4+ T cells through a TLR9- and MyD88-independent mechanism. *The journal of immunology* 187, 3033-3043.
- Lewis, C.R., Ait-Ali, T., Clapperton, M., Archibald, A.L., Bishop, S., 2007, Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral immunology* 20, 343-358.
- Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R.M., Beg, A.A., 2001, An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *The journal of immunology* 166, 7128-7135.

- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Stahl, P.D., Gordon, S., 1999, Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *The journal of experimental medicine* 189, 1961-1972.
- Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007, Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229.
- Maecker, H., Trotter, J., 2009, Selecting reagents for multicolor BD flow cytometry with BD™ LSR II and BD FACSCanto™ systems. *Postepy biochem* 55, 461-467.
- Mair, K.H., Sedlak, C., Kaser, T., Pasternak, A., Levast, B., Gerner, W., Saalmuller, A., Summerfield, A., Gerdts, V., Wilson, H.L., Meurens, F., 2014, The porcine innate immune system: An update. *Developmental and comparative immunology* 45, 321-343.
- Makala, L.H., Haverson, K., Stokes, C.R., Bailey, M., Bland, P.W., 1998, Isolation and characterisation of pig Peyer's patch dendritic cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 61, 67-81.
- Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2011, Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS one* 6, e16320.
- Marquet, F., Vu Manh, T.P., Maisonnasse, P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bouguyon, E., Jouneau, L., Bourge, M., Simon, G., Ezquerro, A., Lecardonnel, J., Bonneau, M., Dalod, M., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2014, Pig Skin Includes Dendritic Cell Subsets Transcriptomically Related to Human CD1a and CD14 Dendritic Cells Presenting Different Migrating Behaviors and T Cell Activation Capacities. *The journal of immunology*.
- Masten, B.J., Olson, G.K., Tarleton, C.A., Rund, C., Schuyler, M., Mehran, R., Archibeque, T., Lipscomb, M.F., 2006, Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *The journal of immunology* 177, 7784-7793.
- Mateu, E., Diaz, I., 2008, The challenge of PRRS immunology. *Veterinary journal* 177, 345-351.
- Matsuda, J.L., Kronenberg, M., 2001, Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules. *Current opinion in immunology* 13, 19-25.
- Morton, D., Bertram, T.A., 1988, Isolation and preliminary in vitro characterization of the porcine pulmonary intravascular macrophage. *Journal of leukocyte biology* 43, 403-410.
- Music, N., Gagnon, C.A., 2010, The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal health research reviews / Conference of research workers in animal diseases*, 1-29.
- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005, Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 385-392.
- Nicod, L.P., Lipscomb, M.F., Weissler, J.C., Lyons, C.R., Albertson, J., Toews, G.B., 1987, Mononuclear cells in human lung parenchyma. Characterization of a potent accessory cell not obtained by bronchoalveolar lavage. *The American review of respiratory disease* 136, 818-823.
- Ondrackova, P., Nechvatalova, K., Kucerova, Z., Leva, L., Dominguez, J., Faldyna, M., 2010, Porcine mononuclear phagocyte subpopulations in the lung, blood and bone marrow:

- dynamics during inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary research* 41, 64.
- Park, J.Y., Kim, H.S., Seo, S.H., 2008, Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells. *Journal of microbiology and biotechnology* 18, 1709-1716.
- Peiser, L., Gordon, S., 2001, The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3, 149-159.
- Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008, Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary research* 39, 54.
- Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009, Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 73, 298-302.
- Poderoso, T., Martinez, P., Alvarez, B., Handler, A., Moreno, S., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., Revilla, C., 2011, Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. *Vaccine* 29, 4813-4820.
- Pollard, A.M., Lipscomb, M.F., 1990, Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *The journal of experimental medicine* 172, 159-167.
- Pujhari, S., Baig, T.T., Zakhartchouk, A.N., 2014, Potential role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus structural protein GP2 in apoptosis inhibition. *BioMed research international* 2014, 160505.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., Murphy, K.M., 2012, Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 13, 1145-1154.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., Shortman, K., 1996, Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The journal of experimental medicine* 184, 2185-2196.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H.A., Hilkens, C.M., Tam, J., Poidinger, M., Stanley, E.R., Krug, A.B., Renia, L., Sivasankar, B., Ng, L.G., Collin, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Honda, K., Haniffa, M., Ginhoux, F., 2013, IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970-983.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S., 2012, Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The journal of experimental medicine* 209, 653-660.
- Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., Hernandez, J., 2010, European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology* 396, 264-271.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Resendiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernandez, J., 2009, Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387, 373-379.
- Silva-Campa, E., Mata-Haro, V., Mateu, E., Hernandez, J., 2012, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs). *Virology* 430, 73-80.

- Soerensen, C.M., Holmskov, U., Aalbaek, B., Boye, M., Heegaard, P.M., Nielsen, O.L., 2005, Pulmonary infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic cells in bronchial-associated lymphoid tissue. *Immunology* 115, 526-535.
- Steinman, R.M., 1991, The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology* 9, 271-296.
- Strober, W., 2001, Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology* Appendix 3, Appendix 3B.
- Stumbles, P.A., Thomas, J.A., Pimm, C.L., Lee, P.T., Venaille, T.J., Proksch, S., Holt, P.G., 1998, Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *The journal of experimental medicine* 188, 2019-2031.
- Summerfield, A., Guzylack-Piriou, L., Schaub, A., Carrasco, C.P., Tache, V., Charley, B., McCullough, K.C., 2003, Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110, 440-449.
- Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009, The porcine dendritic cell family. *Developmental and comparative immunology* 33, 299-309.
- Sun, Y., Chen, N., Yoo, D., 2009, Inhibition of type I interferon signaling by Nsp11 of PRRSV. 2009 International PRRS symposium, p.54.
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., 2003, Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The journal of general virology* 84, 2755-2760.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012, PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews* 249, 158-175.
- Thelen, T., Hao, Y., Medeiros, A.I., Curtis, J.L., Serezani, C.H., Kobzik, L., Harris, L.H., Aronoff, D.M., 2010, The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages. *The journal of immunology* 185, 4328-4335.
- Vanhee, M., Delputte, P.L., Delrue, I., Geldhof, M.F., Nauwynck, H.J., 2009, Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Veterinary research* 40, 63.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005, Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115, 388-398.
- Vremec, D., Shortman, K., 1997, Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *The journal of immunology* 159, 565-573.
- Wang, C., Lee, F., Huang, T.S., Pan, C.H., Jong, M.H., Chao, P.H., 2008, Genetic variation in open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Taiwan. *Veterinary microbiology*.
- Wang, M., Li, G., Yin, J., Ren, X., 2009, Phylogenetic characterization of genes encoding for glycoprotein 5 and membrane protein of PRRSV isolate HH08. *Journal of Veterinary Science* 10, 309-315.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., 2007, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Archives of virology* 152, 289-303.

- Weber, K., Fehse, B., 2009, Diva-Fit: A step-by-step manual for generating high-resolution graphs and histogram overlays of flow cytometry data obtained with FACSDiva software. Cell therapy and transplantation. 1.
- Weissler, J.C., Lyons, C.R., Lipscomb, M.F., Toews, G.B., 1986, Human pulmonary macrophages. Functional comparison of cells obtained from whole lung and by bronchoalveolar lavage. The American review of respiratory disease 133, 473-477.
- Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E.M., Gunther, S., Moderer, M., 2002, Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. The Journal of investigative dermatology 118, 327-334.
- Wongyanin, P., Buranapraditkun, S., Chokeshai-Usaha, K., Thanawonguwech, R., Suradhat, S., 2009, Induction of inducible CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Veterinary immunology and immunopathology.
- Wongyanin, P., Buranapraditkun, S., Chokeshai-Usaha, K., Thanawonguwech, R., Suradhat, S., 2010, Induction of inducible CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Veterinary immunology and immunopathology 133, 170-182.
- Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1996, Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. Viral immunology 9, 51-63.

ANEXO

Artículo en proceso de publicación

Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system

Enviado a la revista "Research in veterinary science"

Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system

Article Type: Research Paper

Section/Category: Immunology

Keywords: Antigen-presenting cells, dendritic cells, porcine, respiratory system

Corresponding Author: Dr. Jesus Hernandez, PhD

Corresponding Author's Institution: CIAD

First Author: Guadalupe López-Robles

Order of Authors: Guadalupe López-Robles ; Alexel Burgara-Estrella ; Erika Silva-Campa ; Jesus Hernandez, PhD

Abstract: Antigen-presenting cells (APCs) are strategically placed in all anatomic sites with high antigen exposure such as the respiratory system. The aim of this study was to evaluate phenotypic and functional properties of APCs from the lung (L-Cs), mediastinal lymph node (LN-Cs) and BAL-Cs. The APCs were first analyzed based on forward scatter and side scatter profiles and the selection of MHC-II^{high}CD172a⁺ cells (referred to as APCs); then, the expression of CD1a, CD163⁺, CD206⁺, CD16 and CD11R3 was evaluated in the APCs. The results showed that CD1a, CD163⁺ and CD206⁺ were differentially expressed among L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs, suggesting the phenotype MHC-II^{high}CD172+CD1a^{low}/-CD163^{low}CD206⁻ for L-Cs and MHC-II^{high}CD172+CD1a+CD163^{low}/-CD206⁺ for LN-Cs. BAL-Cs were MHC-II^{high}CD172+CD1a-CD163^{high}CD206⁺/-. The functional characteristics of L-Cs and LN-Cs were different from those of BAL-Cs, confirming that L-Cs and LN-Cs resemble specialized APCs and confirm that BAL-Cs are macrophages. In conclusion, we present the characterization of APCs from L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs of the porcine respiratory system.

