

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

**ANÁLISIS DE CÉLULAS T REGULADORAS EN
CERDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DEL
SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO
PORCINO**

POR:

ERIKA SILVA CAMPA

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

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



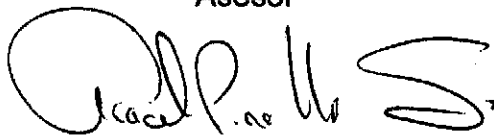
Dr. Jesús Hernández López

Director de Tesis



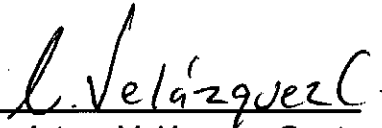
Dra. Verónica Mata Haro

Asesor



Dr. Araceli Pinelli Saavedra

Asesor



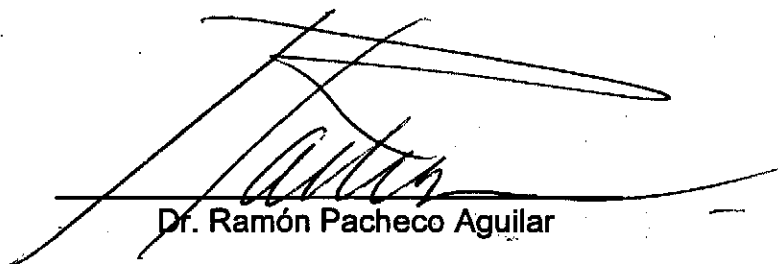
Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Asesor

DECLARACION INSTITUCIONAL

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

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

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

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General del CIAD, A.C.

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo, principalmente al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), así como, al Centre de Reserca en Sanitat Animal (CReSA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado.

Agradezco enormemente al Dr. Jesús Hernández por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por sus enseñanzas y el apoyo que va más allá de lo académico.

A mis asesores la Dra. Verónica Mata Haro, La Dra. Araceli Pinelli y el Dr. Carlos Velázquez, por la guía y el tiempo dedicado al desarrollo y evaluación de este trabajo. Agradezco también a la Dra. María Montoya por la oportunidad que me brindo al aceptarme en su laboratorio.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Verónica Mata porque sus palabras oportunas que influyeron en el desarrollo de esta tesis y por estar presente en cada uno de los experimentos que se realizaron. A mis amigos y compañeros de laboratorio: Jesús, Vero, Maricela, Mónica, Lupita, Alexel, Salvador, José Luis, Karina y Alejandro por su apoyo y sobre todo la paciencia que han tenido durante estos años. Gracias a los nuevos piglets

Erika, Anita, Eli y Carlos que con sus ocurrencias y amistad nos alegran el día.

A mi amiga y compañera de vida Lilian Karem porque sus consejos firmes y su apoyo incondicional que me ayudaron a sobreponerme de las situaciones más difíciles, te quiero mucho y te admiro. A mis gansos-amigos Noé y Frank que me permitieron ser parte de sus vidas e hicieron más llevadero el día a día.

Al equipo de voleibol del ¡¡¡CIAD!!! Alejandra, Mónica, Ana Lilia, Juanita, Laura, Elvira, Dulce, Edna y Tania, gracias muchachas por esas tardes tan divertidas.

Gracias A Dios por permitirme terminar este proyecto de vida.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi FAMILIA: Federico, Amparo, Lizbeth, Adan y Luis Rafael. Gracias por el apoyo que me han dado durante este tiempo, gracias por la paciencia, por la comprensión que me permitió seguir este camino que en ocasiones es difícil de entender, por recordarme que el trabajo no lo es todo. Gracias por su amor.

AGRADECIMIENTOS A LOS SERVICIOS DE APOYO

Por su participación y asistencia técnica en el trabajo de laboratorio: a Q. B. Mónica Reséndiz Sandoval, Q. B. Ana Karina Espinoza Villalba, M.C. Alexel Burgara Estrella, M.C. José Luis Dávila Ramírez y M.C. Salvador Icedo.

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

Asistencia de servicio de cómputo: Karla Gabriela Robles Bernal y Ernesto Labrada.

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

Asistencia en compras: Departamento de compras, Diana, Leticia y Carlos.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto SEP-CONACYT 82850.

CONTENIDO

Resumen	xi
Introducción general	1
Integración del trabajo de investigación	13
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos particulares	17

Capítulo 1

Participación de los linfocitos T reguladores en la respuesta inmune ante patógenos.

Capítulo 2

Inducción de células T reguladoras TH3 por células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo americano.

Capítulo 3

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo europeo infecta células dendríticas derivadas de monocito, pero no induce células T reguladoras.

Capítulo 4

Frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ en sementales infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

Capítulo 5

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino induce la expansión de células T reguladoras con el fenotipo CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Capítulo 6

Frecuencia de linfocitos T reguladores en tejidos linfoides asociados a la replicación y persistencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

Anexos

Capítulos de libro: Inmunología Veterinaria, Editado por José Ángel Gutiérrez Pabello:

Capítulo 7 “Procesamiento y presentación de antígenos”

Capítulo 21 “Vacunación en cerdos”.

RESUMEN

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) establece un estado de persistencia en cerdo debido a su capacidad para modular la respuesta inmune. La respuesta celular de cerdos infectados con PRRSV se caracteriza por un bajo número de células productoras de interferon (IFN)- γ específicas a PRRSV, las cuales se detectan entre los 14 y 28 días post-infección (dpi). En muchos modelos de infección viral, el establecimiento de infecciones persistente o crónicas se asocia con la participación de los linfocitos T reguladores (Treg), los cuales tienen la función de suprimir la respuesta inmune. El objetivo de este trabajo fue determinar si el PRRSV induce la expansión de Treg y con ello identificar un posible mecanismo del virus para evadir la respuesta inmune. En el modelo *in vitro* se evaluó la capacidad de las células dendríticas infectadas con cepas americanas y europeas para inducir la expansión de células CD25⁺Foxp3⁺ (Treg). Los resultados indicaron que las cepas europeas evaluadas no indujeron linfocitos Treg, al contrario de las cepas americanas que sí indujeron Tregs y se caracterizaron por la producción de TGF- β . Lo anterior permitió hipotetizar que la inducción de Treg en cerdos infectados con PRRSV es dependiente de TGF- β .

También se evaluó la presencia de Treg en animales adultos naturalmente expuestos al PRRSV. Se observó un incremento de Treg en animales con cargas virales bajas del virus en suero. Sin embargo no se pudo establecer si existe asociación con la secreción intermitente del virus en semen ya que fue un estudio exploratorio. Para evaluar la participación de las células Treg en el proceso de infección aguda del PRRSV, se infectaron lechones de entre 4 y 6 semanas de edad y se monitoreó la frecuencia de Treg en sangre periférica y tejidos asociados a la replicación de virus (ganglios mediastínicos y amígdalas). Los resultados demostraron que el PRRSV incrementó los Treg en circulación a partir del día 14 pi. Se observó que los Treg se incrementaron en las amígdalas hasta los 8-24 dpi respecto a los no infectados. Se caracterizó que el fenotipo inducido por el PRRSV es T reguladores tipo 1 (Tr1), los cuales producen principalmente interleucina (IL)-10.

Los resultados obtenidos permiten suponer que el retraso en la aparición de la respuesta celular anti-PRRSV es resultado de la inducción de linfocitos Treg, los cuales se presentan en circulación y en tejidos asociados a la replicación del virus. Futuros estudios deberán determinar que proteínas virales son las responsables de la inducción y los antígenos para los que van dirigidos.

INTRODUCCION

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) pertenece al orden de los Nidoviridales, familia Arterividae y género *Arterivirus* (Cavanagh, 1997). Este virus provoca problemas reproductivos en cerdas gestantes, desordenes respiratorios en cerdos jóvenes y ligeros síntomas en sementales (Christopher-Hennings et al., 1995). El PRRSV tiene un diámetro de 50 a 60 nm, es un virus envuelto y su genoma está formado por una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva poliadenilado, tiene una longitud de 15.4 kb con nueve fragmentos de lectura abierta (ORFs) (Meng et al., 1994; Meulenberg et al., 1997). El ORF1a/1b representa el 80% del genoma viral y codifica para la RNA polimerasa y proteínas no estructurales. Los productos de los ORF2 al 5 son glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2a, GP3, GP4 y GP5) y una pequeña proteína no glicosilada (2b); El ORF6 codificada para la proteína intermembranal (M) y el ORF7 una proteína que forma la nucleocapside (N) (Meulenberg et al., 1995; Meulenberg et al., 1997; Wu et al., 2001). El PRRSV presenta tropismo por las células mieloides, donde las células permisivas primarias son los macrófagos, monocitos y células dendríticas (DCs) (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Flores-Mendoza et al., 2008; Loving et al., 2007; Vanderheijden et al., 2003; Wang et al., 2007). Las manifestaciones clínicas de la infección por PRRSV dependen de varios factores, como la edad del animal y su estatus inmunitario y esto es determinante en el curso de la infección. Se puede considerar que los animales jóvenes son los más susceptibles a la infección y éstos excretan el virus por más

tiempo (van der Linden et al., 2003). Por otra parte, en animales adultos la infección suele tener una duración menor. Tal es el caso de verracos infectados quienes cursan con una viremia cortas (hasta 3 semanas) y secreción intermitente en semen. Las cerdas adultas cursan con viremia relativamente cortas de entre 1 y 3 semanas de duración. En los lechones el tiempo de duración varía dependiendo de la edad en la que se infectan, mientras que en cerdos de 4 semanas puede durar 4 semanas o más. Sin embargo, si la infección se produce durante la gestación la viremia es aun más prolongada (Mateu and Diaz 2007).

Tras la infección, el virus del PRRS establece un estado de persistencia, en la cual se observa una replicación viral constante y a bajo nivel (Lopez and Osorio, 2004), eventualmente es eliminado alrededor de los 150 días post-infección (dpi) (Allende et al., 2000). La respuesta celular aparece entre los 14 y 56 dpi y se vuelve más pronunciada meses después (Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004). Esta se caracteriza por bajo número de células productoras de IFN- γ específicas para PRRSV que son detectadas entre los 14 y 28 dpi. Se observa también un incremento gradual en la intensidad de la respuesta con un pico máximo de 70 dpi y la respuesta es dependiente de la cepa (Batista et al., 2004; Diaz et al., 2005, 2006; Meier et al., 2003; Meier et al., 2004). Además, en los animales infectados por PRRSV se observan bajos niveles de linfocitos T citotóxicos PRRSV específicos hasta los 56 dpi (Costers et al., 2009; Mateu and Diaz, 2008). Desafortunadamente, el mecanismo involucrado en la inusual y retardada respuesta inmune se desconoce y aparentemente es multifactorial. Existe fuerte evidencia de que el virus es capaz de modular la respuesta inmune en las

primeras semana post-infección pero los mecanismos exactos se desconocen en su totalidad (Flores-Mendoza et al., 2008; Mateu and Diaz, 2008; Murtaugh et al., 2002).

El establecimiento de infecciones virales persistente o crónicas se asocian con la participación de los linfocitos T reguladores (Treg), suprimiendo la acción efectora de las células CD4⁺ y CD8⁺ quienes tienen una participación primordial en la eliminación de patógenos intracelulares principalmente virus. Algunos ejemplos donde los Treg provocan el establecimiento de infecciones crónicas son el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis B (HBV), Citomegalovirus y virus del Epstein-Barr (Kinter et al., 2004; Peng et al., 2008; Rieger et al., 2006; Smyk-Pearson et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005). Por tanto, la inducción de Treg es una de las estrategias utilizadas por los virus para evadir el sistema inmune. En el capítulo uno se describe con mayor profundidad las características de las células Treg y los procesos de supresión de la respuesta inmune en los que están involucrados.

Debido a la alta persistencia del PRRSV en cerdos, aunado a la baja respuesta inmune celular y tomando en consideración que las Treg están involucradas en el establecimiento de infecciones crónicas y persistentes en otros mamíferos, este trabajo tuvo como objetivo determinar si el PRRSV induce la expansión de Treg y con ello evadir la respuesta inmune.

En la primera etapa donde se estimularon *in vitro* linfocitos T (provenientes de cerdos que no habían estado infectados con PRRSV) con células dendríticas

(DCs) derivadas de monocitos (moDCs) infectadas con 2 cepas de genotipo americano (CIAD008 y NVSL97-7895 cepa sonoreña y de referencia, respectivamente) y 4 cepas de genotipo europeo (2992, 2998, 2993 y 2756 cepas españolas) y se evaluó la capacidad de inducir los linfocitos T reguladores CD25⁺Foxp3⁺ en los co-cultivos. Estos resultados se describen a detalle en los capítulos 2 y 3. Los resultados mostraron que las cepas americanas tienen la capacidad de inducir el incremento de linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ y la expresión de transcritos del *Foxp3*, mientras que las europeas evaluadas no tuvieron dicho efecto, incluso las DCs infectadas con la cepa altamente inductora de IL-10 (2992) no fue capaz de estimular la inducción de Treg. Para explicar estas diferencias fue necesario determinar si las cepas europeas tenían la capacidad de infectar a DCs derivadas de monocitos. El resultado mostró que las cepas europeas infectan y se replican con la misma eficiencia que en macrófagos alveolares. Sin embargo, a diferencia de lo observado en las cepas americanas, no inducen una disminución en la expresión de moléculas de MHC-II o MHC-I, sólo la cepa 2992 tuvo efecto sobre el porcentaje de expresión de MHC-I. Específicamente, la cepa 2992 tiene la capacidad de inducir la secreción de IL-10 en las moDCs al igual que las americanas CIAD008 y NVSL97-7895, estas últimas provocan también la disminución de moléculas de MHC-I y II y CD80/86 (Flores-Mendoza et al., 2008), además del incremento de transcritos de IL-10 y TGF- β (Flores-Mendoza, 2007). Aunque las moDCs no indujeron el incremento de Treg in vitro, tampoco tuvieron la capacidad de estimular la respuesta celular (proliferación y producción de IFN- γ). En conclusión, estos resultados muestran otro punto donde los genotipos americano y europeo difieren en la forma en que modulan la respuesta inmune del

cerdo y se propone la hipótesis de que la inducción de Treg en cerdo es dependiente de TGF- β .

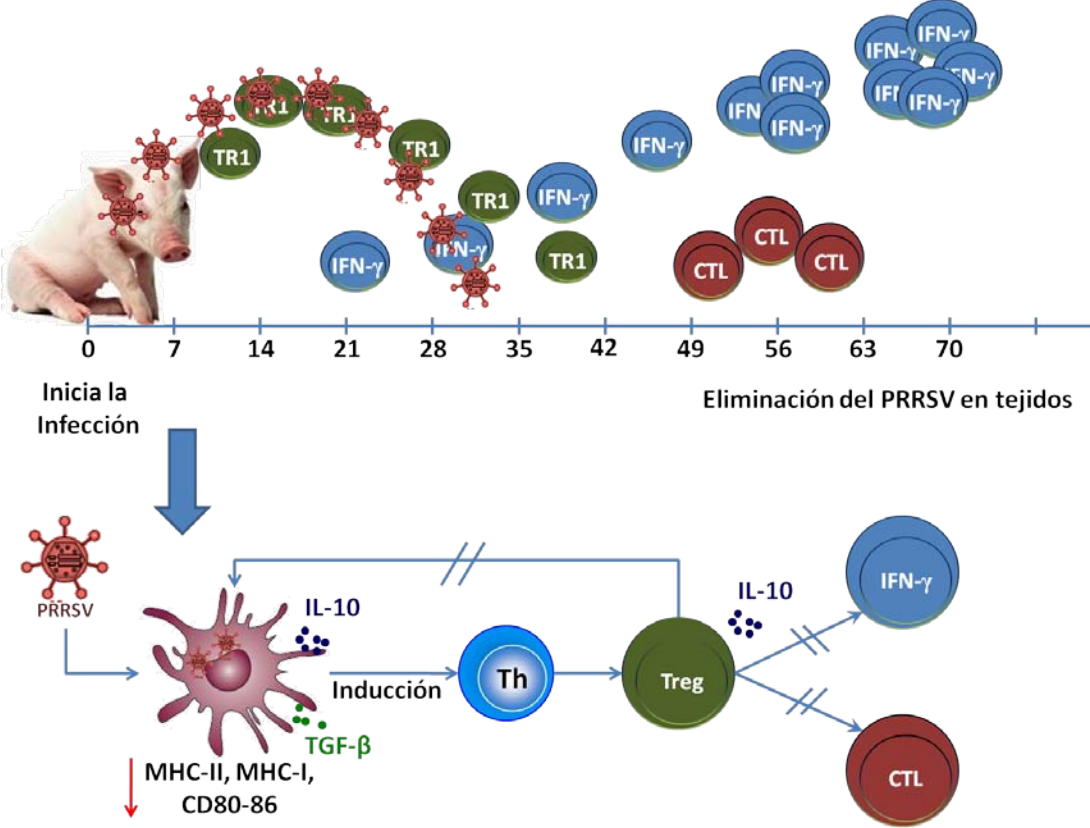
En la segunda etapa de este trabajo se evaluó la presencia de los Treg en animales adultos naturalmente expuestos al PRRSV. Los resultados se describen en el capítulo 4. Este trabajo se realizó en cerdos adultos, ya que están relacionados con la diseminación del PRRSV de manera intermitente y los mecanismos por lo que ocurre este fenómeno se desconocen y los Treg podrían estar involucrados. Al determinar la frecuencia de Treg en sementales infectados se observó un incremento en el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺, mientras que las CD8⁺Foxp3⁺ tuvieron una media igual respecto a los sementales sanos. Además, se logró detectar la expresión de TGF- β solo en el grupo de los animales infectados al estimular células mononucleares con una cepa de PRRSV. Al evaluar los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se observaron niveles bajos respecto a los sanos, lo cual coincide con una infección persistente del PRRSV, que va acompañada con linfopenia (Molina et al., 2008). Estos resultados muestran el incremento de células CD4⁺Foxp3⁺ en animales expuestos persistentemente con PRRSV. Sin embargo no se puede establecer si existe asociación con la secreción intermitente del virus en semen ya que se trató de un estudio exploratorio y se requiere la realización de un estudio longitudinal.

La tercera etapa de esta tesis se describe en los capítulos 5 y 6. El objetivo fue evaluar la capacidad del PRRSV para inducir la expansión de Treg en las primeras semanas de la infección. Se infectaron lechones de entre 4 y 6 semanas de edad para monitorear la frecuencia de Treg en sangre periférica y tejidos

asociados a la replicación de virus (ganglios mediastínicos y amígnadas). Además, se evaluaron los subtipos de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ y $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ y la expresión, secreción y porcentaje de células productora de IL-10 y TGF- β para realizar la clasificación de los Treg inducidos por PRRSV. El análisis de la expresión de citocinas mostró un incremento a nivel de transcrito de IL-10 y TGF- β . La población $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ permaneció sin cambios durante el tiempo de infección. Pero se observó un incremento de las células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ y $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$, principalmente en las doble positivas. Además, se observó que al estimular células mononucleares con PRRSV se aumentó el porcentaje de células $CD4^+$, $CD4^+CD8^+$ y $CD8^+$ productoras de IL-10, en las células $Foxp3^+$. Por otra parte, el virus solo provocó un ligero incremento en el porcentaje de células $CD4^+CD8^+TGF-\beta^+$. El PRRSV no promovió cambio en la población $Foxp3^-$. Estos resultados demuestran que el PRRSV estimula el incremento de células Treg *in vivo* en la fase aguda de la infección. Este incremento de Treg circulantes aparentemente se debe a la inducción al tercer dpi en los ganglios mediastínicos y se relacionó con el comportamiento de la carga viral en dicho tejido. Además, se pudo detectar que en las amígdalas los Treg $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ se aumentaron en cerdos infectados hasta los 18-24 dpi respecto a los no infectados. El fenotipo inducido por el PRRSV fue $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$, las cuales se pueden clasificar como Tr1 productoras de IL-10 (Belkaid, 2007). Estos resultados permiten explicar el retraso en la aparición de la respuesta celular PRRSV específica, así como la baja producción de IFN- γ y el establecimiento persistente del PRRSV en tejidos linfoides secundarios.

En conclusión en esta tesis se describe la participación de células Treg durante la infección con el PRRSV, la cual se caracteriza por provocar infecciones persistentes con deficiente respuesta inmune celular. El PRRSV genotipo americano induce la expansión de Treg a través de la infección de DCs, en donde realiza un efecto inmunomodulador provocando un estado inmaduro. Además, se pudo demostrar que es necesaria la participación del TGF- β para la inducción de Treg en cerdo y no se generan con la sola participación de la IL-10. La inducción de Treg se observa en la fase aguda de la infección, donde el fenotipo que se incrementa principalmente son las células CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, clasificadas como Tr1 o productoras de IL-10. Estas células pueden estar provocando que la infección se establezca por largos periodos de tiempo al evitar el desarrollo de respuesta inmune celular.

Modelo de inducción de células T reguladoras y respuesta inmune celular en cerdo infectados con PRRSV



BIBLIOGRAFÍA

- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 74, 10834-10837.
- Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H.S., Xiao, Z., Murtaugh, M., 2004, Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 68, 267-273.
- Belkaid, Y., 2007, Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7, 875-888.
- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D., 1992, Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4, 127-133.
- Cavanagh, D., 1997, Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142, 629-633.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Goddeeris, B., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009, Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3(+)CD8(high) cells. *Vet Res* 40, 46.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A., 1995, Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7, 456-464.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2005, Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 86, 1943-1951.
- 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.
- 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. *Clin Vaccine Immunol* 15, 720-725.
- Flores, L., 2007, Respuesta de células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Tesis de Maestría, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC; 41pp.
- Kinter, A.L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., Ziegler, S.F., Fauci, A.S., 2004, CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of

- asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200, 331-343.
- Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004, Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 155-163.
- 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.
- Mateu, E., Diaz, I., 2008, The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 177, 345-351.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003, Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.
- Meier, W.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Osorio, F.A., Lunney, J.K., Zuckermann, F.A., 2004, Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 299-314.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., 1994, Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1795-1801.
- Meulenbergh, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., 1995, Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.
- Meulenbergh, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55, 197-202.
- Molina, R.M., Cha, S.H., Chittick, W., Lawson, S., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J., Evans, R., Rowland, R.R., Wu, W.H., Zimmerman, J.J., 2008, Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 283-292.
- Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002, Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15, 533-547.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Sun, Z., Chen, Y., Chen, Z., 2008, Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 123, 57-65.
- Rieger, K., Loddenkemper, C., Maul, J., Fietz, T., Wolff, D., Terpe, H., Steiner, B., Berg, E., Miehke, S., Bornhauser, M., Schneider, T., Zeitz, M., Stein, H., Thiel, E., Duchmann, R., Uharek, L., 2006, Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 107, 1717-1723.
- Smyk-Pearson, S., Golden-Mason, L., Klarquist, J., Burton, J.R., Jr., Tester, I.A., Wang, C.C., Culbertson, N., Vandenbark, A.A., Rosen, H.R., 2008, Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 197, 46-57.

- Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2005, The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 219-225.
- van der Linden, I.F., van der Linde-Bril, E.M., Voermans, J.J., van Rijn, P.A., Pol, J.M., Martin, R., Steverink, P.J., 2003, Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 97, 45-54.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003, Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77, 8207-8215.
- Voo, K.S., Peng, G., Guo, Z., Fu, T., Li, Y., Frappier, L., Wang, R.F., 2005, Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 65, 1577-1586.
- 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. *Arch Virol* 152, 289-303.
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 2001, A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004, The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 78, 5923-5933.

INTEGRACION DEL MANUSCRITO DE TESIS

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

Capítulo 1 “Participación de los linfocitos T reguladores en la respuesta inmune ante patógenos”. Erika Silva Campa, Jesús Hernández. Este capítulo describe la clasificación, función y mecanismos de acción de las células T reguladoras, además de los efectos que provocan en la respuesta inmune ante patógenos como virus, bacterias y parásitos. Es decir, la participación de los Treg en el establecimiento de infecciones persistentes y crónicas. Este capítulo es un artículo de revisión y se presenta en forma de manuscrito, será sometido a revisión para su publicación en la revista INMUNOLOGIA de la Sociedad Española de Inmunología, bajo el título “Participación de los linfocitos T reguladores en la respuesta inmune ante patógenos”.

Capítulo 2 “Inducción de Células T Reguladoras T helper 3 por Células Dendríticas Infectadas con el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Genotipo americano”. Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J. En este capítulo se describe como las células dendríticas derivadas de monocitos

infectadas con las cepas de PRRSV americano pueden inducir la expansión de células Treg a partir de linfocitos T vírgenes *in vitro*. Además se observó un incremento en la expresión de TGF- β , el cual podría estar involucrado en el mecanismo de supresión de la respuesta inmune ante el PRRSV. Artículo publicado, referencia: Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387:373-9.

Capítulo 3 “El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo europeo infecta células dendríticas derivadas de monocito, pero no induce células T reguladoras”. Erika Silva-Campa, Lorena Cordova, Lorenzo Fraile Lorenzo, María Montoya, and Jesús Hernández. En este capítulo se evaluó si el virus del PRRS genotipo europeo tiene la capacidad de infectar células dendríticas derivadas de monocitos y los efectos moduladores que pueda provocar en ellas para la inducción de Treg. Las células dendríticas infectadas con las cepas europeas no fueron capaces de inducir el incremento de Treg al menos *in vitro*, debido a que no promueven la secreción de TGF- β . Artículo publicado, referencia: Erika Silva-Campa, Lorena Cordova, Lorenzo Fraile Lorenzo, María Montoya, and Jesús Hernández (2010). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells, but does not induce Tregs cells. *Virology* 396:264-271.

Capítulo 4 “Frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ en sementales infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino”. Erika Silva-Campa, Verónica Mata, Jesús Hernández. Describe la frecuencia de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺ en cerdos adultos infectados naturalmente con PRRSV. Con este estudio se evaluó la presencia de los Treg en sementales, ya que el virus puede ser secretado intermitentemente en semen por largos periodos de tiempo. El incremento de la población de Treg puede estar relacionado con el establecimiento de la persistencia viral en las gónadas del semental. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito y será sometido a revisión para publicación en la revista *Research in Veterinary Science* bajo el título: CD4⁺Foxp3⁺ T cells in boars infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and vaccine immunology*.

Capítulo 5 “El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino induce la expansión de células T reguladoras con el fenotipo CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺”. Silva-Campa E, Hernández J. En este capítulo se evaluó la inducción in vivo de Treg en la fase aguda de la infección en cerdos jóvenes. Además se determinó el subtipo de Treg involucrado en la supresión de la respuesta PRRSV específica. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito y será sometido a revisión para publicación en la revista *Veterinary Research*, bajo

el título: CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are the phenotype induced by porcine reproductive and respiratory syndrome.

