Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

"ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T POR CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO"

POR:

ERIKA SILVA CAMPA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

OUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA **DICIEMBRE DEL 2007**

DECLARACIÓN

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académico, se deberá contar con la autorización del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

Las publicaciones en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

ATENTAMENTE

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

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 Maestro en Ciencias.

Dr. Jesús Hernández López
Director de Tesis

Dra. Araceli Pinelli Saavedra

Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de ser un becario y al Centre de Reserca en Sanitat Animal (CReSA). Además este trabajo fue financiado por SEP-CONACyT, proyecto 43602 y por el Ministerio de Educación y Ciencia de España, proyecto AGL2005-07073-C02-02.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Jesús Hernández L. por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología, por su paciencia y comprensión, por alentarme a ir más allá de lo planeado, por sus grandes enseñanzas esas que estarán conmigo siempre y por ser más que un asesor un amigo. Gracias también a mi co-asesora la Dra. María Montoya por darme la oportunidad y las facilidades necesarias para realizar parte de este trabajo en el CReSA.

Quiero dar las gracias a QB. Mónica Reséndiz del CIAD, A.C. por el valioso apoyo técnico prestado en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Harry Dawson de Unites States Deparment of Agriculture por su asesoría y generosidad al obsequiarnos los iniciadores y sondas que fueron utilizados en este trabajo. También quiero agradecer a los Doctores Lorenzo Fraile e Ivan Díaz del CReSA por su apoyo técnico.

Gracias a mi comité de tesis por su guía y el tiempo que dedicaron al desarrollo y evaluación de este trabajo, estuvo integrado por el Dr. Carlos Velázquez de la Universidad de Sonora, por la Dra. Gloria Yepiz y la Dra.

Araceli Pinelli del CIAD, A.C. que en muchas ocasiones fue como mi segunda asesora, gracias por tantos consejos.

También quiero agradecer a la Coordinación de docencia por el apoyo constante durante estos dos años especialmente a la Dra. Ana María Calderón, sin olvidarme por supuesto de Isabel, Verónica, Laura y Héctor gracias por su paciencia.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio Araceli, Alexel, Andrea, Eneida, Jesús, Lupita, Marisela, Mónica, Normande, Rosario, Salvador, Susana y Verónica por esa sonrisa que alegra el alma, por ese abrazo que te mantiene en pie y te ayuda a seguir adelante, los quiero mucho. Sobre todo quiero darte las gracias a ti mi gran amiga Lilian, pues además de regalarme tu amistad has sido mi maestra, eres una persona fuerte e inteligente a la que admiro profundamente, te quiero mucho amiguis.

Gracias a mis compañeros de la generación 2005-2007 porque entre risas que muchas veces fueron de nervios supimos ir llevando nuestros días en CIAD, A.C. Especialmente quiero agradecer a Lilian, Aurora, Jesús, Orlando, Sandra, Oliviert, Mariana, Margarito y Daniel, siempre los recordaré.

Por ultimo quiero darles las gracias a mis amigos Lupita, Rafael y Barbara porque me recuerdan que existe otro mundo fuera del CIAD, A.C,.los quiero mucho. También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del CReSA Nilsa, Beto, Yenifer, Elisa, Bibiana, Carolina, Ivan, María, Mariona y Lorena gracias por hacerme sentir como en casa, nunca los olvidare.

Agradezco enormemente a DIOS por darme la fortaleza para terminar este proyecto de vida.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres Amparo Campa y Federico Silva por su apoyo y consejos, pero sobre todo por su ejemplo de trabajo, honestidad y superación que me hicieron esforzarme cada día estoy muy orgullosa de ustedes. A mis hermanos Lizbeth y Adán porque han sido una inspiración para mí, así como ustedes están siguiendo sus sueños y nada ni nadie los detiene yo también quise hacerlo y en el camino estoy los quiero mucho.

También quiero dedicarla a ti Luis Rafael por ser un ejemplo de crecimiento personal, esfuerzo y sobretodo por el cariño que me has dado, gracias a ti estuve fuerte en los días difíciles, gracias por todo mi amor.

Este trabajo lo dedico especialmente a mi abuelo Eduardo porque fue un ejemplo de rectitud, honradez y amor, te extraño mucho tatota.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE TABLAS X

RESUMEN XI

INTRODUCCIÓN 1

ANTECEDENTES 3

Linfocitos T 3
- Clasificación y función de los linfocitos T cooperadores 3
- Función efectora de las células T citotóxicas 4

Células Dendríticas 4
- Generalidades 4
- Ontogenia y estadios de diferenciación 5
- Función de las células dendríticas 6

Interacción entre Células Dendríticas y Linfocitos T 8
- Activación de los linfocitos T 8
- Complejo TCR y moléculas accesorias 9
- Cascadas de señalización 10
- Modulación de la respuesta inmune 12
- Factores de transcripción 13

Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino 14
- Generalidades 14
- Estructura olecular 15
- Patogenicidad 16
- Respuesta inmune frente al virus del PRRS 17

JUSTIFICACIÓN 20

HIPÓTESIS 21

OBJETIVOS 21

General 21

Particulares.....21

MATERIALES Y MÉTODOS.....23

Animales.....23

Preparación del Stock Viral.....23

Generación de Células Dendríticas Derivadas de Monocitos.....24

Infección de Células Dendríticas con Virus del PRRS.....25

Proliferación de Linfocitos T.....25

Inducción de Células T reguladoras.....26

Determinación de Citocinas Th1, Th2 y Treg.....27

Expresión de Factores de Transcripción.....27

Análisis Estadístico.....28

RESULTADOS.....29

Proliferación de células T por citometría y CFSE.....29

Generación de Células T reguladoras.....33

Cuantificación de Citocinas.....36

DISCUSIÓN.....40

CONCLUSIONES.....46

ANEXOS.....47

Lista de Abreviaturas.....47

REFERENCIAS.....49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía electrónica de una dendrítica aislada de pulmón de cerdo..... 5
Figura 2. Moléculas que participan en la activación del linfocito T..... 9
Figura 3. Cascada de activación de linfocitos T 11
Figura 4. Modulación de la respuesta inmune por las células dendríticas 13
Figura 5. Esquema de la organización genómica del virus PRRS 16
Figura 6. Proliferación celular con CFSE 30
Figura 7. Proliferación de células T inducida por DCs infectadas con virus PRRS 31
Figura 8. Proliferación celular inducida por DCs infectadas con PCV2 ... 32
Figura 9. Expresión de $Foxp3^{+}CD25^{+}$ en células no adherentes 34
Figura 10. Inducción de Linfocitos T con fenotipo regulador $Foxp3^{+}CD25^{+}$..... 35
Figura 11. Expresión de mRNA de citocinas Th1, Th2 y Treg 37
Figura 12. Cuantificación de las citocinas IL-10 e IFN-γ por ELISA 38
Figura 13. Expresión relativa de factores de transcripción T-bet, GATA3 y Foxp3 39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Inducción de citocinas en DCs infectadas por cepas de virus PRRS 24

Tabal 2. Descripción de iniciadores y sondas..... 28

Tabla 3. Porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 33

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) tienen la capacidad de activar linfocitos T y modular su respuesta a Th1, Th2 o T reguladoras (Treg). La respuesta inmune celular ante el virus del PRRS se encuentra dlsrninuida y es ineficaz. Éste virus infecta y se replica en DCs, por ello la hipótesis fue que las DCs infectadas con virus PRRS suprimen la respuestas Th1 y Th2 en linfocitos T in vitro. El objetivo fue evaluar la capacidad de las DCs infectas con el virus PRRS para estimular una respuesta inmune. Las DCs se infectaron (m.o.i. 0.1) con 2 cepas americanas y 5 cepas europeas, se co-cultivaron con células no adherentes homólogas, La proliferación se analizó con CFSE y la inducción de células con fenotipo Treg con anticuerpos anti-Foxp3 y anti-CD25, por citometría de flujo. La cuantificación del mRNA de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ) y factores de trascripción (T-bet, GATA3 y Foxp3) se analizaron por PCR en tiempo real a las 24 h de co-cultivo. La producción de cltocinas (IL-10 e IFN-γ) en el sobrenadante colectados al día 3 se determinó por ELISA. Los resultados muestran que las cepas americanas, pero no las europeas reducen la proliferación ($p<0.05$). El tratamiento con IFN-α de las DCs infectadas con cepas americanas no modifica la proliferación ($p>0.05$), Las cepas americanas aumentaron ($p<0.05$) el porcentaje de células con fenotipo $Foxp3^{+}CD25^{+}$, mientras que las europeas no ($p>0.05$). No hubo diferencias en la expresión de IL-10, IFN-γ , IL-4, T-bet y Gata-3 ($p>0.05$). Para las cepas americanas se observó un incremento significativo en la expresión de TGF-β y el Foxp3 tiende a incrementar. Estos resultados muestran que las DCs infectadas con PRRS no son capaces de estimular la respuesta de células T y este efecto podría ser la consecuencia de la inducción de células Treg por las cepas americanas y debido a la acción del TGF-β.

INTRODUCCIÓN

Para controlar una infección viral se requiere de la respuesta inmune innata y adaptativa. En la respuesta inmune innata uno de los mecanismos efectores de mayor relevancia es la producción de interferón de tipo I (IFN-α e IFN-β) por las células infectadas. Otros mecanismos son la participación de células NK (que al activarse promueven la lisis de la célula infectada), producción de citocinas proinflamatorias (como TNF-α e IL-1) y activación del complemento (Goldsby et al., 2004). Dentro de la respuesta inmune adaptativa anti-viral se encuentran mecanismos humorales y celulares, siendo la respuesta celular la más importante (Abbas y Lichtman, 2004).

La activación de una respuesta inmune específica y efectiva requiere de un sistema que pueda examinar, descifrar y responder rápidamente ante una infección de una manera apropiada. Las células dendríticas (DCs) son parte del sistema inmune innato y participan en cada una de estas actividades. Las DCs poseen la capacidad de modular la respuesta inmune dependiendo del tipo de patógeno, por lo que son el punto medio entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Degli-Esposti and Smyth, 2005).

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) emergió a finales de los ochentas y se diseminó rápidamente en la población de cerdos a nivel mundial (Van Gucht et al., 2004). Las pérdidas económicas reportadas por la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) tan solo en un año ascienden a 560 millones de dólares, por ello es considerado un virus devastador a nivel mundial. Su alta variabilidad y la baja respuesta inmune de los cerdos infectados, provoca que las vacunas sean poco efectivas para controlar al virus. En los cerdos infectados la respuesta inmune celular está disminuida y es ineficaz (Murtaugh et al., 2002). Por lo tanto, es importante

estudiar los mecanismos por los cuales los linfocitos T no responden adecuadamente. Una posibilidad es una deficiente activación de los linfocitos T por parte de las células dendríticas infectadas con el virus PRRS.

ANTECEDENTES

Linfocitos T

La respuesta inmune celular (mediada por linfocitos T) tiene un papel muy importante en la eliminación de células infectadas por virus. Existen principalmente dos tipos de células T, CD4 y CD8. Los linfocitos CD4 o cooperadores tienen la función de sintetizar citocinas y factores de crecimiento que inducen diferenciación y proliferación de otros linfocitos T. Además, promueven la acción de otras células como linfocitos B, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Los linfocitos CD8 o citotóxicos (CTL) poseen la función de destruir células infectadas por virus o tumorales. Por lo tanto, tienen una actividad muy importante en el control y la eliminación de infecciones virales (Abbas and Lichtman, 2004; Balasuriya and MacLachlan, 2004).

Clasificación y Función de los Linfocitos T Cooperadores

Los linfocitos T cooperadores también denominados células Th (del inglés T helper), se clasifican dependiendo del tipo de citocina que producen en 3 tipos: Th1, Th2 y T reguladores (Treg). Los linfocitos Th1 secretan principalmente IFN-γ e IL-2 citocinas que favorecen la eliminación de organismos intracelulares. El IFN-γ participa en la activación de macrófagos, NK y CTL, éstos ayudan a la eliminación de células infectadas con virus. Las células Th2 sintetizan IL-4, IL-5, y IL-13, que favorecen la eliminación de patógenos extracelulares al promover la producción de anticuerpos (Abbas and Lichtman, 2004). Por último, los linfocitos Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) se caracterizan por producir IL-10 y TGF-β suprimiendo la respuesta inmune, es

decir, bloqueando tanto la respuesta Th1 como Th2 (Kapsenberg, 2003). Por lo tanto, es deseable que en una infección viral se generen linfocitos CD4 Th1.

Función Efectora de las Células T Citotóxicas

Los linfocitos T $CD8^+$ o citotóxicos inducen apoptosis en células infectadas o las eliminan por lisis utilizando un sistema de porfirinas y granzimas. Las primeras forman poros en la superficie de las células y de esta manera las granzimas (proteasas) penetran al citoplasma y activan enzimas denominadas caspasas quienes inducen apoptosis (Abbas and Lichtman, 2004). Además los linfocitos T citotóxicos expresan en su superficie una molécula llamada ligando Fas (FasL), el cual se une al receptor Fas (CD95) e induce la activación de caspasas y con ello apoptosis de células infectadas (Thome and Tschopp, 2001).

Para que los linfocitos T se activen y realicen su función, es necesario que el antígeno sea procesado y presentado en forma de péptido. Está función la realizan las células presentadoras de antígeno.

Células Dendríticas

Generalidades

Las células dendríticas (DCs) representan una población heterogénea de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés antigen presenting cells)

que inician y regulan la respuesta inmune. Además, están especializadas en capturar, transportar, procesar y presentar antígenos a las células T. Las DCs son las principales responsables de estimular la respuesta inmune primaria, activando a linfocitos T y B vírgenes y estimulando a las células NK (Hackstein and Thomson, 2004).