Suggested Reviewers: Artur Summerfield
artur.Summerfield@ivi.admin.ch

Highlights

1. Antigen-presenting cells are strategically placed in all anatomic sites.
2. This study evaluated properties of respiratory antigen-presenting cells.
3. Cells from lymph node and lung resemble specialized antigen-presenting cells in contrast to alveolar macrophages

24 **Abstract**

25 Antigen-presenting cells (APCs) are strategically placed in all anatomic sites with high antigen
26 exposure such as the respiratory system. The aim of this study was to evaluate phenotypic and
27 functional properties of APCs from the lung (L-Cs), mediastinal lymph node (LN-Cs) and BAL-
28 Cs. The APCs were first analyzed based on forward scatter and side scatter profiles and the
29 selection of MHC-II^{high}CD172a⁺ cells (referred to as APCs); then, the expression of CD1a,
30 CD163⁺, CD206⁺, CD16 and CD11R3 was evaluated in the APCs. The results showed that
31 CD1a, CD163⁺ and CD206⁺ were differentially expressed among L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs,
32 suggesting the phenotype MHC-II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻ for L-Cs and MHC-
33 II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺ for LN-Cs. BAL-Cs were MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻
34 CD163^{high}CD206^{+/-}. The functional characteristics of L-Cs and LN-Cs were different from those
35 of BAL-Cs, confirming that L-Cs and LN-Cs resemble specialized APCs and confirm that BAL-
36 Cs are macrophages. In conclusion, we present the characterization of APCs from L-Cs, LN-Cs
37 and BAL-Cs of the porcine respiratory system.

38

39 **Keywords:** Antigen-presenting cells, dendritic cells, porcine, respiratory system

40

41

42

43

44

45

46

47 **Introduction**

48 Antigen-presenting cells (APCs) are able to recognize and uptake antigens as well as process and
49 present peptides to T cells. Additionally, APCs can secrete molecules that are important in
50 activating the immune system for the removal of antigens (Hamilos, 1989). APCs include
51 dendritic cells (DCs), B cells, and macrophages (MØs), but DCs are considered to be the
52 “professional” APCs. DCs have a primary role in capturing and presenting antigens as well as in
53 activating and regulating the adaptive immune response (Steinman, 1991). DCs show high
54 presentation, co-stimulatory and cytokine production capacities in allogeneic mixed leukocyte
55 reactions (MLR), therefore exhibiting potent T-cell co-stimulatory capabilities (Cochand et al.,
56 1999; Demedts et al., 2005). B cells are primarily involved in antibody production but also
57 present antigens to T cells (Chen and Jensen, 2008). MØs are sentinels and professional
58 phagocytes with high lysozyme activity (Gordon et al., 1974); however, they have a poor or null
59 migratory capacity (Kirby et al., 2009; Soroosh et al., 2013). APCs are strategically placed in all
60 anatomic sites with high antigen exposure, such as the skin, gut, spleen and lungs. At present,
61 different reports have described the characteristics of DCs and MØs in many species (Bimczok et
62 al., 2005; Bullido et al., 1996; Cochand et al., 1999; Demedts et al., 2005; Fach et al., 2006;
63 Geissmann et al., 2010; Mair et al., 2014; Segura et al., 2012; Summerfield and McCullough,
64 2009; Weissler et al., 1986). In the respiratory system, a variety of APCs have been described,
65 such as lung dendritic cells (L-DCs) and mediastinal lymph node dendritic cells (LN-DCs).

66

67 To our knowledge, a complete characterization of porcine APCs from the respiratory tract has
68 not been performed, and their participation in the immune response is unknown. Only a few
69 studies have described the phenotypic characteristics of porcine pulmonary APCs (Loving et al.,

70 2007; Ondrackova et al., 2010; Soerensen et al., 2005). Enriched CD11c⁺ lung tissue-derived
71 cells (L-Cs) have a granular and complex structure and express CD80/86, CD172a, and CD1.
72 Additionally, more than 50% of the cells exhibit MHC-II and CD16 expression, and there are a
73 fraction of CD14⁺ cells that also have this expression (Loving et al., 2007). The L-Cs showed
74 good latex and ovalbumin uptake ability and high lymphoproliferative activity. However, it is
75 possible that this population was not only composed of APCs because these cells were sorted by
76 CD11c⁺ expression, and although this receptor is expressed by APCs, other granulocytes such as
77 eosinophils also express this receptor (Bimczok et al., 2005; Dominguez et al., 2001). In the case
78 of lung-associated lymph node APCs, less is known about their phenotypic and functional
79 characteristics in swine. Therefore, a better characterization of porcine respiratory APCs is
80 necessary. The aim of this study was to evaluate the phenotypic and functional properties of L-
81 Cs and LN-Cs with the characteristics of APCs and to compare them with bronchoalveolar
82 lavage cells (BAL-Cs). To achieve these objectives, the phenotype of the subsets was evaluated,
83 and the functionality in the populations was assessed through uptake abilities and MLR assays,
84 as well as through lysozyme production.

85

86 **Materials and methods**

87 **Animals**

88 Healthy conventionally weaned pigs (n=9) 4 to 6 weeks old from a PRRSV-free herd were used
89 for the experiments. The animals were housed at the animal facility of the Centro de
90 Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. with *ad libitum* access to food and water. The
91 animals were maintained and euthanized according to the ethics of the Mexican Official Norm,
92 NOM-033-ZOO-1995 (NOM-033-ZOO-1995).

93 **Tissue collection and APC harvesting**

94 The protocol to obtain APCs from the lungs was adapted from previous reports on swine and
95 other species with some modifications (Calder et al., 2004; Loving et al., 2007; Stumbles et al.,
96 1998). Briefly, after euthanasia, the thoracic viscera were exposed, and the trachea, esophagus,
97 and caudal vena cava were immediately double-clamped to avoid contamination of the lung. The
98 pulmonary artery was clamped, and a cannula was inserted distal to the clamp for the elimination
99 of pulmonary intravascular MØs and blood DCs. The vasculature was flushed with 200 mL of
100 sterile phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 100 IU penicillin (Sigma-Aldrich,
101 MO, USA) and 1 mg/mL amphotericin B solution (Gibco Laboratories, Grand Island Biological
102 Co., NY, USA) to drain the aorta. The lungs were subsequently removed and immersed in 200
103 mL of sterile PBS and transported to a sterile environment. To obtain the BAL-Cs, the airways
104 were flushed with 100 mL of sterile PBS at least four times or until a clear fluid was observed.
105 The cells were rinsed twice for 10 min at 300 g with RPMI-1640 complete media supplemented
106 with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM 2-mercaptoethanol,
107 100 IU penicillin (all from Sigma-Aldrich), 1 mg/mL amphotericin B solution and 10% fetal
108 bovine serum (FBS, Gibco) and stored at 4° C until their use the next day.

109 To collect the L-Cs, each lung lobe was dissected from the bronchus and trachea and minced into
110 small pieces. The lung tissue was cultured in 100 mL of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
111 supplemented with 2% FBS, 10 mg of collagenase type 1 (Worthington Biochemical Corp, NJ,
112 USA), 100 µg of deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich) and 20 mM HEPES on an orbital shaker
113 (150 rpm) at 37° C for 90 min. The cells from the supernatant were collected and washed twice
114 for 10 min at 300 g with RPMI-1640. The cells were then filtered using 100 µm pore nylon
115 filters (Becton-Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and subsequently fractionated by

116 gradient separation with Ficoll-Hypaque density 1.077 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at 400
117 g for 20 min. The fractionated cells were collected, and the adherent cells were eliminated by
118 culturing overnight in a 75 cm² culture bottle adjusted to a concentration of 5 x 10⁶/mL in RPMI-
119 1640 complete media. The non-adherent cells were harvested, and the bottle was gently washed
120 twice with 10 mL of PBS to obtain the remaining non-adherent cells. The obtained cells were
121 rinsed twice for 10 min at 300 g with RPMI-1640 and resuspended in RPMI-1640 complete
122 media. The cells were counted using trypan blue exclusion to evaluate viability, and the live cells
123 routinely represented more than 80% of the non-adherent cells. The LN-Cs were obtained from
124 the mediastinal lymph node as described for the L-Cs, excluding the Ficoll-Hypaque density
125 gradient step.

