Efecto del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en células dendríticas de cerdo derivadas de monocitos

Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus on porcine monocyte-derived dendritic cells

Lilian Flores-Mendoza* Erika Silva-Campa* Mónica Reséndiz*
Verónica Mata-Haro** Fernando A. Osorio*** Jesús Hernández*

Abstract

Dendritic cells (DC) are considered the most important antigen presenting cells of the immune system. Its anatomical location (skin, mucosa and peripheral blood), the expression of receptors to recognize pathogens, the expression of co-stimulatory molecules (CD80/86), the major histocompatibility complex (MHC) class I and II, and the production of cytokines (such as IFN-α, IL-10, IL-12) confers to these cells the characteristic to regulate innate and adaptive immune responses. The objective of this work was to evaluate the effects of the porcine reproductive and respiratory virus (PRRS) in mature DC. DC were generated from blood monocytes using IL-4 and GM-CSF and were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to induce their maturation. The results show that the expression of CD14 and CD172a molecules in infected DC was not affected, while MHC II and CD80/86 expression was diminished. This decrease seems to affect the allogenic proliferation of lymphocytes stimulated with infected DC. On the other hand, the virus increases mRNA expression of IL-10 and TNF-α, and diminishes that for IL-1β and IL-6. The results obtained could explain, in part, the immunophatology of the disease.

Key words: DENDRITIC CELLS, SWINE, CD80, CD86, MHC-II, RT-PCR.

Resumen

Las células dendríticas (DC) son las presentadoras de antígeno más importantes del sistema inmune. Su localización anatómica (piel, mucosas y sangre periférica), la expresión de receptores para reconocer patógenos, la expresión de moléculas de coestimulación (CD80/86), del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clases I y II, y la producción de citocinas (IFN-α, IL-10, IL-12), les confiere una característica única para regular las respuestas inmune innata y adaptativa. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en DC maduras. Se generaron células dendríticas a partir de monocitos utilizando IL-4 y GM-CSF y se estimularon con lipopolisacárido (LPS) para inducir su maduración. Los resultados muestran que la expresión de las moléculas CD14 y CD172a no se altera en las DC infectadas, mientras que la expresión de MHC II y CD80/86 se ve disminuida. Esta disminución parece afectar la proliferación alogénica de linfocitos estimulados con DC infectadas. Asimismo, el virus aumenta la expresión del ARNm de IL-10 y TNF-α, y disminuye la de IL-1β e IL-6. Lo anterior explica, en parte, la inmunopatología de la enfermedad.

Palabras clave: CÉLULAS DENDRÍTICAS, CERDO, CD80, CD86, MHC-II, RT-PCR.

Recibido el 31 de octubre de 2007 y aceptado el 1 de septiembre de 2008.
*Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Km 0.6, Carretera a la Victoria, 83000, Hermosillo Sonora, México, Apartado Postal 1735, Tel. (01-662) 289-2400, Ext. 294; Fax (01-662) 280-0094.
**Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Km 0.6, Carretera a la Victoria, 83000, Hermosillo, Sonora, México.
***Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska-Lincoln, NE 68583-0905, Estados Unidos de América.
Correspondencia: Jesús Hernández, Correo electrónico: jhdez@ciad.mx

Introduction

Dendritic cells (DC) are considered the most important antigen presenting cells of the immune system. They are located in all the organism, especially in the entrance sites of antigens such as skin and mucosa.[1,2] DC capture, process and present antigens in the form of peptides associated with the major histocompatibility complex (MHC) class I or II;[1] they are also capable of activating naive T lymphocytes and induce and modulate the immune response.[2-4]

In peripheral tissues, DC are found in immature state and have the capacity to capture and process antigens,[5] which allows them to activate and migrate to secondary lymphoid organs and acquire a mature state.[6] Mature DC express great amount of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 and antigen presenting molecules such as MHC I and II.[6,7] These characteristics give them the capacity to stimulate T lymphocytes.[7-9] Also, DC activate other cellular types, including B lymphocytes, neutrophils, NK cells, among others.[10-12] Stimulation and other type of response of lymphocytes and other cells depend on the type of receptors that DC express, as well as the profile of cytokines that secrete.[13] Consequently, DC are important in the induction and regulation of the immune response, and are ideal target for viruses, that modulate its capacity of response in presence of infection, which conducts to the evasion of the immune system.[14,15]