La morfología de las DCs está caracterizada por la presencia de proyecciones citoplasmáticas y un núcleo grande. Estas proyecciones pueden adoptar la forma de dendritas, pseudópodos o bellos (Figura 1). Además las DCs presentan alto contenido de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento de antígenos, tales como endosomas, lisosomas y gránulos de Birkbeck (en células de Lanhergans, LCs) (Fong and Engleman, 2000).

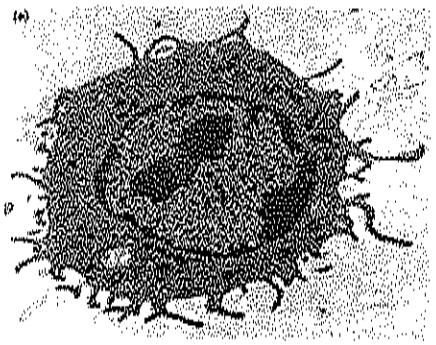


Figura 1. Fotografía electrónica de una célula dendrítica aislada de pulmón de cerdo (Loving et al., 2007).

Ontogenia y Estadios de Diferenciación

Las DCs se originan de células progenitoras ($CD34^+$) de médula ósea o de monocitos ($CD14^+$). Se diferencian en DCs inmaduras y en al menos en tres subtipos: células de Langerhans (LCs), DCs intersticiales (intDCs) y DCs Plasmocitoides (pDCs) (Hackstein and Thomson, 2004). Existen dos vías de diferenciación: por la vía mieloide se generan las LCs y las intDCs, mientras

que por la vía linfoide se generan las pDCs. Las LCs muestras una eficiencia particular para activar a los linfocitos T, mientras que las pDCs representan un tipo de barrera que ayuda a evitar la expansión de virus (células productoras naturales de interferón tipo I) (Vincent et al., 2003). Por último, las DC intersticiales inducen la diferenciación de los linfocitos B vírgenes en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Banchereau and Palucka, 2005).

Función de las Células Dendríticas

Las DCs realizan su función de forma coordinada, inicia con el reconocimiento del antígeno, seguido de la captura, transporte (migración), procesamiento y por último la presentación del antígeno (Degli-Esposti and Smyth, 2005). Durante el transporte y procesamiento del antígeno las DCs maduran convirtiéndose en APC profesionales, aumentando la expresión de moléculas de co-estimulación que participan en la activación de las células T (tales como: CD40, CD80 y CD86) y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y II (Hackstein and Thomson, 2004).

La clave para iniciar la respuesta inmune frente a un patógeno es el reconocimiento de estructuras llamadas PAMP (del inglés patterns associated molecular pathogen), que son estructuras moleculares características de patógenos, mediante receptores conocidos como PRRs (receptor de reconocimiento de patógenos). La familia de receptores tipo Toll (TLR) forman parte de los PRRs y se expresan en DCs inmaduras. Los diferentes tipos de DCs expresan distintos TLRs. En humano, las células dendríticas mieloides se encuentran presentes los TLR2, 4 y 6, mientras que en las dendríticas plasmocitoides se expresan los TLR7 y 9 principalmente (Geijtenbeek et al., 2004). Todas las respuestas de las DCs que son consideradas cruciales para

su funcionamiento y especialmente para la estimulación de linfocitos T, son mediadas por las señales de los TLRs. Por ejemplo, sobrevivencia, secreción de quimiocinas y expresión de moléculas de superficie (incluyendo moléculas de co-estimulación) (Degli-Esposti and Smyth, 2005).

Las DCs inmaduras poseen una maquinaria única para capturar antígenos a través de macropinocitosis, receptores que median la endocitosis y fagocitosis (Guermonprez et al., 2002). Después de la interiorización, la mayoría de los antígenos exógenos son procesados por la vía endosomal y lisosomal, en la cual sus componentes proteicos son degradados en péptidos y ensamblados en moléculas del MHC de clase II. Para los patógenos que no infectan a DCs o no inhiben su función, éstas adquieren antígenos presentes en el citosol, que ganan acceso al proteosoma y los péptidos son ensamblados en moléculas de MHC de tipo I en el retículo endoplásmico (Hackstein and Thomson, 2004). Las células dendríticas inmaduras tienen alta capacidad para capturar antígenos, pero baja capacidad para estimular la activación de linfocitos T. Por otra parte, las DCs maduras disminuyen su capacidad endocítica y son excelentes estimuladoras de linfocitos T (Banchereau and Palucka, 2005).

El reclutamiento de las células dendríticas de la médula ósea hacia los tejidos periféricos (no linfoides) y la subsecuente migración de las DCs maduras hacia tejido linfoide es coordinada por quimiocinas que interaccionan con su correspondiente receptor en las DCs. Por ejemplo, las DC inmaduras expresan receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5 y CXCR1 y son atraídas hacia los tejidos no linfáticos por sus respectivos ligandos, los cuales son expresados constitutivamente o por tejidos inflamados. La maduración de las DCs implica una disminución en la expresión de estos receptores y el aumento en la expresión de CCR7. Éste cambia la respuesta de las DCs por sus ligandos

CCL19 y CCL21, los cuales las guían hacia los órganos linfáticos secundarios (Randolph et al., 2005). Sin embargo, la maduración de las DCs implica también la expresión de un mayor número de moléculas de MHC, y esto es suficiente para promover la migración (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Hackstein and Thomson, 2004).

Después de la maduración, las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales. La maduración es promovida por numerosos estímulos como factores endógenos liberados por células necróticas, proteínas de choque térmico, citocinas pro-inflamatorias (como TNF-α, IL-1 e IL-6) secretadas por los tejidos dañados, productos microbianos exógenos tales como lipopolisacarido o peptidoglicanos. También por células T activadas, las cuales expresan ligandos para moléculas de co-estimulación como CD40L. Además, en las células dendríticas maduras aumenta la expresión de moléculas de co-estimulación que participan en la activación de las células T (tales como: CD40, CD80 y CD86) y moléculas de MHC I y II (Hackstein and Thomson, 2004).

Interacción entre Células Dendríticas y Linfocitos T

Activación de los Linfocitos T

La activación coordinada de linfocitos T en respuesta a antígenos extraños asegura su diferenciación en células efectoras y la expansión de sus clonas específicas. La activación es controlada por dos tipos de señales, la primera es debida al reconocimiento del antígeno (mediante el receptor de

antígeno en los linfocitos, TCR) y la segunda es mediante moléculas de co-estimulación. Los linfocitos T reconocen al complejo formado por el antígeno (péptido) asociado a la molécula de MHC presentes en la superficie de las APC (principalmente DCs) mediante el TCR (Acuto and Cantrell, 2000) (Figura 2).

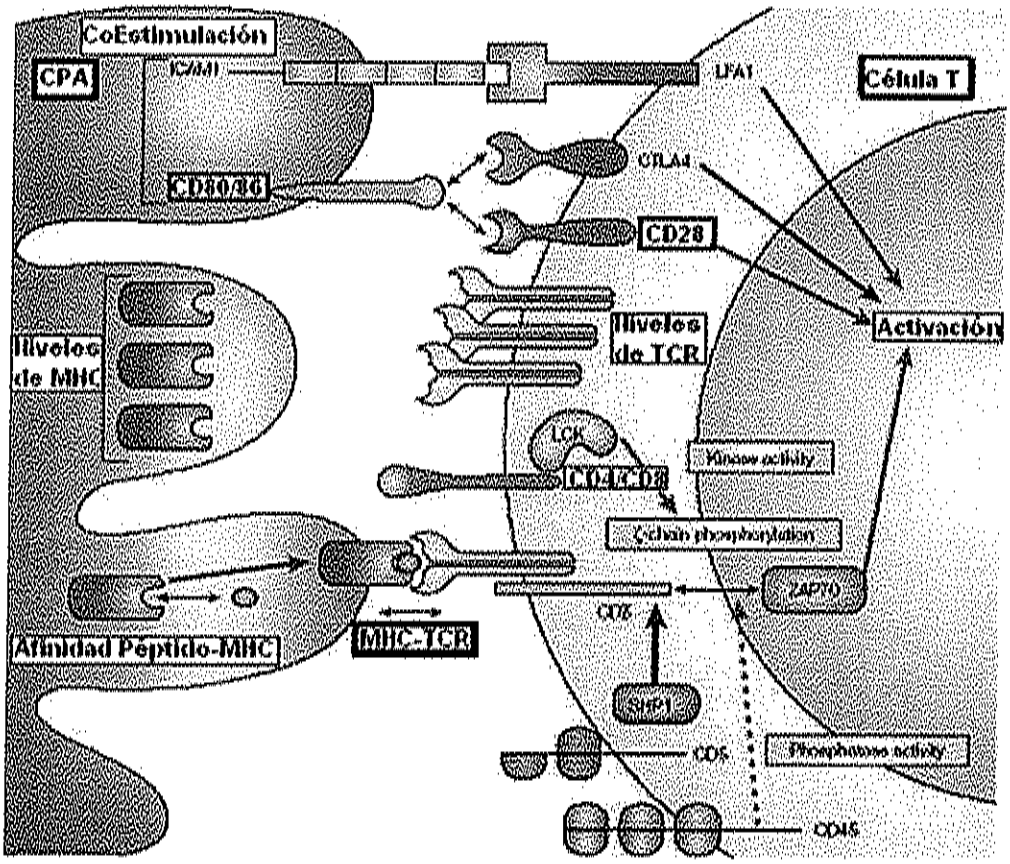


Figura 2. Moléculas que participan en la activación del linfocito T (Anderton and Wraith, 2002).

Complejo TCR y Moléculas Accesorias

El TCR está asociado de manera no covalente con las moléculas accesorias CD3 y cadenas zeta (ζ) formando un complejo. El TCR está

constituido por una cadena α y una β, mientras que el CD3 puede estar formado por dos cadenas de tipo ε, γ ó δ. Otro tipo de proteínas de superficie presentes en el linfocito T son el CD4 y CD8. Las principales moléculas de co-estimulación son el CD28 y ligando de CD40. Además el linfocito T expresa LFA-1 que son moléculas de adhesión leucocitaria. Por último, son necesarias las moléculas que regulen negativamente la activación y este es el caso del CTLA-4 (Figura 3) (Anderton and Wraith, 2002).

El CD28 es una molécula de co-estimulación en los linfocitos T y se une a las moléculas CD80, CD86 (B7-1 y B7-2 respectivamente) presentes en las APC. La interacción provoca el aumento de IL-2 y la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x (Abbas and Lichtman, 2004). La ausencia de las señales promovidas por las moléculas CD80/86 resulta en apoptosis o anergia de los linfocitos T. Mientras que la interacción entre CD40 y su ligando provoca el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80/86 en la DC y síntesis de citocinas como IL-1, TNF-α e IL-12. Por otra parte, la molécula CTLA-4 presenta homología con el CD28 y afinidad por la familia B7. La interacción entre ambos ayuda en la regulación de la respuesta inmune (Alegre et al., 2001) (Figura 2).

Cascadas de Señalización

Cuando el complejo péptido-MHC es reconocido por el TCR y moléculas co-receptoras (CD4 o CD8), resulta la activación de Lck (tirosina cinasa de la familia Src). La Lck fosforila a los ITAMs presentes en la región citoplasmática del CD3. Esto provoca el reclutamiento y fosforilación de cadenas ζ las cuales se encuentran asociadas a una proteína llamada Zap70 (tirosina cinasa), las cuales fosforilan a proteínas adaptadoras. Éstas a su vez activan a PLCγ1

(fosfolipasa C γ1) y a Rac (guanina fosfatasa). PLCγ1 promueve la movilización de calcio y activación de Ras. Las combinaciones de estos eventos activan a las MAPs cinasas: ERK, PKB y p38, así como a PI3k (fosfatidilinositol 3 cinasa) y a proteína cinasa B (PKB/Akt). En conjunto promueven la activación de los factores de transcripción AP-1, NFAT y NF-κβ. Dichos factores están involucrados en la síntesis de citocinas implicadas en la diferenciación y expansión clonal (Alegre et al., 2001) (Figura 3).

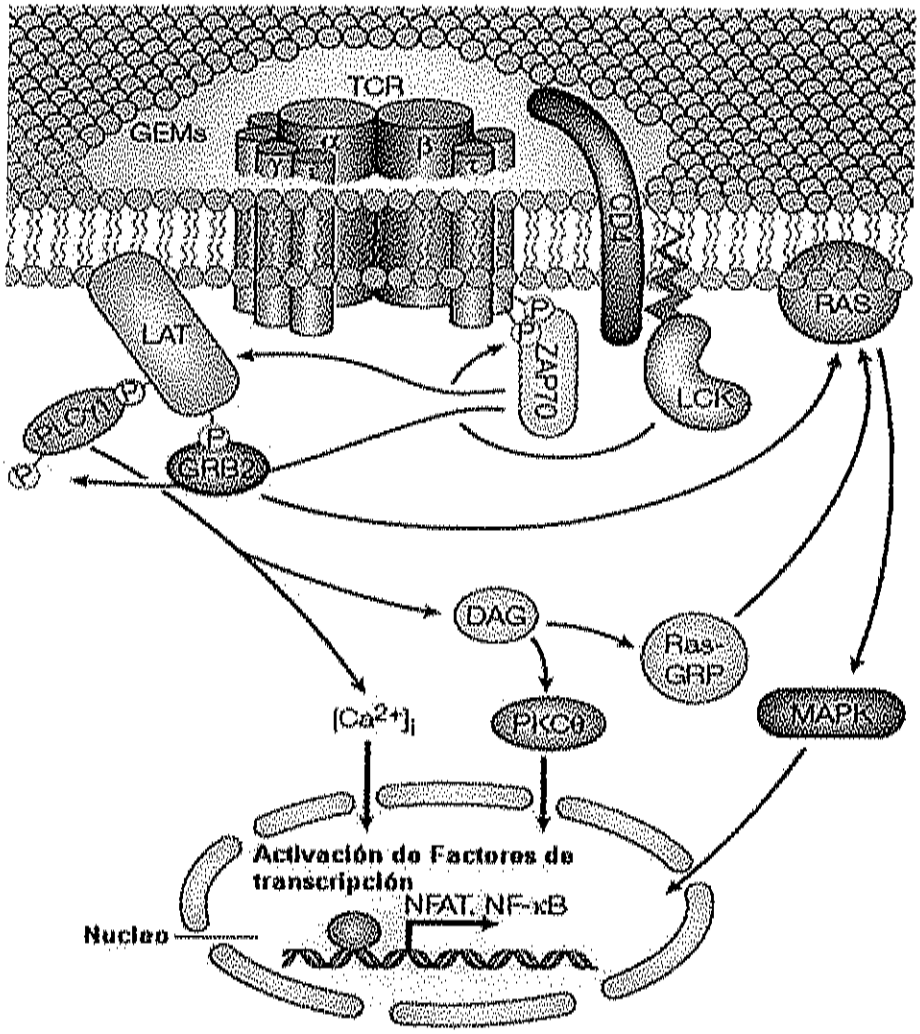


Figura 3. Cascada de Activación de linfocitos T (Koretzky and Myung, 2001).