126 **Antibodies and flow cytometry analysis**

127 For the FACS staining, 5 x 10⁵ cells were dispensed in each tube in 200 µL of PBS with 0.1%
128 FBS for blocking; this buffer was also employed in each rinse, which is a valid protocol
129 employed in previous studies (Kaddoum et al., 2010; Landrigan et al., 2011). A quadruple or
130 quintuple staining was performed as described below. In the first step, one of the following
131 antibodies was added at previously established dilutions: anti-CD11R3 (recognizes the alpha
132 chain of a porcine beta 2 integrin, clone 2F4/11); anti-CD16 (FcγIII receptor, clone G7)
133 AbDSerotec (Oxford, UK); anti-CD1a (a presentation molecule for non-protein antigens, clone
134 76-7-4; VMRD, NC, USA); or anti-CD206 (mannose receptor, clone 122D2.08; Dendritics,
135 Lyon, France). All of the antibodies were incubated at 4° C for 30 min and rinsed twice with 2
136 mL of PBS/FBS 0.1% for 10 min at 300 g. In the second step, a goat anti-mouse IgG (H+L)
137 labeled with Alexa Fluor® 488 (A11001; Invitrogen, CA, USA) was added, incubated at 4° C for
138 30 min and rinsed twice as previously described. Next, the cells were incubated with anti-MHC-

139 II (a presentation molecule for protein antigens, clone H42A; VMRD) conjugated with R-PE
140 Cy7 (LNK112PECY7; AbDSerotec) and anti-CD172a (signal regulatory protein alpha, clone 74-
141 22-15; VMRD) conjugated with R-PE (LNK022RPE; AbDSerotec). In addition, the tubes were
142 incubated with anti-CD163 (haptoglobin-hemoglobin complex receptor, clone 2A100/11;
143 AbDSerotec) conjugated with Zenon® Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1 (Z25008; Molecular
144 Probes®, Invitrogen, CA, USA). The cross-reactivity of the antibody receptor anti-
145 CD206/mannose with swine has been previously demonstrated (Marquet et al., 2011). Finally,
146 the cells were resuspended in 200 µL of PBS/FBS 0.1%.

147 In the first three experiments, the dead cells were excluded with Fixable Viability Dye eFluor®
148 450 (65-0863; eBioscience, CA, USA), and the percentage of dead cells was ~30%; however, a
149 high proportion of the dead cells were from outside the FSC/SSC gate (> 90%), and therefore we
150 analyzed the data without the dead exclusion step and compared both results. We noted no
151 differences in the analyses; therefore, we decided to omit the dead exclusion step in the next
152 experiments. Isotype controls for mice were employed: IgG1 (clone P3) conjugated with R-PE
153 (LNK022RPE); IgG2a (clone eBM2a) conjugated with Zenon® Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2a
154 (Z25102; Molecular Probes®); and IgG2b (clone eBMG2b) conjugated with Zenon® Alexa
155 Fluor® 488 Mouse IgG2b (Z25202, Molecular Probes®). All of the isotype controls were from
156 eBioscience. Isotype controls were prepared by combining all of the individual conjugated
157 isotype control antibodies, and their reactivity was proved in the three populations of cells.
158 Additionally, fluorescence minus one (FMO) controls were employed in each experiment and for
159 each type of cell. The FMO controls were composed of the anti-MHC-II^{RPE Cy7} antibody to define
160 the gate for the subpopulations, and the other control was composed of anti-MHC-II^{RPE Cy7} and
161 anti-CD172a^{RPE} to define the gate for the expression levels and percentages in the histograms by

162 subpopulations. For evaluating contamination with macrophages and T and B lymphocytes, the
163 antibodies anti-CD14 (LPS receptor, clone MIL2) from AbDSerotec (Oxford, UK) and anti-CD3
164 (T cell antigen receptor complex epsilon subunit, clone PPT3) and anti-CD79 α (B cell antigen
165 receptor complex associated protein alpha chain, clone HM57) from Abcam (MA, USA) were
166 used. The cross reactivity of the clone HM57 with swine was previously shown (Jones et al.,
167 1993), and because this antibody recognizes an intracellular epitope, the staining was performed
168 using the BD Cytotfix/CytopermTM Kit (554714; BD Biosciences Pharmigen, CA, USA)
169 following the manufacturer's instruction. The analysis was performed using a BD FACSCanto II
170 flow cytometer and FACSDiva software (BD/Pharmigen, CA, USA). We collected 30,000
171 events in the FSC/SSC gate from each tube of all the cell types. The overlay figures were created
172 using the method described by Weber and Fehse (2009) (Weber and Fehse, 2009). The laser and
173 detectors configuration of the BD FACSCanto II flow cytometer allowed for the use of these
174 fluorochromes in combination (Dwivedi et al.). Moreover, we used adequate compensation
175 controls for each experiment performed.

176 **MHC-II⁺ cell enrichment by MACS**

177 In some experiments, L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs were MHC-II⁺ enriched by MACS. The MHC-
178 II marker was selected for enrichment because MHC-II is expressed in only APCs, whereas
179 CD11R3 is expressed in MHC-II⁻ polymorphonuclear cells (Bimczok et al., 2005; Dominguez et
180 al., 2001). For the enrichment, the cells were first incubated with mouse anti-MHC-II at 4° C for
181 30 min and washed twice with 2 mL of PBS/FBS 2%. Then, anti-mouse IgG antibodies coupled
182 to magnetic beads (Miltenyi Biotec, CA, USA) were incubated with the cells at 4° C for 15 min,
183 and the cells were washed twice. Finally, the positive fraction was selected using an LS column
184 according to the manufacturer's recommendations. The obtained cells were counted and adjusted

185 to a concentration of 1×10^6 cells/mL in RPMI-1640 complete media. The cell purity was
186 analyzed using flow cytometry (BD FACSCanto II), and the MHC-II⁺ cells routinely represented
187 50-80% of the total population. The MACS-enriched MHC-II⁺ populations were used in the
188 functionality assays.

189 **Peripheral blood lymphocytes (PBLs)**

190 Peripheral blood from the pigs was collected into heparin-coated collection tubes (Becton-
191 Dickinson, BD). The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained with a Ficoll-
192 Hypaque (GE Healthcare Life Sciences) gradient, following the manufacturer's instructions. The
193 PBMCs were washed three times in RPMI-1640 with antibiotics and were resuspended in
194 complete media. The cells were cultured in a 6-well plate at a concentration of 1×10^7 cells/mL
195 and incubated at 37° C in 5% CO₂ for 4 h. Following the incubation, the non-adherent PBLs
196 were collected, washed, resuspended in RPMI-1640 and adjusted to a concentration of 1×10^7
197 cells/mL.

198 **Mixed leukocyte reaction**

199 For the MLR assay, 3 mL of PBLs (3×10^7 cells) were labeled with carboxyfluorescein
200 succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at a final concentration of 1
201 μ M. Then, 5×10^5 CFSE-labeled PBLs were plated per well in a 96-well tissue culture plate
202 (Costar, MA, USA). The cells were co-cultured in duplicate with MHC-II⁺ MACS-enriched L-
203 Cs, LN-Cs and BAL-Cs at different ratios (1:5, 1:10, 1:50 and 1:100) and incubated for 72 h.
204 Non-stimulated CFSE-labeled PBLs and unlabeled PBLs were used as the controls, and the cells
205 with fluorescence between these two controls were considered positive for proliferation. Cell
206 proliferation was evaluated using flow cytometry using a BD FACSCanto II flow cytometer and
207 analyzed with FACSDiva software (BD/Pharmingen). A histogram based on the fluorescence

208 intensity of unstimulated CFSE-labeled PBLs and unstained PBLs was used to differentiate the
209 proliferating cells that were induced by the APCs.

210 **Antigen uptake**

211 For assessing the uptake of latex beads or dextran, 1×10^6 MHC-II⁺-enriched APCs/mL were
212 incubated for 1 h at 4° or 37° C with carboxylate-modified polystyrene fluorescent orange latex
213 beads (mean diameter of 0.5 μ m; L5530; Sigma-Aldrich) at a final concentration of 3.7×10^8
214 beads/mL in 500 μ L of RPMI-1640 or fluorescein isothiocyanate-dextran (0.5 μ m size; FD70;
215 Sigma-Aldrich) at a final concentration of 400 μ g/mL in 500 μ L of RPMI-1640. Then, the cells
216 were harvested, rinsed twice with cold PBS with 0.1% FBS and stained with anti-MHC-II to
217 analyze uptake capacity in the MHC-II^{high} cells. The endocytic and phagocytic abilities were
218 analyzed using flow cytometry and assessed for non-specific uptake. The percentages of positive
219 cells incubated at 4° C were subtracted from the percentages of positive cells incubated at 37° C
220 (Loving et al., 2007).