Capítulo 6 “Frecuencia de linfocitos T reguladores en tejidos linfoides asociados a la replicación y persistencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.”. Silva-Campa E, Mateu E, Hernández J. En este capítulo se cuantificaron los porcentajes de células Treg en tejidos asociados a la replicación y persistencia del PRRSV. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito (primer borrador) y será sometido a revisión para publicación en la revista Virology, bajo el título: Frequency of regulatory T cells induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in lymphoid nodes are associated with viral replication and persistence.

HIPÓTESIS

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino induce la generación de células T reguladoras como un mecanismo para evadir la respuesta inmune.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar y clasificar las células T reguladoras de cerdos infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

Objetivos específicos

1. Generar linfocitos T reguladores *in vitro* inducidos por el PRRSV.
2. Determinar la frecuencia de células T reguladoras en sangre periférica de cerdos adultos con una infección del PRRSV.
3. Caracterizar los linfocitos T reguladores en sangre periférica y tejidos de cerdos con infección aguda del PRRSV.

Capítulo 1

**Participación de los linfocitos T reguladores
en la respuesta inmune ante patógenos**

**Erika Silva Campa y Jesús Hernández.
Participación de los linfocitos T reguladores en la
respuesta inmune ante patógenos. INMUNOLOGIA.
Manuscrito en preparación**

Resumen

Los linfocitos T reguladores (Treg) son los responsables de controlar la respuesta inmune y mantener la homeostasis. Dependiendo de su origen, generación o mecanismo de acción los linfocitos Treg se clasifican en los subtipos naturales (nTreg) e inducidos (iTreg), mismos que controlan la respuesta inmune contra antígenos propios o exógenos, respectivamente. Los mecanismos de acción de los Treg se pueden dividir en tres categorías: interacciones célula-célula, secreción local de citocinas inhibitorias y competencia local por factores de crecimiento. En esta revisión se presenta un análisis de los mecanismos de acción de las células T reguladoras en procesos infecciosos de tipo viral, bacteriano y parasitario.

La inducción de linfocitos Treg es una estrategia que utilizan algunos virus para suprimir o evadir la respuesta inmune, y es un mecanismo que utilizan para persistir en el huésped. Una característica importante derivada de la inducción de Treg, es el desarrollo de infecciones persistentes o crónicas ocasionadas por virus. Los modelos infecciosos en los cuales se ha estudiado más ampliamente la inducción de Treg es el virus de la hepatitis C, hepatitis B, inmunodeficiencia humana (VIH), inmunodeficiencia felina, citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr (EBV). Los Treg son inducidos específicamente hacia antígenos virales.

La participación de las células reguladoras en las infecciones causadas por bacterias provoca procesos crónicos o persistentes que el sistema inmune del

huésped no es eficaz para eliminarlas. Bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Listeria monocytogenes* son casos de infecciones bacterianas que se caracterizan por utilizar a los Treg naturales y/o inducidos para establecer infecciones crónicas. Sin embargo, el incremento no es del todo perjudicial para el huésped, por el contrario, limita el daño patológico causado por la propia respuesta inmune.

Por último, se discute la participación de los Treg en la respuesta del huésped en infecciones causadas por parásitos como *Brugia malayi*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, y *Plasmodium vivax*, los Treg naturales predominan, evitando el daño provocado por la propia respuesta inmune contra el parásito. Sin embargo, ello ayuda a la permanencia del patógeno por periodos más prolongados.

La participación de las células T reguladoras en las infecciones tiene diferentes implicaciones dependiendo del patógeno. En las infecciones virales la participación de los iTreg influye directamente en la evasión de la respuesta inmune. Los iTreg se inducen en la fase aguda de la infección y permanecen elevados en la etapa crónica. Mientras que en bacterias y parásitos se observa predominantemente el reclutamiento de nTreg en el sitio de infección. Con ello se previene el daño colateral al tejido provocado por la propia respuesta inmune. Sin embargo, en algunos casos se favorece la permanencia del patógeno de manera indirecta. El estado persistente o crónico de la infección puede implicar mayores riesgos para la salud: individualmente con el deterioro del órgano infectado y

poblacionalmente hablando al existir el riesgo de exposición e incrementarse el número de casos.

**Participación de los linfocitos T reguladores en la respuesta inmune ante
patógenos**

Erika Silva-Campa y Jesús Hernández

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC.

Carretera a La Victoria km 0.6 C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

Tel/Fax: +52 (662) 289-24-00 Ext. 294

Correo electrónico: era015@gmail.com y jhdez@ciad.mx

Resumen

Los linfocitos T reguladores (Treg) son los responsables de controlar la respuesta inmune y mantener la homeostasis. Es decir, suprimen o controlan la acción de células inmunocompetentes y efectoras. Su fenotipo característico es CD4+CD25+Foxp3+ ó CD8+CD25+Foxp3+, donde el Foxp3 es el único marcador específico. Los Treg se clasifican en naturales e inducidos, quienes controlan la respuesta inmune contra antígenos propios o exógenos, respectivamente. Recientemente los Treg se han relacionado con el establecimiento de infecciones crónicas o persistentes, como un mecanismo para evadir la respuesta inmune. Puede tratarse de Treg inducidos por el propio patógeno o reclutados en el sitio de infección. Por tanto, ya sea directa o indirectamente, los Treg se relacionan con el incremento del tiempo de vida del patógeno en el huésped.

Palabras claves: Linfocitos T reguladores, Foxp3, inmunosupresión.

Abstract

Regulatory T cells (Treg) are responsible for controlling the immune response and maintain homeostasis, suppressing or controlling the function of effectors and immunocompetent cells. Treg express CD4+CD25+Foxp3+ or CD8+CD25+Foxp3+, but only in Treg is expressed the transcription factor Foxp3, for that reason is the unique specific marker for these cells. Treg are classified into natural and induced, which control the immune response against themselves or exogenous antigen, respectively. Recently, Treg have been related with chronic or persistent infection establishment. When a pathogen induces Treg, it is capable to persist chronically in the host. However, when natural Treg are recruited to the site of infection, they indirectly prolong the infection. In conclusion, regulatory T cells are other mechanism used by pathogens to escape from immune response.

Key words: Regulatory T cells, Foxp3, immunosuppression.

El control de las infecciones requiere de la respuesta inmune adaptativa, mediante la producción de anticuerpos, la acción de células T cooperadoras y células CD8+ o citotóxicas. Sin embargo, muchos patógenos incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos, han desarrollado estrategias que facilitan su persistencia, en gran medida evadiendo al sistema inmune del huésped. Una estrategia es la capacidad de inducir la diferenciación de los linfocitos T cooperadores en reguladores (Treg), los cuales en gran medida controlan la respuesta inmune. Fueron re-definidos en 1995 por Shimon Sakaguchi, quien demostró que una pequeña población de células CD4+ tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune y promover la homeostasis (Shevach, 2006; Voo et al., 2005). Desde entonces los Treg han sido reconocidos por su participación reguladora del sistema inmune.

Específicamente, la función de los Treg es suprimir la activación y expansión de múltiples tipos de células inmunocompetentes (Miyara and Sakaguchi, 2007). Suprimen la activación de linfocitos T auto-reactivos o la intensidad de la respuesta en células T vírgenes y de memoria (Nesburn et al., 2007). Además suprimen la acción de células dendríticas (DCs), células asesinas naturales (NK), linfocitos B y linfocitos asesinos naturales (NKT) (Li et al., 2008). Los Treg pueden regular la respuesta inmune ante antígenos exógenos tales como, alérgenos o antígenos expresados por patógenos (Vahlenkamp et al., 2005). En individuos con disfunción de los Treg se observan enfermedades autoinmunes severas o incluso fatales como Scurfy en ratones o el síndrome IPEX (Inmunodeficiencia,

Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al X) en humanos (Miyara and Sakaguchi, 2007; Rad et al., 2006).

Para identificar a los Treg se han utilizado varios marcadores de superficie como la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), que es un marcador de activación de las células T; el glucocorticoide inductor del receptor de la familia de moléculas del factor de necrosis tumoral (GITR). También, se ha empleado L-selectina (CD62L), molécula de adhesión leucocitaria; el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) involucrado en la regulación de la respuesta inmune a través del bloqueo de la señal emitida por la familia de receptores B7. Sin embargo ninguno de estos marcadores es específico para células T reguladoras (King and Segal, 2005; Shevach, 2006; Ureta et al., 2007). Recientemente, se ha descrito que el factor de transcripción Forkhead Box P3 (Foxp3) es específico para estas células en humano y en ratón (Voo et al., 2005). Debido a que la expresión de Foxp3 en células T CD4 vírgenes provoca el desarrollo del fenotipo regulador. Además, se sabe que la expresión de Foxp3 en linfocitos Treg se requiere para su diferenciación y función. Los ratones que tienen Foxp3 disfuncional son incapaces de regular la activación de células T y por lo tanto no sobreviven (Jarefors et al., 2006). Esto sugiere que Foxp3 debe ser el gen regulador elemental para la diferenciación de este linaje celular, (Hori et al., 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a su inducción siguen siendo en gran medida desconocidos (Voo et al., 2005). Para que las células CD4+ adquieran la función supresora requieren de las tres señales indispensables para la activación de los linfocitos T, el reconocimiento del antígeno asociado a

moléculas de MHC-II, la co-estimulación a través del CD28, los factores de crecimiento como lo es la IL-2 y citocinas moduladoras como el TGF- β . El TCR y CD28 activan a PLC- γ y PK θ para activar la ruta de señalización por calcio-calmodulina que promueve la activación del NFAT; además activan la ruta AKT-JNK que estimula a AP1, ambos factores de transcripción son indispensables para que se transcriba el gen del *foxp3*. El receptor de IL-2 activa al STAT5, el dímero se transloca al núcleo y se une al promotor del *foxp3*. El TGF- β por su parte activa al SMAD3 y al TIEG-1. La coestimulación por CD28 debe ser muy regulada, debido a que activa la ruta PI3K-AKT y con ello al mTOR, que se asocia con la inhibición de la expresión de *foxp3* (Huehn et al., 2009).

En varias especies animales como humano, ratón, gato y rata, las células CD4+CD25+ representan aproximadamente entre el 5 y el 10% de las CD4+ (Vahlenkamp et al., 2005). En el ratón se ha observado que existe una correlación entre la expresión de CD25 y Foxp3, pero alrededor del 10% de las células Foxp3+ son CD25- y un 10% de CD25+ son Foxp3- las cuales representan las células T efectoras activadas. En el humano casi toda la población de células CD4+ que expresan altos niveles de CD25 (CD25^{hi}) son Foxp3+, aunque las que expresan niveles intermedios de CD25 (CD25^{int}) presentan niveles variables de Foxp3 y en baja cantidad pero suficiente. Mientras que las células CD4+CD25- no expresan Foxp3 (Shevach, 2006).

Los linfocitos Treg CD4+CD25+ han sido reconocidos como las células reguladoras más importantes del sistema inmune. Están involucradas en la regulación de la tolerancia inmunológica, autoinmunidad, inflamación, trasplantes,

cáncer e incluso en infecciones por patógenos (Amarnath et al., 2007; Banerjee et al., 2006). Sin embargo, existe otra población de células con función reguladora, las células CD8+. Este tipo de células supresoras se describieron en los años 70's y 80's. Existen dos tipos de células CD8+ supresoras, con fenotipos CD8+CD25+Foxp3+ y CD8+CD25-Foxp3- involucradas en el control de enfermedades autoinmunes y de cáncer (Shevach, 2006). También se han reportado células doble negativas (CD4-CD8-) con capacidad supresora en humanos y en ratón, involucradas en la respuesta hacia aloantígenos (Chen et al., 2005; Fischer et al., 2005).

Los linfocitos Treg CD4+ se clasifican dependiendo de su origen, generación o mecanismo de acción en dos subtipos: naturales (nTreg) o inducidas (iTreg) por un antígeno (Belkaid, 2007; Nesburn et al., 2007; Suffia et al., 2006). Los nTreg se desarrollan durante un proceso normal de maduración en el timo y regulan la respuesta inmune ante antígenos propios. Mientras que los iTreg se desarrollan en la periferia a partir de células CD4 convencionales como consecuencia de una activación de la célula T bajo ciertas señales. Éstas pueden ser por ejemplo, citocinas reguladoras [la interleucina (IL)-10 o el factor transformante del crecimiento (TGF)- β], una exposición baja al antígeno, drogas inmunosupresoras, baja coestimulación por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs) (Manigold et al., 2006; Voo et al., 2005). Los iTreg se han clasificado de acuerdo a la producción de citocinas en Tr1 que producen IL-10 principalmente, Th3 productores de TGF- β y en Foxp3+ (Belkaid, 2007; Carrier et al., 2007).

Los mecanismos de acción de los Treg siguen siendo poco conocidos y polémicos. Se pueden dividir en tres categorías: interacciones célula-célula, secreción local de citocinas inhibitorias y competencia local por factores de crecimiento (Jarefors et al., 2006; Sojka et al., 2008).

Los mecanismos involucrados en la inhibición por contacto célula-célula incluyen el reconocimiento de moléculas como CTLA, LAG3 (proteína de activación de linfocitos 3), moléculas citolíticas (Fas y granzima B) y TGF- β unido a la membrana. Recientemente se ha descrito que la expresión de CD73 y CD39 (ectonucleotidasas) incrementan la producción de AMP cíclico, el cual se ha asociado a la inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas en células efectoras (Miyara and Sakaguchi, 2007; Sojka et al., 2008). También se sabe que las moléculas PD (muerte programada)-1 al reconocer a su receptor, PD-L1 en células CD4 y CD8, inhiben la proliferación y producción de citocinas (Taylor et al., 2006).

La secreción de citocinas inhibitorias tales como, TGF- β e IL-10 ha sido implicada en la acción efectora de los Treg *in vivo* e *in vitro* (Sojka et al., 2008). TGF- β está relacionado con el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y prevención de enfermedades autoinmunes. Puede suprimir la acción de células T efectoras, tanto Th1 como Th2, además de bloquear la producción de IL-2 (Taylor et al., 2006). La producción de IL-10 como citocina inmunomoduladora suprime la proliferación y producción de citocinas en las células T. Es esencial en la tolerancia ante alérgenos, antígenos propios, en trasplantes y antígenos tumorales y es muy importante en la inducción de anergia. La IL-10 inhibe tanto la

respuesta Th1 como Th2 en varias infecciones como tuberculosis y hepatitis C (Belkaid, 2007; Roncarolo et al., 2006; Taylor et al., 2006). Recientemente se describió una nueva citocina anti-inflamatoria (IL-35), que suprime la respuesta inmune a través de la expansión de células T reguladoras. Se ha reportado que la expresión ectópica de IL-35 en células T vírgenes les confiere actividad supresora, además IL-35 recombinante inhibe la proliferación de células T (Collison et al., 2007; Niedbala et al., 2007; Sojka et al., 2008).

Por otro lado, se ha descrito que la competencia por factores de crecimiento (IL-2), es otro mecanismo de supresión. Se ha observado que en co-cultivos, los Treg privan de IL-2 a las células efectoras. Lo anterior se debe al hecho de que los Treg expresan altos niveles de CD25 y las células T vírgenes lo expresan después de su activación. Además, la absorción de IL-2 activa a los Treg y puede provocar el incremento de la producción de IL-10 (Sojka et al., 2008).

En esta revisión se presenta la información reciente con respecto a la forma en que actúan las células T reguladoras en diferentes modelos de infección, específicamente virales, bacterianos y parasitarios. Es decir, cómo se asocian los Treg en procesos infecciosos y al control de la respuesta inmune.

Inducción de Treg por Virus

La inducción de linfocitos Treg es una vía que utilizan algunos virus para suprimir o evadir la respuesta inmune y es una forma de persistir en el huésped. Una característica importante en la inducción de Treg, es el desarrollo de

infecciones persistentes o crónicas ocasionadas por virus, a pesar de que se presenta una respuesta de linfocitos T citotóxicos continua y cuantificable (Li et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2005).

El virus de la hepatitis C (HCV), produce infecciones persistentes asociadas con el desarrollo de la hepatitis crónica y cáncer de hígado, debido a que la respuesta específica de células T es insuficiente, lo cual facilita la persistencia y mantenimiento de la infección. Existe un incremento en la frecuencia de Treg (CD4+CD25+) en sangre periférica de pacientes crónicamente infectados, sin embargo, no hay diferencia en dicha frecuencia comparándola con aquellos con infección aguda. Lo anterior, indica que los Treg son expandidos en la fase temprana de la infección y causan el establecimiento de la cronicidad (Smyk-Pearson et al., 2008). Estas células son capaces de suprimir la respuesta de células T citotóxicas y se han observado clones de tipo Tr1 con la misma especificidad de las clones Th1, indicando que se están generando a partir de CD4 convencionales (Cools et al., 2007b; Li et al., 2008; MacDonald et al., 2002). Un reporte reciente muestra como una línea células derivada de hepatocitos al ser infectados con HCV, producen TGF- β e inducen la conversión de células CD4⁺ en Treg directamente *in vitro* (Hall et al., 2010). Por tanto, es muy probable que la inducción de Treg esté directamente asociada a la producción de TGF- β en las células infectadas, ya sea provocando directamente la diferenciación a Treg y/o modulando a las células dendríticas quienes a su vez promueven la inducción de los Treg en pacientes infectadas con HCV. Con ello promoviendo o facilitando el establecimiento del virus crónicamente.

Para el caso de pacientes infectados con el virus de la hepatitis B (HBV) la mayoría se resuelven, sin embargo, puede también provocar infecciones crónicas y estos pacientes están en riesgo de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular (Xu et al., 2006). En individuos infectados crónicamente se ha reportado el incremento de linfocitos Treg en circulación y en hígado. Dicha inducción es antígeno específica, ya que al estimular células mononucleares con el antígeno viral HBcAg se incrementan las células reguladoras (CD4+Foxp3+IL-10+) (Barboza et al., 2007; Peng et al., 2008). Además, el incremento de los Treg en el hígado se asocia directamente con la carga viral (Stoop et al., 2008), así como, en los pacientes con tratamiento antiviral (análogos nucleosídicos) al disminuir la carga viral los Treg disminuye, sin embargo se ha asociado con el incremento de células Th17 (Zhang et al., 2010). Por tanto, la inducción de Treg se asocia con la respuesta inadecuada ante el virus, bloqueando la activación de células T específicas y provocando el establecimiento del virus crónicamente. Sin embargo, cabe la posibilidad de que dicho incremento de Treg puede estar involucrado en un proceso de protección al hígado evitando el daño causado por células Th17 aunque es necesario establecer especificidad de esta población hacia el virus del HBV.

En la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se observa una depleción gradual de células CD4 lo que lleva al paciente a la inmunosupresión y con ello a desarrollar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS). La respuesta inmune ante este virus está controlada por linfocitos Treg, ya que se han detectado incrementados tanto en circulación

periférica y ganglios linfáticos de pacientes infectados. Los Treg suprimen la proliferación y producción de citocinas en las células CD4 y CD8 en respuesta a antígenos específicos del VIH. Además se ha reportado que las citocinas producidas por dichas células son la IL-10 y el TGF- β . Sin embargo, *in vitro* la capacidad supresora en mayor medida es dependiente del contacto célula-célula (Amarnath et al., 2007; Kinter et al., 2007a; Kinter et al., 2004; Kinter et al., 2007b; Li et al., 2008; Weiss et al., 2004). En casos de pacientes con infección crónica el número de Treg disminuyen (Thorborn et al., 2010), esto se debe a la redistribución de los mismos hacia los tejidos linfoides y mucosas, y a que los Treg también pueden ser infectados, en consecuencia contribuir con la progresión de la infección (Chase et al., 2008). Sin embargo, existe controversia en cuanto al papel de los Treg en la infección. Debido a que existen individuos portadores del virus que no reciben tratamiento, donde los niveles de CD4 permanecen normales, y los Treg se incrementan en circulación, favoreciendo la no progresión clínica de la infección hacia AIDS (Chase et al., 2008). Es bien conocido que los pacientes con VIH tienen disfunción de las células presentadoras de antígenos principalmente DCs, esto puede deberse a la presencia de Treg, quienes tienen la capacidad de suprimir la presentación de antígenos. Se ha visto que al bloquear la producción de IL-10 y al eliminar mediante la depleción de CD4+CD25+ de los Treg se incrementa la activación de células CD4 (Carbonneil et al., 2004). Por ello el incremento de los Treg en pacientes con HIV a la larga genera la progresión de la infección a AIDS ya que los pacientes no tienen capacidad de presentación de antígenos y además los Treg suprimen la respuesta adaptativa.

Durante el desarrollo de la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) está acompañada por una temprana y robusta respuesta inmune humoral y celular, sin embargo seguida por la supresión inmune progresiva que eventualmente termina en AIDS. El FIV induce el incremento de células T reguladores (CD4+CD25+Foxp3+), tanto en fase aguda como crónica respecto a gatos sanos. Estas células tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células CD4+, producción de IL-2 y activación de células CD8+ (Mexas et al., 2008b; Vahlenkamp et al., 2004). Se ha observado que células CD4+CD25+ provenientes de felinos crónicamente infectados, suprimen la proliferación de células T autólogas (Vahlenkamp et al., 2005). En la fase aguda de la infección la respuesta de células T se suprime a través de la inducción de TGF- β asociado a la membrana (Mexas et al., 2008a; Petty et al., 2008). Un punto importante es que el FIV tiene la capacidad de infectar células CD4+CD25+ selectivamente y debido a la alta capacidad de sobrevivencia de los Treg sirven como reservorio viral (Joshi et al., 2005). Recientemente se identificó que células CD4+CD25+ aisladas de gatos infectados con FIV tienen la peculiar capacidad inducir la expresión de Foxp3 en células CD8+, pero enérgicas al co-cultivarlas *in vitro* (Fogle et al., 2010). A diferencia de los pacientes con VIH, los gatos infectados con FIV aparentemente no pierden la capacidad de presentación de antígenos por DCs derivadas de monocitos y macrófagos (Mizukoshi et al., 2009). Además, no se altera la producción de IL-12 y tampoco se induce IL-10 en DCs derivadas de médula ósea (Lehman et al., 2009). Por lo tanto, el mecanismo por el cual se inducen el incremento de Treg ante el FIV necesita ser estudiado ya que están implicados directamente en el establecimiento de la infección crónica.

El virus Friend infecta a ratones siendo un modelo utilizado para evaluar el efecto inmunosupresor de los retrovirus este complejo viral causa infecciones persistentes del sistema hematopoyético. Cuando se establece una infección crónica en el ratón se observa un efecto inmunosupresor de células CD4+ que conlleva a la falta de respuesta de los linfocitos CD8+, es decir, se bloquea el efecto citotóxicos y la producción de IFN- γ . Históricamente es muy importante ya que fue el primer caso donde se observó la participación de los Treg en la supresión de la respuesta a un patógeno (Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005). La activación de células CD4+ Treg inhiben la producción de IFN- γ y la actividad citotóxica en las células CD8+ (Robertson et al., 2006), pero no su capacidad del reconocimiento del antígeno y de proliferar (Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005). Sin embargo, el incremento de Treg en las infecciones crónicas evita que el daño patológico sea más severo y no necesariamente se trata de Treg específicas contra el FV (Antunes et al., 2008). El incremento de los Treg en los órganos afectados se asociado con la carga viral en dicho tejido y la depleción temporal favoreció el incremento de la respuesta de los CD8+ (Myers et al., 2009; Zelinsky et al., 2009). El FV tiene un amplio repertorio de células blanco, la inducción de Treg se atribuye a la infección de DCs mieloides, las cuales tienen la capacidad de expandir Treg de manera antígeno específica al permanecer en estado inmaduro (Balkow et al., 2007). Por tanto, aunque los Treg en este caso tienen cierto beneficio para el huésped, el incremento lleva al establecimiento del estado crónico.

Otro virus que provoca infección crónica en el ratón es el virus del tumor mamario (MMTV). En la fase aguda de la infección causa un incremento gradual en el número de células CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3+ (nTreg) en las placas de Peyer. Dicho incremento se ve asociado a la falta de activación de células CD4 y CD8 efectoras y a la cronicidad de la infección (Cabrera et al., 2008).

Citomegalovirus (CMV) es causa común de enfermedades infecciosas virales, las cuales son difíciles de eliminar por el sistema inmune, resultando en el establecimiento persistente o crónico de la infección. La inducción de linfocitos Treg por citomegalovirus (CMV) se ha reportado indirectamente. En biopsias de colitis causada por CMV se observó un incremento en el número de células Foxp3+ (Rieger et al., 2006). Además en un estudio donde se eliminaron las células CD25+ y se estimularon células CD8+ específicas para CMV, se observó un incremento en la producción de IFN- γ (Estes et al., 2006; Li et al., 2008). En modelo in vitro, se lograron expandir Treg antígeno específicos, quienes a la vez produjeron IL-10 y TGF- β , sin embargo esta última citocina es de mayor importancia para el efecto supresor (Li et al., 2010).

El análisis de la inducción de Treg por el virus Epstein-Barr (EBV), causante de la formación de tumores en humanos, aportó datos muy interesantes. Se generaron linfocitos Treg específicos para un péptido derivado del virus. Dicho péptido también es reconocido por células CD4 efectoras. Los Treg inducidos no presentaron secreción de IL-10 ni TGF- β , pero son capaces de suprimir la respuesta inmune de células CD4 y CD8 vírgenes, a través de moléculas

presentes en su membrana. Esta es una evidencia clara de que los linfocitos Treg inducidos son antígeno específicos (Voo et al., 2005). El virus induce el reclutamiento de Treg en el tumor (Linfoma de Hodgkin), el mecanismo propuesto es mediante la inducción de la quimiocina CCL20. La supresión de linfocitos citotóxicos específicos está relacionada con la presencia de Treg en el tumor (Baumforth et al., 2008). Por tanto este virus es un caso especial, donde no sólo es capaz de inducir Treg sino de utilizar a los reguladores naturales a su favor.

La fase aguda de las infecciones virales es clave para el establecimiento de su cronicidad. Ello debido a que en esa etapa se incrementan los Treg, que en el caso principalmente de los virus, se inducen específicamente. Es decir, es poca la participación de los nTreg en el establecimiento de la persistencia viral en el huésped.