Modulación de la Respuesta Inmune

Las células dendríticas además de activar a los linfocitos T pueden modificar y adaptar la manera en que estos van a responder ante los distintos patógenos. Mediante el desarrollo de distintos fenotipos de DCs se favorecen la diferenciación en células Th1, Th2 o Treg. Las DCs en respuesta al reconocimiento de un tipo de patógeno, van a producir determinadas citocinas y expresar o no moléculas de coestimulación e inducir la diferenciación a un determinado tipo de célula Th (Kapsenberg, 2003).

Las DCs que sintetizan IL-12 y expresan moléculas CD80/86 para activar al linfocito CD4, promueven la diferenciación a células Th1. La IL-12 es una citocina que induce la secreción de IFN-γ en los linfocitos. Por el contrario, si la célula dendrítica sintetiza IL-10 y expresan bajos niveles de CD80/86 (DCs inmaduras), estimulará la diferenciación a células Th2. Además la expresión baja de CD80/86, síntesis de IL-10 y TGF-β por la célula dendrítica inducirá la generación de linfocitos Treg (Figura 4) (Kapsenberg, 2003).

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para evadir al sistema inmune. Una de ellas es infectar DCs y afectar sus funciones, además existen virus que en su genoma codifican una proteína homologa a IL-10 (vIL-10), tales como Cytomegalovirus, Virus Epstein-Barr y Poxvirus (Chang et al., 2004). Otros inducen la secreción de IL-10 o TGF-β, lo que lleva al desarrollo de una respuesta Th2 o Treg respectivamente, y con ello suprimen la respuesta tipo Th1, que es fundamental para la eliminación de virus. Ejemplo de estos virus son el SARS Coronavirus (Huang et al., 2005) y el virus de la Varicela-zóster (Yeh et al., 2006).

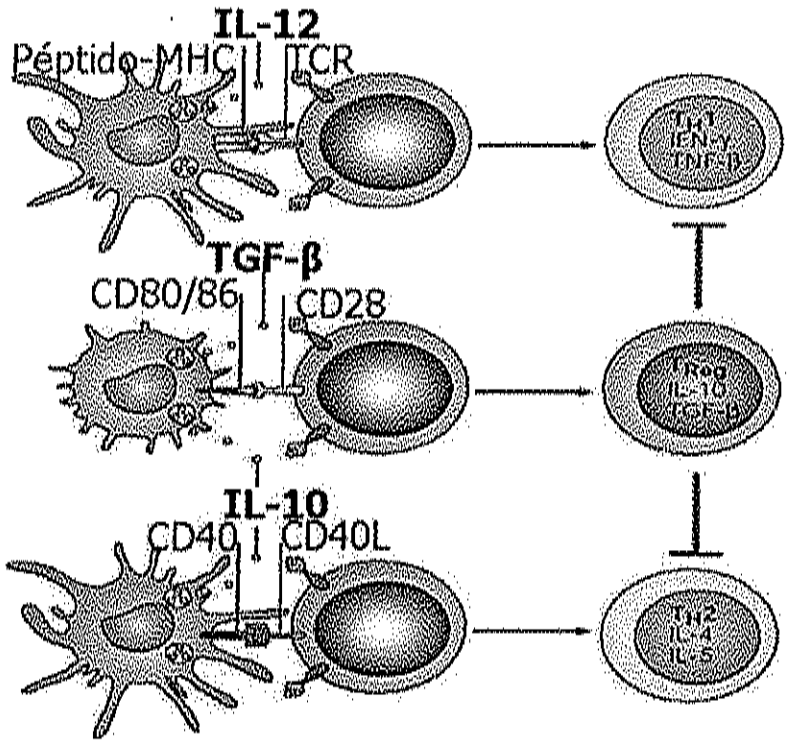


Figura 4. Modulación de la respuesta inmune por las células dendríticas. (Kapsenberg, 2003).

Factores de Transcripción

Se ha observado que varios factores determinan la diferenciación de las células Th en Th1, Th2 o Treg. Entre estos factores se encuentra la presencia de citocinas (IL-12, IL-10, IL-4 o TGF-β) secretadas por la DCs durante la activación. La IL-12 mediante su receptor (IL-12R) activa al traductor de señales y activador de la transcripción 4 (Stat4), el cual promueve la síntesis de IFN-γ. El IFN-γ a su vez autorregula su producción activando a Stat1 y éste a su vez al factor de transcripción T-box (T-bet) aumentando la expresión del IFN-γ (Lighvani et al., 2001). Por otro lado, la respuesta Th2 es controlada por la activación del factor de transcripción GATA-3, por Stat6 que es activado

previamente por citocinas tipo Th2 (Li-Weber and Krammer, 2003) y por la expresión del gen *il-10* (Shoemaker et al., 2006).

Tanto la respuesta Th1 como Th2 puede ser bloqueada en presencia de TFG-β y de Foxp3 (miembro de la familia de proteínas Fox). Se conoce que la expresión de GATA-3 es inhibida por TFG-β (Gorelik and Flavell, 2002), así como la expresión de Stat-4 e IFN-γ por vías independientes (Lin et al., 2005). Por último, Foxp3 es un factor de transcripción que se encuentra altamente expresado en células T reguladoras, el cual suprime la expresión de citocinas IL-4, IL-2 e IFN-γ en células CD4 ya que inhibe directamente la actividad de los factores de trascripción NF-κβ y NFAT (actúa como co-represor), los cuales, son esenciales para la expresión de los genes que codifican para éstas citocinas (Bettelli et al., 2005).

Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

Generalidades

El virus del PRRS es responsable del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, que es una de las enfermedad más importante de los cerdos en la actualidad a nivel mundial (Ostrowski et al., 2002). Se caracteriza por causar problemas respiratorios en cerdos de todas las edades, principalmente lechones donde causa pneumonía. Además provoca severas fallas reproductivas en cerdas gestantes, causa abortos al término del embarazo, nacimientos de cerdos sin vida y cerdos recién nacidos débiles. Entre las características más importantes de esta enfermedad destaca su alta

capacidad de infección y transmisión (Sur et al., 1997; Vanderheijden et al., 2003).

El virus del PRRS es miembro del orden de los *Nidoviridales,* de la familia *Arterividae*, (Ostrowski et al., 2002) y del genero *Arterivirus*. Existen dos genotipos principales el europeo (tipo1) y el americano (tipo2) (Sur et al., 1997), los cuales presentan similitud en su estructura. Sin embargo, presentan marcadas diferencias moleculares y antigénicas. Las cepas virales prototipo de los dos continentes tienen aproximadamente un 60% de identidad nucleotídica. Desde el punto de vista de su antigenicidad, el virus del PRRS se ha dividido en dos subgrupos, donde el subgrupo A es representado por el prototipo europeo Lelystad y el subgrupo B el prototipo estadounidense ATCC VR-2332 (Ropp et al., 2004).

Estructura Molecular

La partícula viral tiene un diámetro de 50 a 60 nm, con una nucleocápside asimétrica de aproximadamente 30 nm de diámetro. Es un virus envuelto, su genoma está formado por una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva (Ostrowski et al., 2002) poliadenilado. Tiene una longitud de 15.4 kb con nueve fragmentos de lectura abierta (ORFs) (Delputte et al., 2004);(de Lima et al., 2006). 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 la proteína que forma la nucleocapside (N) (Diaz et al., 2006; Ostrowski et al., 2002) (Figura 5).

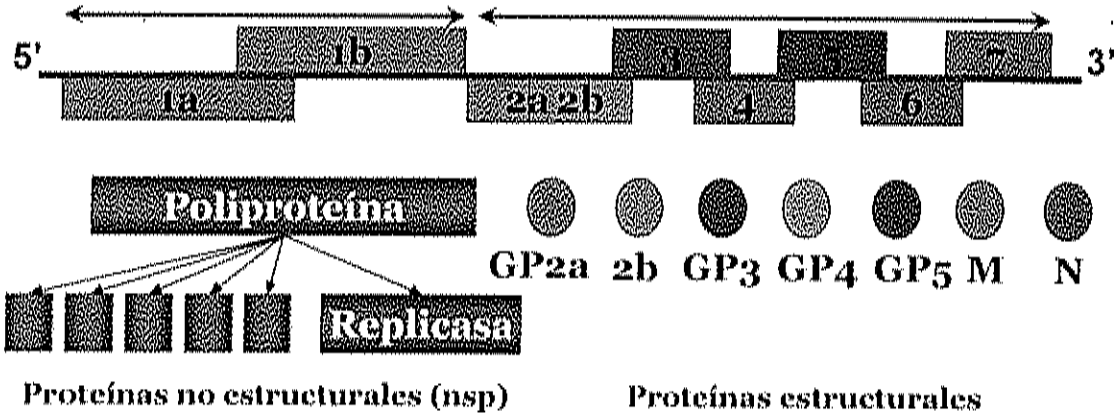


Figura 5. Esquema de la organización genómica del virus PRRS (Mateu and Diaz, 2007).

Patogenicidad

Los cerdos se infectan vía oronasal, el virus entra en contacto con mucosas del tractor respiratorio e inicia su replicación en macrófagos alveolares. Otra ruta es la vía vaginal donde el virus infecta el endometrio uterino, se disemina por la sangre circulando libre o ligado a monocitos. De esta forma el virus alcanza los tejidos linfoides regionales y se distribuye a nivel sistémico hacia otras poblaciones de macrófagos (Ostrowski et al., 2002).

El virus PRRS tiene tropismo por las células de linaje monocito/macrófago, pero sólo en macrófagos alveolares y monocitos de sangre periférica se observa replicación (Vanderheijden et al., 2003). Estudios adicionales demostraron que el virus también infecta macrófagos en el bazo, las amígdalas, los nódulos linfáticos, el hígado, en las placas de Peyer y el timo, mientras que en células progenitoras de médula ósea no puede replicarse (Chang et al., 2005). Reportes recientes indican que el PRRSv tiene la capacidad de infectar pDCs (Zuckermann et al., 2005) y DCs derivadas de

monocitos, en estas últimas también tiene la capacidad de replicarse (Hernández and Osorio, 2005; Loving et al., 2007).

Respuesta Inmune Frente al virus del PRRS

Al infectar a cerdos el virus del PRRS establece un estado de persistencia, en la cual se observa una replicación viral constante y a bajo nivel (López y Osorio, 2004). Los animales infectados presentan una viremia por 4 semanas y el virus se encuentra en tejido por meses (5 meses aproximadamente) (Murtaugh et al., 2002). Lo anterior sugiere que la respuesta que monta el cerdo es ineficaz. El mecanismo exacto que le confiere al virus PRRS la persistencia es desconocido. Pero pueden estar involucrados la inhabilidad del cerdo para montar una respuesta inmune protectiva y/o por la extensa variabilidad genética y antigénica del virus (Chang et al., 2005).

Uno de los mecanismos más importantes de la respuesta inmune innata para la eliminación de virus es la producción de IFN de tipo I (α y β) y citocinas proinflamatorias (TNF-α e IL-1). Las células infectadas con virus PRRS no secretan IFN de tipo I, al parecer éste virus modula su producción a nivel postrascripcional (Lee et al., 2004). En cuanto a la producción de TNF-α e IL-1, se observa que están suprimidas o disminuidas considerablemente (Murtaugh et al., 2002). Las DCs infectadas con virus PRRS producen IFN-β pero no IFN-α (Loving et al., 2007). En DCs derivadas de monocitos el virus disminuye la expresión de moléculas de coestimulación CD80/86, CD11d/c, CD14 y de presentación de antígenos MHC de clase I y II (Loving et al., 2007; Wang et al., 2007). En dichas células la producción de citocinas tipo Th1 es mínima (IL-12 e IFN-γ). Sin embargo, existe controversia en cuando a la producción de IL-10. Wang y cols., 2007 reportó que no existe incremento significativo en DCs

derivadas de monocitos al ser infectadas por el virus PRRS. Sin embargo (Charerntantanakul et al., 2006), reportó un incremento en la expresión de IL-10 en monocitos infectados. Por lo tanto, la primera barrera de defensa que además modula la respuesta inmune adaptativa esta siendo bloqueada.