221 **Lysozyme production**

222 The lysozyme production was evaluated in the L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs stimulated with
223 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) or latex beads (F750; Sigma-Aldrich). The *P.*
224 *aeruginosa* was kindly provided by Dr. Fernando Ayala (Centro de Investigación en
225 Alimentación y Desarrollo, A.C.). The bacteria were originally cultured on Luria Bertani (LB)
226 agar plates and incubated at 37° C for 24 h. Overnight broth cultures were obtained by
227 inoculating a single colony into LB broth and incubating it at 37° C for 24 h. Then, the bacteria
228 were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC, F-1628; Sigma-Aldrich) following the
229 manufacturer's instructions. Next, 5×10^5 MHC-II⁺ MACS-enriched L-Cs, LN-Cs or BAL-Cs
230 were plated per well in a 48-well tissue culture plate (Costar, MA, USA) and stimulated with

231 carboxylate-modified polystyrene fluorescent orange latex beads (L5530; Sigma-Aldrich) at a
232 final concentration of 3.7×10^8 beads/mL or FITC-*Pseudomonas aeruginosa* (CFU 10) in 500
233 μ L of RPMI-1640. The cells were incubated for 0, 4, 24 and 48 h; thereafter, the lysozyme levels
234 were assessed with an anti-lysozyme antibody (PA5-16668; Thermo Scientific Pierce
235 Antibodies, IL, USA) and stained with R-PE (LNK022RPE) in cells permeabilized with the BD
236 Cytotfix/Cytoperm™ Kit (554714; BD Biosciences Pharmigen) following the manufacturer's
237 instructions. Lysozyme production was evaluated using flow cytometry using a BD FACSCanto
238 II flow cytometer and analyzed with FACSDiva software (BD/Pharmigen).

239 **Statistical analysis**

240 The statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA).
241 Differences among the receptor expression levels and APC subpopulations were determined
242 using the Bonferroni multiple comparison test, and for the functionality analyses, Tukey's test
243 was applied. All statistical values were calculated using PRISM 5.02 software (GraphPad, San
244 Diego, CA, USA). The alpha level was set at 0.05.

245 **Results**

246 **Phenotypic characterization of lung antigen-presenting cells**

247 First, L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs were analyzed based on forward scatter (FSC) and side scatter
248 (SSC) profiles, and a gate was set on the largest cells (FSC/SSC gate). In this gate, the
249 expression of T cells, B cells, and MØs was evaluated based on the expression of CD3, CD79 α
250 and CD14, respectively (Fig. 1). It was observed that the percentage of MHC-II⁺CD14⁺ cells was
251 low in L-Cs and LN-Cs ($\leq 5.7\%$); as expected, the highest percentage of MHC-II⁺CD14⁺ cells
252 was detected in BAL-Cs. The percentage of MHC-II⁺CD3⁺ cells was low in the three populations
253 ($\leq 1.8\%$). The evaluation of MHC-II⁺CD79 α ⁺ cells was assessed in permeabilized cells, and a

254 low amount was reported in the three populations ($\leq 1.7\%$). These results suggest that the cells
255 obtained from the lungs and lymph nodes have a low percentage of T cells, B cells and MØs.
256 Then, to characterize the phenotype of the APC populations, the cells in the FSC/SSC gate were
257 further analyzed based on MHC-II and CD172a expression (Fig. 2) to select cells that were
258 MHC-II^{high}CD172a⁺; L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs were selected. In MHC-II^{high}CD172a cells
259 (referred to as APCs), the individual expression of CD163, CD1a, CD206, CD11R3 and CD16
260 was evaluated. Figure 3 shows a representative experiment, and significant differences are shown
261 in Figure 4 (median \pm SEM). Significant differences in the expression of CD163, CD1a and
262 CD206 were observed among APC populations (Fig. 4). L-Cs and BAL-Cs showed the highest
263 percentage of CD163⁺ cells compared with LN-Cs ($p < 0.001$). The percentage of CD1a⁺ cells
264 was low in L-Cs and BAL-Cs; in contrast, LN-Cs had the highest percentage of CD1a⁺ cells
265 (Fig. 3 and Fig. 4) ($p < 0.001$). The percentage of CD206⁺ cells was high and similarly
266 distributed in LN-C and BAL-C populations. In contrast, L-Cs expressed the lowest number of
267 CD206⁺ cells ($p < 0.01$; Fig. 3 and Fig. 4). CD11R3⁺ and CD16⁺ cells were at moderate to high
268 levels without significant differences among the three APC types. According to these results,
269 APCs from the porcine respiratory system are as follows: L-Cs were MHC-
270 II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻; LN-Cs were MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}
271 CD206⁺; and BAL-Cs were MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻CD163^{high}CD206^{+/-}.

272 **Mixed leukocyte reaction by porcine APC populations**

273 Next we performed an MLR assay using MHC-II⁺-enriched L-C, LN-C and BAL-C cells co-
274 cultured at different ratios with PLBs labeled with CFSE. As shown in Figure 5, the proliferation
275 of the allogeneic PBLs was dependent on the cell ratio. A higher response occurred in the cells
276 that were co-cultured at ratios of 1:5 (APC:PBLs). The LN-Cs induced a major proliferation of

277 the allogeneic PBLs that was three-fold and five-fold times higher than that of the L-Cs and
278 BAL-Cs, respectively ($p < 0.001$). The proliferation induced by L-Cs was also significantly
279 higher than that induced by BAL-Cs. BAL-Cs induced minimal proliferation of PBLs. These
280 results suggest that LN-Cs and L-Cs contain cells specialized in antigen presentation in contrast
281 to BAL-Cs.

282

283 **Uptake ability of APC populations**

284 We next evaluated the capabilities of dextran or latex uptake in the MHC-II⁺-enriched L-Cs, LN-
285 Cs and BAL-Cs. The cells were incubated with latex or dextran particles for 1 h at 4° or 37° C
286 and stained with anti-MHC-II to analyze the uptake capacities of the MHC-II^{high} cells. The
287 results represent the percentage of internalization at 37° C after subtracting the percentage of
288 internalization at 4° C. We observed low dextran internalization (< 16%) in the three populations
289 of APCs (Fig. 6A). In contrast, the BAL-Cs had the highest internalization of latex beads ($p <$
290 0.05 ; Fig. 6B) compared with L-Cs and LN-Cs. These data demonstrate that L-Cs and LN-Cs
291 have low phagocytic abilities.

292 **Lysozyme production**

293 Finally, we evaluated lysozyme expression after phagocytosis of latex beads or *P. aeruginosa* in
294 MHC-II⁺-enriched populations of L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs. In the APCs treated with latex, the
295 highest lysozyme expression was observed in the BAL-Cs at 1, 4, 24 and 48 h of culture ($p <$
296 0.001), followed by the L-Cs and finally the LN-Cs (Fig. 7A). In the APCs cultured with *P.*
297 *aeruginosa*, an increase in lysozyme expression was observed in the BAL-Cs at 1 and 24 h ($p <$
298 0.05). L-Cs and LN-Cs showed similar lysozyme expression with < 40% positive cells (Fig. 7B).

299 In agreement with latex uptake, these results suggest that BAL-Cs contain cells specialized in
300 phagocytosis and that LN-C has a lower number of cells with phagocytic capabilities.

301 **Discussion**

302 In this work we characterized APCs from the porcine respiratory system. To identify APCs from
303 L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs, we selected cells expressing MHC-II^{high} and CD172. MHC-II^{high} was
304 selected because this is one of the most important characteristics of APCs, and CD172a was
305 selected because it is expressed in all cells of myeloid origin, such as DCs and macrophages.
306 With this analysis, we eliminated B cells from our APCs; in agreement with this, the percentage
307 of MHC-II⁺ and CD179a⁺ was <2% of L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs. The use of MHC-II^{high} in
308 combination with CD172a is a good strategy to evaluate APCs, but it is important to remark that
309 this strategy does not discriminate clearly between DCs and MØs. Therefore; we used additional
310 markers such as CD1a, CD11R3, CD16, CD163, and CD206 to gain more information about the
311 phenotypical characteristics of the APCs. It has been reported that CD1a mediates presentation
312 of non-protein antigens to T cells and is expressed in swine DCs (Agnés Jamin, 2006), especially
313 in skin DCs (Bautista et al., 2002). However, a fraction of B cells and some macrophages are
314 also CD1a positive (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008). CD163 expression is limited to
315 monocytes and macrophages, and lung macrophages express high levels of CD163 (Ezquerria et
316 al., 2009). Recently, CD163 was used in combination with CD172 to characterize subpopulations
317 of skin DCs (Marquet et al., 2011), but some disagreements have been reported because one
318 subpopulation expressed MHC-II^{high}CD172a⁺CD163⁺ as well as CD206 and CD209. For some
319 authors, the above population could represent DCs from monocytic origin or are simply
320 macrophages (Mair et al., 2014). However, it is generally accepted that CD163 is regulated in
321 monocytes and that when monocytes differentiate into DCs, CD163 expression is decreased

322 (Belén Alvarez and Angel Ezquerra, 2014). CD206 is a mannose receptor and is expressed in
323 macrophages and, to a lesser extent, in DCs. The expression of the CD11R1 receptor has been
324 used in swine as marker for DC subset classification (Bimczok et al., 2005). However, other cell
325 types, such as monocytes, macrophages and neutrophils, also express this marker (Dominguez et
326 al., 2001), and it has therefore been recommended to not use CD11R1 as a DC marker (Mair et
327 al., 2014). In this study, the MHC-II^{high}CD172a⁺ cells in L-Cs and LN-Cs were characterized by
328 higher expression of MHC-II than that of BAL-Cs, which could suggest some functional
329 differences. CD1a on MHC-II^{high}CD172a⁺ cells was differentially expressed in LN-Cs compared
330 with L-Cs and BAL-Cs. CD163 on MHC-II^{high}CD172a⁺ cells was differentially expressed in L-
331 Cs and BAL-Cs compared with L-Cs; however, CD163 on MHC-II^{high}CD172a⁺ cells was
332 differentially expressed in LN-Cs compared with L-Cs and BAL-Cs. CD11R3 and CD16 were
333 not differentially expressed among the APCs analyzed and were not used as markers to
334 characterize APCs. According to our results, the phenotype of L-Cs was MHC-
335 II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻; in LN-Cs, MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺;
336 and in BAL-Cs, MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻CD163^{high}CD206^{+/-}. The phenotype of L-Cs can be
337 compared with the MHC-II^{high}CD172⁺CD163^{low}CD206⁻ subset described in dermal DCs
338 (Marquet et al., 2011), and LN-Cs can be compared with the MHC-
339 II^{high}CD172⁺CD163^{low}CD206⁺ subset of DCs in lymph (Marquet et al., 2011). However, it is not
340 currently possible to clearly discriminate between DCs and macrophages (Mair et al., 2014),
341 especially in the case of L-Cs, where most of the cells are CD163 positive. As previously
342 described, CD163 is highly expressed in macrophages, and lower expression is observed in DCs.
343 The identification of new receptors will help clearly differentiate DCs from macrophages. For
344 now, we can conclude only that phenotypically, L-Cs and LN-Cs represent APCs.