Certain viruses, such as human immunodeficiency (HIV), chicken pox, cytomegalovirus and herpes simplex virus type I, infect and also replicate in DC. The immunosuppression which induce these viruses is mediated, in part, by the infection and it is due to a decrease in the co-stimulatory molecules, CD80 and CD86.[16] On the contrary, other viruses, such as influenza or dengue virus, induce the activation and maturation of DC and promote efficient immune response.[17,18]

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) is an enveloped virus, constituted by single-stranded RNA, of positive polarity, which belongs to the Arteroviridae family. The virus infects and replicates into alveolar macrophages. During the first week of infection, the immune system produces a strong antibody response, which is associated with a policlonal activation of B lymphocytes and high production of IL-6.[19,20] Nevertheless, from the fourth week of infection neutralizing antibodies appear. Likewise, cellular response is characterized by a late T lymphocyte response and the apparition of IFN-α productive cells at the third week of infection. It has been observed that the conferred immunity by memory

Introducción

Las células dendríticas (DC) son las presentadoras de antígeno más importantes del sistema inmune. Se localizan en todo el organismo, especialmente en los sitios de entrada de antígenos, como la piel y mucosas.[1,2] Las DC capturan, procesan y presentan antígenos en forma de péptidos asociados con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clases I o II;[1] además son capaces de activar a linfocitos T vírgenes e inducir y modular la respuesta inmune.[2-4]

En tejidos periféricos, las DC se encuentran en estado inmaduro y tienen la capacidad de capturar y procesar antígenos,[5] lo cual permite que se activen y migren a órganos linfoides secundarios y adquieran un estado maduro.[6] Las DC maduras expresan gran cantidad de moléculas de coestimulación, como CD40, CD80 y CD86 y moléculas de presentación de antígenos, como MHC I y II.[6,7] Estas características les confieren la capacidad de estimular linfocitos T.[7-9] Además, las DC activan otros tipos celulares, incluyendo los linfocitos B, neutrófilos, células NK, entre otras.[10-12] La estimulación y el tipo de respuesta de los linfocitos y otras células dependen del tipo de receptores que expresen las DC, así como del perfil de citocinas que secreten.[13] En consecuencia, las DC son importantes en la inducción y regulación de la respuesta inmune, y son blanco ideal para los virus, que modulan su capacidad de respuesta ante la infección, lo que conduce a la evasión del sistema inmune.[14,15]

Ciertos virus, como el de la inmunodeficiencia humana (VIH), la varicela, el citomegalovirus y el virus del herpes simple tipo I, infectan e incluso se replican en DC. La inmunosupresión que inducen estos virus está mediada, en parte, por la infección y se debe a una disminución en las moléculas de coestimulación, CD80 y CD86.[16] Por el contrario, otros virus, como el de la influenza o dengue, inducen la activación y maduración de las DC y promueven una respuesta inmune eficaz.[17,18]

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es un virus envuelto, compuesto de ARN de cadena sencilla, de polaridad positiva, pertenece a la familia Arteroviridae. El virus infecta y se replica en macrófagos alveolares. Durante la primera semana de infección, el sistema inmune produce una fuerte respuesta de anticuerpos, la cual se asocia con una activación policlonal de linfocitos B y alta producción de IL-6[19,20] Sin embargo, a partir de la cuarta semana de infección aparecen los anticuerpos neutralizantes. Asimismo, la respuesta celular se caracteriza por una respuesta tardía de linfocitos T y la aparición de células productoras de IFN-α a la tercera semana de infección, se ha observado que la inmunidad ofre-

cells apparently is not greater than two years.[19-21]

It has been demonstrated that PRRS virus infects and replicates in monocyte-derived immature DC.[22-24] Wang *et al.*[24] found that the virus decreases MHC I and II expression, and alters the capacity of activating the allogeneic proliferation of T lymphocytes. Nevertheless, in a study by Loving *et al.*,[22] even though a decrease in MHC I expression was observed, the CD80/86 was not altered by PRRS virus. In relation to cytokine expression in infected DC with PRRS virus, Wang *et al.*[24] did not detect changes in IL-10, IL-12 or IFN-γ production; nevertheless, they observed increase in the production of TNF-α after 48 hours of infection. While Loving *et al.*[22] observed mRNA expression increment of IFN-β at 18 h of infection, as well as mRNA expression decrease of IFN-α.