La respuesta inmune humoral se observa en los primeros días de post-infección (pi) con producción de anticuerpos de tipo IgM, pero no brindan protección contra el virus. Además provocan un aumento de replicación del virus PRRS en macrófagos, al favorecer su interiorización mediante el receptor Fcγ por endocitosis (Cancel-Tirado et al., 2004). Con la evolución de la infección aparecen anticuerpos con actividad neutralizante en un período de 2 a 4 semanas pi. Este tipo de anticuerpos ayudan a disminuir la etapa de viremia. Los anticuerpos neutralizantes desaparecen aproximadamente a los 5 meses y los anticuerpos totales a 1 año pi. Por lo tanto, el cerdo está propenso a una reinfección (Lopez and Osorio, 2004).

La respuesta inmune celular en la infección por el virus PRRS inicia tardíamente y es débil en las primeras 12 semanas, existe un incremento gradual de células T específicas para virus PRRS, que se extiende a más de 20 semanas (Xiao et al., 2004). Se han observado poblaciones de linfocitos T $CD8^+$ en pulmón, entre los 25 y 35 días pi. En sangre periférica la respuesta específica anti-PRRSv de linfocitos CD8 aparece aproximadamente a las 4 semanas pi. La presencia de linfocitos CD4 es detectada a las 4 o hasta las 15 semanas pi, al estimular estas células *in vitro*, se observa que tienen la capacidad de sintetizar citocinas de tipo Th1 (Murtaugh et al., 2002). Durante este tiempo existe una cantidad limitada de células secretoras de IFN-γ, a los 5 meses pi existe un incremento gradual en la intensidad de la respuesta (producción de IFN-γ) (Meier et al., 2003; Meier et al., 2004). Por lo tanto, la persistencia de la infección sugiere que la inmunidad celular no es potente y

que la producción de IFN-γ es muy débil o inefectiva (Murtaugh et al., 2002). La respuesta celular debe iniciarse aproximadamente a los 5 días postinfección, en cerdos infectados con PRRSv se inicia después de 4 semanas pi. Por lo que, el cerdo prácticamente está indefenso por un mes (Lopez and Osorio, 2004).

JUSTIFICACIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es considerado como uno de los problemas más importantes de la industria porcina, tanto a nivel nacional como internacional. La respuesta de los linfocitos T en cerdos infectados con este virus es deficiente e inefectiva, desconociéndose el porqué estas células no se activan correctamente. Explicando tal deficiencia, se podrían desarrollar métodos efectivos para limitar la propagación y eliminación del virus en dicha infección.

Además una de los retos más grandes ante está infección es el desarrollo de una vacuna universal. Son muy pocos estudios se han hecho comparando entre genotipo de virus PRRS y éstos han sido enfocados más que nada a nivel genómico. Por ello es necesario comparar el tipo de respuesta inmune entre los virus americanos y europeos.

HIPÓTESIS

Las células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino suprimen la respuestas tipo Th1 y Th2 de linfocitos T *in vitro*.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad de las células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, para estimular la respuesta de linfocitos T.

Particulares

Analizar la capacidad de las células dendríticas infectadas con virus PRRS para estimular una respuesta de linfocitos T.

Identificar el fenotipo de linfocitos T (CD4 y/o CD8) estimulado por células dendríticas infectadas con el virus PRRS.

Evaluar la expresión de Foxp3 y CD25 característicos de linfocitos T reguladores.

Determinar el tipo de linfocitos (Th1, Th2 o Treg) estimulados por células dendríticas infectadas con el virus del PRRS, de acuerdo a su perfil de citocinas.

Evaluar la expresión de los factores de trascripción T-bet, GATA3 y Foxp3.

Comparar el efecto en linfocitos estimulados con células dendríticas infectadas con virus PRRS genotipo Americano y Europeo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Cerdos sanos de entre 2 y 6 meses de edad, libres de PRRS se mantuvieron bajo condiciones asépticas con agua y alimento *ad limitum* (n=6). También se obtuvieron muestras de sangre (n=11) provenientes de cerdos en granjas libres de virus PRRS (Barcelona, España).

Preparación del Stock Viral

Se utilizaron dos cepas de PRRSv genotipo americano: la cepa NVSL 97-7895 y CIAD008 aislada en el Laboratorio de Inmunología, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC. Ambas cepas de virus se multiplicaron en la línea celular MARC-145 durante 3 días en medio Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen Corporation) suplementado con penicilina 100 UI/mL (SIGMA), estreptomicina 100 µg/mL (SIGMA), amfotericina B 0.5 µg/mL (SIGMA), gentamicina 50 µg/mL (SIGMA) y 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO, Invitrogen Corporation). Posteriormente, las células se sometieron a 3 choques térmicos (-80 °C a temperatura ambiente) y clarificando a 700 g durante 35 min y de esta manera obtener el stock de virus o mock (restos proteicos de células MARK-145 libres de virus PRRS). El título viral se obtuvo realizando diluciones décuples del virus y después de 4-5 días se analizó el número de placas virales y los resultados se expresan en dosis infectantes en cultivo celular al 50% ($DICC_{50\%}$) (Wasilk et al., 2004).

También se utilizaron 5 cepas europeas aisladas de brotes españoles identificados como 2998, 2993, 2992, 3008 y 2756. Estos virus se caracterizan por inducir diferentes citocinas en DCs (Tabla 1). Estas cepas se replicaron en macrófagos alveolares, para obtener el stock y título viral se siguió la metodología anteriormente mencionada.

Tabla 1. Inducción de citocinas en DCs infectadas por cepas de virus PRRS.

Cepa	IL-12**	IFN-α*	TNF-α*	IL-10*	TGF-β**
[1]NVSL977895	-	-	¿	-	+
[1]CIAD008	-	-	¿	-	?
[2]2998	?	-	+	-	?
[2]2993	?	-	-	?	?
[2]2992	?	-	+	++	?
[2]3009	?	+	-	-	?
[2]2756	?	-	+	+	?

[1]DCs derivadas de monocitos (Flores-Mendoza; 2007).
[2]DCs derivadas de medula ósea (Datos no publicados).
Medidas por *ELISA o **PCR en tiempo real.

Generación de Células Dendríticas Derivadas de Monocitos

Las células mononucleares (CMN) se separaron a partir de sangre periférica utilizando 10 U/mL de heparina (Inhepar, Laboratorios Pisa SA de CV). La sangre fue diluida 1:1 con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril y se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (relación 1:3) (GE Healthcare Biociences AB) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las CMN se cultivaron en botellas de 25 cm^2 (Corning Incorporated) a una concentración de

5×10^6/mL en DMEM a 37 °C, 5% de CO_2, durante toda la noche. Al cabo de este tiempo, se eliminó la fracción no adherente, mientras que las células adherentes (monocitos) se cultivaron en presencia de GM-CSF recombinante (40 ng/mL) e IL-4 (40 ng/mL) (V/V) (Biosource Internacional) durante 5 días, con cambio de citocinas al día 3 (Carrasco et al., 2001).

Infección de Células Dendríticas con Virus del PRRS

Para infectar a las células dendríticas derivadas de monocitos se expusieron al virus PRRS (o mock) durante 1 hora a 37 °C a un índice de multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0.1. Después se cosecharon y centrifugaron a 250 g durante 10 min para eliminar el virus del sobrenadante (lavando 3 vez con PBS). Posteriormente se resuspendieron a una concentración de ($1X10^6$ DCs/mL) en DMEM y se cultivaron durante 24 h en placas de 96 pozos (Corning Incorporated) (Vincent et al., 2005). Para los ensayos donde se evaluó el efecto de la replicación viral se utilizó virus inactivado por calor (56°C durante 1 h) (Wang et al., 2007). En el caso de IFN-α, 30 min antes y durante la infección las DCs se suplementaron con 200 U/mL de IFN-α recombinante de cerdo (prIFN-α, PBL Biomedical Laboratorios). Para el análisis de resultados se utilizó el programa WinMDI 2.8.

Proliferación de Linfocitos T

A partir de células mononucleares se obtuvieron células no adherentes (95% expresan CD3). Estás células se mantuvieron congeladas en 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO) y 40% de SFB, hasta su cultivo en RPMI-1640 (SIGMA) el cual está suplementado con 2 mM piruvato de sodio (SIGMA), 2 mM

L-glutamina (SIGMA), 50 µg/mL de gentamicina (SIGMA), penicilina 100 UI/mL (SIGMA), estreptomicina 100 µg/mL (SIGMA), y 10% de SFB.

Las células no adherentes ($5x10^5$) se co-cultivaron con DCs inmaduras. Éstas últimas infectadas con virus PRRS activo e inactivo, con y sin IFN-α, pulsadas con mock y sin tratamiento, a una relación de 1:10 (DCs/linfocito) durante 5 días. Se evaluó la capacidad proliferativa de células T, tiñéndolas previamente con 0.1 µM de succiminidil ester diacetato carboxifluoresceina (CFSE) (Molecular Probes) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Determinándose el porcentaje de células que proliferaron y el tipo de ellas (CD4 y/o CD8). Esto ultimo marcando las células con anti-CD8 (CD8a anti-cerdo conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) y anti-CD4 (VMRD), utilizando como segundo anticuerpo uno de cabra contra IgG anti-ratón conjugado con PE (Southern Biotech).

Inducción de Células T reguladoras

Después de los 5 días de co-cultivo, se evaluó si las DCs infectadas con el virus del PRRS al estimular a linfocitos T inducen la diferenciación a células fenotipo regulador ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$). Al quinto día de co-cultivo se realizó un doble marcaje con anti-CD25 (VMRD) utilizando como segundo anticuerpo uno de cabra contra IgG de ratón conjugado con fluoresceina isocianato (FITC) (Souther Biotech) y un anti-Foxp3 humano marcado con Alexa647® (AbDserotec).

Determinación de Citocinas Th1, Th2 y Treg

Después de estimular a linfocitos T como se describió previamente, se determinó el perfil de citocinas tipo Th1, Th2 y Treg (IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β e IFN-γ). Se cuantificaron a nivel de proteína en el sobrenadante de los cultivo por ELISA (IL-10 e IFN-γ) de acuerdo a las instrucciones el fabricante (Biosource y R&D systems). Mientras que a nivel de trascrito se cuantificó por PCR de tiempo real, utilizando los iniciadores y las sondas que se describen en la Tabla 2.

Para la extracción del RNA se utilizaron columnas de separación RNeasy Protocol Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de éste se realizó una qRTPCR utilizando el kit brillant core qRTPCR master mix (Stratagene). Las condiciones fueron: 1 ciclo de 50 °C por 30 min, 95 °C por 10 min, y 50 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. En la tabla 1 se muestran los iniciadores y sondas (SIGMA-Genosys). Los niveles de expresión relativa de mRNA se calcularon usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa los niveles de mRNA de células tratadas ajustados primero con el gen constitutivo (citocina - PPIA) y posteriormente se compararon con el mock. ΔCt muestra - ΔCt control=ΔΔCt.

Expresión de Factores de Transcripción

Tras la estimulación de células T con DCs infectadas con cepas americanas o pulsadas con mock (m.o.i. de 0.1), se cuantificó la expresión de los factores de trascripción T-bet, GATA3 y Foxp3 mediante PCR de tiempo real, por la metodología previamente descrita, los iniciadores y las sondas utilizadas se describen en la Tabla 2.

Análisis Estadístico

Los ensayos se realizaron por duplicado y se realizó un analisis descriptivo de los datos, cuando su comportamiento fue normal (Kurtosis) se analizaron por comparación de medias utilizando t de student pareada. A los datos que no se distribuyeron normalmente se les realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En ambos casos se tomó como diferencia significativa cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Tabal 2. Descripción de iniciadores y sondas.

IL-2	Sentido	5'-ACAGTTGCTTTTGAAGGAAGTTAAGAA-3'	*X56750
	Antisentido	5'-CCTGCTTGGGCATGTAAAATTT-3'	
	Sonda	5'-CGAGAATGCTGATCTCTCCAGGATGCTC-3'	
IL-4	Sentido	5'-GCCGGGCCTCGACTGT-3'	*NM_214123
	Antisentido	5'-TCCGCTCAGGAGGCTCTTC-3'	
	Sonda	5'-CTTCGGCACATCTACAGACACCACACG-3'	
IL-10	Sentido	5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	*L20001
	Antisentido	5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA-3'	
	Sonda	5'-CAACCAGCCTGCCCCACATGC-3'	
IFN-γ	Sentido	5'- TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG-3'	*AY188090
	Antisentido	5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'	
	Sonda	5'-CTTCGAAAAGCTGATTAAAATTCCGGTAGATAATCTGC-3'	
TGF-β1	Sentido	5'-AGGGCTACCATGCCAATTTCT-3'	*M23703
	Antisentido	5'-CGGGTTGTGCTGGTTGTACA-3'	
	Sonda	5'-CCTAGACACTCAGTACAGCAAGGTCCTGGC-3'	
GATA-3	Sentido	5'-TCTAGCAAATCCAAAAAGTGCAAA-3'	*AY368199
	Antisentido	5'-GGGTTGAACGAGCTGCTCTT-3'	
	Sonda	5'-TCCTCCAGCGTGTCGTGCACCT-3'	
TBX21	Sentido	5'-TGGACCCAACTGTCAATTGCT-3'	*AY435216
	Antisentido	5'-ACGGCTGGGAACGGGATA-3'	
	Sonda	5'-ACCACTACTCTCCTCTCCTCCCCAACCAGT-3'	
Foxp3	Sentido	5'-CCCTGCCCTTCTCATCCA-3'	*AY669812
	Antisentido	5'-GTGGCCCGGATGTGAAAA-3'	
	Sonda	5'-AGCCAGAGGACTTCCTCAAGCACTGCC-3'	
PPIA	Sentido	5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3'	*AY266299
	Antisentido	5'-TTATTAGATTTGTCCACAGTCAGCAAT-3'	
	Sonda	5'-TGATCTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCCT-3'	

Las sondas están marcadas con los fluorocromos: TET como reportero y TAMRA como inhibidor. (*) Representa el número de acceso al banco de genes.