345 To provide more support to our data, some functional characteristics of the APCs were
346 evaluated. The MLR analysis showed that LN-Cs and L-Cs induced higher proliferation of PBLs
347 in comparison with BAL-Cs, suggesting that LN-Cs and L-Cs contain cells with functional
348 characteristics of specialized APCs. These data are in concordance with the results obtained from
349 the phenotypic analysis, where we concluded that L-Cs and LN-Cs are phenotypically APCs.
350 These results are also consistent with the data from CD11c⁺ L-DCs reported by Loving et al.
351 (2007). The authors showed that these cells induce more T cell proliferation than monocyte-
352 derived DCs and monocyte-derived MØs. Additionally, other studies have shown that L-DCs
353 from humans, sheep and swine have a high MLR capacity (Basta et al., 2000; Cochand et al.,
354 1999; Fach et al., 2006; Nicod et al., 1987; Weissler et al., 1986). However, it is important to
355 remark that MLR is just an indicator of APC activity, and the obtained information is limited due
356 to the unspecific response induced by L-Cs and LN-Cs. In further studies, an experiment using
357 lymphocytes from pigs stimulated with homologous L-Cs or LN-Cs pulsed with antigen could
358 demonstrate an antigen-specific lymphoproliferation. Additionally, another characteristic of
359 APCs is antigen capturing. Our results showed that L-Cs and LN-Cs possessed low latex uptake
360 activity compared to BAL-Cs, which were more efficient. A similar scenario was observed when
361 lysozyme was evaluated. A high expression of lysozyme was observed in BAL-Cs, in contrast to
362 L-Cs or LN-Cs. According to Siamon Gordon in Geissmann et al. (2010a) (Gordon et al., 1974),
363 this is a valuable tool for the identification of MØs. Taken together, the functional analyses
364 support the hypothesis that L-Cs and LN-Cs are composed mainly of cells with characteristics of
365 specialized APCs. In contrast, BAL-Cs are cells composed mainly of alveolar macrophages with
366 minimal characteristics of APCs.

367 In conclusion, our data demonstrate that L-Cs can be phenotypically differentiated by the
368 expression of MHC-II^{high}CD172⁺CD1a^{low/-}CD163^{low}CD206⁻ and LN-Cs by MHC-
369 II^{high}CD172⁺CD1a⁺CD163^{low/-}CD206⁺. These phenotypes resemble APCs. This was in contrast
370 to BAL-Cs, which were MHC-II^{high}CD172⁺CD1a⁻CD163^{high}CD206^{+/-}, confirming the phenotype
371 of alveolar macrophages. Functionally, LN-Cs and L-C resemble specialized APCs, and BAL-Cs
372 resemble macrophages. Further studies are necessary to evaluate the role of L-C and LN-C
373 populations in the immune response and the immunopathology of respiratory diseases affecting
374 pigs. The use of new markers or genomic or proteomic analyses will help better discriminate
375 between DCs and macrophages.

376

377

378 **Conflict of interest**

379 The authors declare that there is no conflict of interest.

380

381 **Acknowledgements**

382 We thank QB. Mónica Reséndiz and Dr. Maricela Montalvo-Corral for their valuable technical
383 assistance and Dr. Fernando Ayala for providing the *Pseudomonas aeruginosa*. Guadalupe
384 López-Robles received scholarships from CONACYT.

385

386 **Financial disclosure**

387 This study was supported by the C0008-2011-01 ANR Francia-CONACYT (Convocatoria
388 Conjunta de Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación Bilaterales
389 México-Francia) grant No. 160315.

390

391 **Author contribution**

392 Conceived and designed the experiments: GLP JH. Performed the experiments: GLR. Analyzed
393 the data: GLR ABE ESC JH. Contributed reagents/materials/analysis tools: GLR JHL. Wrote the
394 paper: GLR JH

395

396 **Competing interests**

397 Authors declare that no competing interest exist

398

399

400 **References**

- 401 Agnés Jamin, S.G., Marie-Frédérique Le Potier, Gaelle Kuntz-Simon, 2006. Characterization of
402 conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood.
403 *Veterinary immunology and immunopathology* 114, 224–237.
- 404 Basta, S., Carrasco, C.P., Knoetig, S.M., Rigden, R.C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2000.
405 Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes.
406 *Veterinary immunology and immunopathology* 77, 177-190.
- 407 Bautista, E.M., Gregg, D., Golde, W.T., 2002. Characterization and functional analysis of skin-derived
408 dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. *Veterinary immunology and*
409 *immunopathology* 88, 131-148.
- 410 Belén Alvarez, P.M., María Yuste, Teresa Poderoso, Fernando Alonso, Javier Domínguez,, Angel Ezquerra,
411 C.R., 2014. Phenotypic and functional heterogeneity of CD169+ and CD163+
412 macrophages from porcine lymph nodes and spleen. *Developmental and comparative immunology* 22.
413 Bimczok, D., Sowa, E.N., Faber-Zuschratter, H., Pabst, R., Rothkotter, H.J., 2005. Site-specific expression
414 of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut
415 immune system. *European journal of immunology* 35, 1418-1427.

416 Bullido, R., Alonso, F., Gomez del Moral, M., Ezquerra, A., Alvarez, B., Ortuno, Dominguez, J., 1996.
417 Monoclonal antibody 2F4/11 recognizes the alpha chain of a porcine beta 2 integrin involved in
418 adhesion and complement mediated phagocytosis. *Journal of immunological methods* 195, 125-134.
419 Calder, C.J., Liversidge, J., Dick, A.D., 2004. Murine respiratory tract dendritic cells: isolation,
420 phenotyping and functional studies. *Journal of immunological methods* 287, 67-77.
421 Chen, X., Jensen, P.E., 2008. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Archivum*
422 *immunologiae et therapiae experimentalis* 56, 77-83.
423 Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., Nicod, L.P., 1999. Human lung dendritic cells have an immature
424 phenotype with efficient mannose receptors. *American journal of respiratory cell and molecular biology*
425 21, 547-554.
426 Demedts, I.K., Brusselle, G.G., Vermaelen, K.Y., Pauwels, R.A., 2005. Identification and characterization
427 of human pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 177-
428 184.
429 Dominguez, J., Alvarez, B., Alonso, F., Thacker, E., Haverson, K., McCullough, K., Summerfield, A.,
430 Ezquerra, A., 2001. Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11
431 specificity. *Veterinary immunology and immunopathology* 80, 111-119.
432 Dwivedi, V., Manickam, C., Patterson, R., Dodson, K., Murtaugh, M., Torrelles, J.B., Schlesinger, L.S.,
433 Renukaradhya, G.J., Cross-protective immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus
434 by intranasal delivery of a live virus vaccine with a potent adjuvant. *Vaccine*.
435 Ezquerra, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., Dominguez, J., 2009. Porcine myelomonocytic
436 markers and cell populations. *Developmental and comparative immunology* 33, 284-298.
437 Fach, S.J., Brockmeier, S.L., Hobbs, L.A., Lehmkuhl, H.D., Sacco, R.E., 2006. Pulmonary dendritic cells
438 isolated from neonatal and adult ovine lung tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 112,
439 171-182.
440 Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., Randolph, G.J., 2010. Unravelling mononuclear
441 phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 10, 453-460.
442 Gordon, S., Todd, J., Cohn, Z.A., 1974. In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear
443 phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 139, 1228-1248.
444 Hamilos, D.L., 1989. Antigen presenting cells. *Immunologic Research* 8, 98-117.
445 Jones, M., Cordell, J.L., Beyers, A.D., Tse, A.G., Mason, D.Y., 1993. Detection of T and B cells in many
446 animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J Immunol* 150, 5429-5435.
447 Kaddoum, L., Magdeleine, E., Waldo, G.S., Joly, E., Cabantous, S., 2010. One-step split GFP staining for
448 sensitive protein detection and localization in mammalian cells. *Biotechniques* 49, 727-728, 730, 732
449 *passim*.
450 Kirby, A.C., Coles, M.C., Kaye, P.M., 2009. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining
451 lymph nodes. *J Immunol* 183, 1983-1989.
452 Landrigan, A., Wong, M.T., Utz, P.J., 2011. CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides directly costimulate
453 mouse and human CD4+ T cells through a TLR9- and MyD88-independent mechanism. *J Immunol* 187,
454 3033-3043.
455 Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility
456 of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229.
457 Mair, K.H., Sedlak, C., Kaser, T., Pasternak, A., Levast, B., Gerner, W., Saalmuller, A., Summerfield, A.,
458 Gerdts, V., Wilson, H.L., Meurens, F., 2014. The porcine innate immune system: an update.
459 *Developmental and comparative immunology* 45, 321-343.
460 Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2011.
461 Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS*
462 *one* 6, e16320.