Inducción de Treg por Bacterias

La inducción o acción de las células reguladoras en infecciones causadas por bacterias también ha sido evaluada, sobre todo en aquellas donde las infecciones son crónicas o persistentes y el sistema inmune del huésped no es eficaz para eliminar la infección. Tal es el caso de la tuberculosis (TB) causada por *Mycobacterium tuberculosis*, donde se observa una prolongada supresión de la respuesta inmune. Además, la producción de IFN- γ e IL-2 está disminuida y las citocinas antiinflamatorias incrementadas (IL-10 y TGF- β) (Ribeiro-Rodrigues et al., 2006). En pacientes con TB activa se ha visto que la frecuencia de células

CD4+CD25+Foxp3+ en sangre periférica, incrementa respecto a sujetos sanos y pueden suprimir la producción de IFN- γ específica para TB (Chen et al., 2007). Así como, en estudios *ex-vivo*, al eliminar las células CD4+CD25+ del resto de las mononucleares y retarlas con antígenos de *M. tuberculosis*, aumenta la producción de IFN- γ (Hougardy et al., 2007). También se ha reportado el incremento en la expresión de citocinas como la IL-10 y TGF- β en pacientes con TB (Guyot-Revol et al., 2006). Sin embargo, el incremento en el número de Treg se debe a la proteína de choque térmico 70 de la TB (TBHsp70) la cual presenta gran homología con la del humano. Por tanto, es posible que el tipo de Treg expandidos sean naturales (Borges et al., 2010; Motta et al., 2007). Aunque, la expansión o reclutamiento de Treg en el pulmón permite al *Mycobacterium tuberculosis* colonizar y suprimir la respuesta inmune en la fase temprana, permaneciendo en un estado de anergia en los pacientes y provocando con ello la fase activa de la infección.

Helicobacter pylori es una bacteria que afecta el tracto digestivo, aunque los pacientes pueden cursar con infecciones asintomáticas. Las manifestaciones más frecuentes son la gastritis crónica y úlceras estomacales, aunque también puede causar cáncer gástrico. En la infección por *H. pylori* existe una respuesta inmune vigorosa. Tanto en el estómago como en sangre periférica se pueden encontrar células T y B específicas para *H. pylori*. Sin embargo, el huésped no puede eliminar la infección de la mucosa intestinal y la infección puede persistir de por vida (Lundgren et al., 2003). La frecuencia de células con fenotipo regulador (CD4+CD25+) se incrementa en el estómago de los individuos infectados con *H.*

pylori. Esta población se asocia directamente con la supresión de la respuesta anti *H. pylori* y la persistencia de la infección. Sin embargo, cuando se ha infectado a ratones que son CD4-CD25-, la infección provoca gastritis más severa en las fases tempranas de la infección (Lundgren et al., 2005). Además, en niños infectados el incremento de Treg acompañado de TGF- β ayuda a evitar la gastritis (Harris et al., 2008), también en pacientes con úlcera los Treg están disminuidos y la respuesta Th1 y Th2 aumentada respecto a los sin úlcera (Robinson et al., 2008). La citocina que se ha asociada a la supresión es el TGF- β en los procesos de gastritis (Kandulski et al., 2008). El posible mecanismo de inducción de Treg, puede ser el incremento de la expresión del ligando de las moléculas de muerte programada 1 (PDL1) en las células epiteliales (Beswick et al., 2007), mientras que el papel de especificidad por DCs debe ser analizado con detalle, aunque se ha detectado que las DCs pulsadas con diferentes cepas de *H. pilory* favorecen la diferenciación a Treg respecto a los Th17 (Kao et al., 2010). Por tanto, el incremento de Treg limita el daño a la mucosa causado por una respuesta exacerbada y en este caso la presencia de Treg mantiene un balance en aquellos pacientes asintomáticos.

Los linfocitos Treg se han encontrado asociados a la evasión de la respuesta inmune en infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y *Listeria monocytogenes*. La *N. gonorrhoeae* infecta a hombres y mujeres causando la enfermedad conocida como gonorrea, en las mujeres puede cursar asintomática y con una débil respuesta inmune lo que evidencia un posible mecanismo de supresión. Al infectar ratones con *N. gonorrhoeae* se observó un incremento de

células CD4+CD25+Foxp3+ en nódulos linfáticos asociados al tracto genital, que aparentemente producen TGF- β . Esto indica que al menos en los ratones, *N. gonorrhoeae* induce Treg como mecanismo para establecerse crónica y asintóticamente (Imarai et al., 2008). En dicho modelo de infección pero utilizando una cepa vacunal de *L. monocytogenes*, las células nTreg actúan bloqueando la acción de linfocitos T citotóxicos (Belkaid, 2007). Aunque recientemente se evaluó la inducción específica de Treg y T efectoras, donde la respuesta efectora domina a la supresora en ratones infectados con la bacteria (Ertelt et al., 2009). Es necesario establecer el papel de los Treg en estas infecciones ya que se conoce muy poco.

Todos estos ejemplos de infecciones bacterianas se caracterizan por utilizar a los Treg para establecer infecciones crónicas. Sin embargo en *H. pylori* dicho reclutamiento de Treg no es del todo perjudicial para el huésped, por el contrario limita el daño patológico causado por la propia respuesta inmune.

Inducción de Treg por Parásitos

En esta última sección se analiza la participación de los Treg en la respuesta del huésped en infecciones causadas por diferentes parásitos. Hasta la fecha la información disponible es de protozoarios y helmintos.

Las infecciones por helmintos se caracterizan por modular la respuesta inmune y con ello asegurar la supervivencia del parásito en el huésped inmunocompetente. Éste a su vez, es capaz de responder adecuadamente, sin

embargo la exposición continua a los antígenos del parásito causa que el sistema inmune se vuelva anergico (Rausch et al., 2008). Tal el caso de *Brugia malayi* que provoca la falta de proliferación y producción de citocinas por los linfocitos T. En modelos con ratones, a los cuales este nemátodo puede infectar, se identificó el incremento en la frecuencia de células CD4+CD25+Foxp3+ en el sitio de infección, que a su vez expresan CTLA-4. Así pues, se cree que la falta de respuesta de células T se debe a la supresión por iTreg y con ello se favorece la evasión del sistema inmune del huésped (McSorley et al., 2008). En contraste la infección por *Heligmosomoides polygyrus* que causa una infección crónica en el ratón, se observó el incremento de células CD4+CD25+Foxp3+ en ganglios linfáticos con producción de TGF- β e IL-10. Dicho incremento se asocia con la supervivencia del parásito pero no es responsable de la persistencia, ya que el incremento es temporal y esta población está involucrada en controlar el efecto patológico de la infección (Rausch et al., 2008; Wilson et al., 2005).

Los tremátodos son otro tipo de helmintos que incluyen al *Schistosoma*. Estos parásitos producen infecciones crónicas en mamíferos, *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* son de importancia clínica por ser patógenos para el humano (Stavitsky, 2004). La infección de ratones con huevos de ambas especies provoca el aumento de células CD4+CD25+Foxp3+ con capacidad supresora y producción de IL-10. Sin embargo, aunque los Treg se incrementan y como consecuencia se establece la infección crónicamente, éstos ayudan a la supresión de la respuesta inmune en enfermedades como el asma (Pacífico et al., 2008; Yang et al., 2007). Además la producción de citocinas anti-inflamatorias IL-

10 y TGF- β evita el daño hepático en la infección aguda por *S. mansoni* en ratones infectados (Herbert et al., 2008).

Los protozoarios o protozoos es otro grupo de parásitos en donde se ha evaluado la participación de los linfocitos Treg como mecanismo para permanecer en el huésped. En ratones infectados con *Toxoplasma gondii* se observa el incremento de células CD4+CD25+Foxp3+ en circulación y en bazo, en la fase crónica de la infección. Prematuramente se cree que son responsables de mantener la cronicidad, sin suprimir la producción de IFN- γ (Wagner et al., 2008). En ratones crónicamente infectados con *Leishmania major* se reclutan nTreg en el sitio de infección. Éstos regulan la respuesta mediante la producción de IL-10, lo que ocasiona una eliminación ineficiente del parásito (Belkaid, 2007). *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular que causa infecciones crónicas, en las cuales la participación de los Treg ha creado controversia. Aparentemente no tienen ningún efecto en la supresión de la respuesta inmune. Sin embargo, los estudios coinciden en que la presencia de Treg en el sitio de infección ayuda a evitar el daño provocado por la respuesta exacerbada del huésped para eliminarlo (Kotner and Tarleton, 2007; Mariano et al., 2008). La infección en ratón con *P. vivax* incrementa la frecuencia de Foxp3+ Treg en la fase aguda, con aumento en la producción de IL-10. Dicha población se relaciona con la supresión de respuesta celular y humoral en malaria (Jangpatarapongsa et al., 2008). A diferencia de la participación de los linfocitos Treg en las infecciones antes mencionadas, en las causadas por *Plasmodium yoelii*, *P. chabaudi adami* ni *P.*

falciparum no se han encontrado linfocitos Treg relacionados (Cambos et al., 2008; Couper et al., 2008; Torcia et al., 2007).

En las infecciones parasitarias la participación de linfocitos Treg predominantes son los naturales. En la mayoría de los casos evitan el daño provocado por la propia respuesta montada contra el parásito. Sin embargo, ello ayuda a la permanencia del patógeno por periodos más prolongados.

Conclusión

La participación de las células T reguladoras en las infecciones tiene diferentes implicaciones dependiendo del patógeno. En el caso de los virus, la participación de los iTreg influye directamente en la evasión de la respuesta inmune. Éstos se inducen en la fase aguda de la infección y permanecen elevados en la etapa crónica. Mientras que en bacterias y parásitos se observa predominantemente el reclutamiento de nTreg en el sitio de infección. Con ello se previene el daño colateral al tejido provocado por la propia respuesta inmune. Sin embargo en algunos casos de manera indirecta se favorece la permanencia del patógeno. Por tanto, la inducción de Treg en una infección no necesariamente es perjudicial para el huésped. Sin embargo, el estado persistente o crónico de la infección puede implicar mayores riesgos para la salud individual o colectiva. Individualmente con el paso del tiempo, trae consigo el deterioro de los tejidos u órganos infectados por los factores intrínsecos y no inmunológicos. Así como, un mayor número de personas o animales portadores de un virus o patógeno, es un

factor de riesgo para la población, ya que pueden contagiar y con ello diseminar el virus a otras personas.

Referencias

- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 74, 10834-10837.
- Amarnath, S., Dong, L., Li, J., Wu, Y., Chen, W., 2007, Endogenous TGF-beta activation by reactive oxygen species is key to Foxp3 induction in TCR-stimulated and HIV-1-infected human CD4+CD25- T cells. *Retrovirology* 4, 57.
- Antunes, I., Tolaini, M., Kissenpfennig, A., Iwashiro, M., Kuribayashi, K., Malissen, B., Hasenkrug, K., Kassiotis, G., 2008, Retrovirus-specificity of regulatory T cells is neither present nor required in preventing retrovirus-induced bone marrow immune pathology. *Immunity* 29, 782-794.
- Balkow, S., Krux, F., Loser, K., Becker, J.U., Grabbe, S., Dittmer, U., 2007, Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells. *Blood* 110, 3949-3958.
- Banerjee, D.K., Dhodapkar, M.V., Matayeva, E., Steinman, R.M., Dhodapkar, K.M., 2006, Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108, 2655-2661.
- Barboza, L., Salmen, S., Goncalves, L., Colmenares, M., Peterson, D., Montes, H., Cartagirone, R., Gutierrez Mdel, C., Berrueta, L., 2007, Antigen-induced regulatory T cells in HBV chronically infected patients. *Virology* 368, 41-49.
- Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H.S., Xiao, Z., Murtaugh, M., 2004, Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 68, 267-273.
- Baumforth, K.R., Birgersdotter, A., Reynolds, G.M., Wei, W., Kapatai, G., Flavell, J.R., Kalk, E., Piper, K., Lee, S., Machado, L., Hadley, K., Sundblad, A., Sjoberg, J., Bjorkholm, M., Porwit, A.A., Yap, L.F., Teo, S., Grundy, R.G., Young, L.S., Ernberg, I., Woodman, C.B., Murray, P.G., 2008, Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol* 173, 195-204.
- Belkaid, Y., 2007, Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7, 875-888.
- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D., 1992, Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4, 127-133.
- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Das, S., Powell, D.W., Reyes, V.E., 2007, Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Infect Immun* 75, 4334-4341.
- Borges, T.J., Porto, B.N., Teixeira, C.A., Rodrigues, M., Machado, F.D., Ornaghi, A.P., de Souza, A.P., Maito, F., Pavanelli, W.R., Silva, J.S., Bonorino, C., 2010, Prolonged survival of allografts

- induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS One* 5, e14264.
- Cabrera, G., Burzyn, D., Mundinano, J., Courreges, M.C., Camicia, G., Lorenzo, D., Costa, H., Ross, S.R., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., 2008, Early increases in superantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells during mouse mammary tumor virus infection. *J Virol* 82, 7422-7431.
- Cambos, M., Belanger, B., Jacques, A., Roulet, A., Scorza, T., 2008, Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol* 38, 229-238.
- Carbonneil, C., Donkova-Petrini, V., Aouba, A., Weiss, L., 2004, Defective dendritic cell function in HIV-infected patients receiving effective highly active antiretroviral therapy: neutralization of IL-10 production and depletion of CD4+CD25+ T cells restore high levels of HIV-specific CD4+ T cell responses induced by dendritic cells generated in the presence of IFN- α . *J Immunol* 172, 7832-7840.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2007, Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J Immunol* 178, 179-185.
- Cavanagh, D., 1997, Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142, 629-633.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A., 2007, The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2007a, Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2007b, Regulatory T cells and human disease. *Clinical & developmental immunology* 89195.
- Corthay, A., 2009, How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326-336.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Goddeeris, B., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009, Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3(+)CD8(high) cells. *Vet Res* 40, 46.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Wilson, M.S., Hafalla, J.C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R.A., de Souza, J.B., Riley, E.M., 2008, IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* 4, e1000004.
- Charentantanakul, 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 Immunol* 19, 646-661.
- Chase, A.J., Yang, H.C., Zhang, H., Blankson, J.N., Siliciano, R.F., 2008, Preservation of FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4+ T-cell activation. *J Virol* 82, 8307-8315.
- Chen, W., Zhou, D., Torrealba, J.R., Waddell, T.K., Grant, D., Zhang, L., 2005, Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 175, 3409-3416.
- Chen, X., Zhou, B., Li, M., Deng, Q., Wu, X., Le, X., Wu, C., Larmonier, N., Zhang, W., Zhang, H., Wang, H., Katsanis, E., 2007, CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress

- Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123, 50-59.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A., 1995, Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7, 456-464.
- Dawson, H.D., Royae, A.R., Nishi, S., Kuhar, D., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F., Urban, J., Jr., Lunney, J.K., 2004, Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 100, 105-111.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2005, Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 86, 1943-1951.
- 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.
- Ertelt, J.M., Rowe, J.H., Johanns, T.M., Lai, J.C., McLachlan, J.B., Way, S.S., 2009, Selective priming and expansion of antigen-specific Foxp3⁻ CD4⁺ T cells during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 182, 3032-3038.
- Estes, J.D., Li, Q., Reynolds, M.R., Wietgreffe, S., Duan, L., Schacker, T., Picker, L.J., Watkins, D.I., Lifson, J.D., Reilly, C., Carlis, J., Haase, A.T., 2006, Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 193, 703-712.
- Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C.A., Andreesen, R., Mackensen, A., 2005, Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4⁽⁻⁾CD8⁻ double-negative regulatory T cells. *Blood* 105, 2828-2835.
- 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. *Clin Vaccine Immunol* 15, 720-725.
- Fogle, J.E., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B., 2010, CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells from FIV⁺ cats induce a unique anergic profile in CD8⁺ lymphocyte targets. *Retrovirology* 7, 97.
- Guyot-Revollat, V., Innes, J.A., Hackforth, S., Hinks, T., Lalvani, A., 2006, Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 803-810.
- Hall, C.H., Kassel, R., Tacke, R.S., Hahn, Y.S., 2010, HCV⁺ hepatocytes induce human regulatory CD4⁺ T cells through the production of TGF-beta. *PLoS One* 5, e12154.
- Harris, P.R., Wright, S.W., Serrano, C., Riera, F., Duarte, I., Torres, J., Pena, A., Rollan, A., Viviani, P., Guiraldes, E., Schmitz, J.M., Lorenz, R.G., Novak, L., Smythies, L.E., Smith, P.D., 2008, *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology* 134, 491-499.
- Herbert, D.R., Orekov, T., Perkins, C., Finkelman, F.D., 2008, IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *J Immunol* 181, 7214-7220.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Hougardy, J.M., Verscheure, V., Loch, C., Mascart, F., 2007, In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low}/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *Microbes Infect* 9, 1325-1332.

- Huehn, J., Polansky, J.K., Hamann, A., 2009, Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9, 83-89.
- Imarai, M., Candia, E., Rodriguez-Tirado, C., Tognarelli, J., Pardo, M., Perez, T., Valdes, D., Reyes-Cerpa, S., Nelson, P., Acuna-Castillo, C., Maisey, K., 2008, Regulatory T cells are locally induced during intravaginal infection of mice with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 76, 5456-5465.
- Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., Hisaeda, H., Troye-Blomberg, M., Cui, L., Udomsangpetch, R., 2008, *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38, 2697-2705.
- Jarefors, S., Karlsson, M., Forsberg, P., Eliasson, I., Ernerudh, J., Ekerfelt, C., 2006, Reduced number of interleukin-12 secreting cells in patients with Lyme borreliosis previously exposed to *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Exp Immunol* 143, 322-328.
- Joshi, A., Garg, H., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2005, Preferential feline immunodeficiency virus (FIV) infection of CD4+ CD25+ T-regulatory cells correlates both with surface expression of CXCR4 and activation of FIV long terminal repeat binding cellular transcriptional factors. *J Virol* 79, 4965-4976.
- Kandulski, A., Wex, T., Kuester, D., Peitz, U., Gebert, I., Roessner, A., Malfertheiner, P., 2008, Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter* 13, 295-303.
- Kao, J.Y., Zhang, M., Miller, M.J., Mills, J.C., Wang, B., Liu, M., Eaton, K.A., Zou, W., Berndt, B.E., Cole, T.S., Takeuchi, T., Owyang, S.Y., Luther, J., 2010, *Helicobacter pylori* immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology* 138, 1046-1054.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008a, Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 92-101.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008b, Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 153-158.
- King, I.L., Segal, B.M., 2005, Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J Immunol* 175, 641-645.
- Kinter, A., McNally, J., Riggan, L., Jackson, R., Roby, G., Fauci, A.S., 2007a, Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3390-3395.
- Kinter, A.L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., Ziegler, S.F., Fauci, A.S., 2004, CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200, 331-343.
- Kinter, A.L., Horak, R., Sion, M., Riggan, L., McNally, J., Lin, Y., Jackson, R., O'Shea, A., Roby, G., Kovacs, C., Connors, M., Migueles, S.A., Fauci, A.S., 2007b, CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23, 438-450.
- Kotner, J., Tarleton, R., 2007, Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 75, 861-869.
- Lehman, T.L., O'Halloran, K.P., Fallon, S.A., Habermann, L.M., Campbell, J.A., Nordone, S., Dean, G.A., Hoover, E.A., Avery, P.R., 2009, Altered bone marrow dendritic cell cytokine

- production to toll-like receptor and CD40 ligation during chronic feline immunodeficiency virus infection. *Immunology* 126, 405-412.
- Li, S., Gowans, E.J., Chougnet, C., Plebanski, M., Dittmer, U., 2008, Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 82, 21-30.
- Li, Y.N., Liu, X.L., Huang, F., Zhou, H., Huang, Y.J., Fang, F., 2010, CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the immune responses of mouse embryo fibroblasts to murine cytomegalovirus infection. *Immunol Lett* 131, 131-138.
- Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004, Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 155-163.
- 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.
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A.M., Lundin, B.S., 2003, Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755-1762.
- Lundgren, A., Trollmo, C., Edebo, A., Svennerholm, A.M., Lundin, B.S., 2005, Helicobacter pylori-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Infect Immun* 73, 5612-5619.
- MacDonald, A.J., Duffy, M., Brady, M.T., McKiernan, S., Hall, W., Hegarty, J., Curry, M., Mills, K.H., 2002, CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 185, 720-727.
- Manigold, T., Shin, E.C., Mizukoshi, E., Mihalik, K., Murthy, K.K., Rice, C.M., Piccirillo, C.A., Rehermann, B., 2006, Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* 107, 4424-4432.
- Mariano, F.S., Gutierrez, F.R., Pavanelli, W.R., Milanezi, C.M., Cavassani, K.A., Moreira, A.P., Ferreira, B.R., Cunha, F.Q., Cardoso, C.R., Silva, J.S., 2008, The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. *Microbes Infect* 10, 825-833.
- Mateu, E., Diaz, I., 2008, The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 177, 345-351.
- McSorley, H.J., Harcus, Y.M., Murray, J., Taylor, M.D., Maizels, R.M., 2008, Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi. *J Immunol* 181, 6456-6466.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003, Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.
- Meier, W.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Osorio, F.A., Lunney, J.K., Zuckermann, F.A., 2004, Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 299-314.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., 1994, Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1795-1801.
- Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., 1995, Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.
- Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55, 197-202.

- Mexas, A.M., Fogle, J.E., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B., 2008a, CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 263-272.
- Mexas, A.M., Fogle, J.E., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B., 2008b, CD4+CD25+ regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 263-272.
- Miyara, M., Sakaguchi, S., 2007, Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13, 108-116.
- Mizukoshi, F., Baba, K., Horiuchi, H., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K., Moore, P.F., Tsujimoto, H., 2009, Characterization of monocyte-derived dendritic cells from cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci* 71, 865-871.
- Molina, R.M., Cha, S.H., Chittick, W., Lawson, S., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J., Evans, R., Rowland, R.R., Wu, W.H., Zimmerman, J.J., 2008, Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 283-292.
- Motta, A., Schmitz, C., Rodrigues, L., Ribeiro, F., Teixeira, C., Detanico, T., Bonan, C., Zwickey, H., Bonorino, C., 2007, Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology* 121, 462-472.
- Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002, Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15, 533-547.
- Myers, L., Messer, R.J., Carmody, A.B., Hasenkrug, K.J., 2009, Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8+ T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *J Immunol* 183, 1636-1643.
- Nesburn, A.B., Bettahi, I., Dasgupta, G., Chentoufi, A.A., Zhang, X., You, S., Morishige, N., Wahlert, A.J., Brown, D.J., Jester, J.V., Wechsler, S.L., BenMohamed, L., 2007, Functional Foxp3+ CD4+ CD25(Bright+) "natural" regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4+ and CD8+ effector T cells during ocular herpes infection. *J Virol* 81, 7647-7661.
- 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. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.
- Niedbala, W., Wei, X.Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2007, IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 37, 3021-3029.
- Pacifico, L.G., Marinho, F.A., Fonseca, C.T., Barsante, M.M., Pinho, V., Sales, P.A.J., Cardoso, L.S., Araujo, M.I., Carvalho, E.M., Cassali, G.D., Teixeira, M.M., Oliveira, S.C., 2008, Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+CD25+Foxp3+ T cells independent of IL-10. *Infect Immun*.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Sun, Z., Chen, Y., Chen, Z., 2008, Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 123, 57-65.
- Petty, C.S., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2008, Transforming growth factor-beta/transforming growth factor-betaRII signaling may regulate CD4+CD25+ T-regulatory cell homeostasis and suppressor function in feline AIDS lentivirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47, 148-160.

- Rad, R., Brenner, L., Bauer, S., Schwendy, S., Layland, L., da Costa, C.P., Reindl, W., Dossumbekova, A., Friedrich, M., Saur, D., Wagner, H., Schmid, R.M., Prinz, C., 2006, CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology* 131, 525-537.
- Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Scheffold, A., Hamann, A., Lucius, R., Hartmann, S., 2008, Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection. *Infect Immun* 76, 1908-1919.
- Ribeiro-Rodrigues, R., Resende Co, T., Rojas, R., Toossi, Z., Dietze, R., Boom, W.H., Maciel, E., Hirsch, C.S., 2006, A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144, 25-34.
- Rieger, K., Loddenkemper, C., Maul, J., Fietz, T., Wolff, D., Terpe, H., Steiner, B., Berg, E., Miehle, S., Bornhauser, M., Schneider, T., Zeitz, M., Stein, H., Thiel, E., Duchmann, R., Uharek, L., 2006, Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 107, 1717-1723.
- Robertson, S.J., Messer, R.J., Carmody, A.B., Hasenkrug, K.J., 2006, In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* 176, 3342-3349.
- Robinson, K., Kenefick, R., Pidgeon, E.L., Shakib, S., Patel, S., Polson, R.J., Zaitoun, A.M., Atherton, J.C., 2008, *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut* 57, 1375-1385.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, M.K., 2006, Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.
- Shevach, E.M., 2006, From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.
- 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.
- Smyk-Pearson, S., Golden-Mason, L., Klarquist, J., Burton, J.R., Jr., Tester, I.A., Wang, C.C., Culbertson, N., Vandenbark, A.A., Rosen, H.R., 2008, Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 197, 46-57.
- Sojka, D.K., Huang, Y.H., Fowell, D.J., 2008, Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.
- Stavitsky, A.B., 2004, Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect Immun* 72, 1-12.
- Stoop, J.N., Claassen, M.A., Woltman, A.M., Binda, R.S., Kuipers, E.J., Janssen, H.L., van der Molen, R.G., Boonstra, A., 2008, Intrahepatic regulatory T cells are phenotypically distinct from their peripheral counterparts in chronic HBV patients. *Clin Immunol* 129, 419-427.
- Suffia, I.J., Reckling, S.K., Piccirillo, C.A., Goldszmid, R.S., Belkaid, Y., 2006, Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 203, 777-788.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., Akdis, C.A., 2006, Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 117, 433-442.
- Thorborn, G., Pomeroy, L., Isohanni, H., Perry, M., Peters, B., Vyakarnam, A., 2010, Increased sensitivity of CD4+ T-effector cells to CD4+CD25+ Treg suppression compensates for reduced Treg number in asymptomatic HIV-1 infection. *PLoS One* 5, e9254.