Charerntantanakul *et al.*[23] neither described changes in IL-10 expression in infected DC by PRRS virus. However, they found increase in IL-10 expression in monocytes and reduction in IFN-γ expression and TNF-α in monocyte/lymphocyte co-cultures stimulated by concanavalin A and PMA/ionomycin.

In this context, the aim of this work was to analyze the effect of PRRS virus on the expression of co-stimulatory molecules (CD80/86) and MHC-II, as well as to evaluate capacity of stimulate allogeneic responses of lymphocytes and the modulation in the production of inflammatory cytokines in DC.

Material and methods

Experimental design

DC were generated from porcine monocytes, incubating adherent cells during seven days in presence of porcine recombinant cytokines IL-4 and GM-CSF. At day five, immature DC (iDC) were obtained. Mature DC (mDC) were generated by stimulation with LPS for two days. The mDC were infected with PRRS virus and the following was evaluated: *a*) the expression of surface markers of CD172a, CD14, MHC II and CD80/86 by flow cytometry in iDC, mDC and infected-mDC; *b*) the expression of IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α cytokine transcripts in infected mDC; and *c*) the capacity of infected DC to stimulate an allogeneic response using non-adherent cells with carboxyfluorescein succinimidyl ester diacetate (CFSE).

Experimentation animals

Four pigs of four to six weeks of age coming from a farm free of PRRS, Aujezsky disease, porcine rubulavirus and classic porcine fever were used. The animals were housed in the animal metabolic unit of the Research Center for Food and Development, A.C.

cida por células de memoria aparentemente no es mayor de dos años.[19-21]

Se ha demostrado que el virus PRRS infecta y se replica en DC inmaduras derivadas de monocitos.[22-24] Wang *et al.*[24] encontraron que el virus disminuye la expresión de MHC I y II, y altera la capacidad de activar la proliferación alogénica de los linfocitos T. Sin embargo, en un trabajo de Loving *et al.*, [22] aun cuando se observó disminución en la expresión de MHC I, la de CD80/86 no se vio alterada a causa del virus PRRS. En relación con la expresión de citocinas en DC infectadas con el virus PRRS, Wang *et al.*[24] no detectaron cambios en la producción de IL-10, IL-12 o IFN-γ; sin embargo, observaron incremento en la producción de TNF-α después de 48 h de infección. Mientras que Loving *et al.*[22] observaron aumento en la expresión de ARNm de IFN-β a las 18 h de infección, así como disminución en la expresión del ARNm de IFN-α.

Por su parte, Charerntantanakul *et al.*[23] tampoco describieron cambios en la expresión de IL-10 en DC infectadas por el virus PRRS. Sin embargo, encontraron aumento en la expresión de IL-10 en monocitos y reducción en la expresión de IFN-γ y TNF-α en cocultivos de monocitos/linfocitos estimulados con concanavalina A y PMA/ionomicina.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del virus PRRS sobre la expresión de moléculas de coestimulación (CD80/86) y del MHC-II, así como evaluar su capacidad de estimular respuestas alogénicas de linfocitos y la modulación en la producción de citocinas inflamatorias en DC.

Material y métodos

Diseño experimental

Se generaron DC a partir de monocitos de cerdos, incubando células adherentes durante siete días en presencia de citocinas recombinantes de cerdo IL-4 y GM-CSF. Al quinto día de cultivo se obtuvieron DC inmaduras (iDC), las cuales se estimularon dos días con LPS para generar DC maduras (mDC). Las mDC se infectaron con el virus PRRS y se evaluó: *a*) la expresión de marcadores de superficie de CD172a, CD14, MHC II y CD80/86 por citometría de flujo en iDC, mDC y mDC infectadas; *b*) la expresión de transcritos de citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 y TNF-α en mDC infectadas; y *c*) la capacidad de las DC infectadas para estimular una respuesta alogénica usando células no adherentes marcadas con succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE).