463 Nicod, L.P., Lipscomb, M.F., Weissler, J.C., Lyons, C.R., Albertson, J., Toews, G.B., 1987. Mononuclear
464 cells in human lung parenchyma. Characterization of a potent accessory cell not obtained by
465 bronchoalveolar lavage. *The American review of respiratory disease* 136, 818-823.
466 NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
467 Ondrackova, P., Nechvatalova, K., Kucerova, Z., Leva, L., Dominguez, J., Faldyna, M., 2010. Porcine
468 mononuclear phagocyte subpopulations in the lung, blood and bone marrow: dynamics during
469 inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary research* 41, 64.
470 Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update.
471 *Veterinary research* 39, 54.
472 Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S.,
473 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of*
474 *experimental medicine* 209, 653-660.
475 Soerensen, C.M., Holmskov, U., Aalbaek, B., Boye, M., Heegaard, P.M., Nielsen, O.L., 2005. Pulmonary
476 infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic
477 cells in bronchial-associated lymphoid tissue. *Immunology* 115, 526-535.
478 Soroosh, P., Doherty, T.A., Duan, W., Mehta, A.K., Choi, H., Adams, Y.F., Mikulski, Z., Khorram, N.,
479 Rosenthal, P., Broide, D.H., Croft, M., 2013. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+
480 regulatory T cells and promote airway tolerance. *The Journal of experimental medicine* 210, 775-788.
481 Steinman, R.M., 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of*
482 *immunology* 9, 271-296.
483 Stumbles, P.A., Thomas, J.A., Pimm, C.L., Lee, P.T., Venaille, T.J., Proksch, S., Holt, P.G., 1998. Resting
484 respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require
485 obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *The Journal of experimental medicine* 188,
486 2019-2031.
487 Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009. The porcine dendritic cell family. *Developmental and*
488 *comparative immunology* 33, 299-309.
489 Weber, K., Fehse, B., 2009. Diva-Fit: A step-by-step manual for generating high-resolution graphs and
490 histogram overlays of flow cytometry data obtained with FACSDiva software. *Cell Ther Transplant*. 1.
491 Weissler, J.C., Lyons, C.R., Lipscomb, M.F., Toews, G.B., 1986. Human pulmonary macrophages.
492 Functional comparison of cells obtained from whole lung and by bronchoalveolar lavage. *The American*
493 *review of respiratory disease* 133, 473-477.

494

495

496

497

498

499

500

501
502
503
504
505
506
507
508
509
510

511 **Figure captions**

512 **Fig. 1. Presence of contaminating cells.** Lung tissue-derived (L-Cs), lymph node-derived (LN-
513 Cs) and bronchoalveolar lavage-derived (BAL-Cs) MHC⁺ enriched cells were gated using FACS
514 analysis (FSC/SSC). The expression of CD3 and CD14 was evaluated in non-permeabilized
515 MHC-II⁺ APCs, and CD79 α was evaluated in permeabilized MHC-II⁺ APCs. These data
516 represent one independent experiment from a total of three experiments with similar results
517 (n=3).

518 **Fig. 2. Determination of APC populations.** The populations of the lung tissue-derived cells (L-
519 Cs), lymph node-derived cells (LN-Cs) and bronchoalveolar lavage cells (BAL-Cs) were
520 analyzed. Cells were gated by MHC-II^{high} *versus* CD172a expression. These data represent one
521 independent experiment from a total of four experiments with similar results (n=4).

522 **Fig. 3. Expression levels of markers of APC populations.** An analysis of receptor expression
523 was performed on the lung tissue-derived cells (L-Cs), lymph node-derived cells (LN-Cs) and

524 bronchoalveolar lavage cells (BAL-Cs). Gray histograms indicate isotype control staining, and
525 white histograms indicate the expression of the evaluated markers. The histograms from each
526 subpopulation are representative of four independent experiments with similar results (n=4).

527 **Fig. 4. Phenotypic characterization of APC populations.** An analysis of receptor expression
528 was performed on the lung tissue-derived cells (L-Cs, black bars), lymph node-derived cells
529 (LN-Cs, gray bars) and bronchoalveolar lavage cells (BAL-Cs, white bars). Statistical
530 significance was assessed using a one-way ANOVA and Tukey's test (** p < 0.01; *** p <
531 0.001). The graphs show the means and SEM from three independent experiments (n=3).

532 **Fig. 5. APCs ability to induce lymphoproliferation in an MLR assay.** The presentation
533 capacity of respiratory antigen-presenting cells in a mixed leukocyte reaction (MLR) was
534 evaluated in MHC-II⁺ cells sorted by MACS at different ratios and in duplicate. The MHC-II⁺
535 cells were pulsed with allogeneic CFSE-stained peripheral blood lymphocytes (PBLs) and were
536 then co-cultured for 3 days. Statistical significance was assessed using Tukey's test (* p < 0.05;
537 ** p < 0.01; *** p < 0.001). The graphs show the means and SEM from three independent
538 experiments (n=3).

539 **Fig. 6. Uptake abilities of L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs.** The MHC-II⁺ enriched cell populations
540 were incubated with dextran or latex for 1 h at 4° or 37° C. The uptake of A) dextran or B) latex
541 was analyzed using flow cytometry. Data are expressed as the percentage difference between
542 cells at 37° and 4° C. Statistical significance was assessed using a one-way ANOVA and
543 Tukey's test (* p < 0.05). The graphs show the means and SEM from three independent
544 experiments (n=3).

545 **Fig. 7. Lysozyme production by L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs.** The L-Cs, LN-Cs and BAL-Cs
546 were cultured with latex beads or *P. aeruginosa* for 0, 1, 24 and 48 hrs at 37° C. The intracellular

547 expression of lysozyme was measured in the MHC⁺-enriched cells. Statistical significance was
548 assessed using a one-way ANOVA and Tukey's test (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Nd
549 = Not determined. The graphs show the means and SEM from three independent experiments
550 (n=3).