RESULTADOS

Proliferación de células T por citometría y CFSE

Para evaluar si las DCs infectadas con el virus PRRS son capaces de estimular la respuesta de células T, primero se determinó la proliferación de células T por citometría y CFSE. La figura 6 muestra que al estimular linfocitos con DCs infectadas, disminuye la proliferación. Como controles se utilizó células no adherentes sin estímulo, estimuladas con DCs sin antígeno y virus inactivado. No hubo diferencias entre ellos ($p>0.05$). También como control positivo se utilizó fitohemaglutinina (PHA) (Figura 6 y 7). El resultado fue que la proliferación de células T ante el virus PRRS disminuyó con respecto al mock un 10 y 15% para los virus NLSV y CIAD respectivamente. No se observó diferencia entre las dos cepas de virus americanas utilizadas ($p>0.05$) (Figura 7A). Sin embargo, cuando se evaluó el efecto producido por las cepas europeas, hubo un comportamiento diferente. En el caso de las cepas 2293 y 2992 existe un incremento ($p<0.05$) de 15 y 20% respectivamente y en las otra dos cepas evaluadas no hay diferencias con respecto al mock ($p>0.05$) (Figura 7B).

Las DCs infectadas con el virus del PRRS no producen IFN-α, citocina primordial para promover la expresión de moléculas de MHC tipo I y II (Loving et al., 2007). Por ello, se evaluó la proliferación utilizando DCs infectadas con virus PRRS americanos estimuladas con IFN-α. En estas condiciones, no se observó un aumento en la proliferación de células T ($p>0.05$). Es tan débil la capacidad de las DCs infectadas con PRRS para presentar antígenos, que la estimulación con IFN-α no tuvo ningún efecto (Figura 7A). Se observó que aunque pareciera que existe una tendencia a incrementar, ésta no es mayor

que la del mock (p>0.05). Cuando se utilizó virus NVSL y CIAD inactivados con calor la proliferación fue de 6.2±2.7% y 8.4±4.9% respectivamente y al comparar con los virus activos no existe diferencia significativa (p>0.05).

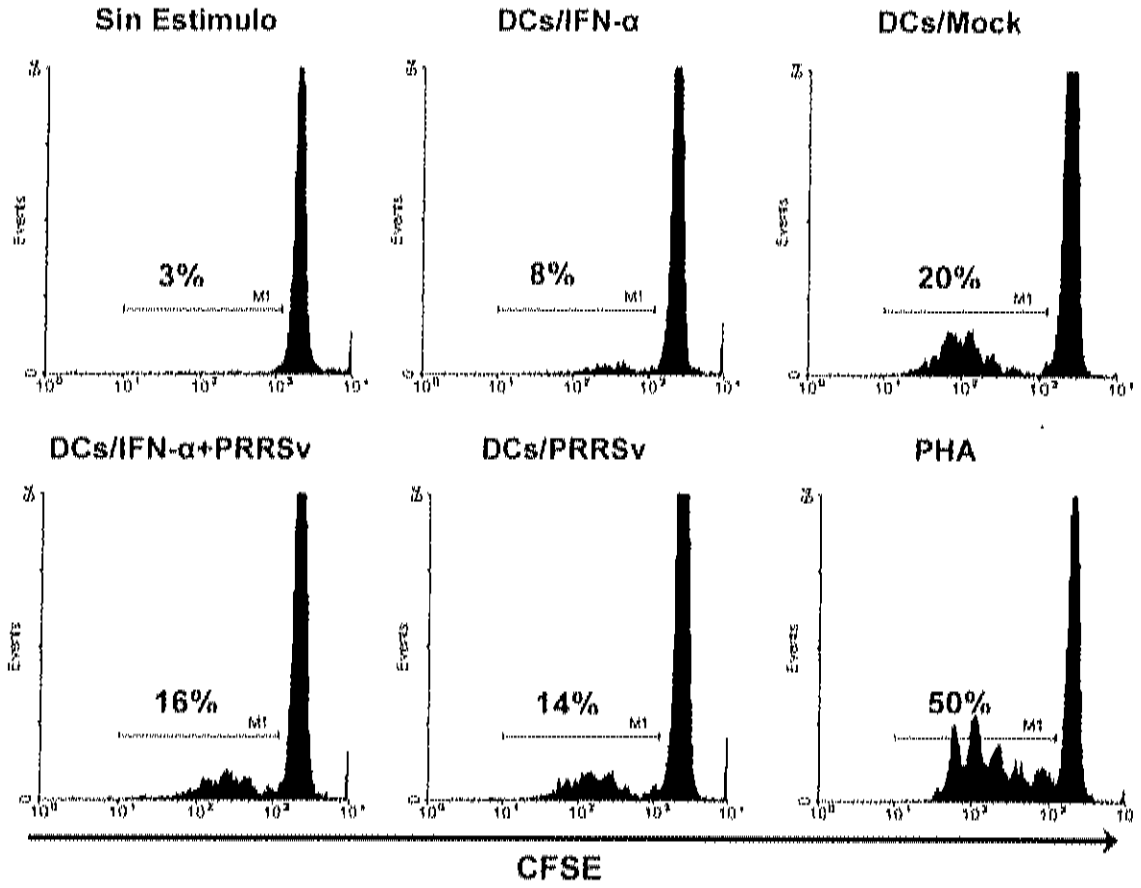
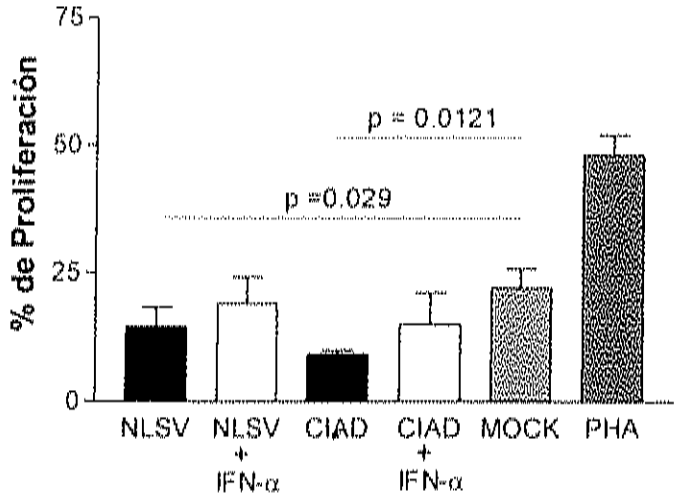


Figura 6. Proliferación celular con CFSE. Los histogramas muestran un experimento representativo de células no adherentes estimuladas con los diferentes tratamientos. El porcentaje de células que se encuentren dentro de marcador son las células que proliferaron, por ello dicho marcador se establece en la células sin estimulo.

A



B

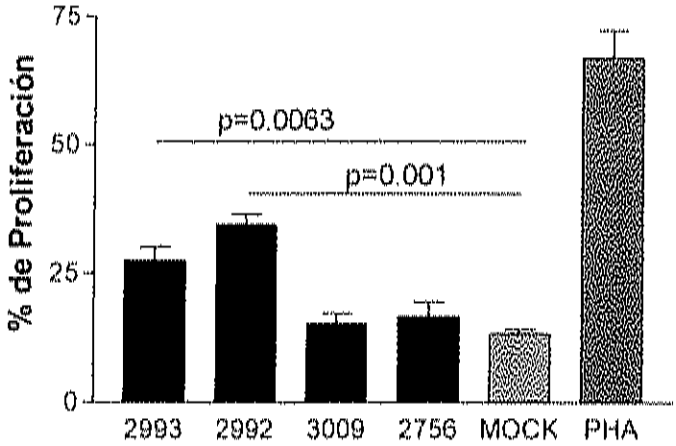


Figura 7. Proliferación de células T inducida por DCs infectadas con virus PRRS. Células no adherentes estimuladas durante 5 días con DCs infectadas a un m.o.i. de 0.1 con PRRSv de cepas americanas e IFN-α (A) y cepas europeas (B). Los gráficos representan la media y desviación estándar, para n=6 donde se aplicó una t de student pareada, $p<0.05$.

Para comparar el resultado obtenido con PRRS se utilizó al Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2), el cual tiene la capacidad de infectar a las células dendríticas, sin una modulación aparente y en ausencia de replicación (Vincent y cols. 2005). La proliferación estimulada por las DCs infectadas con PCV2 fue de 26±1.5% y con mock de 11±1% (n=2) (Figura 8).

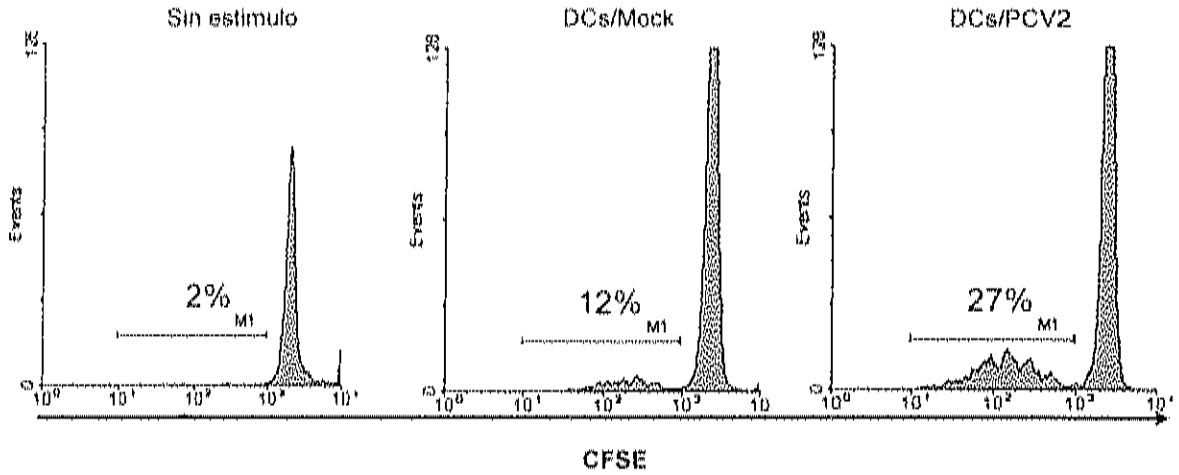


Figura 8. Proliferación celular inducida por DCs infectadas con PCV2. Se muestran los histogramas de un experimento representativo, donde se estimularon células no adherentes (teñidas con CFSE) con DCs infectadas con PCV2 a m.o.i. de 1.

También se determinó el porcentaje de células CD4 y CD8 que proliferaron. Después del quinto día de co-cultivo se colectaron las células y se marcaron con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. No existieron diferencias entre los tratamientos ($p>0.05$). Los datos se resumen en la Tabla 3. Donde se observó como la respuesta de células CD4 y CD8 ante el virus de PRRS, es muy débil, casi nula.

Tabla 3. Porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4 y CD8.

Células no adherentes:	CD4	CD8
DCs/Mock	4±4.6	5±4.2
DCs/PRRSv (NVSL)	5±4.3	6±3.9
DCs+IFN-α/ PRRSv (NVSL)	8±6.1	7±4.6
DCs/PRRSv (CIAD)	6±5.2	7±5
DCs+IFN-α/PRRSv (CIAD)	3±2.5	3±3.2
PHA	30±10.3*	23±8.3*

Los datos representan la media y DS, $p<0.05$ (*).

Generación de Células T reguladoras

Para identificar si la baja respuesta celular se debía a la supresión por la inducción de linfocitos T reguladores ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$), se evaluó la expresión de CD25 y Foxp3 en células no adherentes (Figura 9). El porcentaje de linfocitos con fenotipo regulador aumentó respecto al mock en los tratamientos con virus PRRS genotipo americano. El incremento ($p<0.05$) fue de 14 y 9% para NVSL y CIAD respectivamente. Como controles se utilizaron células no adherentes sin estímulo, DCs sin antígeno y mock, donde no hubo diferencias entre éstos ($p>0.05$). Además se encontró que no hay diferencias entre las cepas de virus NVSL y CIAD en cuanto a la inducción de linfocitos $Foxp3^+CD25^+$ (Figura 10A).

Para comprobar si el aumento en el número de células con fenotipo regulador estaba asociado a la replicación viral, se determinó el porcentaje de células $Foxp3^+CD25^+$ estimulando DCs con IFN-α para bloquear la replicación viral y virus inactivado por calor. En el caso del virus inactivado se observó que el porcentaje de células que expresan $Foxp3^+CD25^+$ disminuye en las dos

cepas americanas (Figura 10A), presentando el mismo comportamiento que el mock ($p>0.05$). En las cepas de genotipo europeo no se favoreció la inducción de células con fenotipo $Foxp3^{+}CD25^{+}$ ($p>0.05$) (Figura 10B). Al comparar entre el tratamiento con y sin IFN-α en la inducción de células $Foxp3^{+}CD25^{+}$ en la cepa NVSL, disminuyó un 6% al tratar con IFN-α. No se encontró diferencias en el tratamiento del virus CIAD con y sin IFN-α ($p>0.05$), sin embargo, se observó una tendencia a disminuir como el virus NVSL (Figura 10A).