- Todd, S., Cecere, T., LeRoith, T., 2010, Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus structural protein epitopes that induce CD4+CD24+Foxp3+ regulatory T cells in vitro. 2010 International PRRS Symposium Chicago, USA.
- Torcia, F., Salvatori, M.M., Valente, A., Di Netta, T., Mattioli, C., Pacifici, E., Moscarini, M., 2007, Spontaneous in utero second-trimester resolution of isolated mild fetal megalourethra. *J Ultrasound Med* 26, 1625-1628.
- Ureta, G., Osorio, F., Morales, J., Roseblatt, M., Bono, M.R., Fierro, J.A., 2007, Generation of dendritic cells with regulatory properties. *Transplant Proc* 39, 633-637.
- Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2004, Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 172, 4752-4761.
- Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2005, The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 219-225.
- van der Linden, I.F., van der Linde-Bril, E.M., Voermans, J.J., van Rijn, P.A., Pol, J.M., Martin, R., Steverink, P.J., 2003, Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 97, 45-54.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003, Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77, 8207-8215.
- Voo, K.S., Peng, G., Guo, Z., Fu, T., Li, Y., Frappier, L., Wang, R.F., 2005, Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 65, 1577-1586.
- Wagner, A., Forster-Waldl, E., Garner-Spitzer, E., Schabussova, I., Kundi, M., Pollak, A., Scheiner, O., Joachim, A., Wiedermann, U., 2008, Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *Int J Parasitol*.
- 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. *Arch Virol* 152, 289-303.
- Weiss, L., Donkova-Petrini, V., Caccavelli, L., Balbo, M., Carbonneil, C., Levy, Y., 2004, Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood* 104, 3249-3256.
- Wilson, M.S., Taylor, M.D., Balic, A., Finney, C.A., Lamb, J.R., Maizels, R.M., 2005, Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 202, 1199-1212.
- 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). *Vet Immunol Immunopathol*.
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 2001, A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004, The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 78, 5923-5933.
- Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., Zhao, J.M., Zhang, B., Shi, M., Ding, X., Tang, Z., Fu, Y.X., Wang, F.S., 2006, Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 177, 739-747.

- Yang, J., Zhao, J., Yang, Y., Zhang, L., Yang, X., Zhu, X., Ji, M., Sun, N., Su, C., 2007, Schistosoma japonicum egg antigens stimulate CD4 CD25 T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* 120, 8-18.
- Zelinskyy, G., Dietze, K.K., Husecken, Y.P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K., Kershaw, O., Gruber, A.D., Sparwasser, T., Dittmer, U., 2009, The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood* 114, 3199-3207.
- Zhang, J.Y., Song, C.H., Shi, F., Zhang, Z., Fu, J.L., Wang, F.S., 2010, Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment. *PLoS One* 5, e13869.
- Zuckermann, F.A., 1999, Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 55-66.

Capítulo 2

Inducción de células T reguladoras T helper 3 por células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, genotipo americano

Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387:373-9.

Resumen

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es considerada una de las enfermedades más devastadoras de la industria porcina alrededor del mundo, debido a su impacto en la producción de cerdo. Es causada por el virus del PRRS (PRRSV), que pertenece al orden de los Nidovirales, familia Arteriviridae y género *Arterovirus*. Este virus tiene la capacidad de replicarse y persistir hasta 150 días post-infección (pi). La respuesta inmune celular aparece hasta las 2 semanas pi y es detectable hasta las 9 ó 14 semanas pi. Sin embargo, los niveles de IFN- γ secretados por estas células son bajos. Los mecanismos involucrados en esta respuesta inusual y deficiente se atribuyen a la capacidad del virus de modular la respuesta inmune en las primeras semanas pi. Particularmente, tiene la capacidad de infectar células dendríticas (DCs) y modular su función. Uno de los mecanismos que utilizan los virus para evadir el sistema inmune es la inducción de células T reguladoras (Treg). El fenotipo convencional es CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ las cuales pueden ser naturales e inducidas. También se clasifican de acuerdo al perfil de citocinas que producen: Treg1 (TR1) productoras de IL-10, T helper 3 (Th3) productoras de TGF- β y Foxp3⁺ (no secretoras de citocinas). En esta etapa se evaluó la inducción de células Treg por células dendríticas infectadas con PRRSV. Los resultados mostraron que las DCs infectadas con PRRSV indujeron un incremento de células CD25⁺Foxp3⁺ respecto al control. Además, dicho efecto fue revertido con la adición de IFN- α al cultivo. Al analizar la expresión de citocinas se observó un incremento de TGF- β y no IL-10. Además, la expresión de Foxp3 se observó incrementada pero no los factores de

transcripción TBX21 y GATA-3, que inducen la respuesta Th1 y Th2, respectivamente. Por último, se detectó que los linfocitos estimulados con DCs infectadas tenían la capacidad de suprimir la proliferación de células mononucleares estimuladas con PHA. En conclusión, pudimos detectar que las DCs infectadas con PRRSV tienen la capacidad de inducir células Treg a partir de linfocitos vírgenes con fenotipo Th3. Estos resultados sugieren que el PRRSV es capaz de retrasar la respuesta inmune celular al infectar DCs y con ello generar Treg en la fase temprana de la infección como un mecanismo para evadir el sistema inmune porcino.

Capítulo 3

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino genotipo europeo infecta células dendríticas derivadas de monocito, pero no induce células T reguladoras

Erika Silva-Campa, Lorena Cordova, Lorenzo Fraile Lilian Flores-Mendoza, María Montoya, and Jesús Hernández (2009). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells, but does not induce Tregs cells. *Virology* 396:264-271.

Resumen

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) está distribuido a nivel mundial y causa grandes pérdidas económicas a la industria porcina. El virus se clasifica en dos genotipos el tipo 1 (europeo) y 2 (americano). Ambos presentan una identidad nucleotídica entre el 55 y 70%. Se ha descrito que existen variaciones en la patogenicidad entre los genotipos, tales como la susceptibilidad de las diferentes células a la infección y la duración de la viremia que es menor en cerdos infectados con cepas europeas respecto a las americanas. Este fenómeno puede estar influenciado por la respuesta inmune. La inducción de la respuesta celular es baja para ambos genotipos; sin embargo, las células secretoras de IFN- γ específicas para PRRSV pueden ser detectadas inclusive a los 7 días post-infección (pi), mientras que para las cepas americanas son detectadas entre los 14 y 28 días pi. Se conoce la capacidad de las cepas americanas de infectar y modular la función de las DCs, así como su capacidad de producir IL-10 y TGF- β , y con ello la inducción potencial de células T reguladoras (Treg). Sin embargo, poco se conoce respecto a las cepas europeas, algunas tienen la capacidad de inducir la secreción de IL-10. Debido a que uno de los mecanismos utilizados por los virus para evadir al sistema inmune es la inducción de Treg, en este trabajo se evaluó la capacidad de cepas de PRRSV españolas para infectar DCs y modular su respuesta, inducir la activación de los linfocitos T y expansión de Treg. Los resultados mostraron que las cepas utilizadas (n=5) fueron capaces de infectar y replicarse en DCs tan eficientemente como en macrófagos. Sin embargo, los niveles de moléculas de MHC-II permanecieron sin cambios,

mientras que la expresión de moléculas de MHC-I solo se vio afectada por la cepa altamente inductora de IL-10. No se detectaron evidencias de inducción de Treg al medir la frecuencia de células CD25⁺Foxp3⁺. Al evaluar la producción de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β en los sobrenadantes de los cultivos de DCs infectadas, solo dos cepas fueron capaces de inducir IL-10, ninguna provocó la producción de TGF- β . Sin embargo, en ninguno de los casos se pudo detectar la inducción de IFN- γ en los co-cultivos con linfocitos. En conclusión las DCs infectadas con las cepas de PRRSV europeas no tienen la capacidad de inducir la correcta activación de células T, además se observó que la respuesta es dependiente de cada cepa y su capacidad inductora de citocinas. Sin embargo, la falta de respuesta celular no se asoció con la inducción de Treg, al menos *in vitro*. Con estos resultados surge la hipótesis de que la inducción de Treg en cerdo puede ser dependiente del TGF- β y no solo de IL-10 como en otras especies.

Capítulo 4

**Frecuencia de células T CD4⁺Foxp3⁺ en
sementales infectados con el virus del
síndrome reproductivo y respiratorio porcino**

**E. Silva-Campa, V. Mata and J. Hernández.
CD4⁺Foxp3⁺ T cells in boars infected with porcine
reproductive and respiratory syndrome virus. Short
Communications, Research in Veterinary Science.
Manuscrito terminado.**

Reumen

La infección por PRRSV se caracteriza por desórdenes reproductivos en cerdas, desórdenes respiratorios en lechones y pocos o ningún síntoma en sementales. Los efectos en los sementales van desde anorexia, letargia, pérdida del libido y calidad del semen. El semen es una fuente de transmisión del virus, ya que puede ser secretado en éste en ausencia de viremia. La persistencia y secreción intermitente del PRRSV en semen puede prolongarse hasta 92 días post-infección. El establecimiento de infecciones persistentes y crónicas se asocia con el incremento de células T reguladoras (Treg) en sangre o en tejidos afectados. Estas células suprimen la activación de la respuesta inmune celular mediada por células productoras de IFN- γ , en cerdos infectados con PRRSV es muy débil y en un estudio reciente se observó que la intensidad de la respuesta es aún más baja en infecciones persistentes. Por otra parte, el mecanismo inmune involucrado en la persistencia y secreción intermitente del virus en semen se desconoce en su totalidad. En esta etapa se realizó un estudio exploratorio para describir la frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺ en sementales infectados naturalmente con PRRSV. En esta parte de la investigación evaluamos a las potenciales Treg con el fenotipo CD4⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺ y CD25⁺Foxp3⁺, y se evaluó la expresión de citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β . Se colectaron muestras de sangre y semen de sementales provenientes de dos granjas con status sanitario similar excepto que una de ellas es PRRSV positiva. Se determinó la carga viral en suero y semen, así como anticuerpos anti-PRRSV, con ello se

obtuvieron los grupos PRRSV positivos (n=9) y PRRSV negativos (n=5). Al evaluar la frecuencia de Treg se observó que en los animales positivos el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺ fue mayor respecto a los no infectados. No se detectaron diferencias en la frecuencia de células CD8⁺Foxp3⁺ y sólo un ligero incremento en las CD25⁺Foxp3⁺. Para evaluar la expresión de citocinas anti-inflamatorias se estimularon CMN con PRRSV y se observó un incremento en la expresión de TGF- β solo en el grupo de los animales infectados y no se observaron cambios para la IL-10. La conclusión de este estudio exploratorio fue que las células con fenotipo regulador CD4⁺Foxp3⁺ podrían estar involucradas en la persistencia y/o secreción intermitente del PRRSV en semen.

**CD4⁺Foxp3⁺ T cells in boars infected with porcine reproductive and
respiratory syndrome virus**

E. Silva-Campa, V. Mata and J. Hernández*

Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
A.C. Hermosillo, Sonora, México

* Corresponding author: Tel/Fax +52 662 2800010.

E-mail address: jhdez@ciad.mx (Jesús Hernández).

Abstract

In this study, we describe regulatory T cells (Treg) defined as CD4⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺ and CD25⁺Foxp3⁺ phenotype, and regulatory cytokines (TGF- β and IL-10) expression in boars naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Blood samples were collected from two farms located in Sonora, Mexico to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and to analyze the percentages of Treg cells. The results showed that CD4⁺Foxp3⁺ cells in infected boars (n=9) were greater than uninfected boars (n=5). The mRNA expression of regulatory cytokines in PRRSV-stimulated PBMCs showed an increase of TGF- β . In conclusion, this exploratory study describes cells that can phenotypically represent Treg and further studies will help to explain if these Treg participate in persistence and/or intermittence of infected boars.

Key words: PRRSV, regulatory T cells, Foxp3, TGF- β , IL-10

Abbreviations: PRRSV, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. TGF, transformer grown factor. IL, interleukin., Phytohaemagglutinin, PHA. regulatory T cells (Treg).

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the pathogen responsible for significant losses in the swine industry (Neumann et al., 2005). Infection with PRRSV is characterized by reproductive disorders in sows, respiratory distress in young pigs, and mild or no symptoms in boars. In boars, clinical manifestations include anorexia, lethargy, and loss of libido. In addition, alterations in the quality of semen, including a decrease in sperm motility, an increase in morpho-anomalies and cytoplasmic droplets, and a decrease in the percentage of spermatozoa with a normal acrosome are observed (Christopher-Hennings et al., 2008). PRRSV can be shed in the semen of infected boars, even in the absence of viremia and in the presence of neutralizing antibodies ([Christopher-Hennings et al., 2008] and [Prieto and Castro, 2005]). However, the duration of shedding in semen is inconsistent among boars and depends on multiple factors, such as breed (Christopher-Hennings et al., 2001). Various reports describe a broad range for shedding of PRRSV in semen, which can occur between 2 and 92 days post-infection (DPI) from experimentally infected boars (Maes et al., 2008). Because PRRSV was isolated in the bulbourethral gland of boars at 101 DPI, it is possible that intermittent persistent shedding may have occurred for longer than 92 DPI (Christopher-Hennings et al., 1995).

Persistent and chronic infections are linked to the induction of regulatory T cells (Treg) as a way to escape the immune response. These inductions and the resultant infections have also been described for human immunodeficiency virus, hepatitis virus C and B, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus ([Kinter et al., 2004], [Peng et al., 2008], [Rieger et al., 2006], [Smyk-Pearson et al., 2008], [Vahlenkamp et al., 2005] and [Voo et al., 2005]). Cell mediated immune (CMI)

response in young pigs infected with genotype-II of PRRSV appears transiently between 14 to 56 days after infection and becomes more pronounced months later. Low levels of IFN- γ secreting cells are detectable between 14 to 28 DPI with a gradual increase in the intensity of the IFN- γ ([Batista et al., 2004], [Meier et al., 2003], [Meier et al., 2004] and [Xiao et al., 2004]). However, a longitudinal study reported that IFN- γ response is lower in persistent infections rather than in acute infections (Molina et al., 2008). Moreover, the mechanisms involved in the immune response in boars are not entirely clear, especially when related to persistent and intermittent shedding of PRRSV in semen. In a previous report from our laboratory, it was proposed that the low and delayed cellular mediated immune response is due in part to the induction of Treg (Silva-Campa et al., 2009). The objective of this exploratory study was to describe the frequency of CD4⁺Foxp3⁺ and CD8⁺Foxp3⁺ cells in boars naturally infected with PRRSV.

Boars from two different farms were sampled: boars from farm A had a positive PRRS status but no outbreak at the moment of sampling (n=9); and boars from farm B were negative for PRRS with no record of the disease (n=5). PRRS status was confirmed by the presence of anti-PRRSV antibodies and virus in semen and serum. As expected, boars from farm B (negative for PRRS) did not show antibodies against PRRSV; in contrast, 8 out of 9 boars from farm A (positive for PRRS) presented S/P values over 0.4 (IDEXX Laboratory, Inc.). The analysis for viremia showed that 7 out of 9 boars were positive (range from 1.6×10^2 to 2×10^3) and only 3 out of 9 were shedding the virus in semen (range from 2.1×10^2 to

2.4x10²) (Tetracore, Inc.). These results confirmed the negative and positive status of the boars.

The frequency of Treg cells was analyzed with the phenotype CD4⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺, and CD25⁺Foxp3⁺ on PBMCs from the two groups of boars. Cells were stained with anti-porcine CD25 (AbDSerotec, MCA1736 clone K231.3B2), CD4 or CD8 (VMRD, Inc., 74-12-4 and 76-2-11, respectively), followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, molecular probes). Intracellular staining for Foxp3 was performed with anti-rat/mouse Foxp3 PE (eBioscience, clone FJK-16s) using Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience). Frequency was calculated for each population using the WinMDI 2.9 software, (Figure 1e). Results showed that cells with phenotype CD4⁺Foxp3⁺ were significantly greater in infected boars compared with those uninfected (7.2 ± 1.7% vs. 4.9 ± 1.6%, respectively) (p<0.05) (Figure 1a). In contrast, no differences were observed when the CD8⁺Foxp3⁺ population was compared in infected and uninfected boars (2.7 ± 1.2% vs. 3.5 ± 1.7%, respectively) (Figure 1b). The analysis of the CD25⁺Foxp3⁺ population was also evaluated and a discrete increase was observed in infected boars (Figure 1c). The total percentage of CD4⁺ cells in infected boars was lower than in uninfected boars (24 ± 7% vs. 40 ± 12%, respectively) (p<0.05). A similar result was observed when CD8⁺ cells were compared in the boar populations (44 ± 10% vs. 56 ± 9%, respectively) (Figure 1d) (p<0.05).

Finally, the mRNA expression of regulatory cytokines TGF-β and IL-10 was evaluated by real time RT-PCR in PBMCs stimulated with PRRSV strain CIAD008

and PHA. Figure 2 shows that similar levels of IL-10 were observed in infected or uninfected boars ($p>0.05$) when PBMCs were stimulated with the virus or PHA. However, TGF- β expression was increased in PBMCs from infected swine when stimulated with PRRSV ($p<0.05$) and no changes were observed in PHA-stimulated cells (Figure 2). Primers sequences from Porcine Immunology and Nutrition database (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6065>), RPL32 (ribosomal protein L32).

In this study, we evaluated if boars naturally exposed to PRRSV present with an elevated percentage of Treg cells. The percentage of CD4⁺Foxp3⁺ and CD8⁺Foxp3⁺ lymphocytes was evaluated as an indirect way to presumptively identify a population of Treg cells. Results showed an increase of CD4⁺Foxp3⁺ cells in PRRSV infected swine but no differences were observed for the CD8⁺Foxp3⁺ cells. CD25⁺Foxp3⁺ cells showed a narrow increase in infected boar. In addition, PRRSV stimulation of PBMCs increased the mRNA expression of TGF- β . According to our results, we can assume that CD4⁺Foxp3⁺ populations represent Treg cells that were induced in boars naturally infected with PRRSV. To our knowledge, this is the first time that Treg cells were described in infected boars.

Previous reports have described how viruses developed the ability to induce Treg cells to suppress the immune response and provoke the persistence or chronicity of infection in the host. In the case of PRRSV, we reported that infected dendritic cells (DCs) induce Treg cells and the production of TGF- β (Silva-Campa et al., 2009). Other authors have shown that PBMCs re-stimulated with PRRSV

also increase Treg cells (Wongyanin et al., 2009). Based on previous reports, it is possible to assume that Tregs are present in infected swine and the induction of Treg in infected boars could be a reasonable explanation for the lengthy or intermittent shedding of the virus in semen.

In this study, we confirmed that boars were infected with PRRSV but the exact time of infection was unknown. This represents a limitation because it is not possible to assume if the induction of Treg was time-dependent or whether it is linked to the persistence and/or shedding of the virus. However, it was possible to identify an increment of Treg cells. Also, we observed low percentages of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in infected boars and similar results were recently reported by Molina *et al.* (2008), lymphopenia accompanied by a diminution on CD4⁺ and CD8⁺ cells was reported in chronically PRRSV-infected pigs that correspond with a persistent infection (Molina et al., 2008).

The induction of Treg cells by viruses as a way to provoke persistent and chronic infection has been described in another study (Vahlenkamp et al., 2005). However, in swine, no information on this phenomenon is available, only the description of Treg cells has been reported. Actually, in swine have been identified two populations, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD8a⁺MHC-II⁺ described as a natural and activated or memory-like Treg, respectively (Kaser et al., 2008). The increase of CD4⁺Foxp3⁺ Treg in PRRSV-infected boars and the effects on persistent infection and intermittent shedding in semen needs further study. Controlled longitudinal studies that confirm if Treg cells are responsible for

immunopathology in boars need to be performed. However, this exploratory study describes for the first time that Treg cells are present in infected boars and it could help to explain the host immune response to PRRSV.

Acknowledgments

This work was supported by SEP-CONACyT grant 82850. We are grateful to M en C Adriana Bolaños for her assistance in manuscript editing and QB Mónica Reséndiz and QB Ana Karina Espinoza Villalba for her technical support.

References

Batista et al., 2004 L. Batista, C. Pijoan, S. Dee, M. Olin, T. Molitor, H.S. Joo, Z. Xiao and M. Murtaugh, Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 68 (2004), pp. 267-273.

Christopher-Hennings et al. 2001 J. Christopher-Hennings, L.D. Holler, D.A. Benfield and E.A. Nelson, Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest* 13 (2001), pp. 133-142.

Christopher-Hennings et al., 2008 J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, G.C. Althouse and J. Lunney, Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Anim Health Res Rev* 9 (2008), pp. 59-69.

Christopher-Hennings et al., 1995 J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, R.J. Hines, J.K. Nelson, S.L. Swenson, J.J. Zimmerman, C.L. Chase, , M.J. Yaeger and D.A. Benfield, Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7 (1995), pp. 456-464.

Kaser et al. 2008 T. Kaser, W. Gerner, S.E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller, Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 125 (2008), pp. 92-101.

Kinter et al., 2004 A.L. Kinter, M. Hennessey, A. Bell, S. Kern, Y. Lin, M. Daucher, M. Planta, M. McGlaughlin, R. Jackson, S.F. Ziegler and A.S. Fauci, CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200 (2004), pp. 331-343.

Li et al., 2008 S. Li, E.J. Gowans, C. Chougnet, M. Plebanski and U. Dittmer, Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 82 (2008), pp. 21-30.

Maes et al., 2008 D. Maes, H. Nauwynck, T. Rijsselaere, B. Mateusen, P. Vyt, A. de Kruif and A. Van Soom, Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70 (2008), pp. 1337-1345.

Meier et al., 2003 W.A. Meier, J. Galeota, F.A. Osorio, R.J. Husmann, W.M. Schnitzlein and F.A. Zuckermann, Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309 (2003), pp. 18-31.

Meier et al., 2004 W.A. Meier, R.J. Husmann, W.M. Schnitzlein, F.A. Osorio, J.K. Lunney and F.A. Zuckermann, Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102 (2004), pp. 299-314.

Molina et al., 2008 R.M. Molina, S.H. Cha, W. Chittick, S. Lawson, M.P. Murtaugh, E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, K.J. Yoon, R. Evans, R.R. Rowland, W.H. Wu, J.J. Zimmerman, Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Vet Immunol Immunopathol* 126 (2008), pp. 283-292.

Neumann et al., 2005 E.J. Neumann, J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H. Seitzinger, A.L. Green and J.J. Zimmerman, Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227 (2005), pp. 385-392.

Peng et al., 2008 G. Peng, S. Li, W. Wu, Z. Sun, Y. Chen and Z. Chen, Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 123 (2008), pp. 57-65.

Prieto and Castro 2005 C. Prieto and J.M. Castro, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63 (2005), pp. 1-16.

Rieger et al., 2006 K. Rieger, C. Loddenkemper, J. Maul, T. Fietz, D. Wolff, H. Terpe, B. Steiner, E. Berg, S. Miehlke, M. Bornhauser, T. Schneider, M. Zeitz, H. Stein, E. Thiel, R. Duchmann and L. Uharek, Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 107 (2006), pp. 1717-1723.

Silva-Campa et al., 2009 E. Silva-Campa, L. Flores-Mendoza, M. Resendiz, A. Pinelli-Saavedra, V. Mata-Haro, W. Mwangi, and J. Hernandez, Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387 (2009), pp. 373-379.

Smyk-Pearson et al., 2008 S. Smyk-Pearson, L. Golden-Mason, J. Klarquist, J.R. Jr. Burton, I.A. Tester, C.C. Wang, N. Culbertson, A.A. Vandebark, H.R. Rosen, Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 197 (2008), pp.46-57.

Vahlenkamp et al., 2005 T.W. Vahlenkamp, M.B. Tompkins and W.A. Tompkins, The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 108 (2005), pp. 219-225.

Voo et al., 2005 K.S. Voo, G. Peng, Z. Guo, T. Fu, Y. Li, L. Frappier and R.F. Wang, Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 65 (2005), pp. 1577-1586.

Wongyanin et al., 2009 P. Wongyanin, S. Buranapraditkun, K. Chokeshai-Usaha, R. Thanawonguwech and S. Suradhat, Induction of inducible CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol.* 133 (2009), pp. 170-82.

Xiao et al., 2004 Z. Xiao, L. Batista, S. Dee, P. Halbur and M.P. Murtaugh, The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 78 (2004), pp. 5923-5933.

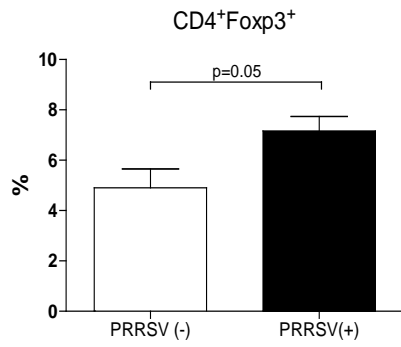
Figure legend

Figure 1. Frequency of regulatory T cells. A Foxp3+ cell on CD4 (a) and CD8 (b) lymphocytes from PBMCs was determined by flow cytometry. The percentage of Foxp3+ cells in CD25+ (c) activated lymphocytes was also quantified. In (d) the total percentage of CD4 and CD8 lymphocytes are presented. (e) Dots plots from CD4 or CD8 or CD25 total cell was gated and the square represent the % of double positive cells from each population. Data represent the mean \pm SEM of infected (n=9) and uninfected (n=5) boars, respectively. Student t test statistical analysis was used to establish differences between groups (*p<0.05).

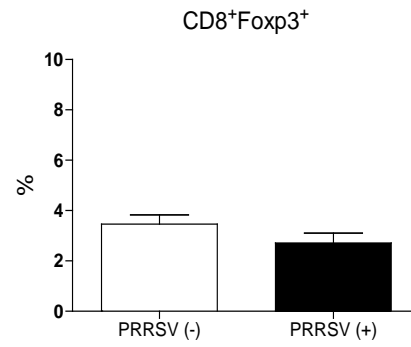
Figure 2. mRNA expression of regulatory cytokines. PBMCs were stimulated *in vitro* with PRRSV as previously described. After 24 h, RNA was isolated and the quantification of IL-10 and TGF- β was done by real time PCR and differences were analyzed by using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. White bars represent uninfected boars, black bars show PRRSV-infected boars; data represents the mean \pm SEM. The Kruskal-Wallis test was used to establish differences among groups followed by Dunns for medians comparisons.