551

552

553

554

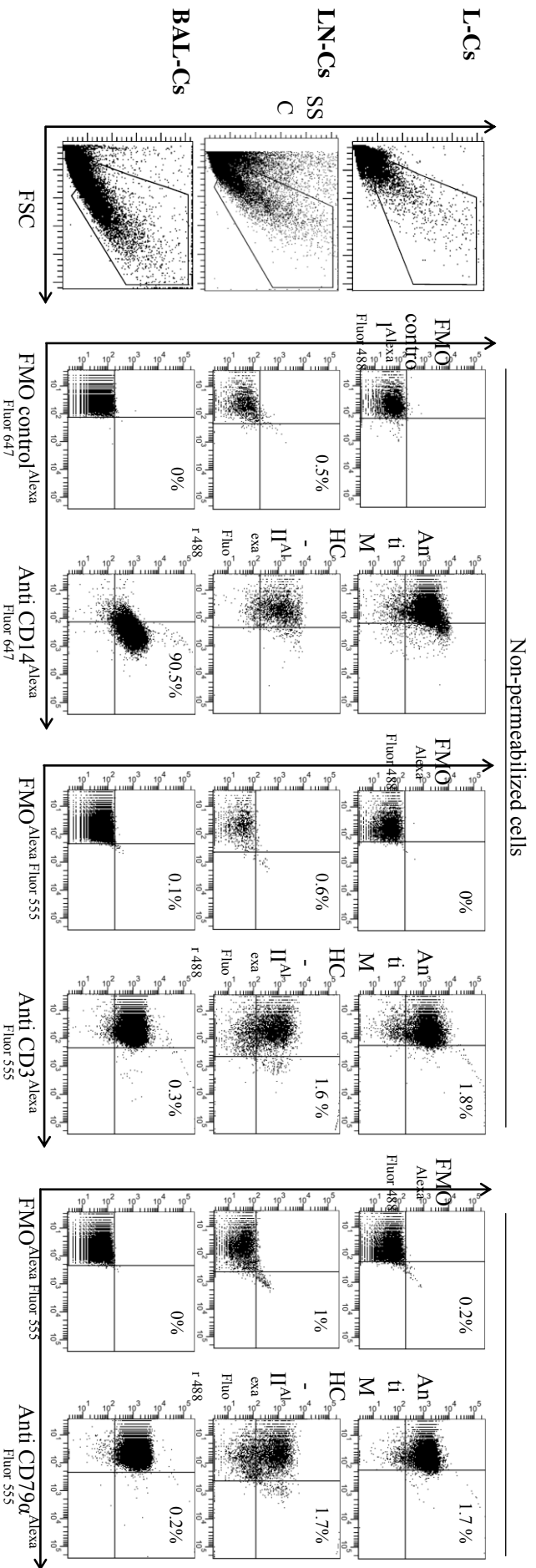
555

556

557

558

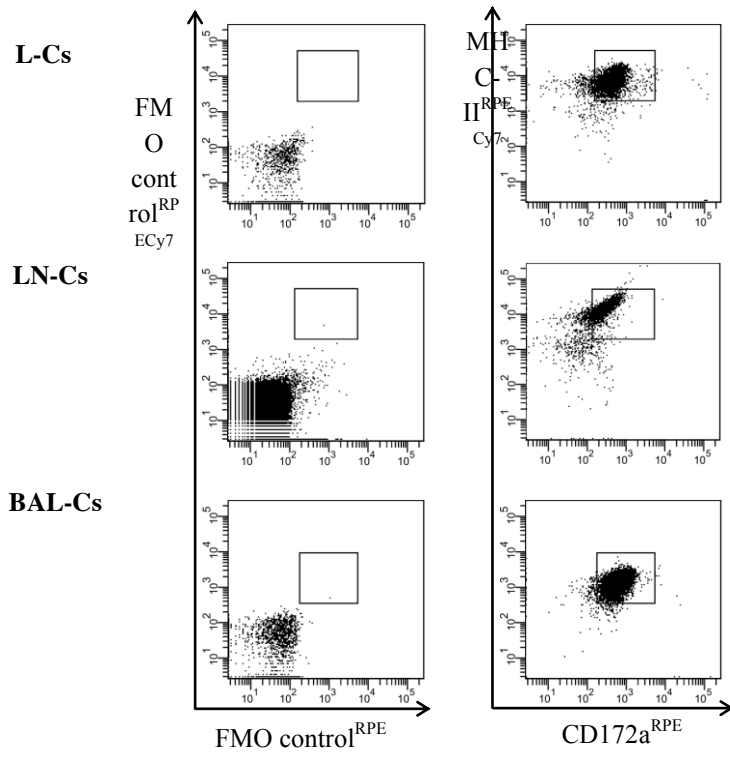
559



560
561 **Figure 1**

562
563
564
565

566



567

568 **Figure 2**

569

570

571

572

573

574

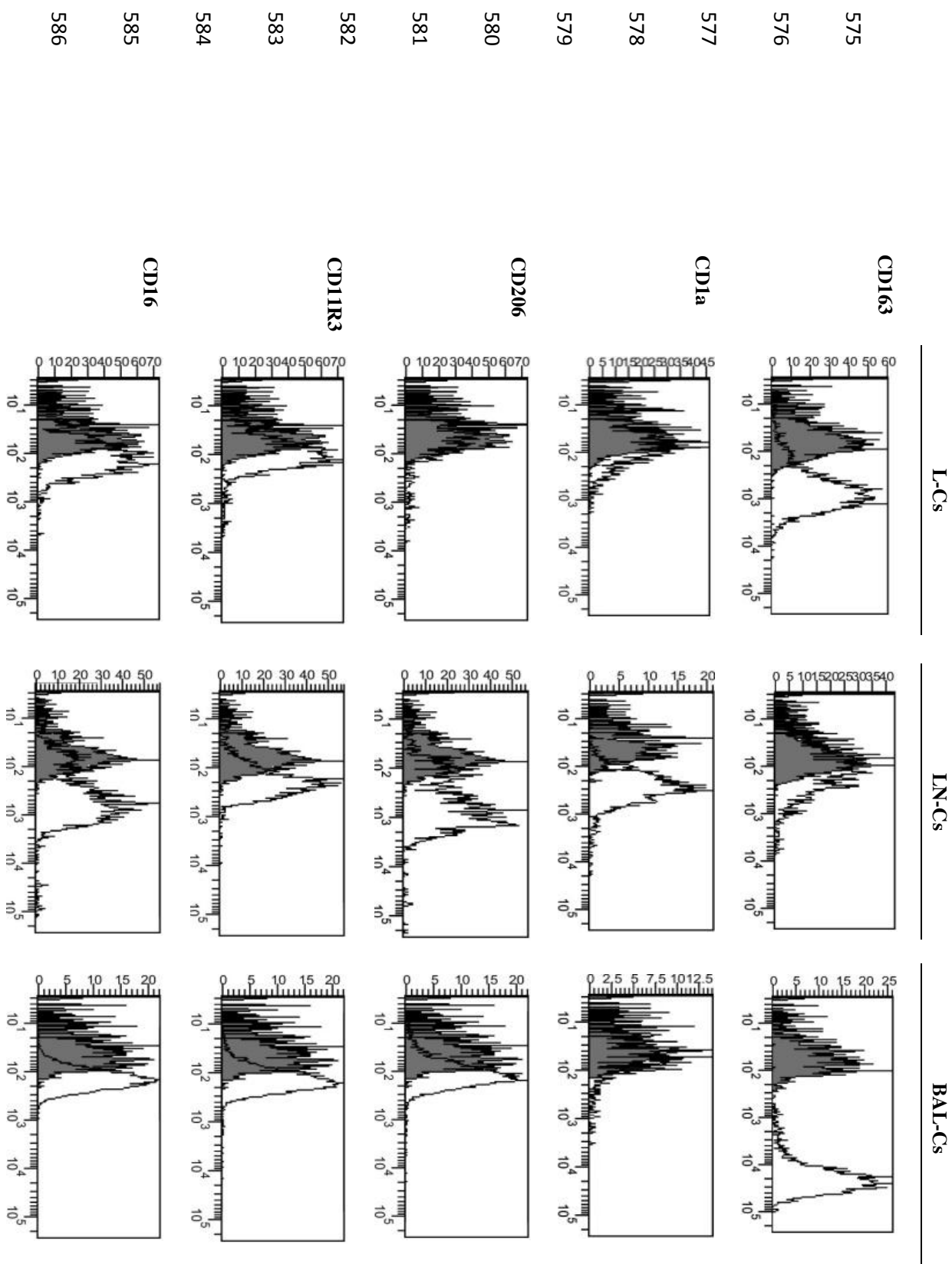
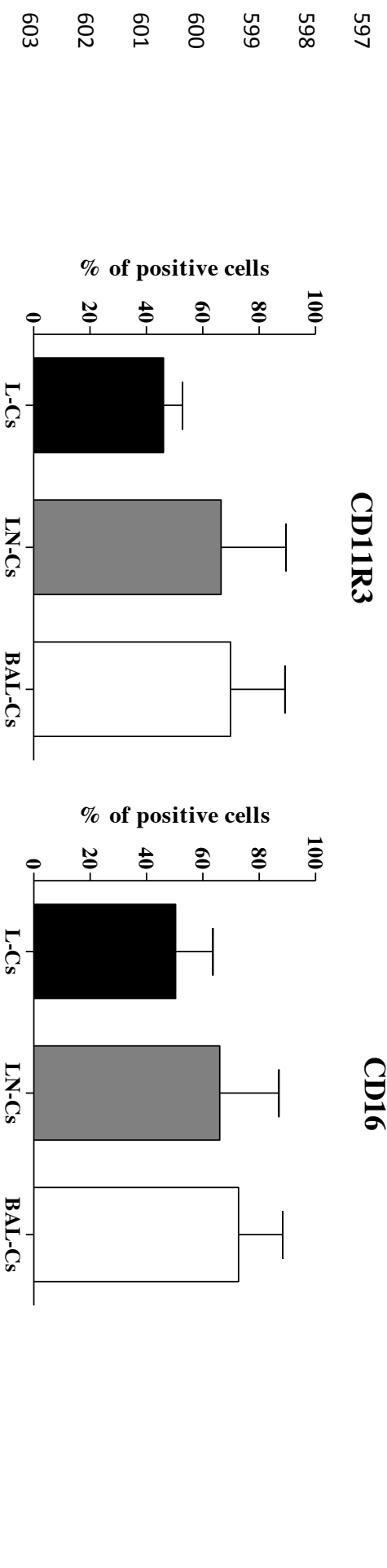
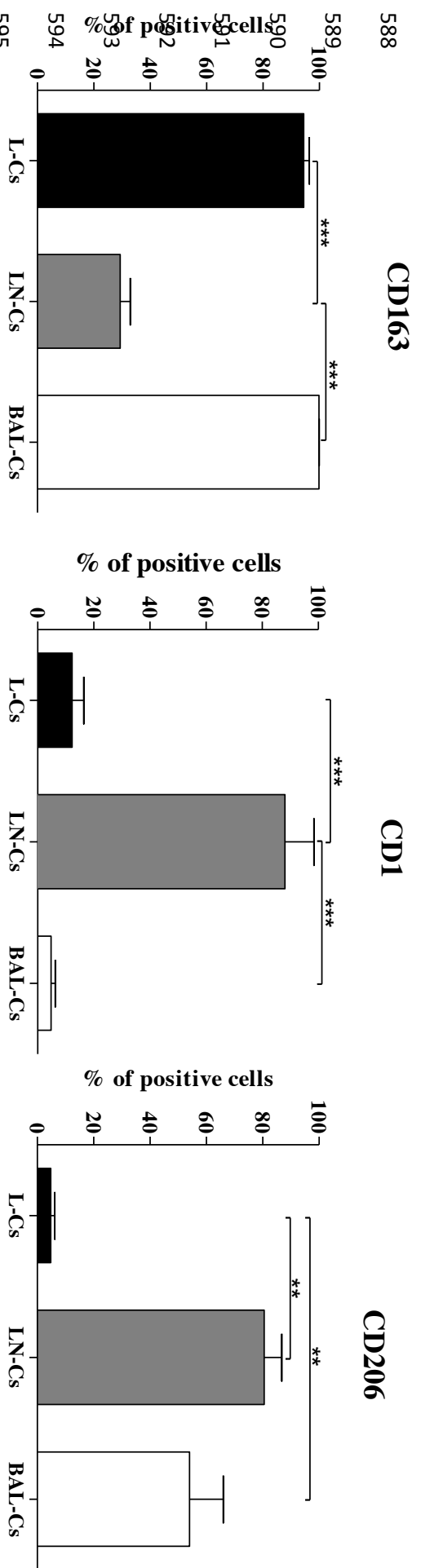
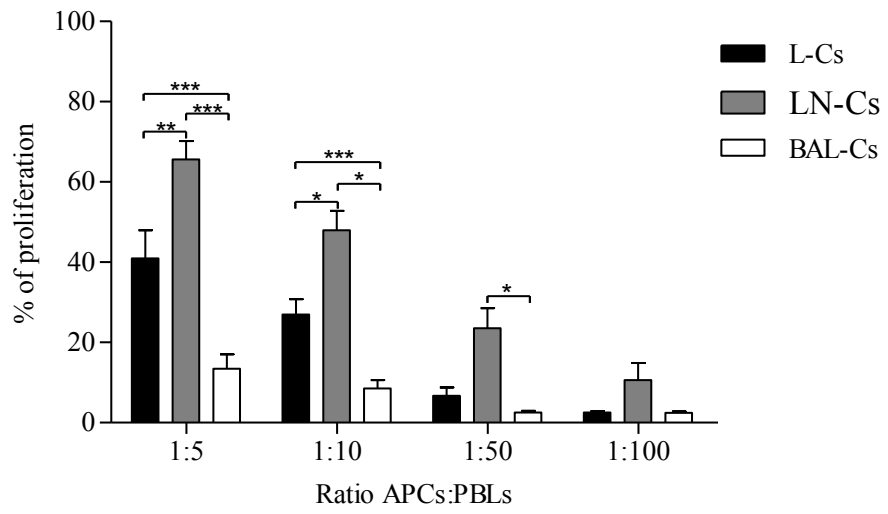