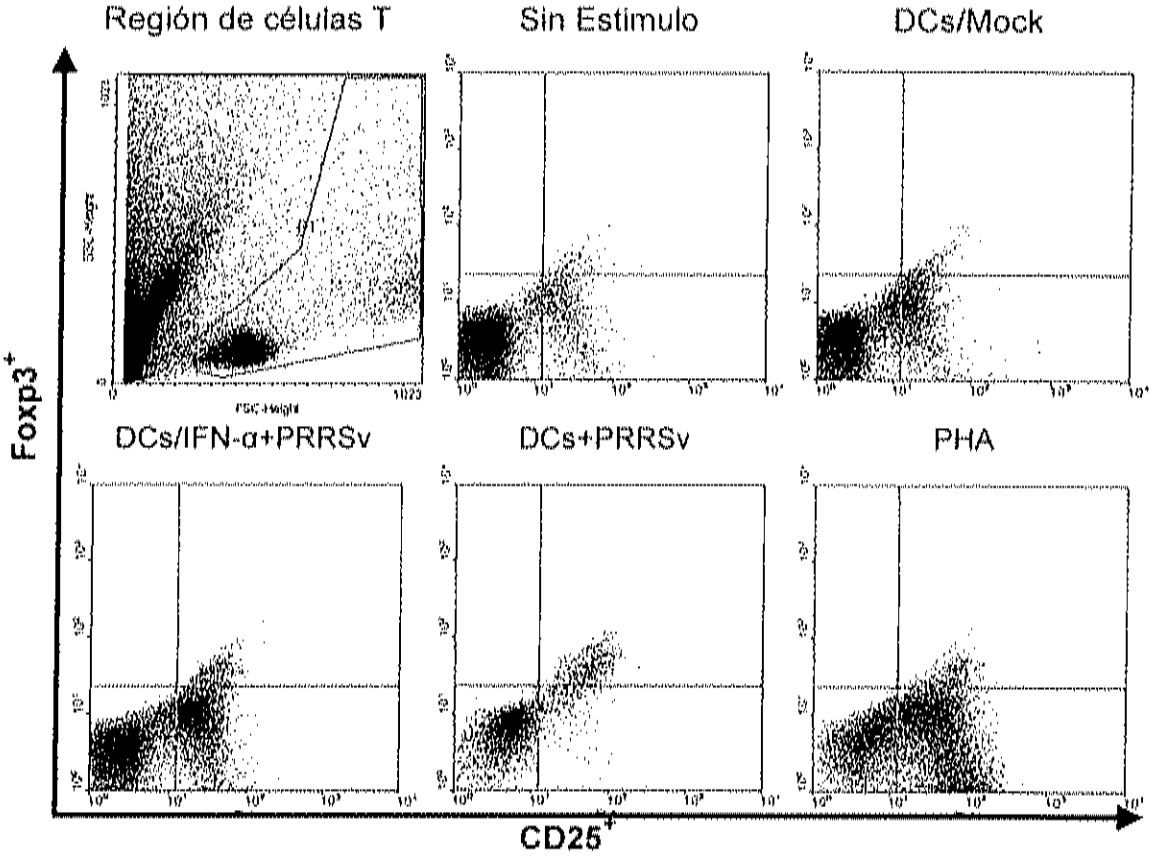


Figura 9. Expresión de $Foxp3^{+}CD25^{+}$ en células no adherentes. Las gráficas de puntos que se muestran son de un experimento representativo. El cuadrante inferior izquierdo representa las células $Foxp3^{-}CD25^{-}$, el superior izquierdo $Foxp3^{+}$, el inferior derecho $CD25^{+}$ y el superior derecho $Foxp3^{+}CD25^{+}$. Por lo que el porcentaje de células doble positivas son las que nombramos como células con fenotipo regulador.

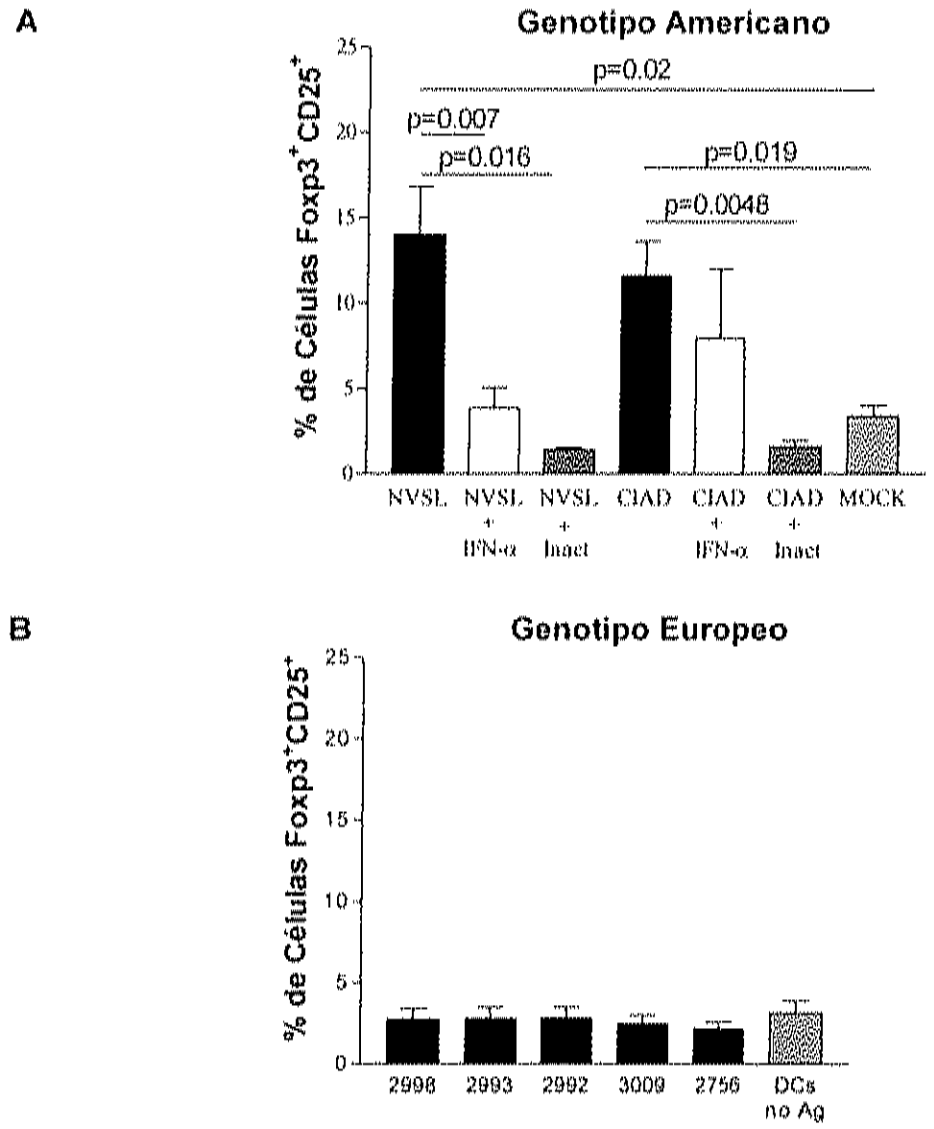


Figura 10. Inducción de Linfocitos T con fenotipo regulador Foxp3$^+$CD25$^+$. La expresión de Foxp3 y CD25 se determinó por citometría de flujo. Las células no adherentes se estimularon con DCs infectadas con virus activos, inactivados por calor o estimuladas con IFN-α (previo y durante la infección). Los gráficos representan la media y desviación estándar, donde A) representa las cepas Americanas (n=6) y B) las cepas Europeas (n=11). Para determinar diferencias entre tratamientos y control, se utilizó una t de student pareada, ($p<0.05$).

Cuantificación de Citocinas

Para confirmar los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la proliferación celular fue suprimida, debido quizás a la inducción de células $Foxp3^{+}CD25^{+}$, fue importante caracterizar el perfil de citocinas. Por lo que se evaluó la expresión de mRNA para citocitas Th1, Th2 y Treg en los co-cultivos tras 24 horas. La expresión de IL-10 no se incrementó con respecto al mock en ninguno de los tratamientos. Pero en el caso del TGF-β se observó una tendencia a incrementar 5 veces con respecto al mock ($p=0.04$ y $p=0.1$ para el virus NVSL y CIAD, respectivamente). Hubo además una ligera disminución de 2 veces cuando se estimuló con IFN-α en el tratamiento con virus NVSL y CIAD ($p>0.05$). Ésta se puede relacionar con la disminución que se observó en el porcentaje de células $Foxp3^{+}CD25^{+}$ (Figura 11). Para las citocinas tipo Th1 y Th2 no hubo incremento en la expresión de mRNA para IFN-γ e IL-4 ($p>0.05$), y al estimular con IFN-α en el virus CIAD hubo un incremento relativo de 5 veces con respecto al mismo sin estímulo en la expresión de IFN-γ ($p<0.05$). Para la expresión de IL-2 se observó que tiende a incrementar en 5 veces para la cepa NVSL ($p=0.07$) y el mismo comportamiento en la cepa CIAD ($p>0.05$). Al estimular con IFN-α se observó un incremento con respecto al mock, sin embargo estos resultados no son estadísticamente significativos (Figura 11).

Además de evaluar la expresión de los genes de citocinas, también se determinó IFN-γ e IL-10 por ELISA, para los dos genotipos del virus PRRS. En los resultados para las cepas americanas podemos observar que no existió diferencias significativas entre tratamiento, tanto para IL-10 como IFN-γ ($p>0.05$) (Figura 12A). Los virus europeos tampoco son capaces de inducir IFN-γ y sólo con la cepa 2992 se incremento 5 veces la producción de IL-10 ($p=0.001$) con respecto al control (DCs sin antígeno) (Figura 12B).

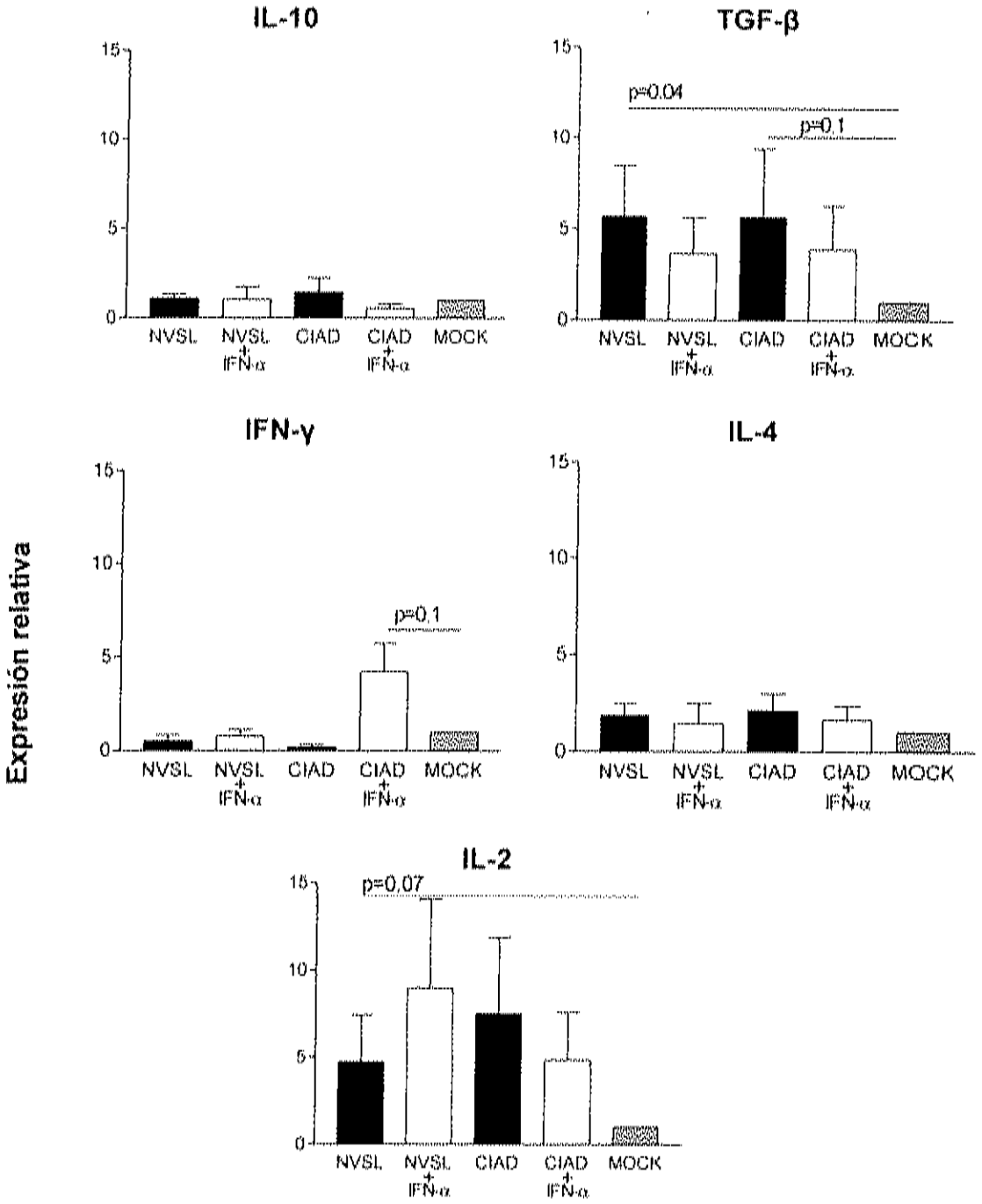


Figura 11. Expresión de mRNA de citocinas Th1, Th2 y Treg. A las 24 horas de co-cultivo se extrajo el mRNA de las muestras y se determinó la expresión de transcritos de citocinas. La expresión relativa se determinó utilizando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para una n=5, aplicando una prueba de Krukal-Wallis $p<0.05$.