Figures

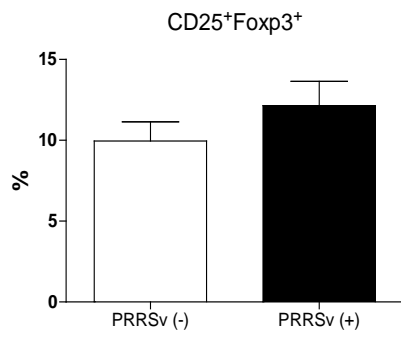
A



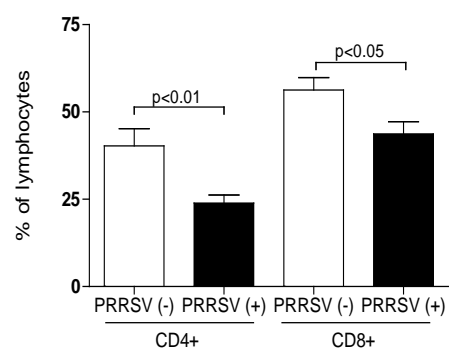
b



C



d



E

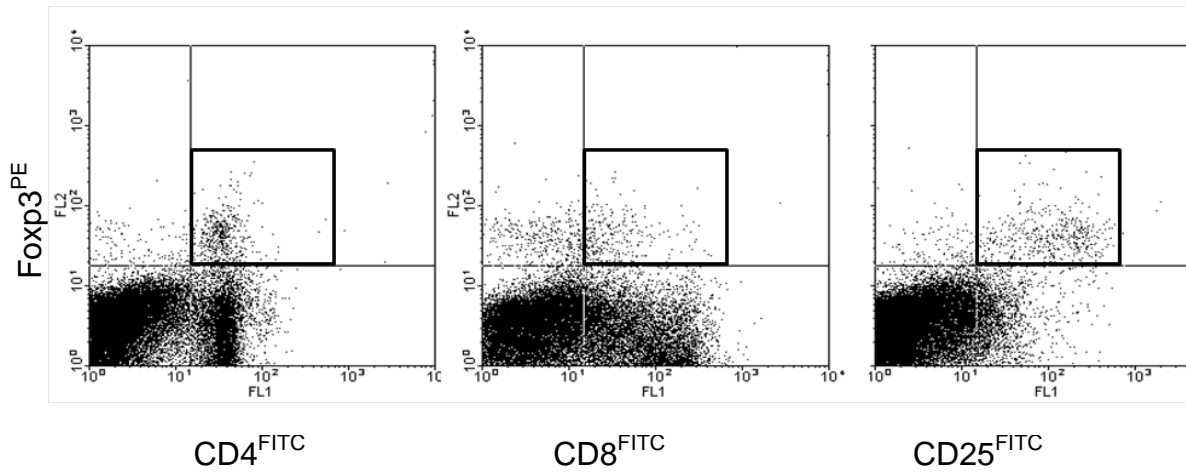


Figure 1.

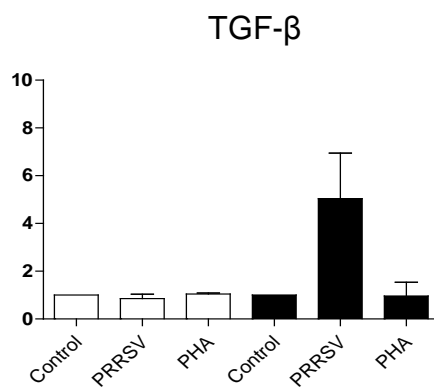
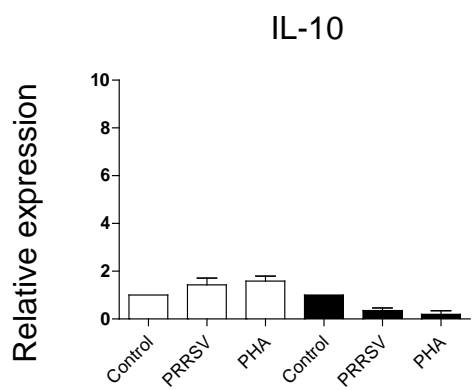


Figure 2.

Capítulo 5

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino induce la expansión de células T reguladoras con el fenotipo $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$

**Silva-Campa E. and Hernández J.
 $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells are the
phenotype induced by porcine reproductive and
respiratory syndrome. Veterinary Research.
Manuscrito en preparación.**

Resumen

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) provoca una prolongada infección aguda (1 mes o más de viremia) y puede persistir por largos períodos de tiempo. Eventualmente es eliminado en la mayoría de los animales infectados alrededor del día 150 post-infección (pi), aparentemente debido a la participación de la respuesta inmune celular. En cerdos infectados con las cepas americanas la respuesta celular se caracteriza por aparecer entre los días 14 y 56 pi, con bajos niveles en la secreción de IFN- γ , la cual va incrementándose gradualmente tanto en número de células productoras como en intensidad con un pico a los 70 días pi. Mientras que la actividad de células citotóxicas específicas contra PRRSV es detectable hasta los 56 dpi. Los mecanismos de supresión de la respuesta celular por PRRSV aún no están completamente definidos, se cree que el virus modula la respuesta en las primeras semanas post-infección. Evidencias recientes sugieren que la deficiente respuesta inmune celular es causada por la inducción de células T reguladoras (Treg) en fases tempranas de la infección. El objetivo de este capítulo fue determinar si el virus del PRRSV induce células Treg durante la fase aguda de la infección. Se infectaron cerdos jóvenes con una cepa americana y se colectaron muestras semanales durante un mes post infección. Se evaluó la carga viral, anticuerpos anti-PRRSV, citocinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β) y la frecuencia de subpoblaciones de Treg: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺. El análisis de la expresión de citocinas mostró un incremento a nivel de transcritos de IL-10 y TGF- β . La población CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺

permaneció sin cambio durante el tiempo de infección. Se observó un incremento de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ al día 28 pi y $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ principalmente en las doble positivas donde se incremento al doble al día 14 pi y triple al día 28 dpi ($p < 0.05$). Además, se observó que al estimular CMN con PRRSV, en la población $Foxp3^+$ se incrementó el porcentaje de células $CD4^+IL-10^+$, $CD4^+CD8^+IL-10^+$ y $CD8^+IL-10^+$. Por otra parte, el virus solo provocó un ligero incremento en el porcentaje de células $CD4^+CD8^+TGF-\beta^+$. Estos resultados indican que el virus del PRRSV provoca el incremento de células Treg *in vivo* en la fase aguda de la infección. El fenotipo inducido por el PRRSV fue $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$, las cuales se pueden clasificar como Tr1 productoras de IL-10. Con ello, se puede explicar el retraso en la aparición de la respuesta celular PRRSV específica, así como la baja producción de IFN- γ .

**CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are the phenotype induced by
porcine reproductive and respiratory syndrome**

Silva-Campa E., Mata Haro V., and Hernández J*.

Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
A.C.

Carretera a La Victoria km 0.6 C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

* Corresponding author: Jesús Hernández (jhdez@ciad.mx)

Abstract

The aim of this study was to evaluate if PRRSV-infected pigs can induce regulatory T (Treg) cells *in vivo*. Nine weeks old (n=6), PRRSV-free pigs were infected with 5mL of 10^5 TCID₅₀ (strain NVSL 97-7895), and blood samples were taken during 28 days post-infection (dPI). Viral load, anti-PRRSV antibodies, IL-10 and TGF- β cytokines and the frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, and CD4⁻CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ cells populations were quantified. The analysis of cytokine mRNA expression showed an increment of IL-10 and TGF- β . In addition, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg population remained stable during the time of infection. However, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ show a little increase at 28 dPI, but CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells increased twice at 14 dPI and three times at 28 dPI ($p < 0.05$). Also, in Foxp3⁺ cells CD4⁺IL-10⁺ increase of 4% to 6%, CD4⁺CD8⁺IL-10⁺ from 40% to 55% and CD8⁺IL-10⁺ increase of 5% to 15% respond to PRRSV stimulation. These results provide the first evidence *in vivo* that PRRSV increase the frequency of regulatory T cells *in vivo* with the phenotype CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ and IL-10 producer (Tr1) and these cell could explain the delay in the onset of cellular immune response and the low production of IFN- γ by PRRSV-specific T cells.

Key words: PRRSV; regulatory T cells; Foxp3; IL-10; TGF- β .

1. INTRODUCTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is the disease that causes the most significant losses of swine industry (Neumann et al., 2005). The causative agent is PRRS virus (PRRSV) (Meulenberg et al., 1997), which belong to the order Nidovirales, family Arteriviridae and genus Arterivirus (Cavanagh, 1997). PRRSV provoke a prolonged acute infection and can persist in pigs for long periods of time after the initial infection, even infected boars persistently can shed infectious virus (REF). But eventually is cleared in most of the infected animals around 150 days post-infection (pi) (Allende et al., 2000), it suppose that cell mediated immune (CMI) response plays a primary role in virus clearance but the precise mechanisms are not complete understood.

CMI response on pigs infected with American PRRSV strains appear transiently at 14 to 56 days after infection and become more pronounced months later (Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004). It is characterized by low levels of IFN- γ secreting cells (IFN- γ SC) detectable at 14 to 28 days post-infection (dPI) and a gradual increase in the intensity of the IFN- γ with a pick at 70 dPI and it is dependent of PRRSV strain and genotype (Batista et al., 2004; Diaz et al., 2005, 2006; Meier et al., 2003; Meier et al., 2004). While, strong proliferative response of CD8⁺ cells are in PRRS, a low level of PRRSV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) are detected at 56 dpi (Costers et al., 2009). Unfortunately, the mechanisms involved in this unusual and delayed immune responses are still unknown and apparently this behavior is multifactorial, but available evidence suggests that PRRSV is able to modulate the porcine immune system, specially during the first

weeks PI (Flores-Mendoza et al., 2008; Mateu and Diaz, 2008; Murtaugh et al., 2002).

Regulatory T cells (Treg) are responsible for controlling the immune response and maintaining homeostasis, suppressing or controlling the function of effectors and immunocompetent cells. Treg are classified into natural and induced, which control the immune response against themselves or exogenous antigen, respectively (Belkaid, 2007; Miyara and Sakaguchi, 2007). In human and mouse, transcription factor forkhead box P3 (Foxp3) which currently is their most selective marker, control the development and function of Treg. Actually, in swine have been identified two populations, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD8a⁺MHC-II⁺ described as a natural and activated or memory-like Treg, respectively (Kaser et al., 2008a).

Treg have been related with chronic or persistent infection establishment caused by viruses such as human immunodeficiency virus, hepatitis virus C and B, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus (Kinter et al., 2004; Peng et al., 2008; Rieger et al., 2006; Smyk-Pearson et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005). As a whole, Treg are one of the mechanisms used by pathogens to escape from the immune response. Recent evidence suggests that low levels of CTL and IFN- γ SC PRRSV-specific are effect of induction of regulatory T cells during early phase of infection (Costers et al., 2009; Silva-Campa et al., 2009; Wongyanin et al., 2009). For that reason, the aim of the present study was to determinate if PRRSV can induce regulatory T cells to suppress swine immune response during acute phase of infection.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals.

Six nine-weeks-old pigs, coming from a farm free of PRRSV were housed in the animal metabolic unit of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. with ad libitum access to water and food. PRRSV negative status was confirming by PCR and anti-PRRSV antibodies quantification.. The animals were infected with 5mL of 10^5 TCID₅₀ of PRRSV strain (NVSL 97-7895) intranasal (2mL) and intramuscularly (3mL) routes. Samples of serum and blood were taken at 0 wk (pre-infection) and 1 to 4 wk post-infection (PI). To determinate if infection was productively, PRRSV quantification was performing by real time PCR (Tetracore Inc) in serum and anti-PRRSV antibodies title was evaluated using a commercial kit (IDEXX Laboratory).

2.2. Viruses and cells.

The PRRSV NVSL 97-7895 (GenBank accession no. AY545985) and CIAD008 (GenBank accession no. DQ250071) strains were used. The viruses were propagated in MARC-145 cells using Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO), 100 IU penicillin mL⁻¹ and 100 µg streptomycin mL⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, USA) (complete DMEM). Once the cytopathic effect was apparent, cell cultures were freeze-thawed twice and the cell lysates were

centrifuged at 650g at 4 °C for 20 min. The supernatant containing the virus was collected, titrated, and stored at -70 °C.

2.3. PBMC isolation

Porcine peripheral blood was collected into EDTA-coated collection tubes (Becton-Dickinson), diluted 1:2 with PBS (GIBCO), overlaid on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 500g for 20 min. PBMCs were washed three times in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO), 100 IU penicillin mL⁻¹, 100 µg streptomycin mL⁻¹, 110 µg sodium pyruvate mL⁻¹, 2mM L-glutamine, and 1µg aphothericin B mL⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, USA) (complete RPMI).

2.4. Flow cytometry.

Frequency of regulatory T cells was determined by the co-expression of CD25, CD4, CD8 and Foxp3 markers in PBMCs. Cells were stained with anti-porcine CD25 (AbDSerotec, MCA1736 clone K231.3B2), followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, molecular probes). After this step were added the antibodies mouse anti-porcine CD4 conjugated with APC (VMRD, Inc, 74-12-4) and CD8 conjugated with RPECy7 (VMRD, Inc, 76-2-11) using LYNX rapid antibody conjugation kit (AbDSerotec). Foxp3 intracellular staining were performed with anti-rat/mouse Foxp3 (eBioscience, clone FJK-16s, with cross reactivity with swine Foxp3) (Kaser et al., 2008a) using Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, Staining, Fixation/Permeabilization and Permeabilization Buffers) to obtain a four staining CD4^{APC}CD8^{RPECy7}CD25^{Alexa488}Foxp3^{PE}. The frequency of

Treg was evaluated by flow cytometry (BD FACS Canto II) and data was analyzed using BD FACS Diva 6.0 software.

For analysis of IL-10⁺ and TGF-β⁺ cells PBMCs (1 x 10⁶) were cultured with PRRSV at MOI=0.1, mock (negative control), and 10µg/mL of PHA (positive control) incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 hours. PBMCs were labeled with anti-porcine CD4^{APC} and anti-porcine CD8^{RPECy7}. Thereafter, cells were fixed and permeabilized as described previously and stained with anti-Foxp3 and 0.025µg of biotin-labelled anti-swine IL-10 (Biosource) or biotin-labelled anti-TGF-β multispecies (Biosource) for 2 hours, followed by 0.25µg of Streptavidin FITC (BD Pharmingen) over night, in the dark at 4°C.

2.5. Real-time PCR.

IL-10, IFN-γ, and TGF-β mRNA expression were quantified by real time RT-PCR. After 24-h total RNA was extracted from PBMCs unstimulated, mock, PRRSV and PHA stimulated, using RNeasy Protocol Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was performed with one-step QRT-PCR Core Reagent Kits Brilliant® Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA) and a SmartCycler system (Cepheid, Sunnyvale, CA). Amplification conditions were as follows: one cycle at 50 °C for 30 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 1 min. Primers and probes are listed in Table 2. Ct values from different treatments were normalized against the endogenous control gene RPL32 (ribosomal protein L32) (Dawson et al., 2004). Results are expressed as relative expression of mRNA from infected animals, and was

calculate based on the Ct values from PBMCs none stimulated from each week (control value 1) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula.

2.6. ELISA.

Supernatants from a three-day of PBMCs culture were collected, and the levels of secreted IL-10, TGF- β and IFN- γ were quantified using a commercial ELISA Kit according to the manufacturer's recommendations (Biosource, Camarillo, CA), results are expressed as pg/ml.

2.7. Statistical analysis.

Data were analyzed using paired Student's t-test or one way analysis of variance (ANOVA). Differences among treatments were determined by Tukey's test ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis test and Dunns for medians comparison was done for relative expression analysis. Analyses were performed with PRISM 5.02 software (Graph Pad, San Diego, CA).

3. RESULTS

3.1. Phenotypic characterization of regulatory T cells in PRRSV-infected swine.

We have previously described that PRRSV induce regulatory T cells, and this could explain the delay in the immune response against the virus. In addition,

in vivo evidence of T regulatory cells has been described for others (Wongyanin et al., 2009), however, the available information only describe preliminary evidence of expansion of Treg *in vitro*. In this work, the frequency of Treg was determinate in pigs at different times after experimental infection with PRRSV. Viral load was quantified and remain constant from 1 and 4 weeks post-infection (wPI) that is an unusual behavior. To identify the cell type that is increasing on swine PRRSV infected, four staining were performed for detection of Treg populations: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, and CD4⁻CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺. A clear increase of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells was identified at 2 wk PI (p<0.05). Whereas CD4⁺Foxp3⁺ population described like natural Treg the population showed a uniform behavior, only at 4 wk PI increased significantly (p<0.05). But, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁻CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ cells remain constant. Other remarkable finding was that 0.3% of Foxp3⁺ cells, did not express CD25 marker in CD4⁻CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ population, however does not affected by PRRSV infection (p>0.05) (Fig. 1). Also, the percentage of lymphocytes in the samples are listed the table 1, CD4⁺ and CD8⁺ cells remain constant at 1 wk PI, decrease at 2 wk PI then recovered at 3 wk PI. Double positive cells CD4⁺CD8⁺ remain constant through the time.

3.2. RNA expression of cytokine from PBMCs re-stimulated with PRRSV.

In order to determinate the type of Treg induced, cytokines were quantified on RNA and supernatants from PBMCs treated with PRRSV (m.o.i 0.01) and as

controls unstimulated and mock treated cells. The expression of IL-10 increases one fold since 1 wk PI, and decrease at 4 wk PI (Fig. 2A). As well as, the expression of TGF- β showed a little increase at 2 wk PI and tends to decrease at 4 wk PI (Fig. 2B). Also, IFN- γ relative expression was quantified as a control the results showed that began to increase at 4 wk PI (Fig. 2C).

3.3 Secretion of soluble suppressor factors.

After three day of culture of PBMCs with virus and controls IL-10 and TGF- β were quantified. The production of IL-10 showed an increase on production through time, but no differences between treatments (Fig. 3A). However, when secreted TGF- β was quantified on supernatants showed a little increase on PBMCs unstimulated through time and decrease at 4 wk PI (Fig. 3B). IFN- γ production only was detected when PBMCs were stimulated with PHA (5ug/mL) (data not showed). This way was not sensitive to detect differences because a low number of Treg on PBMCs.

3.4. IL-10⁺ and TGF- β ⁺ producer Foxp3⁺ and Foxp3⁻ cells.

Additionally we evaluate in Foxp3⁺ and Foxp3⁻ population the frequencies of cytokines (IL-10 and TGF- β) positive cells on CD4⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD8⁺ lymphocytes. Results shown that Foxp3⁺ cells are around 45% IL-10⁺ and 55% TGF- β ⁺. Those cells respond to viral stimulation, specifically CD4⁺IL-10⁺ increase

of 4% to 6%, CD4⁺CD8⁺IL-10⁺ from 40% to 55% and CD8⁺IL-10⁺ increase of 5% to 15%. The results showed that PRRSV can induce an increase in this population after re-stimulate. Also, PHA had no ability to induce the production of IL-10 or TGF in Foxp3⁺ cells. Besides, in the case of CD4⁺TGF-β⁺, CD4⁺CD8⁺TGF-β⁺ and CD8⁺TGF-β⁺ cells, PRRSV induce a narrow increase only in CD4⁺CD8⁺TGF-β⁺. However, PHA has effect on CD4⁺TGF-β⁺ population increasing from 5% to 10% and CD8⁺TGF-β⁺ from 9% to 12% (Figure 4). As well as, in Foxp3⁻ population only PHA produces an increase and PRRSV had no effect on this cells (Figure 4). On the other hand, when stimulate PBMCs with polyclonal activator (PHA) Foxp3⁺ cells change appearance, specifically in those cells that express intermediate Foxp3 (data not shown).

4. DISCUSSION

The capacity of PRRSV to modulate the immune response through infection of antigen presenting cells (APCs), and the development of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF-β) environment are factors that can propitiate the induction of Treg (Charerntantanakul et al., 2006; Flores-Mendoza et al., 2008; Loving et al., 2007; Wang et al., 2007). Treg cells are mostly represented by a subpopulation of CD4 T helper cells that can suppress immune system and promote the homeostasis (Miyara and Sakaguchi, 2007). Indeed, Treg have been implicated in the control of initial activation events, proliferation, differentiation and effectors functions (Cools et al., 2007a; Sojka et al., 2008). Conventionally are

classified in naturally occurring and inducible regulatory T cells. Inducible Treg are developed in the periphery from conventional CD4⁺ T cells (Belkaid, 2007). Some viruses have acquired the ability to induce Treg cells, as a way to suppress immune response and provoke the persistence or chronicity of infection in the host. These are the cases of virus like human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, hepatitis C, B virus, Epstein-Barr virus and others (Li et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2005).

On this regards, the results obtained show an increase of CD4⁺CD8⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Treg cells in swine infected at acute phase of immune response to PRRSV at 1-2 week PI. This behavior is not due to age of swine because, CD4⁺CD8⁺ remain constant indicating that the increase of CD4⁺CD8⁺CD25^{high}Foxp3⁺ is not due to a normal accumulation of memory T cells through the age of pig (Zuckermann, 1999). The information about regulatory T cells on swine is limited, but two main populations have been identified: CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁻ and CD4⁺CD8⁺CD25^{high}Foxp3⁺, together with a few CD4⁺CD25^{high} effectors T cells represent 6.4±1.1% of CD4⁺ cells (Kaser et al., 2008a, b; Silva-Campa et al., 2009; Wongyanin et al., 2009). Like in human cells all CD4⁺Foxp3⁺ cells express high amount of CD25 (IL-2α receptor), Kaser report that in swine Foxp3 are expressed predominantly in CD4⁺CD25^{high} cells (Kaser et al., 2008b). According to this, the increase on CD4⁺CD8⁺CD25^{high}Foxp3⁺ population on swine PRRSV infected, allows to classify them as inducible Treg cells. But is necessary contemplated that CD8 are express on memory lymphocytes, complicating the differentiation between natural and induced memory

Treg, but in pig facilitate to distinguish between populations. We and others suggest that in swine Foxp3⁺ cells have the capacity of suppress the activity of PBMCs *in vitro* (Kaser et al., 2008b). In addition, this information confirm that PRRSV induce regulatory T cells in early time PI as previously described by Wongyanin, who evaluate the *in vitro* expansion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg from PBMCs at 10 days PI (Wongyanin et al., 2009). We present a more prolonged analysis in the frequency of Treg in PRRSV infection, where the levels of inducible Treg remained elevated at least one month PI

Moreover, delay on immune response and poor INF- γ production at least on early weeks PI can be explained by the increase of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in acute phase of infection. As well as, the increase in the number of INF- γ secreting cells at 28 days PI could be related to decrease of Treg at the same time and by the loss of their suppressive activity. Because, Treg (unstable Foxp3⁺ Treg cells) generated from conventional CD4 T cells may lose the expression of Foxp3 in the absence of an adequate stimulus, like TGF- β (Huehn et al., 2009). Treg induced by TGF- β *in vitro* were shown to lose Foxp3 expression and suppressive activity upon re-stimulation in the absence of TGF- β (Corthay, 2009). However, more prolonged analysis of Treg frequency is needed to determine if the pull of Treg expanded by infection remain increased or decrease over time, and thus allow the INF- γ -producing clones expansion. It is also necessary establisher Treg cells specificity to viral antigen and well known as involved in the lack of immunological memory to heterologous strains of virus. It is likely that Treg-specific epitopes are conserved between different strains and thereby partly explain the

lack of cross reaction, recently reports indicate that one conserved peptide between American strains from ORF5 are capable to expand Treg cells (Todd et al., 2010).

In order to classify Treg in PRRSV infection, analysis of regulatory cytokines expression was done and showed a little increase of IL-10 and TGF- β mRNA, but more analysis to confirm this are needed. Moreover, after stimulation with PRRSV strain CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺ cells responded producing IL-10 mainly. Also, little response was detected in CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺TGF- β ⁺ cells to PRRSV stimuli. Taken together, we can classified the Treg induced by PRRSV as CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ IL-10 producer which are described like Tr1 cells (Belkaid, 2007).

In conclusion, these results represent complete evidence *in vivo*, that American PRRSV strain induce the increment of regulatory T cells. This information can contribute to explain the absence of cellular immune response in the first weeks post-infection and the low production of IFN- γ by PRRSV specific T cells. Moreover, these results provide evidence to support the idea that CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ populations in swine are inducible regulatory T cells. In addition, our data represent the first description of CD4⁻CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁻CD8⁻CD25⁻Foxp3⁺ cells that may represent others possible population of Treg in swine.

5. REFERENCES

1. **Allende, R., W. W. Laegreid, G. F. Kutish, J. A. Galeota, R. W. Wills, and F. A. Osorio.** 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* **74**:10834-7.
2. **Batista, L., C. Pijoan, S. Dee, M. Olin, T. Molitor, H. S. Joo, Z. Xiao, and M. Murtaugh.** 2004. Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* **68**:267-73.
3. **Belkaid, Y.** 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* **7**:875-88.
4. **Cavanagh, D.** 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**:629-33.
5. **Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman.** 2007. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* **2007**:89195.
6. **Corthay, A.** 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* **70**:326-36.
7. **Costers, S., D. J. Lefebvre, B. Goddeeris, P. L. Delputte, and H. J. Nauwynck.** 2009. Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3(+)CD8(high) cells. *Vet Res* **40**:46.
8. **Charerntantanakul, W., R. Platt, and J. A. Roth.** 2006. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunol* **19**:646-61.
9. **Dawson, H. D., A. R. Royae, S. Nishi, D. Kuhar, W. M. Schnitzlein, F. Zuckermann, J. Urban, Jr., and J. K. Lunney.** 2004. Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. *Vet Immunol Immunopathol* **100**:105-11.
10. **Diaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, and E. Mateu.** 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* **351**:249-59.
11. **Diaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, and E. Mateu.** 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **86**:1943-51.
12. **Flores-Mendoza, L., E. Silva-Campa, M. Resendiz, F. A. Osorio, and J. Hernandez.** 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* **15**:720-5.
13. **Huehn, J., J. K. Polansky, and A. Hamann.** 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* **9**:83-9.
14. **Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl, and A. Saalmuller.** 2008. Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **125**:92-101.
15. **Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl, and A. Saalmuller.** 2008. Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* **122**:153-8.
16. **Kinter, A. L., M. Hennessey, A. Bell, S. Kern, Y. Lin, M. Daucher, M. Planta, M. McGlaughlin, R. Jackson, S. F. Ziegler, and A. S. Fauci.** 2004. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in

- vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* **200**:331-43.
17. **Li, S., E. J. Gowans, C. Chougnnet, M. Plebanski, and U. Dittmer.** 2008. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* **82**:21-30.
 18. **Loving, C. L., S. L. Brockmeier, and R. E. Sacco.** 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* **120**:217-29.
 19. **Mateu, E., and I. Diaz.** 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* **177**:345-51.
 20. **Meier, W. A., J. Galeota, F. A. Osorio, R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein, and F. A. Zuckermann.** 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* **309**:18-31.
 21. **Meier, W. A., R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein, F. A. Osorio, J. K. Lunney, and F. A. Zuckermann.** 2004. Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology* **102**:299-314.
 22. **Meulenbergh, J. J., A. Petersen den Besten, E. de Kluyver, A. van Nieuwstadt, G. Wensvoort, and R. J. Moormann.** 1997. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* **55**:197-202.
 23. **Miyara, M., and S. Sakaguchi.** 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* **13**:108-16.
 24. **Murtaugh, M. P., Z. Xiao, and F. Zuckermann.** 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* **15**:533-47.
 25. **Neumann, E. J., J. B. Kliebenstein, C. D. Johnson, J. W. Mabry, E. J. Bush, A. H. Seitzinger, A. L. Green, and J. J. Zimmerman.** 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **227**:385-92.
 26. **Peng, G., S. Li, W. Wu, Z. Sun, Y. Chen, and Z. Chen.** 2008. Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* **123**:57-65.
 27. **Rieger, K., C. Loddenkemper, J. Maul, T. Fietz, D. Wolff, H. Terpe, B. Steiner, E. Berg, S. Miehke, M. Bornhauser, T. Schneider, M. Zeitz, H. Stein, E. Thiel, R. Duchmann, and L. Uharek.** 2006. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* **107**:1717-23.
 28. **Silva-Campa, E., L. Flores-Mendoza, M. Resendiz, A. Pinelli-Saavedra, V. Mata-Haro, W. Mwangi, and J. Hernandez.** 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **387**:373-9.
 29. **Smyk-Pearson, S., L. Golden-Mason, J. Klarquist, J. R. Burton, Jr., I. A. Tester, C. C. Wang, N. Culbertson, A. A. Vandenbark, and H. R. Rosen.** 2008. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* **197**:46-57.
 30. **Sojka, D. K., Y. H. Huang, and D. J. Fowell.** 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* **124**:13-22.
 31. **Todd, S., T. Cecere, and T. LeRoith.** 2010. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus structural protein epitopes that induce CD4+CD24+Foxp3+ regulatory T cells in vitro. 2010 International PRRS Symposium Chicago, USA.