Figure 3



604 **Figure 4**



605

606

607 **Figure 5**

608

609

610

611

612

613

614

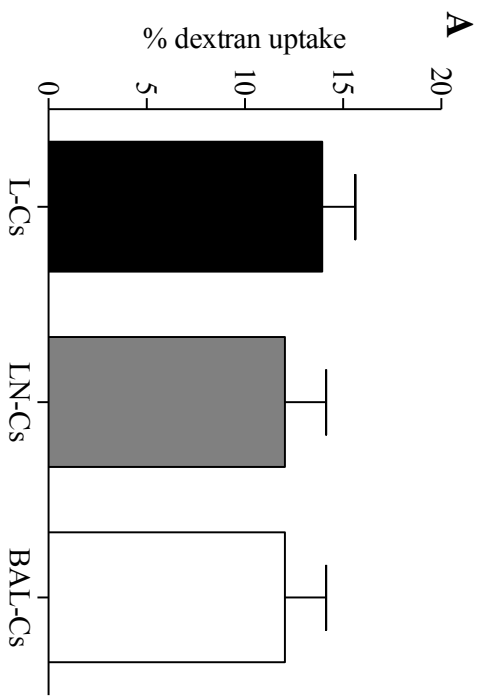
615

616

617

618

619



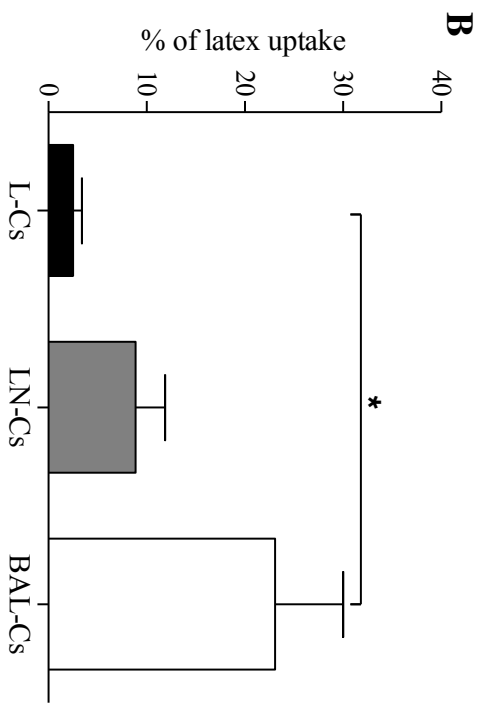
620

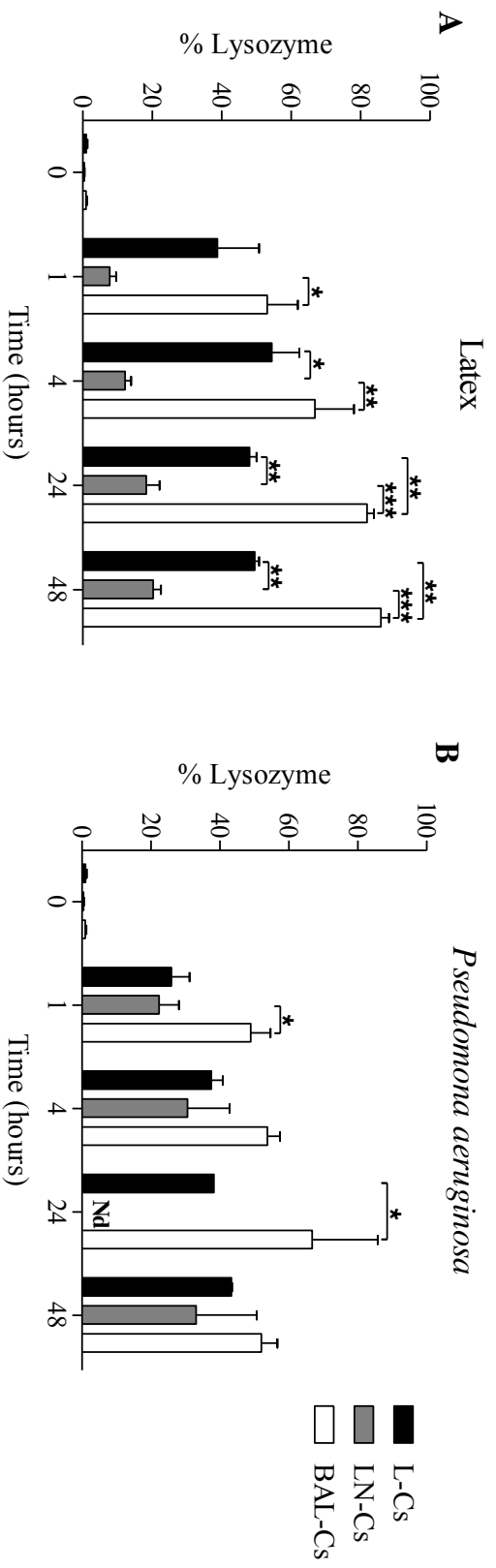
621

622 **Figure 6**

623

624





627 **Figure 7**

625

626

628

629

630

631

632

633

634

635

636 **Table 1. Marker expression on porcine respiratory APCs**

| Populations | CD1a | CD11R3 | CD16 | CD163 | DEC205 | CD206 |
|---------------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| LN-C _s ^A | 8.8 ± 2.7 ^b | 46.1 ± 6.7 | 50.4 ± 13.2 | 94.5 ± 2 ^a | 47.2 ± 9.9 | 4.8 ± 1.4 ^b |
| LN-C _s ^B | 88.1 ± 10.3 ^a | 66.5 ± 23 | 66 ± 21.1 | 29.4 ± 3.6 ^b | 61 ± 13.1 | 80.5 ± 6.3 ^a |
| BAL-C _s ^C | 3.2 ± 0.3 ^b | 69.9 ± 19.3 | 72.7 ± 15.7 | 99.8 ± 0.1 ^a | 69.7 ± 9.4 | 54 ± 12 ^a |

637 ^ALung derived cells638 ^BMediastinal lymph node derived cells639 ^CBronchoalveolar lavage cells

640 The numbers indicate the media percentage and SEM from 4 independent experiments

641 Significant differences of marker expression between subpopulations were determined by one-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test

642 Literals represent differences among receptor expression levels between populations

643

644