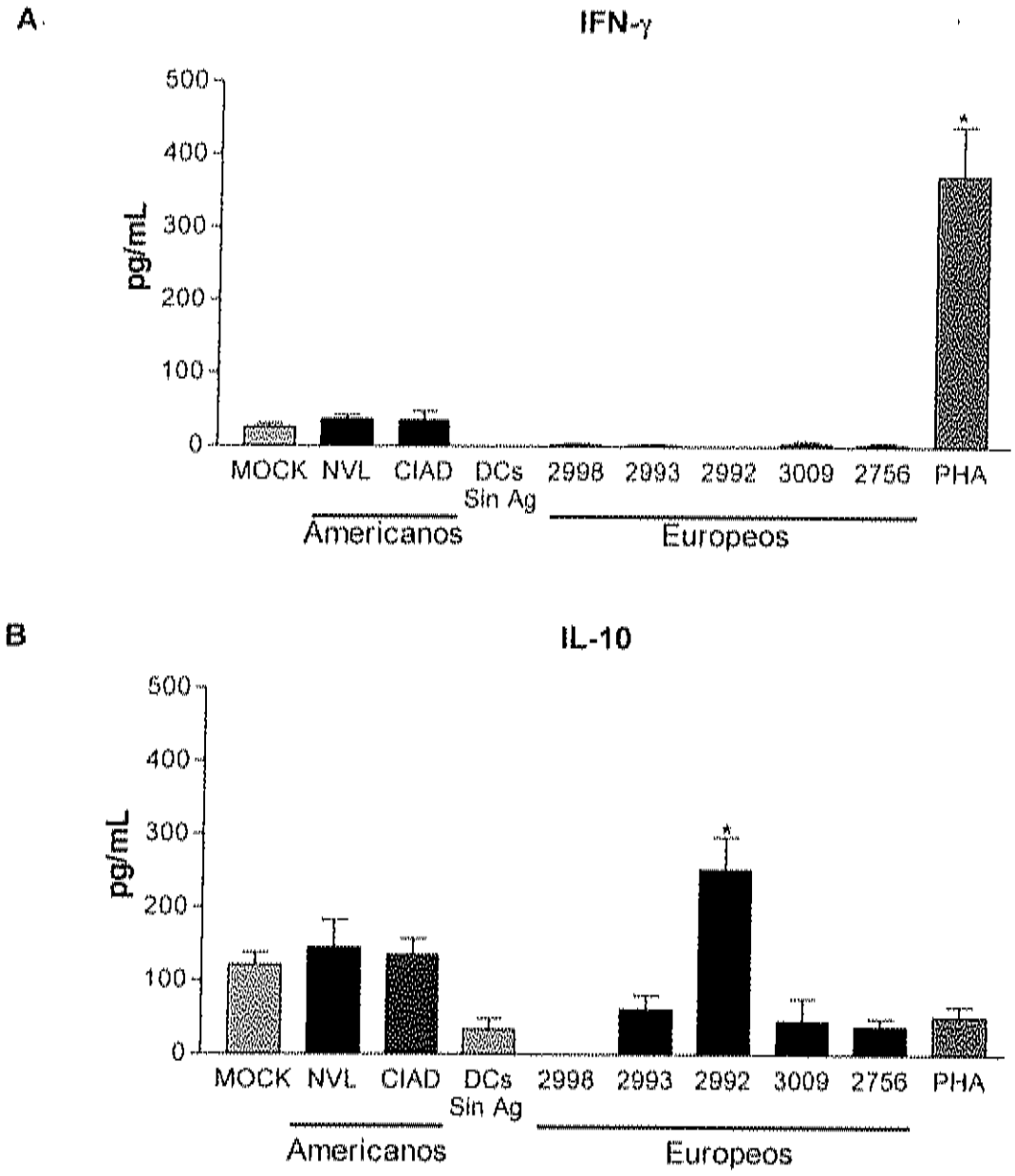


Figura 12. Cuantificación de las citocinas IL-10 e IFN-γ por ELISA. A partir de los co-cultivos se colectaron alicotas de los sobrenadantes al tercer día. Se determinó IFN-γ (A) e IL-10 (B), para una n=3 en las cepas americanas y una n=5 en cepas europeas. Se comparó la media [t student pareada, $p<0.05$ (*)] del tratamiento contra su respectivo control (cepas americanas-mock y europeas-DCs sin antígeno).

Expresión de Factores de Transcripción

El último objetivo que se cumplió fue evaluar la expresión de factores de transcripción que condicionan un tipo u otro de respuesta en las células T. Se determinó la expresión de T-bet, GATA-3 y Foxp3, sólo para las cepas de genotipo americano. La expresión de GATA-3 y T-bet no se incrementó ($p>0.05$) y sólo en el tratamiento con DCs infectadas con la cepa NVSL se observó una tendencia a incrementar la expresión de Foxp3 (1.5 veces) con respecto al mock ($p=0.07$). Además los tratamientos con IFN-α tienen efecto en la expresión de Foxp3 y no en T-bet y GATA-3 ($p>0.05$) (Figura 13).

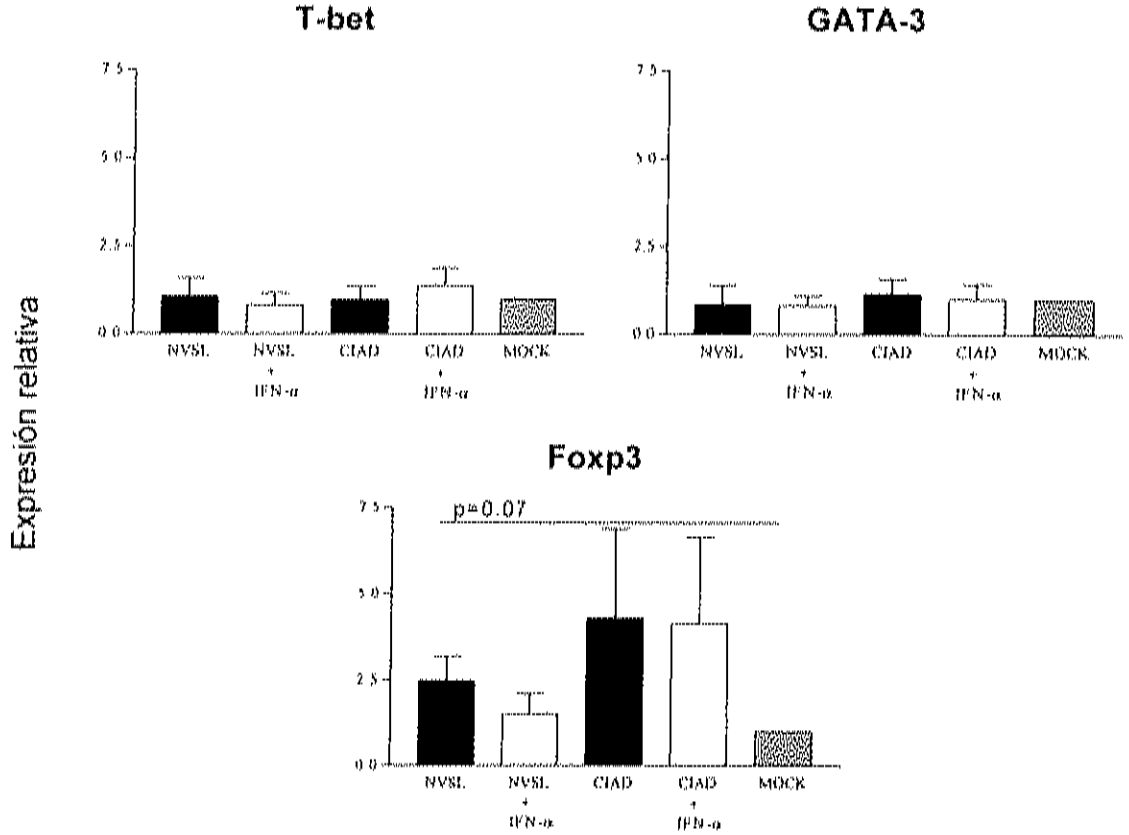


Figura 13. Expresión relativa de factores de transcripción T-bet, GATA-3 y Foxp3. A partir de RNA extraído a las 24 h de co-cultivos se evaluó la expresión relativa (mRNA), utilizando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para n=5, aplicando una prueba de Krukal-Wallis, $p<0.05$.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune celular en cerdos infectados con virus PRRS aparece tardíamente y las células productoras de IFN-γ aparecen a un nivel muy bajo (Meier et al., 2003). Debido a que este virus tiene la capacidad de infectar y replicarse en células dendríticas, y que éstas son muy importantes en la activación y diferenciación de los linfocitos T, se evaluó la capacidad de las DCs infectadas de estimular la respuesta de células T. Se observó que el virus PRRS disminuye el porcentaje de proliferación con respecto al control (mock). Estos resultados concuerdan con los publicados por Wang (2007). Lo anterior puede ser debido a que el virus provoca que disminuya la expresión de moléculas de MHC I y II, así como moléculas de coestimulación como CD80, CD86, CD14, y CD11 (Loving et al., 2007; Wang et al., 2007). El virus NVSL también provoca la disminución de MHC-II y CD80/86 en células dendríticas derivadas de monocitos (Flores-Mendoza et al., 2008). Sin embargo los virus con genotipo europeo tienen un comportamiento distinto. Dos cepas presentan un incremento en la proliferación, lo que indica como la variabilidad entre cepas influye en el tipo de respuesta (Diaz et al., 2005).

Se ha descrito que las células infectadas con virus PRRS no tienen la capacidad de producir IFN-α (Lee et al., 2004) el cual es importante en la inducción de proteínas antivirales, como son: proteína Mx (del inglés, mixovirus resistant), proteínas cinasas dependientes de RNA (PKR), las cuales evitan la replicación viral o degradan componentes virales (Kawamoto et al., 2003). 2003). Además el IFN-α tiene la capacidad de activar a STAT-1 y 2 y con ello favorecer la producción de IFN-γ (Bossert et al., 2003). En estudios realizados por Loving (2007), reportó que células dendríticas derivadas de monocitos infectadas con virus PRRS son deficientes en la producción de IFN-α. Al

estimular con IFN-α la replicación del virus disminuye y la expresión de moléculas de coestimulación aumenta. Los resultados de este trabajo muestran que el IFN-α en DCs infectadas con virus PRRS no aumenta la proliferación de células T. Estos resultados concuerdan con previos reportes donde al estimular con IFN-α las DCs infectadas con virus PRRS aumenta la expresión de MHC-I y de CD80/86. Sin embargo esto no se ve reflejado en un aumento en la proliferación de células T heterólogas (Loving et al., 2007). Estos resultados sugieren que existe otra vía por la cual este virus está bloqueando la proliferación de células T.

Diferentes reportes sugieren que el virus PRRS modula el sistema inmune del cerdo durante las primeras semanas después de la infección (Meier et al., 2004; Xiao et al., 2004; Zuckermann et al., 2007). Estudios recientes indican que las diferentes cepas del virus PRRS tienen distinta habilidad de inducir la producción de IL-10 y por lo tanto interferir con la inducción de IFN-γ (Diaz et al., 2006). Por lo tanto es posible que el tipo de células y la cantidad de citocinas secretadas por ellas puedan tener un efecto regulador. Estudios realizados en DCs derivadas de monocitos maduradas con LPS infectadas con virus PRRS, muestran que existe un incremento en la producción de IL-10, además cuando se infectan DCs inmaduras con las cepas NVSL la expresión de TGF-β aumenta (Flores-Mendoza et al., 2008). Lo anterior sugiere que el virus del PRRS puede provocar la inducción de células T reguladoras. Se evaluó la expresión de CD25 y Foxp3, encontrando que el virus PRRS con genotipo americano provoca el aumento de esta población celular. Sin embargo el hecho de que las cepas con genotipo europeo evaluadas no inducen la generación de células con fenotipo regulador, concuerda además con el hecho de que virus europeos no disminuyen el porcentaje de proliferación. La diferencia en el tipo de respuesta puede estar relacionada directamente con la alta variabilidad genética y antigénica que existe entre los dos genotipos. Se

dice que la respuesta inmune ante los dos genotipos es similar, sin embargo, los cerdos infectados con virus PRRS genotipo europeo cursan con viremias de menor intensidad y las células productoras de IFN-γ aparecen a las 2 semanas post infección (Diaz et al., 2005). Sin embargo se necesitan más estudios donde se vea los efectos de la infección en DCs del virus PRRS genotipo europeo para definir cual podría ser la causa de la falta de producción de IFN-γ que se observa.

Por otro lado, el hecho de que las DCs infectadas con virus PRRS no son capaces de producir IFN de tipo 1, nos llevó a evaluar el efecto que tendría la estimulación con IFN-α, es decir, al bloquear la replicación de PRRS en la inducción de células T con fenotipo regulador. Los resultados muestran que en efecto existe una disminución en el porcentaje de células con fenotipo regulador. Sin embargo para el caso del virus CIAD, el IFN-α no evita la generación de células $Foxp3^{+}CD25^{+}$, lo cual podría indicar que se trata de una cepa más agresiva. Por otro lado al estimular con DCs pulsadas con virus inactivado por calor, la generación de linfocitos T con fenotipo regulador disminuye. Estos resultados sugieren que el proceso de infección del virus en la DCs está relacionado con la inducción de células T reguladoras. El virus del PRRS podría estar afectando el proceso de fosforilación del factor de transcripción IRF3, que normalmente es desencadenada por la infección viral y las cinasas responsables son de tipo IκB: TBK1 e IKKε (Katze et al., 2002). Estas cinasas son esenciales en la inducción de interferones (tipo 1 y 2) y citocinas pro-inflamatorias, por su habilidad de fosforilar residuos de serina en el carboxilo terminal del IRF3. El virus hepatitis C codifica para una proteasa (NS3/4A), que es importante en la replicación del virus, donde cataliza los cortes de la poliproteína e interfiere con la activación de TBK1 e IKKε (Meurs and Breiman, 2007). En el caso del virus del PRRS aún no se conoce la función de todas las proteínas no estructurales. Sin embargo, en el caso de los

arterivirus se sabe que la proteína no estructural 4 (nsp4) tiene actividad de serín proteasa (Snijder and Meulenberg, 1998).