32. **Vahlenkamp, T. W., M. B. Tompkins, and W. A. Tompkins.** 2005. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* **108**:219-25.
33. **Voo, K. S., G. Peng, Z. Guo, T. Fu, Y. Li, L. Frappier, and R. F. Wang.** 2005. Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* **65**:1577-86.
34. **Wang, X., M. Eaton, M. Mayer, H. Li, D. He, E. Nelson, and J. Christopher-Hennings.** 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol* **152**:289-303.
35. **Wongyanin, P., S. Buranapraditkun, K. Chokeshai-Usaha, R. Thanawonguwech, and S. Suradhat.** 2009. Induction of inducible CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol*.
36. **Xiao, Z., L. Batista, S. Dee, P. Halbur, and M. P. Murtaugh.** 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* **78**:5923-33.
37. **Zuckermann, F. A.** 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* **72**:55-66.

Table I

Population of lymphocytes on PBMCs

	0 wk PI	1 wk PI	2 wk PI	3 wk PI	4 wk PI
CD4⁺	19.91±4.55	19.69±.69	15.67±1.19	18.39±4.44	18.14±4.86
CD8⁺	9.84±1.95	11.92±2.15	8.34±2.53	12.75±5.1	11.14±2.58
CD4⁺CD8⁺	3.31±1.06	2.57±0.98	2.18±0.66	2.68±0.96	1.35±0.35

Table 2.

Primer and probe sequences

Gene	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')	Probe sequence (5' to 3')
TGF- β^a	AGGGCTACCATG CCAATTTCT	CCGGGTTGTGCTG GTTGTACA	TET- CAACCAGCCTGCCCCA CATGC-BHQ1
IL-10 ^a	TGAGAACAGCTG CATCCACTTC	TCTGGTCCTTCGT TTGAAAGAAA	TET- CAACCAGCCTGCCCCA CATGC-BHQ1
RPL32 ^a	TGGAAGAGACGTT GTGAGCAA	CGGAAGTTTCTGG TACACAATGTAA	TET- ATTTGTTGCACATTAGC AGCACTTCAAGCTC-- BHQ1

^a Sequences from Porcine Immunology and Nutrition database<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6065>^b RPL32 (ribosomal protein L32)

Figure legends

Figure 1. Regulatory T cells subpopulations. The percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺, CD4⁺CD8⁺, CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ lymphocytes T population was quantified by flow cytometry. (A) Dot plots are one representative swine through time, each column are the same population CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ from left to right. (B) Data represent the mean \pm SEM of n=6; differences were determined using one-way ANOVA and Tukey's test. For CD4⁺CD8⁺ population different letters represent significant differences ($p < 0.05$).

Figure 2. mRNA expression of regulatory cytokines in lymphocytes.

Regulatory cytokine mRNA relative expression was evaluated by real-time PCR expression using PBMC from different weeks PI. Relative expression of IL-10, TGF- β and IFN- γ was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. PBMCs without treatment were used as relative control from each week evaluated. Non stimulated (white bars), mock treated (light gray), PRRSV stimulated (black bars) and PHA stimulated (dark gray bars) cells. Data presented correspond to the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Data analysis was done using a Kruskal-Wallis Z test and a $p < 0.05$ was considered significant.

Figure 3. Secretion of suppressor factors IL-10 and TGF- β .

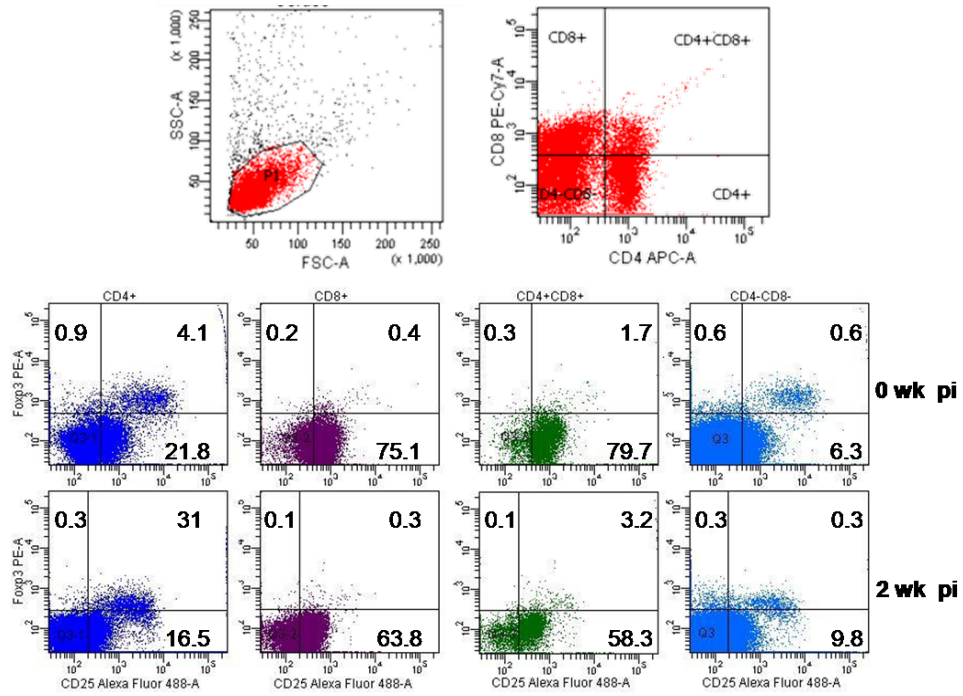
Cytokine production was quantified by ELISA on supernatants of PBMCs from each week evaluated. Non stimulated (white bars), mock treated (light gray), PRRSV stimulated (black bars) and PHA stimulated (dark gray bars) cells. Data presented

correspond to the mean \pm SEM of 4 independent animals. Data analysis was done using a one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

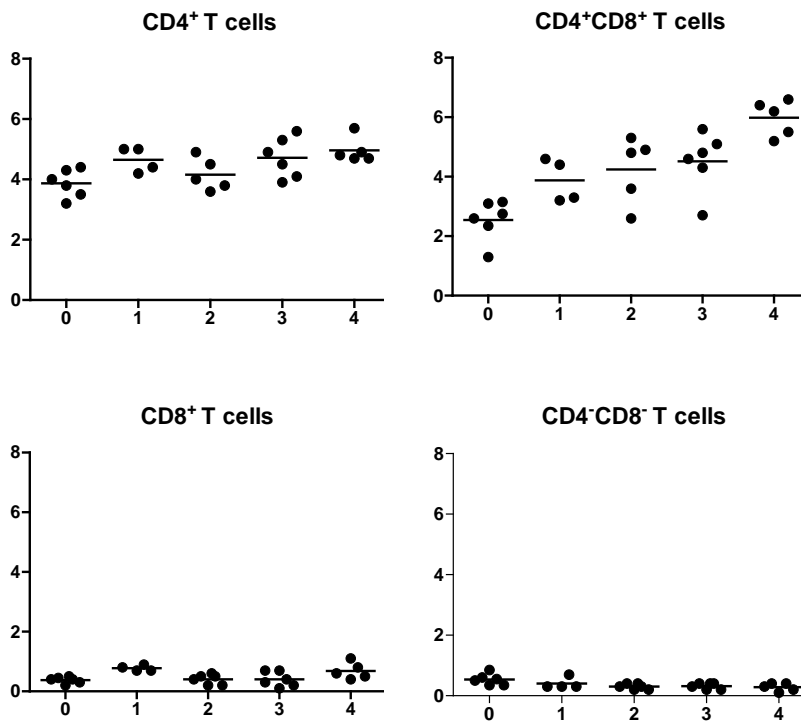
Figure 4. IL-10 and TGF- β Foxp3⁺ Cells. PBMCs from 3 wk PI were stimulated with mock, PRRSV and PHA during 24 h. Four staining was done, Foxp3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and IL-10⁺ or TGF- β ⁺ Cells. The analysis was done take it Foxp3⁺ or Foxp3⁻ cells populations as a region 1, then divided into sub regions CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺, for determinate wish are IL-10 or TGF- β producer cells.

Figures

A

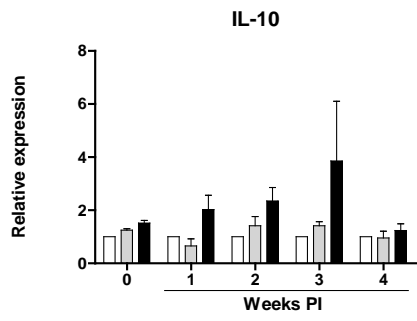


B

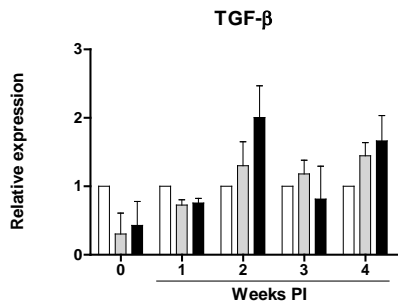


1 Figure 1

A



B



C

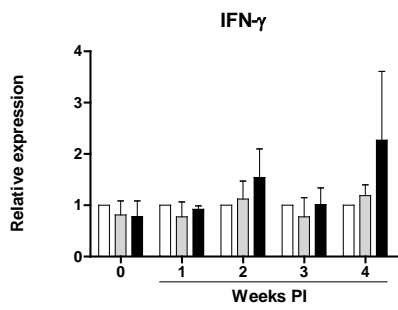
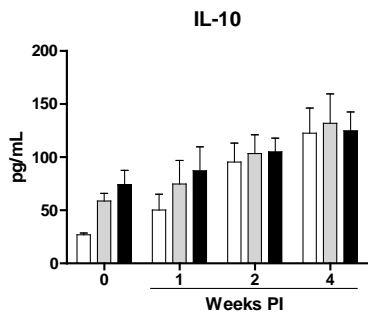


Figure 2

A



B

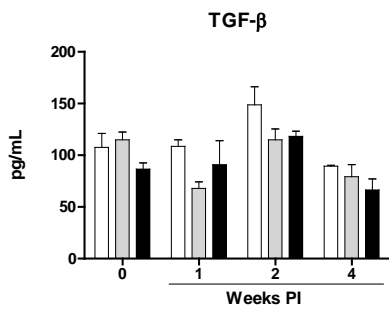
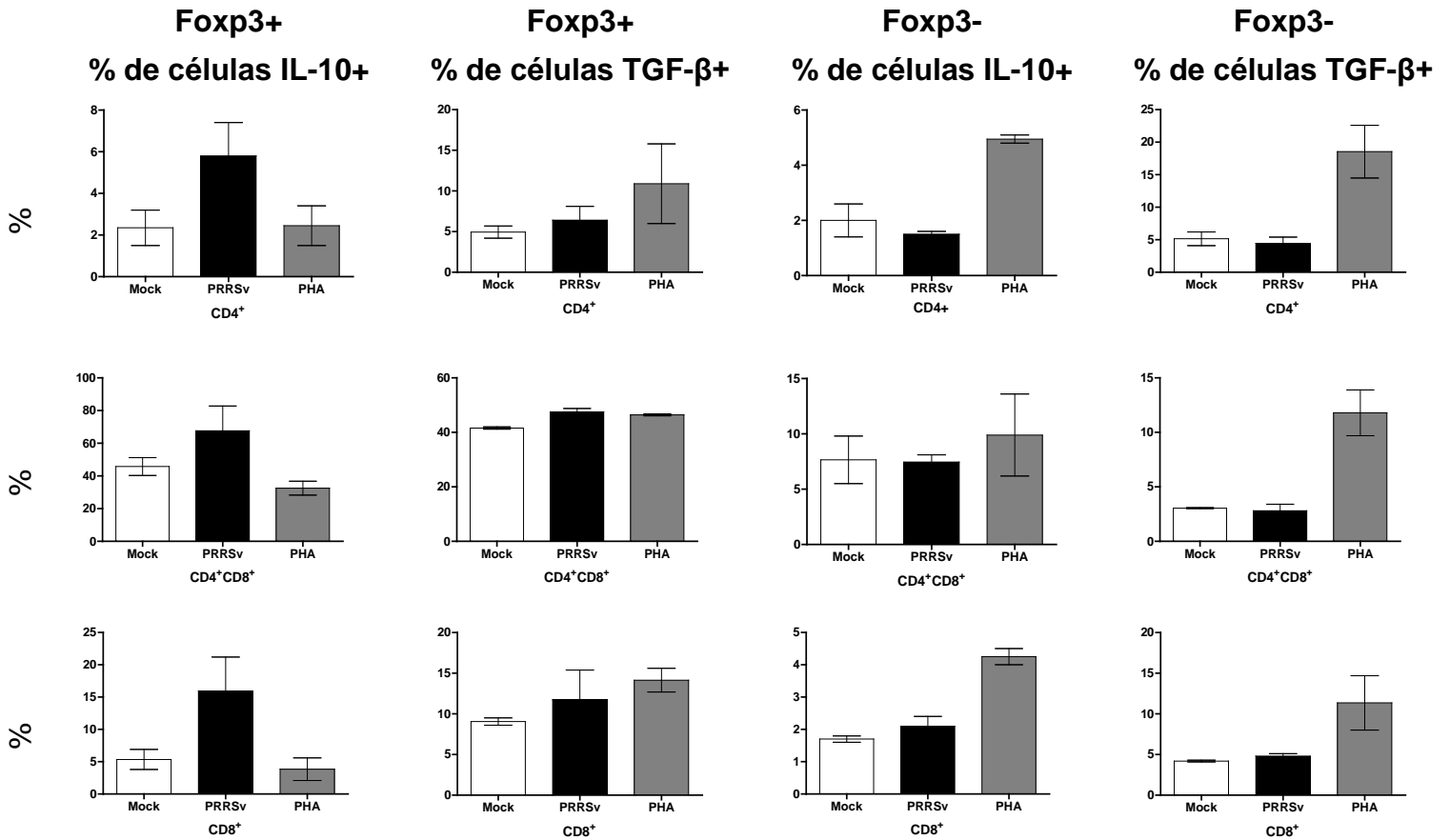
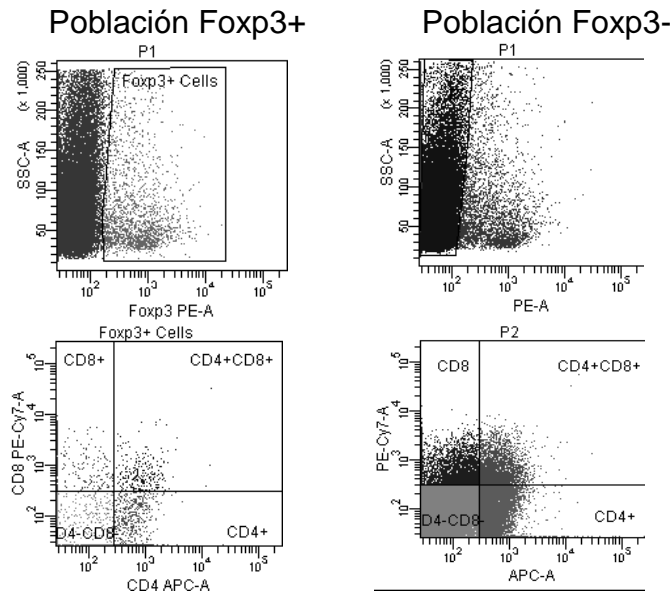


Figure 3



455 Figure 4

Capítulo 6

Frecuencia de linfocitos T reguladores en tejidos linfoides asociados a la replicación y persistencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

Silva-Campa E. and Hernández J. Frequency of regulatory T cells induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in lymphoid nodes are associated with viral replication and persistence.

Borrador de artículo.

Resumen

La infección causada por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) se caracteriza por provocar viremia prolongadas de más de un mes y persistir en tejidos linfoides secundarios hasta 5 meses. Uno de los sitios primarios donde el PRRSV se establece persistentemente es en la amígdala. Para comprender las bases inmunológicas que provocan la prolongación de la infección aguda y la persistencia, se examinó la frecuencia de las células T reguladoras (Treg) durante un mes y se comparó con la carga viral en suero y tejidos infectados. Los resultados sugieren que la carga viral en suero está asociada al comportamiento de las células $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ en cerdos infectados. Además, la frecuencia de Treg en los nódulos linfáticos mediastínicos se detectó a los 3 días post-infección (dpi) y parecer ser que están relacionados con la carga viral en este tejido. Así mismo, en las amígdalas la distribución de las células $CD4^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$ aumentó entre los días 18-24 dpi. En conclusión, estos resultados pueden contribuir a explicar que el aumento de las Treg circulantes es inducido en etapas tempranas de la infección en los nódulos linfáticos cercanos al pulmón y que promueven el establecimiento de la persistencia del PRRSV en los tejidos linfoides secundarios.

Frequency of regulatory T cells induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in lymphoid nodules are associated with viral replication and persistence

Silva-Campa E., Mateu E., Hernández J.

Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Carretera a La Victoria km 0.6 C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

* Corresponding author: Jesús Hernández (jhdez@ciad.mx)

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection is characterized by a prolonged viremia of 30 or more days and an extended persistent infection of lymphoid tissues.

To better understand the immunological basis for prolonged acute and persistent PRRSV infection, we have examined the frequency of regulatory T cells (Treg) throughout the course of infection and compared with viral load in serum and infected tissues. Preliminary evidences suggest that viral load in serum are associated with the behavior of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ PRRSV frequency on PRRSV infected swine. Also, in mediastinal lymphoid nodule (NL) Treg was detected early of infection at 3 days post-infection (dpi) and apparently are related with de viral load in this tissue. As well as, in tonsils CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ distribution increase at 18-24 dpi. In conclusion, these results can contribute to explain that Treg circulating increased are induced at early time after infection and promote the establishing persistence in secondary lymphoid tissues like tonsil.

Key words: PRRSV; regulatory T cells; Foxp3; PRRSV, Tissues.

1. INTRODUCTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is the disease that causes the most significant losses of swine industry (Neumann et al., 2005). The causative agent is a virus, named PRRS virus (PRRSV) (Meulenbergh et al., 1997), which belong to the order Nidovirales, family Arteriviridae and genus Arterivirus (Cavanagh, 1997). PRRSV provoke a prolonged acute infection and can replicate and persist in pigs for long periods of time after the initial infection,

even animals infected persistently can shed infectious virus. But eventually is cleared in most of the infected animals around 150 days post-infection (pi) (Allende et al., 2000), where the cell mediated immune (CMI) response plays a primary role. However, is well known that PRRSV CMI is retarder and deficient, we propose that this behavior is due in part for the induction of regulatory T cells at the begin of infection process (unpublished results). Treg are one of the mechanisms used by pathogens to escape from the immune response. Recent evidence suggests that low levels of CTL and IFN- γ SC PRRSV-specific are effect of induction of regulatory T cells during early phase of infection (Costers et al., 2009; Silva-Campa et al., 2009; Wongyanin et al., 2009).

Regulatory T cells (Treg) are responsible for controlling the immune response and maintaining homeostasis, suppressing or controlling the function of effectors and immunocompetent cells. Treg are classified into natural and induced, which control the immune response against themselves or exogenous antigen, respectively (Belkaid, 2007; Miyara and Sakaguchi, 2007). In human and mouse, transcription factor forkhead box P3 (Foxp3) which currently is their most selective marker, control the development and function of Treg. Actually, in swine have been identified two populations, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD8a⁺MHC-II⁺ described as a natural and activated or memory-like Treg, respectively (Kaser et al., 2008a). In swine infected with PRRSV circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ are increased and can be *in vitro* expanded from PBMCs at 10 days PI (Wongyanin et al., 2009), and this cells present the phenotype CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD8a⁺ IL-10⁺⁺ and TGF- β ⁺ producer at 2 week post-infection (unpublished results).

Treg have been related with chronic or persistent infection establishment caused by viruses such as human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis virus C (HCV) and B (HBV), cytomegalovirus and Epstein-Barr virus (Kinter et al., 2004; Peng et al., 2008; Rieger et al., 2006;

Smyk-Pearson et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005). Viral load in serum and tissues has been related to the induction of Treg, in patients chronically infected with HBV exist association between viral load on liver and Treg increase (Stoop et al., 2008) and circulation Treg decreased on some chronic infected patients with HIV is due to redistribution to tissues and lymphoid nodules (Thorborn et al., 2010) and correlate with severity of infection (Chase et al., 2008). For that reason, the aim of the present study was to determine if the induction of Treg by PRRSV is localized on lymphoid nodules and associated with viral load.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals.

Four-week-old pigs, coming from a farm free of PRRSV were housed in the animal metabolic unit of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. with ad libitum access to water and food. Animals were divided into control (n=15) and infected (n=20) groups. Pigs were infected with 2mL of 10^5 TCID₅₀ of PRRSV strain (NVSL 97-7895) intranasal. Samples of serum, blood and lymphoid tissues (tonsil, mediastinal and inguinal) from 2 control and 4 infected pigs were taken at 0, 3, 7, 11, 18 and 24 days post-infection (PI). To determine viral load, PRRSV quantification was performed by real time PCR (Tetracore Inc) in serum and tissues and anti-PRRSV antibodies titer was evaluated using a commercial kit (IDEXX Laboratory).

2.2. Viruses and cells.

The PRRSV NVSL 97-7895 (GenBank accession no. AY545985) and CIAD008 (GenBank accession no. DQ250071) strains were used. The viruses were propagated in MARC-145 cells using Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO), 100 IU penicillin mL⁻¹

and 100 µg streptomycin mL⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, USA) (complete DMEM). Once the cytopathic effect was apparent, cell cultures were freeze-thawed twice and the cell lysates were centrifuged at 650g at 4 °C for 20 min. The supernatant containing the virus was collected, titrated, and stored at -70 °C.

2.3. Cells and tissues.

Porcine peripheral blood was collected into EDTA-coated collection tubes (Becton-Dickinson), diluted 1:2 with PBS (GIBCO), overlaid on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 500g for 20 min. PBMCs were washed three times in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO), 100 IU penicillin mL⁻¹, 100 µg streptomycin mL⁻¹, 110 µg sodium pyruvate mL⁻¹, 2mM L-glutamine, and 1µg aphoticeracin B mL⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, USA) (complete RPMI). Samples from mediastinal lymph nodes (LN), tonsil and inguinal LN were gained by sieving small pieces of the respective organs through cells strainer of 100µm (BD Falcon). Then were washed ones time with PBS and put it in RPMI-1640.

2.4. Flow cytometry.

Frequency of regulatory T cells was determinate by co-expression of CD25, CD4, CD8 and Foxp3 markers by lymphocytes in PBMCs. Cells were stained with anti-porcine CD25 (AbDSerotec, MCA1736 clone K231.3B2), followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, molecular probes). After this step were added the antibodies mouse anti-porcine CD4 conjugated with APC (VMRD, Inc, 74-12-4) and CD8 conjugated with RPECy7 (VMRD, Inc, 76-2-11) using LYNX rapid antibody conjugation kit (AbDSerotec). Foxp3 intracellular staining were performance with anti-rat/mouse Foxp3 (eBioscience, clone FJK-16s, with cross reactivity with swine Foxp3) (Kaser et al., 2008a) using Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, Staining, Fixation/Permeabilization and Permeabilization Buffers) to obtained a four

staining CD4^{APC}CD8^{RPECy7}CD25^{Alexa488}Foxp3^{PE}. The frequency of Treg was evaluated by flow cytometry (BD FACS Canto II) and data was analyzed using BD FACS Diva 6.0 software.

2.7. Statistical analysis. Data were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA). Differences among treatments were determined by Tukey's test ($p < 0.05$) for parametric data. Kruskal-Wallis test and Dunns for medians comparison were done for non parametric data. Analyses were performed with PRISM 5.02 software (Graph Pad, San Diego, CA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Frequency of regulatory T cells on PBMCs.

Previous results from our laboratory have been described that PRRSV can induce increment of regulatory T cells. However, had doubts whether the increase was due to the age of the animal and the site of induction, as well as, whether viral load influences the frequency of Treg. In this work, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ frequency was determinate at different early times after experimental infection with PRRSV at 0, 3, 7, 11, 18 y 24 days post-infection. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ behavior remain constant over time, and no differences between groups were found (Fig. 1). The result obtained from CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ was different from previous report, in this group of animal; at 7 dpi we detect increase of these cells on infected pigs (Fig. 1). Above, could be the effect of high viral replication and thereby induce Treg mobilization.