Al observar el perfil de citocinas, podemos notar que la expresión de IL-4, IL-10 e IFN-γ, así como la expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA-3 no se ve favorecida y el IFN-α no tuvo efecto. Estos resultados validan nuestra hipótesis, de que las DCs infectadas con el virus PRRS suprimen la respuesta Th1 y Th2. En cuanto a las citocinas IL-2 y TGF-β, así como para Foxp3 se observa un aumento en la expresión de mRNA, aunque estadísticamente no son significativos. Este resultado sugiere que las células con fenotipo regulador que son inducidas por las DCs infectadas con PRRS, están relacionadas directamente con la producción de TGF-β. Estudios recientes indican que la IL-2 es requerida para que las células T CD4 convencionales exprese *de novo* Foxp3 en respuesta al TGF-β (Rubtsov and Rudensky, 2007). En nuestros resultados podemos observar que las células con fenotipo regulador expresan alto contenido del receptor de IL-2 (CD25). Se dice, que es posible que las células T reguladoras adsorban la IL-2 producida por otras células, en consecuencia bloquea la proliferación celular (Miyara and Sakaguchi, 2007). Lo anterior podría explicar el porque se observa una mayor expresión de IL-2 (en comparación con la expresión de IL-10, IL-4 e IFN-γ) y la proliferación celular esta disminuida.

Para humano y ratón se han descrito varios tipos de células T reguladoras, en base a su origen, generación y mecanismo de acción, sin embargo se han clasificado en dos subtipos: naturales e inducidas, estás últimas adquieren una función reguladora por causa de una infección determinada. En esta población se incluyen las células T reguladoras 1 (T_R1) productoras de IL-10, células T helper 3 (Th3) productoras de TGF-β y células T reguladoras Foxp3 (Belkaid; 2007). Para el cerdo no se han caracterizado los

tipos de células T reguladoras. Un reporte reciente indica que células $CD4^{+}CD25^{hi}$ de cerdo tienen capacidad supresora. Además que estás células expresan Foxp3 y no producen IL-10, por lo que atribuyen que su función es a través del contacto célula-célula. Sin embargo, no evaluaron la producción de TGF-β (Käser et al., 2007). En nuestros resultados tenemos que la cepa 2992 indujo la producción de IL-10, aunque la proliferación celular no se afectó y tampoco fue capaz de inducir células con fenotipo regulador $Foxp3^{+}CD25^{+}$. Por ello podemos decir que la IL-10 no está relacionada con la inducción de células T reguladoras. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las células T con fenotipo regulador antígeno específicas en cerdo se caracterizan por ser $Foxp3^{+}CD25^{+}$ y productoras de TGF-β. Sin embargo, el TGF-β también se expresa en la membrana de las células T reguladoras $Foxp3^{+}$ (Miyara and Sakaguchi, 2007). Por lo tanto, se sugiere que el mecanismo por el cual este tipo de células suprimen la respuesta de células T esta relacionado a la acción del TGF-β. Si se confirma que el virus del PRRS genotipo americano induce la diferenciación de linfocitos T CD4 convencionales en reguladores. Se podría explicar el hecho de que en las infecciones causadas por este virus la memoria inmunológica esta retrasada (Murtaugh et al., 2002). Ya que los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de suprimir la acción de células de memoria (Miyara and Sakaguchi, 2007). Sin embargo, no se puede llegar a una conclusión de este tipo en el caso de las cepas Europeas.

En resumen podemos decir que las células dendríticas infectadas con virus PRRS genotipo americano disminuyen el porcentaje de proliferación, mientras que las infectadas con las cepas de genotipo europeo no. Que las cepas con genotipo americano provocan la inducción de células con fenotipo regulador ($Foxp3^{+}CD25^{+}$) y las cepas europeas no. Además las células dendríticas infectadas con virus PRRS no son capaces de inducir la producción de IL-10 e IFN-γ en linfocitos T. Por ultimo, que las células dendríticas

infectadas con cepas americanas no promueven la expresión de IFN-γ, IL-4, IL-2, IL-10, T-bet, y GATA-3, además se observó un incremento en la expresión de TGF-β y la expresión de Foxp3 tiende a incrementar, por lo que no se puede afirmar que las células $Foxp3^{+}CD25^{+}$ sean células T reguladoras.

CONCLUSIONES

En conclusión estos resultados muestran que además de la alta variabilidad genética y antigénica otro posible mecanismo por el cual el virus del PRRS suprime la respuesta inmune celular es mediante la infección de células dendríticas. Las cuales no promueven una correcta activación de células T y además para el caso de los virus con genotipo americano inducen un aumento de células T con fenotipo regulador ($Foxp3^{+}CD25^{+}$), que al parecer esta acción se relaciona con la producción de TGF-β.

ANEXOS

Lista de Abreviaturas

APC o APCs. (antigen presentation cell) célula presentadora de antígeno.

CTL. (cytotoxic cells) células citotóxicas.

DC o DCs. (dendritic cell) célula dendrítica.

IFN. Interferón

IL. Interleucina.

intDCs. (insterticial dendritic cells) células dendríticas insterticiales.

ITAMS. (Imunoglobulin family tyrosine (Y)- based activation motifs) motivos de tirosina.

IRFs. (IFN-regulatory factors). Factores de regulación de interferones.

LCs. (langerhans cells) células de Langerhans.

MHC. (major histocompatibity complex) complejo principal de histocompatibilidad.

M.O.I. (multiplicity infection index). Índice de multiplicidad de infección. }

Mx. (myxovirus resistance). Proteína resistente a myxovirus.

NK. (natural killer) célula asesina natural.

mRNA. (messenger ribonucleic acid). RNA mensajero.

ORF. (open reading frame) marcos de lectura abierta.

PAMP. (patterns associated molecular pathogen) patrones moleculares asociados a patógenos.

pDCs. (plasmocytoide dendritic cell) célula dendrítica plasmocitoide.

PHA. Fitohemaglutinina.

PKR. (dsRNA-dependent protein kinase). Proteinas cinasas dependientes de RNA de doble cadena.

PPIA. (peptidylprolyl isomerase A) Peptidilpropil isomerasa A.

PRR. (patterns recognition receptor) receptor de reconocimiento de patógenos.

SLA. (swine leucocyte antigens) antígeno leucocitario porcino.

Stat. (signal transducer and activator of transcription) traductor de señales y activador de la transcripción.

TCR. (T cell receptor) receptor de células T.

Th. (T helper cells) células T helper

TGF-β. (transformer growth factor β) factor transformante del crecimiento β.

TLR. (toll like receptor) receptores tipo toll.

TNF. (tumour necrosius factor) factor de necrosis tumoral.

Treg. (T regulatory cells) células T reguladoras.

REFERENCIAS

Abbas, A., Lichtman, A., 2004, Inmunologia celular y molecular 5°, Elsevier, España: Madrid, p. 163-187, 298-316, 355-157. .

Acuto, O., Cantrell, D., 2000, T cell activation and the cytoskeleton. Annu Rev Immunol 18, 165-184.

Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., Thompson, C.B., 2001, T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat Rev Immunol 1, 220-228.

Anderton, S.M., Wraith, D.C., 2002, Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. Nat Rev Immunol 2, 487-498.

Balasuriya, U.B., MacLachlan, N.J., 2004, The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. Vet Immunol Immunopathol 102, 107-129.

Banchereau, J., Palucka, A.K., 2005, Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol 5, 296-306.

Bettelli, E., Dastrange, M., Oukka, M., 2005, Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 5138-5143.

Bossert, B., Marozin, S., Conzelmann, K.K., 2003, Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. J Virol 77, 8661-8668.

Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B., Yoon, K.J., 2004, Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. Vet Immunol Immunopathol 102, 249-262.

Carrasco, C.P., Rigden, R.C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S., Takamatsu, H., Bertoni, G., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2001, Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. Immunology 104, 175-184.

Chang, C., Zimmerman, J., Yoon, K.y.d.D., 2005., 2005, Characterization of PRRS virus mutation after persistent infection in pigs. International PRRS Symposium. St. Louis Misspuri. December 1 and 2.

Chang, W.L., Baumgarth, N., Yu, D., Barry, P.A., 2004, Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. J Virol 78, 8720-8731.

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.

de Lima, M., Pattnaik, A.K., Flores, E.F., Osorio, F.A., 2006, Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural

proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology 353, 410-421.

Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., 2005, Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nat Rev Immunol 5, 112-124.

Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2004, Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. Vet Immunol Immunopathol 102, 179-188.

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. The Journal of general virology 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 (PRRSV) infects mature porcine dendritic cells and up-regulates IL-10 production. Clin Vaccine Immunol.

Fong, L., Engleman, E.G., 2000, Dendritic cells in cancer immunotherapy. Annu Rev Immunol 18, 245-273.

Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A., van Kooyk, Y., 2004, Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. Annu Rev Immunol 22, 33-54.

Goldsby, R., Kindt, T., BA, O., J, K., 2004, Inmunologia, Reacción inmunitarias a las enfermedades infecciosas. . 5th ed , McGraw-Hill Interamericana, p. 83-84, 411-413.

Gorelik, L., Flavell, R.A., 2002, Transforming growth factor-beta in T-cell biology. Nat Rev Immunol 2, 46-53.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S., 2002, Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 20, 621-667.

Hackstein, H., Thomson, A.W., 2004, Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. Nat Rev Immunol 4, 24-34.

Hernández, J., Osorio, F., 2005, Effect pf PRRS virus on monocyte-derived dendritic cells. . International PRRS Symposium. St. Louis Misspuri. December 2 and 3.

Huang, J.L., Huang, J., Duan, Z.H., Wei, J., Min, J., Luo, X.H., Li, J.G., Tan, W.P., Wu, L.Z., Liu, R.Y., Li, Y., Shao, J., Huang, B.J., Zeng, Y.X., Huang, W., 2005, Th2 predominance and CD8+ memory T cell depletion in patients with severe acute respiratory syndrome. Microbes Infect 7, 427-436.

Kapsenberg, M.L., 2003, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol 3, 984-993.

Käser, T., Gerner, W., Hammer, S., Patzl, M., Saalmüller, A., 2007, Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4+CD25high regulatory T cells. Veterinary immunology and immunopathology.

Katze, M.G., He, Y., Gale, M., Jr., 2002, Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol 2, 675-687.

Kawamoto, S., Oritani, K., Asada, H., Takahashi, I., Ishikawa, J., Yoshida, H., Yamada, M., Ishida, N., Ujiie, H., Masaie, H., Tomiyama, Y., Matsuzawa, Y., 2003, Antiviral activity of limitin against encephalomyocarditis virus, herpes simplex virus, and mouse hepatitis virus: diverse requirements by limitin and alpha interferon for interferon regulatory factor 1. J Virol 77, 9622-9631.

Koretzky, G.A., Myung, P.S., 2001, Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. Nat Rev Immunol 1, 95-107.

Lee, S.M., Schommer, S.K., Kleiboeker, S.B., 2004, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. Vet Immunol Immunopathol 102, 217-231.

Li-Weber, M., Krammer, P.H., 2003, Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. Nature reviews 3, 534-543.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., O'Shea, J.J., 2001, T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 15137-15142.

Lin, J.T., Martin, S.L., Xia, L., Gorham, J.D., 2005, TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. J Immunol 174, 5950-5958.

Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004, Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Veterinary immunology and immunopathology 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., 2007, PRRS update recienes avances sobre la enfermedad. Merial

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. Veterinary immunology and immunopathology 102, 299-314.

Meurs, E.F., Breiman, A., 2007, The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus. World J Gastroenterol 13, 2446-2454.

Miyara, M., Sakaguchi, S., 2007, Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. Trends in molecular medicine 13, 108-116.

Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002, Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Viral immunology 15, 533-547.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002, Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. Journal of virology 76, 4241-4250.

Randolph, G.J., Angeli, V., Swartz, M.A., 2005, Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. Nature reviews 5, 617-628.

Ropp, S.L., Wees, C.E., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., Benfield, D.A., Faaberg, K.S., 2004, Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. Journal of virology 78, 3684-3703.

Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., 2007, TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. Nature reviews 7, 443-453.

Shoemaker, J., Saraiva, M., O'Garra, A., 2006, GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. J Immunol 176, 3470-3479.

Snijder, E.J., Meulenberg, J.J., 1998, The molecular biology of arteriviruses. The Journal of general virology 79 (Pt 5), 961-979.

Sur, J.H., Doster, A.R., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Osorio, F.A., 1997, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. Journal of virology 71, 9170-9179.

Thome, M., Tschopp, J., 2001, Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. Nature reviews 1, 50-58.

Van Gucht, S., Labarque, G., Van Reeth, K., 2004, The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. Veterinary immunology and immunopathology 102, 165-178.

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. Journal of virology 77, 8207-8215.

Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005, Subset-dependent

modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. Immunology 115, 388-398.

Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003, Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. Journal of virology 77, 13288-13300.

Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., 2007, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. Archives of virology 152, 289-303.

Wasilk, A., Callahan, J., Christopher-Henning, J., Gay, T., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., Nelson, W., 2004, Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome vieuses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. J. Clin. Microbial. , 4453-4461.

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. Journal of virology 78, 5923-5933.

Yeh, S.H., Chuang, H., Lin, L.W., Hsiao, C.Y., Eng, H.L., 2006, Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. British journal of sports medicine 40, 239-243.

Zuckermann, F., Calzada-Nova, G., Husmann, R., Schnitzein, W., 2005, PRRS virus modulates the innate immune function of porcine plasmocytoid dendritic cells. International PRRS Symposium. St. Louis Misspuri., St. Louis Misspuri. 2 y 3 de Diciembre, 2005.

Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F., 2007, Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. Veterinary microbiology 123, 69-85.