In addition, at 18 to 24 days we observed an increase on both groups of pigs, and confirm that the increase reported previously at 28 dpi is due to age of swine and not by PRRSV infection. As expected, the population of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ increase at 11 dpi with a pick

at 18 dpi and begins to decrease at 24 dpi (Fig 1). These results are consistent with those reported previously, the only change was the decrease observed at 24 dpi. However, this phenomenon may be due to viral load that remain constant in those pigs at 28 dpi. Viral load present the classic form that increase from 3 days, with a pick between 7-11 dpi, and begins to decrease at 18 dpi, no correlation was found between viral load and CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ percentage (lineal regression; $r^2=0.022$ and $p=0.45$) (Fig. 2). But, at the time of viral load of PRRSV decrease also the percentage of Treg. Also, independent effect of viral load on PRRSV infection has been reported for levels of specific T cells and macrophages recruitment (Xiao et al., 2004).

3.2. Frequency of Treg from mediastinal LN cells.

Mediastinal lymphoid nodules are associated directly with lungs, which are the primary site of infection caused by PRRSV, may be the nodules that are involved in the increase of Treg circulating. Samples were taken at 0, 3, 7, 11, 18 and 24 dpi from 4 infected group and 2 from uninfected (control) and cells were obtained to determinate the percentages of Treg cells. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells present random behavior, no differences at 3-7 dpi were detected, but increase at 11-18 dpi respect control group. For CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ only show increased at 3 and 18 dpi respect control group. As if was expected on CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ population the increase was observed early at 3 dpi, but unexpected decrease at 7-11 dpi and recover at 18 dpi, and fall again at 24 dpi (Fig. 3). The association between viral load on this tissue and Treg percentage showed how the curve of PRRSV particles has a similar behavior that CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells on infected pigs. At 3 dpi is the most concentration of viral particles, being to decrease at 7 to 11 dpi, and then increased again at 18 to 24 dpi (Fig. 4). The reason because no differences was observed at 7 dpi can be explained by the fact that Treg are

redistributed to the periphery and potentially come to the site of infection. Moreover, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ behave erratically, difficulty to understand whether or not associated with PRRSV infection.

3.3. Distribution of Treg on Tonsil.

Once of the primary sites of PRRSV being to persist is tonsil, in which the number of responding virus-specific T cells are extremely low (Xiao et al., 2004). For that reason, we try to determinate if Treg cells are responsible for this response. The results shows, that CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ from uninfected swine being to increase through the time until 18 and 24 dpi that remain constant. In contrast, on infected group tend to decrease at 11 dpi respect control, and being to recovered at 18 dpi, however, at 24 dpi remain decreased respect uninfected swine (Fig. 5). The population CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ aparentally decrease on infected pigs respect the control each time (Fig. 5). This behavior can be effect growth retardation in PRRSV infected piglets (REF) that can impact at immune system development. But, the distribution of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells on tonsil present similar percentages from 7 to 11 dpi respect control group, as well as, at 18 to 24 dpi increase. Once possibility is that CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells start to increase on infected animal around 20 dpi and remain stables, resulting viral persistence on tonsil. This result are related with the increased on CD4⁺CD8⁺ cells at 19 dpi on tonsil from PRRSV-infected swine respect uninfected and can explain why exist a very low levels of IFN- γ secreting cells in tonsil (Xiao et al., 2004). To probe this hypothesis, are needed a longitudinal study, for determinate if Treg are increase on tonsil (PRRSV positives) from swine that carried the PRRSV persistently.

In conclusion, delay on immune response and poor INF- γ production on early weeks PI can be explained by the increase of CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells circulating, these cells are generated apparently on mediastinal LN at 3-7 dpi. As well as, the increase in the number of IFN- γ secreting cells at 28 days PI could be related to decrease of Treg at the same time and by the loss of their suppressive activity. However, viral persistence on tissues in absence of viremia, can be explained by the increase of Treg on tonsil around 20 dpi. This information can contribute to explain the absence of cellular immune response in the first weeks post-infection and the low production of IFN- γ by PRRSV specific T cells after 28 dpi. Moreover, these results provide evidence to support the idea that CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ populations in swine are inducible regulatory T cells.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Frequency of Treg cells on PBMCs. The percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD8⁺ lymphocytes T population was quantified by flow cytometry. Black column represent infected swine and white are uninfected swine in CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ population. Data represent the mean of n=4 infected and n=2 uninfected groups; differences were determined using one-way ANOVA and Tukey's test.

Figure 2. Viral particles on serum. A) Detection of PRRS virus was performed by real time PCR using a standard curve. B) Lineal regression was done to correlate viral load vs. Treg.

Figure 3. Treg frequency on mediastinal lymph nodes. The percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD8⁺ lymphocytes T population was quantified by flow cytometry. Black column represent infected swine and white are uninfected swine in CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ population. Data represent the mean of n=4 infected and n=2 uninfected groups; differences were determined using Kruskal-Wallis test and Dunns for medians comparison or two tailed Mann Whitney test p<0.05.

Figure 4. Viral load in mediastinal LN. Detection of PRRS virus was performed by real time PCR using a standard curve to obtained viral particles by gram of tissue.

Figure 5. Distribution of Treg on Tonsil. The percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD8⁺ lymphocytes T population was quantified by flow cytometry. Black column represent infected swine and white are uninfected swine in CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ population. Data represent the mean of n=4 infected and n=2 uninfected groups; differences were determined using Kruskal-Wallis test and Dunns for medians comparison.

5. REFERENCES

- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 74, 10834-10837.
- Belkaid, Y., 2007, Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7, 875-888.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2007, Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195.
- Corthay, A., 2009, How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326-336.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Goddeeris, B., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009, Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3(+)CD8(high) cells. *Vet Res* 40, 46.
- 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 Immunol* 19, 646-661.
- Chase, A.J., Yang, H.C., Zhang, H., Blankson, J.N., Siliciano, R.F., 2008, Preservation of FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4+ T-cell activation. *J Virol* 82, 8307-8315.
- 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. *Clin Vaccine Immunol* 15, 720-725.
- Huehn, J., Polansky, J.K., Hamann, A., 2009, Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9, 83-89.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008a, Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 92-101.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008b, Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 153-158.
- Li, S., Gowans, E.J., Chougnet, C., Plebanski, M., Dittmer, U., 2008, Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 82, 21-30.
- 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.

- Meulenbergh, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55, 197-202.
- Miyara, M., Sakaguchi, S., 2007, Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13, 108-116.
- 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. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.
- 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.
- Sojka, D.K., Huang, Y.H., Fowell, D.J., 2008, Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.
- Stoop, J.N., Claassen, M.A., Woltman, A.M., Binda, R.S., Kuipers, E.J., Janssen, H.L., van der Molen, R.G., Boonstra, A., 2008, Intrahepatic regulatory T cells are phenotypically distinct from their peripheral counterparts in chronic HBV patients. *Clin Immunol* 129, 419-427.
- Thornborn, G., Pomeroy, L., Isohanni, H., Perry, M., Peters, B., Vyakarnam, A., 2010, Increased sensitivity of CD4+ T-effector cells to CD4+CD25+ Treg suppression compensates for reduced Treg number in asymptomatic HIV-1 infection. *PLoS One* 5, e9254.
- Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2005, The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 219-225.
- 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. *Arch Virol* 152, 289-303.
- 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). *Vet Immunol Immunopathol*.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004, The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 78, 5923-5933.

FIGURES

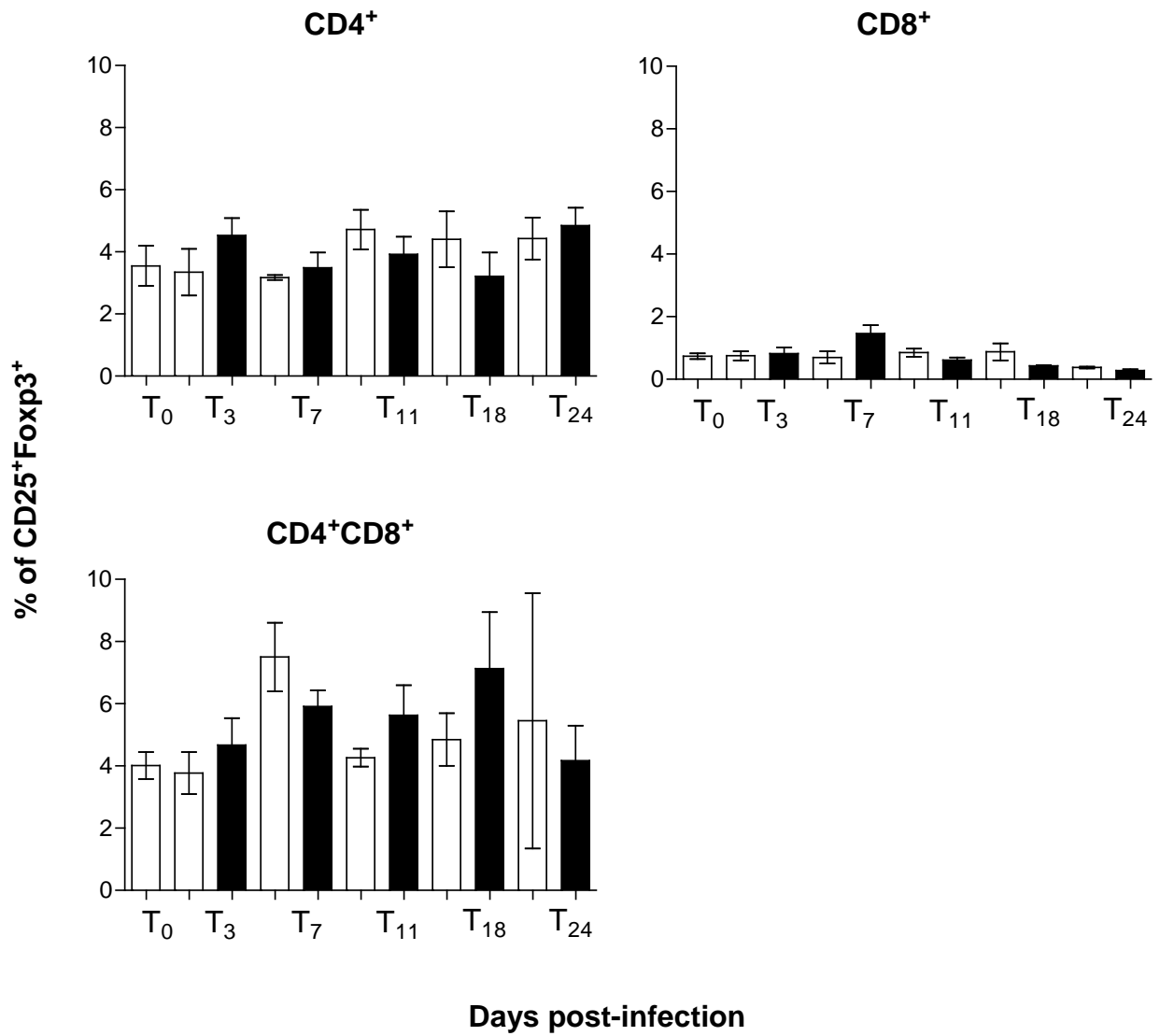


Figure 1. Frequency of Treg cells on PBMCs.

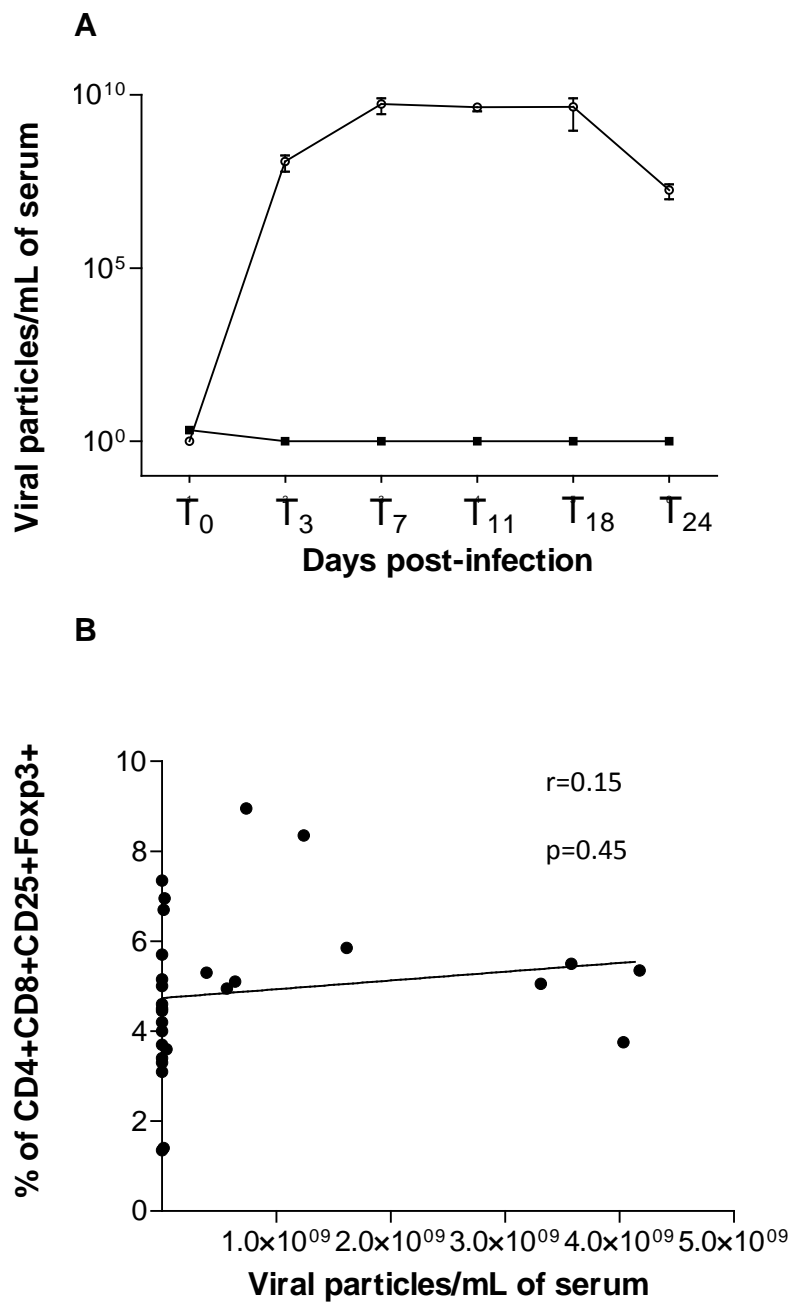


Figure 2. Viral particles on serum.

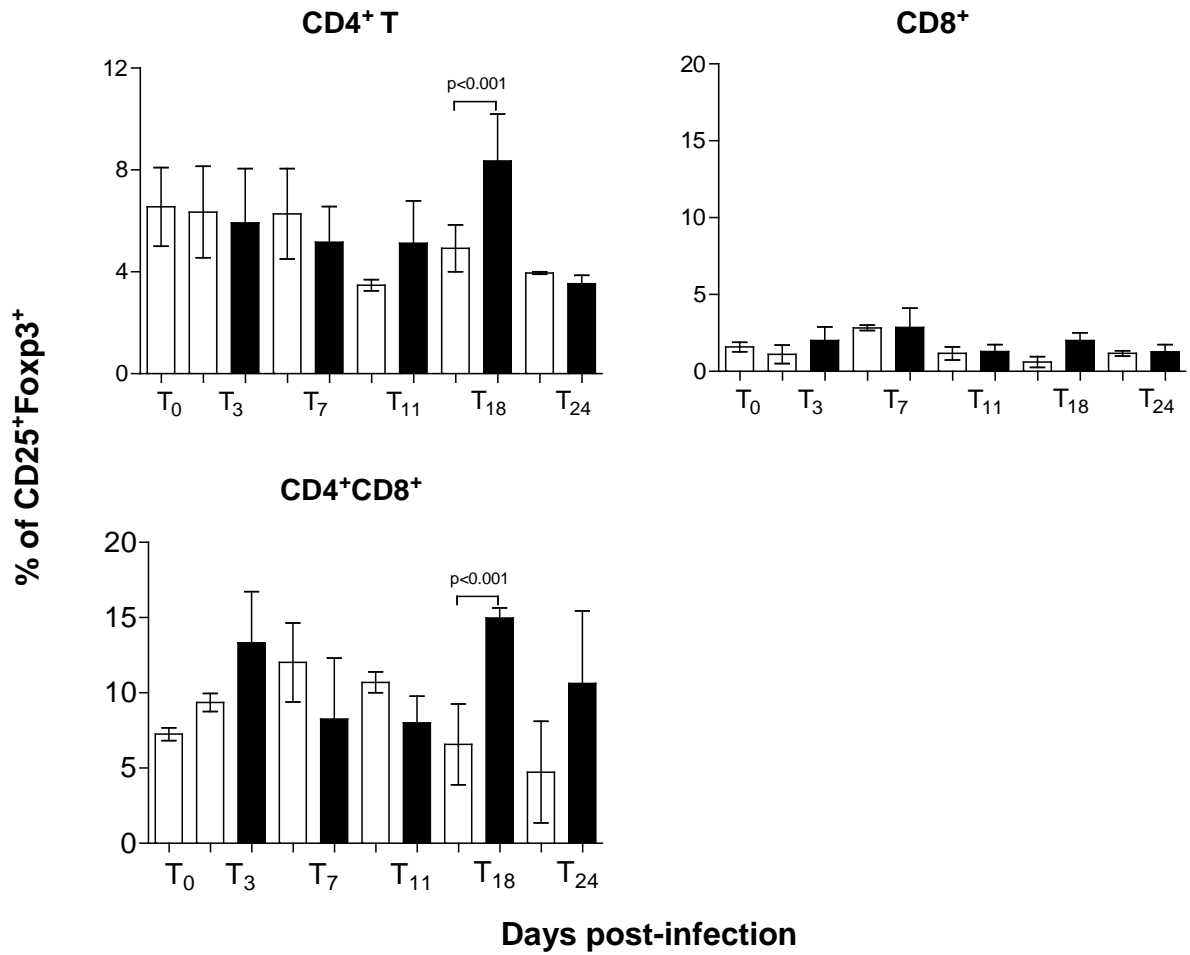


Figure 3. Treg frequency on mediastinal lymph nodes.

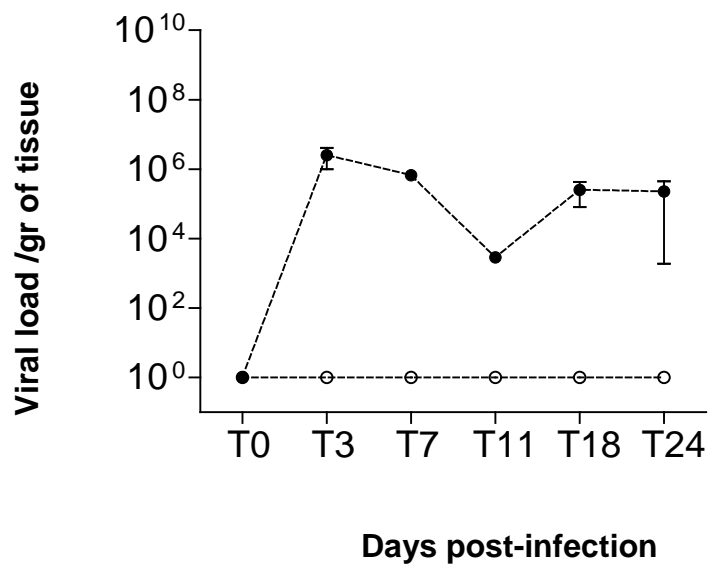


Figure 4. Viral load in mediastinal LN.

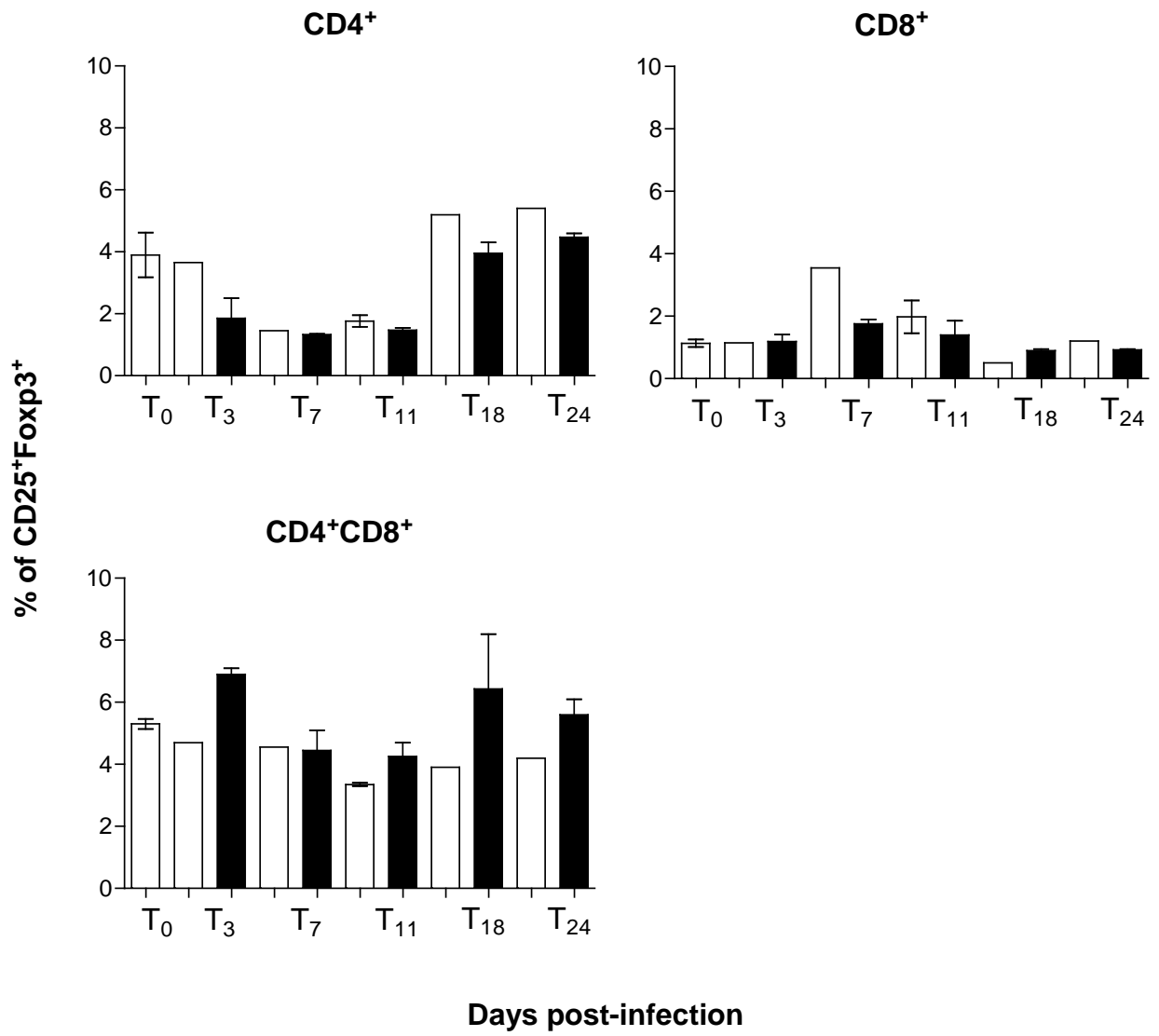


Figure 5. Distribution of Treg on Tonsil.

Anexos

Capítulos de libro:

**Inmunología Veterinaria José Ángel
Gutiérrez Pabello**

Procesamiento y presentación de antígenos

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

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

de antígeno.

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

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

de MHC-II, sólo tres tipos celulares pueden hacerlo, los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. Estas tres últimas son conocidas como células presentadoras de antígenos profesionales, y de todas ellas las más efectivas con las células dendríticas

CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS PROFESIONALES

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

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

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

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

RECONOCIMIENTO Y CAPTURA DE ANTÍGENOS MEDIADO POR LAS APC

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

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

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

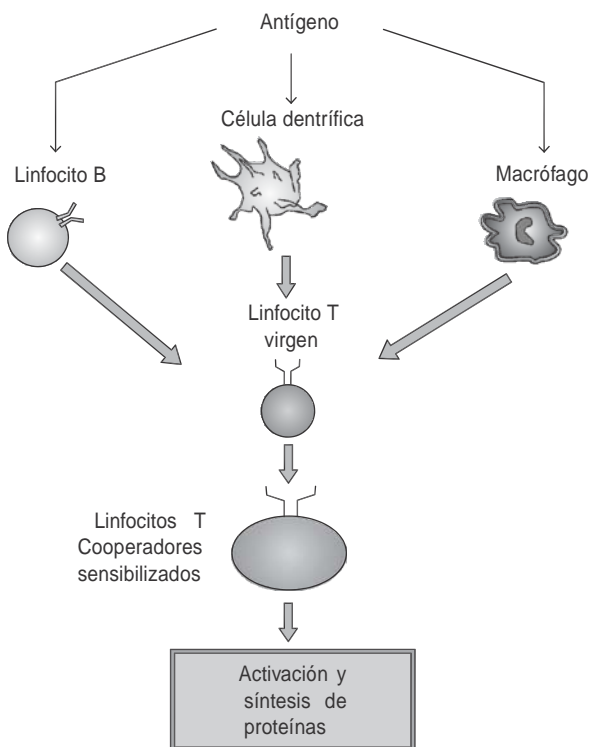


Figura 7-1. Células presentadoras de antígenos: células B, macrófagos (MØ) y células dendríticas (DC). Las DC son las APC que poseen mayor habilidad de activación de los linfocitos T vírgenes; lo anterior, debido a sus características de ubicación anatómica y capacidad de migración, así como la variedad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

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

LINFOCITOS B COMO CÉLULAS PRESENTADORAS

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

MACRÓFAGOS COMO CÉLULAS PRESENTADORAS

Los macrófagos (MØ) son células fagocíticas, cuya función principal es participar en la respuesta inna-

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

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

CÉLULAS DENDRÍTICAS

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

Poblaciones de células dendríticas

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

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

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

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

Células dendríticas inmaduras

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

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

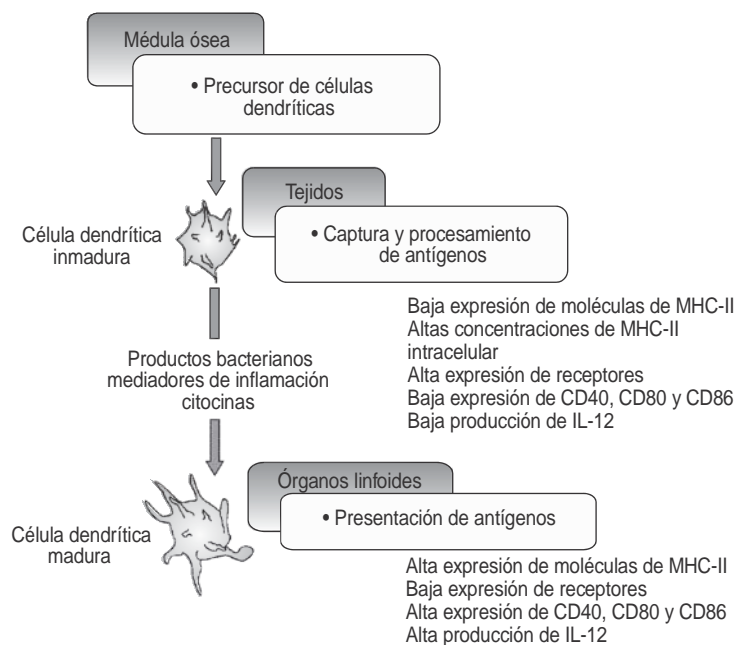


Figura 7-2. Las células dendríticas tienen dos estados de maduración: DC inmaduras y maduras. Las características funcionales y ubicación dependen de este estado de maduración.

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

Células dendríticas maduras

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

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

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

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

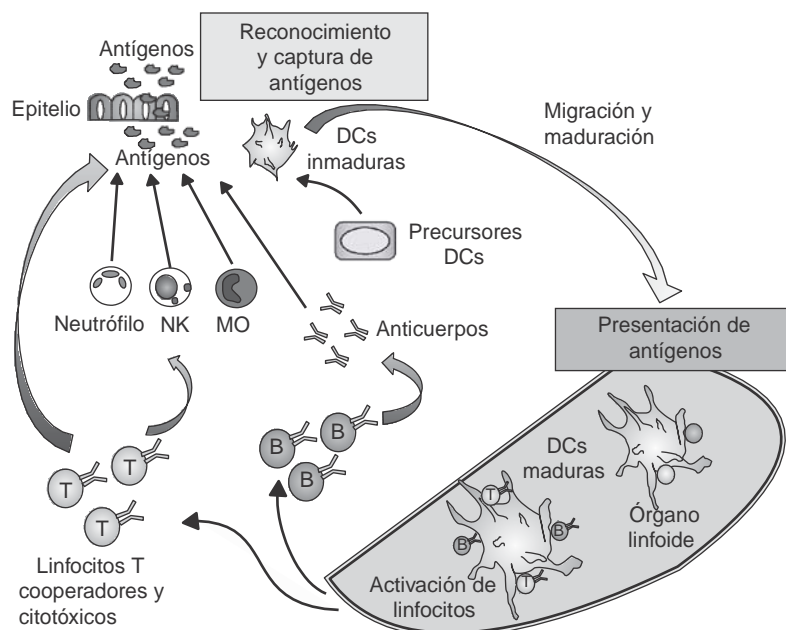


Figura 7-3. Importancia de las células dendríticas en la respuesta inmune. Las funciones principales que desempeñan las DC son la de reconocimiento y captura del antígeno, procesamiento y migración y la presentación de antígenos.

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

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

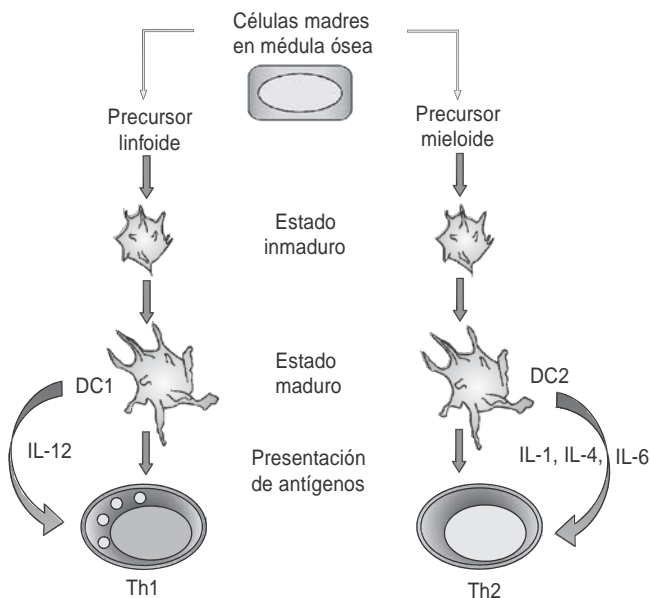


Figura 7-4. Las DC se originan de un precursor común que se encuentra en médula ósea, el cual se diferencia en un precursor mielóide y uno linfóide. Estos precursores se diferencian en células dendríticas inmaduras, las cuales tras su maduración presentan antígenos a linfocitos T. Distintas poblaciones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

RUTAS DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

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

PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EXÓGENOS POR LA VÍA DEL MHC-II

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

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

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

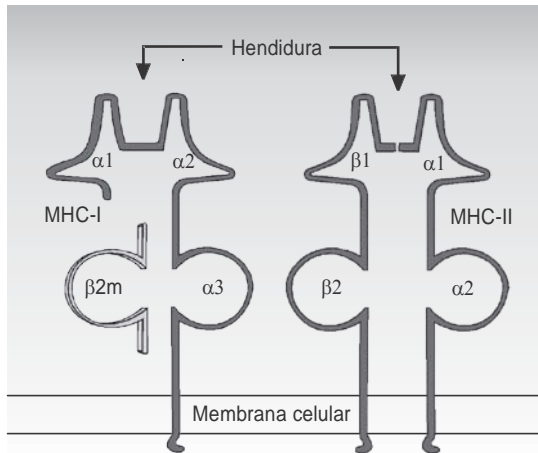


Figura 7-5. Esquema de la estructura de las moléculas de MHC-I y MHC-II. El esquema ilustra las diferentes regiones de las moléculas de MHC. Los dominios que forman la hendidura de unión al péptido son: $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en las moléculas de clase 1. $\alpha 1$ y $\alpha 1$ en las moléculas de clase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

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

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

PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ENDÓGENOS POR LA VÍA DEL MHC-I

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

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

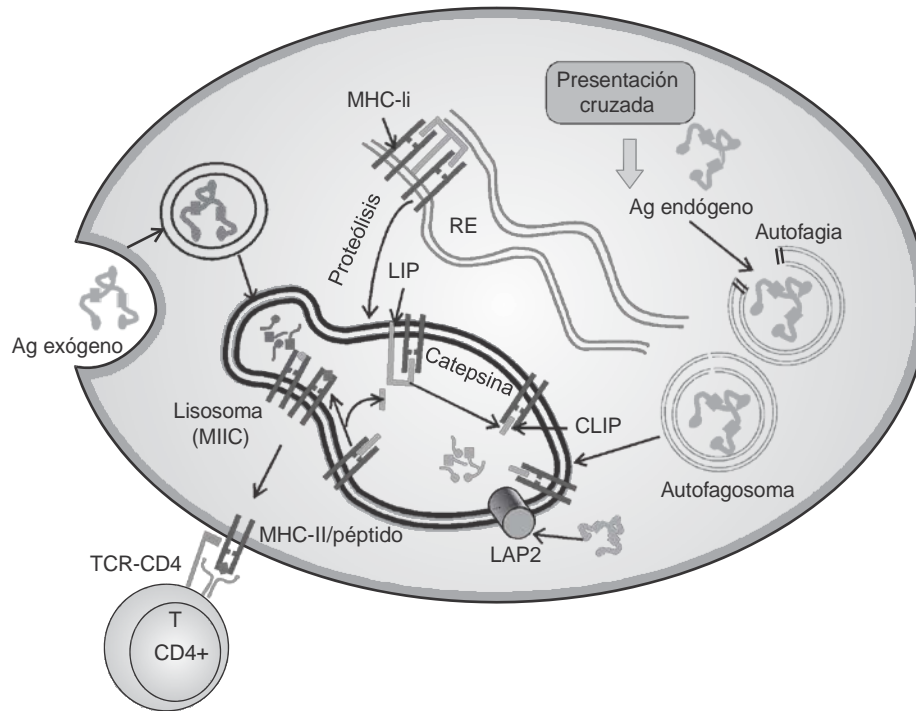


Figura 7-6. Vía de presentación por MHC-II. En esta vía se presentan por lo general antígenos que son fagocitados o endocitados por las células presentadoras de antígenos. Los antígenos son transportados hasta el lisosoma para ser degradado, donde son asociados a las moléculas de MHC-II presentes en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

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

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

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

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

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

PRESENTACIÓN CRUZADA

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

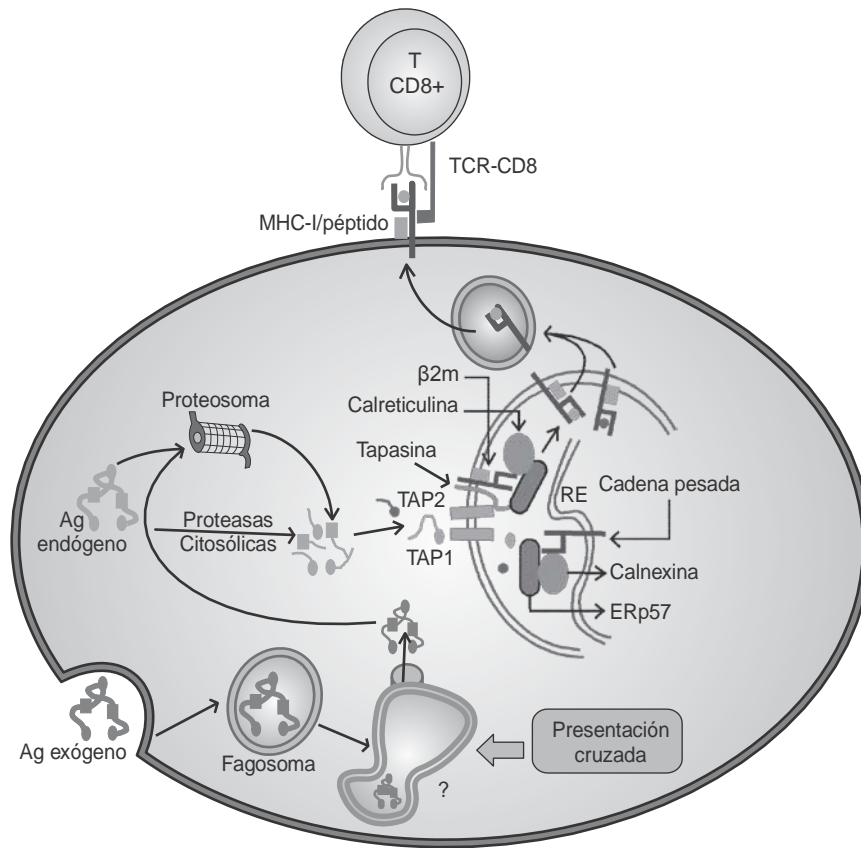


Figura 7-7. Vía de presentación por MHC-I. Los antígenos proteicos que se presentan por esta vía provienen del citosol (proteínas propias o patógenos intracelulares como virus). La formación del complejo MHC-péptido se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, para ser transportada hacia la membrana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

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

PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS LIPÍDICOS POR LA VÍA CD1

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

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

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

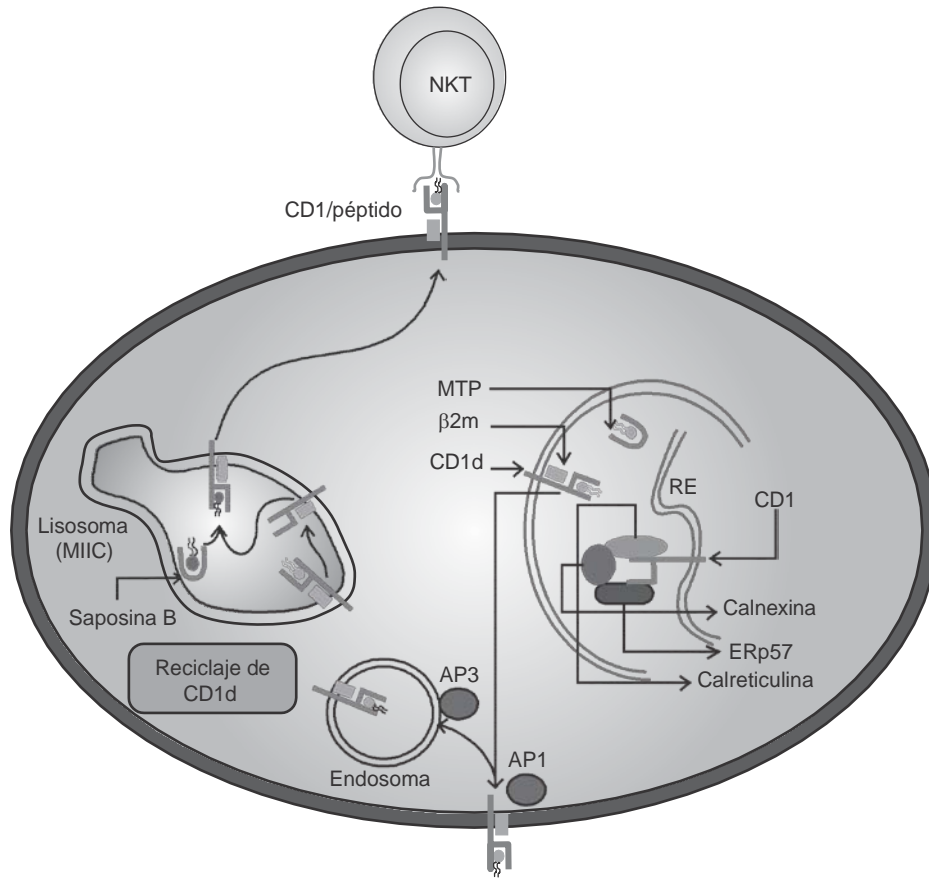


Figura 7-8. Vía de presentación por CD1. Los antígenos lipídicos (lípidos isoprenoides, esfingolípidos y fosfatidilinosítoles) son asociados a moléculas de CD1. En este esquema se presenta la vía del CD1d, donde el lípido (propio) se asocia con la molécula CD1 en el RE, de forma posterior es transportado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

citoplasma. El CD1 tiene una estructura muy parecida a las moléculas de MHC-I (figura 7-5).

La asociación de las moléculas de CD1 al antígeno tiene lugar en los diferentes compartimentos o estadios de la ruta endocítica. La ruta completa para la asociación de los lípidos a las diferentes moléculas de CD1 (a, b, c, b y e) aún no se conoce con exactitud.

El mecanismo por el cual los lípidos son cargados a las moléculas de CD1d ha sido descrito como modelo para la presentación de antígenos por las moléculas CD1. Se ha propuesto que los lípidos son unidos a las

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

BIBLIOGRAFÍA

- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L et al:** Antigen presentation and T cells stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;621–667.
- Moody DB, Porcelli AS:** Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nature Reviews Immunology.* Vol 3. 2003;11-22.
- Münz C:** Autophagy and antigen presentation. *Cellular Micro-biology.* 2006;8(6):891–898.
- Strawbridge AB, Blum JS:** Autophagy in MHC class II antigen processing. *Current Opinion in Immunology.* 2007;87-92.
- Trombetta ES, Mellman I:** Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23: 975–1028.
- Wearsch P, Cresswell P:** Antigen processing and presentation. *Nature Review immunology.* Poster. 2009.

Vacunación en cerdos

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

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

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

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

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

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

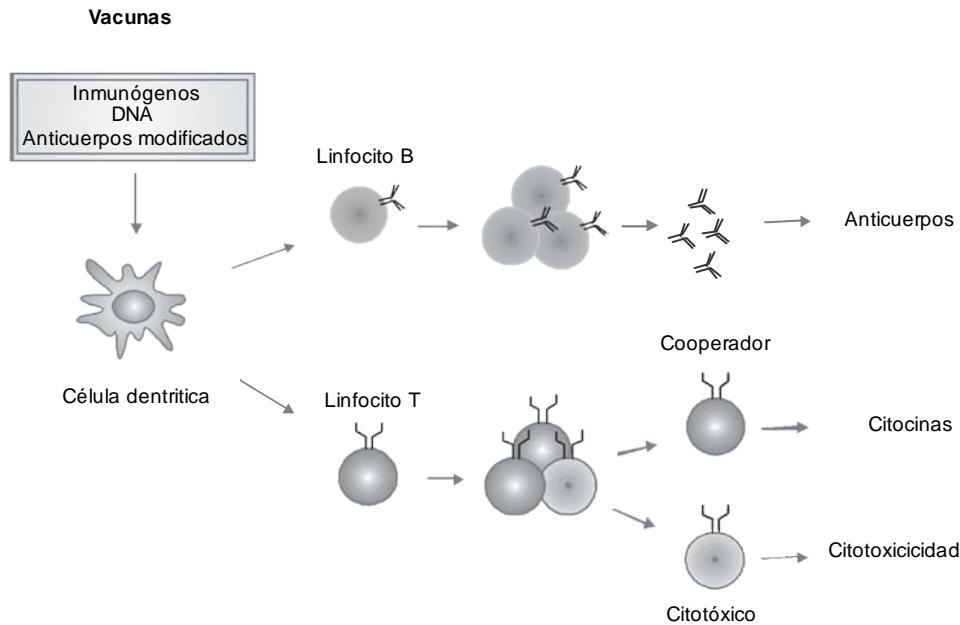


Figura 21-1. Esquema que ilustra como las vacunas estimulan el sistema inmune. Células involucradas en la respuesta inmune frente a una vacuna o un inmunógeno. Una vacuna eficiente confiere protección mediante anticuerpos y respuesta celular tras la activación de linfocitos B y T por células dendríticas.

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

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

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

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

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

minado patógeno. El plásmido actúa como un vector que permite la expresión del gen de interés en el interior de las células que son transfectadas como resultado de la inmunización (figura 21-2). La respuesta inmune generada, humoral o celular, ayuda al cerdo vacunado a contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su uso constituye una herramienta potencial en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune.

Entre las ventajas que pueden atribuirse al empleo de las vacunas de DNA se puede mencionar: su capacidad para estimular una respuesta de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8 la cual no se logra con la mayoría de las actuales vacunas convencionales inactivadas o de subunidades recombinantes, además de que se obvia el empleo de vacunas vivas y las cuestiones de seguridad asociadas a este tipo de vacunación. Además de esto su bajo costo de producción y el hecho de que no requieren de cadena de frío para su distribución (dada su mayor estabilidad) son ventajas importantes en este tipo de vacunas.

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

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

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

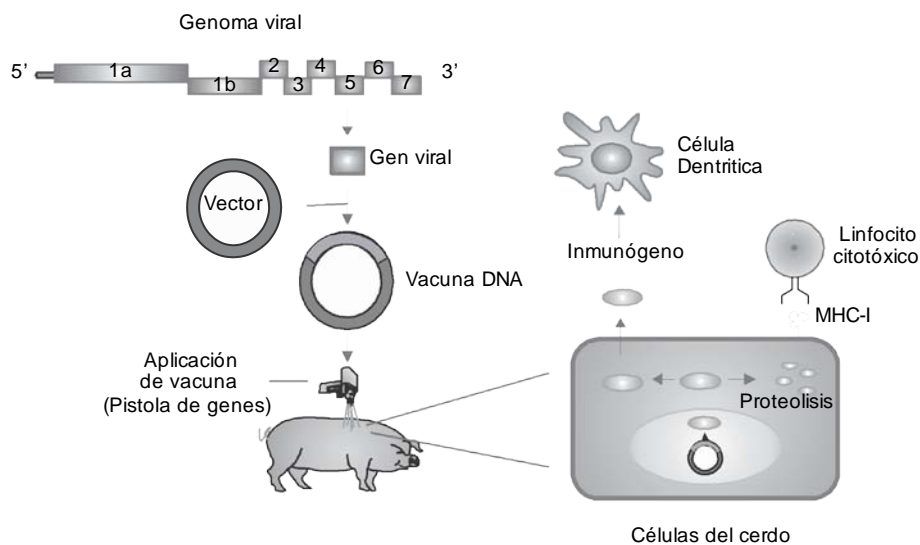


Figura 21-2. Esquema que ilustra la generación y mecanismo de acción de las vacunas a base de DNA. En primer lugar se elige del gen que confiere protección y la inserción de dicho gen en un vector de expresión adecuado y eficiente. Posteriormente los eventos que se llevan a cabo dentro de las células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

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

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

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

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

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

ENFERMEDADES EN LA GRANJA O LA REGIÓN

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

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

VACUNAS DISPONIBLES

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

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

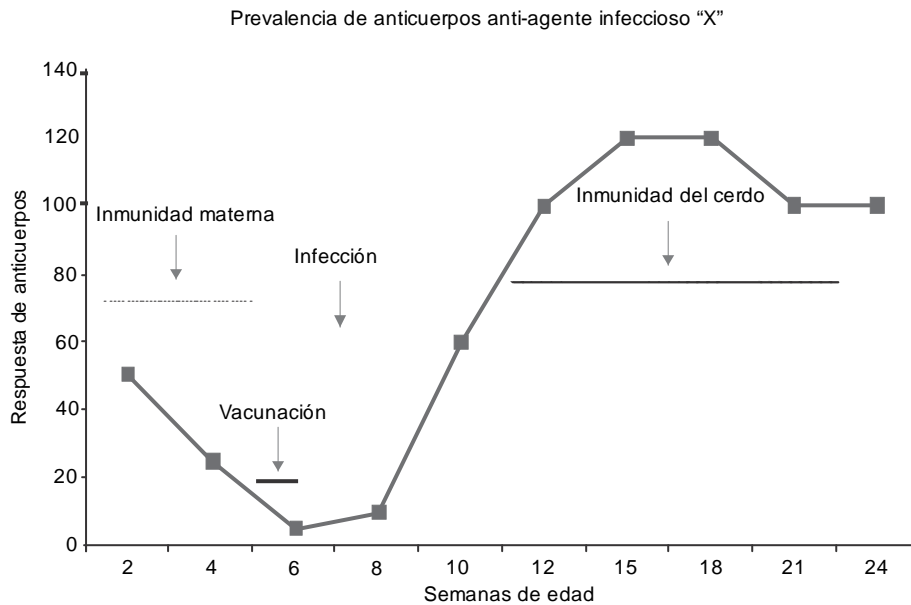


Figura 21-3. Esquema ilustrativo de prevalencia de anticuerpos en la línea de producción para determinar el momento ideal para la aplicación de una vacuna.

Vacunas a base de patógenos con capacidad infectiva

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

Vacunas a base de patógenos inactivados

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

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

Vacunas a base de subunidades

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

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

Las reacciones secundarias que se pueden presen-

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

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

EJEMPLOS PRÁCTICOS DE LA VACUNACIÓN EN CERDOS

SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)

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

Inmunidad

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

Selección de inmunógeno

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

Criterios de cronograma de vacunación

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

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

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

Vacunación emergente o en brote

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

Riesgos de vacunación

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

CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)

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

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

Inmunidad

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

Selección de inmunógeno

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

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

Criterios de cronograma de vacunación

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

Vacunación emergente o en brote

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

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

Riesgos de vacunación

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

INFLUENZA PORCINA

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

Inmunidad

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

Selección de inmunógeno

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

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

Criterios de cronograma de vacunación

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

Mycoplasma

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

Inmunidad

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

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

Selección de inmunógeno

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

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

Criterios de cronograma de vacunación

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Manual Moderno. 2005.

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

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

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

Artículos con arbitraje

1. Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387:373-9.
2. Erika Silva-Campa, Lorena Cordova, Lorenzo Fraile Lorenzo, Lilian Flores-Mendoza María Montoya, and Jesús Hernández (2009). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells, but does not induce Tregs cells. *Virology* 396:264-271.
3. Sugich-Miranda, R., Sotelo-Mundo, R. R., Silva-Campa, E., Hernández, J., Gonzalez-Aguilar, G. A. and Velazquez-Contreras, E. F. (2010), Antioxidant capacity of binuclear Cu(II)-cyclophanes, insights from two synthetic bioactive molecules. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24: 379–383.
4. Erika Silva-Campa, Verónica Mata, Jesús Hernández. CD4+Foxp3+ regulatory T cells in boars infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Research Veterinary Science*. Terminado.
5. Silva-Campa E. and Hernández J. CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells are the phenotype induced by porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Research*. Manuscrito en preparación.

6. Erika Silva Campa y Jesús Hernández. Participación de los linfocitos T reguladores en la respuesta inmune ante patógenos. Inmunología. Manuscrito en preparación.
7. Silva-Campa E. and Hernández J. Frequency of regulatory T cells induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in lymphoid nodules are associated with viral replication and persistence. Virology. Manuscrito en preparación.

Capítulos de Libros

1. "Procesamiento y presentación de antígenos". Silva-Campa Erika, Flores-Mendoza Lilian, Hernández J. Inmunología Veterinaria. Capítulo 7. pp 65-76. Ed. Manual Moderno. 1^{ra} Edición.
2. "Vacunación en cerdos". Flores-Mendoza Lilian, Silva-Campa Erika, Hernández J. Inmunología Veterinaria. Capítulo 21. pp 259-268. Ed. Manual Moderno. 1^{ra} Edición.

Presentaciones en Congresos

1. Erika Silva-Campa, Lilian Flores-Mendoza, Mónica Reséndiz, Karina Espinoza, Verónica Mata and Jesús Hernández. Enhancement of regulatory T cells during primary and secondary swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. International PRRS Symposium, Chicago, USA. December 2009. Poster.
2. Erika Silva-Campa, Lilian Flores-Mendoza, Mónica Reséndiz, Karina Espinoza y Jesús Hernández. Frecuencia de células T reguladoras en cerdos infectados con el virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino. VI Congreso Nacional de Virología, Mérida, Yucatán, México. Noviembre 2009. Poster.
3. Erika Silva-Campa, Lilian Flores-Mendoza, Mónica Reséndiz, Karina Espinoza, Verónica Mata y Jesús Hernández. Frecuencia de células T reguladoras en cerdos infectados con el virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino. XIX Congreso Nacional de Inmunología, Cancún, Quintana Roo, México. Marzo 2010. Poster.

Estancia académica

Universidad Autónoma de Barcelona. Fundación Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Laboratorio de Inmunología, con la Dra. María Montoya, de Julio a Septiembre del 2008.

Distinciones

CANIFARMA-VETERINARIA 2008 Premio: “Dr. Alfredo Téllez Giron Rode”
La mejor investigación básica. “Análisis de la interacción entre células dendríticas y el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PPRS) para entender y proponer alternativas en el control de la enfermedad”. Otorgada por: Sección Veterinaria de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica.

2009 David A. Benfield Student Travel Fellowship Award. Enhancement of regulatory T cells during primary and secondary swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Otorgado por IPRRSS.