Animales de experimentación

Se utilizaron cuatro cerdos de cuatro a seis semanas

(CIAD, A.C. for its Spanish meaning) with *ad libitum* access to water and food.

Reagents

Mouse monoclonal antibodies (mAb) specific for pig anti-CD14,* MHC-II* and CD172a* were used. In order to identify the expression of co-stimulatory molecules CD80/86, a mouse hCTLA4-immunoglobulin fusion protein was used.** The detection of these antibodies and the fusion protein were done with a second mouse anti-IgG goat antibody, conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC).*** Porcine recombinant cytokines IL-4 and GM-CSF† were used for the DC differentiation.

Virus

The PRRS virus‡ was multiplied in MARC-145 cells prepared in culture bottles of 25cm^2. Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 UI/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 50 µg/mL of gentamycin. The inoculated cells were incubated at 37°C, 90% humidity and 5% of CO_2 atmosphere. When the cells presented cytopathic effect (at 48 or 72 h) they were subjected to two thermal shocks (–80/25°C). The cellular lysis was cultured and clarified by centrifugation at 650 *g* during 30 minutes at 4°C. The supernatant rich in viral particles was stored in volumes of 1mL at –70°C. The same procedure was applied to non-infected cells and the obtained lysis of these cells was used as control in posterior experiments, which is called mock or control, and it is referred to a utilized control in experiments, which serves to determine the induced effects by cells where the virus grew and not for the *per se* virus.[25]

Generation of monocyte-derived dendritic cells

Thirty to forty mL blood samples of the porcine anterior cava vein were collected in heparin tubes. Blood was mixed in a 1:2 ratio with DMEM medium without FBS and with antibiotics. The mononuclear cells (MNC) were obtained using a Ficoll-Hypaque gradient in a 1:4 ratio and centrifuged at 500 *g* for 20 min at 4°C. The MNC were re-suspended in ammonium chloride during 5 min to lyse the erythrocyte remnants (if necessary), they were washed with DMEM without serum and they were centrifuged during 10 min at 200 *g*.[26] Finally, MNC were re-suspended in DMEM medium with 10% of FBS and were cultured in 25 cm^2 culture dishes at a cellular density of 5×10^6/mL. They were incubated all night at 37°C and 5% of CO_2 to obtain the adherent cells. The non-adherent

de edad procedentes de una granja libre de PRRS, enfermedad de Aujezsky, rubulavirus porcino y fiebre porcina clásica. Los animales se alojaron en la unidad metabólica animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C (CIAD, A. C.) con agua y alimento *ad libitum*.

Reactivos

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón específicos para cerdo anti-CD14,* MHC-II* y CD172a.* Para identificar la expresión de las moléculas de coestimulación CD80/86, se utilizó una proteína de fusión hCTLA4-inmunoglobulina de ratón.** La detección de estos anticuerpos y la proteína de fusión se realizaron con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).*** Se utilizaron las citocinas recombinantes de cerdo IL-4 y GM-CSF† en la diferenciación de células dendríticas.

Virus

El virus PRRS‡ se multiplicó en células MARC-145 preparadas en botellas de cultivo de 25 cm^2. Las células se cultivaron en medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 50 µg/mL de gentamicina. Las células inoculadas se incubaron a 37°C, 90% de humedad y atmósfera con 5% de CO_2. Cuando las células presentaron efecto citopático (a las 48 o 72 h) se sometieron a dos choques térmicos (–80/25°C). Los lisados celulares se cosecharon y clarificaron por centrifugación a 650 *g* durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante rico en partículas virales se almacenó en volúmenes de 1 mL a –70°C. El mismo procedimiento se aplicó a células sin infectar y el lisado obtenido de estas células fue utilizado como testigo en experimentos posteriores, el cual es llamado mock o testigo, y se refiere a un testigo utilizado en los experimentos, que sirve para determinar los efectos inducidos por las células donde creció el virus y no por el virus *per se*.[25]

Generación de células dendríticas derivadas de monocitos

Se recolectaron de 30 a 40 mL de sangre de la vena cava anterior de cerdo en tubos con heparina. La sangre se mezcló en relación 1:2 con medio DMEM

*VMRD, Estados Unidos de América.
**Ancell, Estados Unidos de América.
***Southern Biotech, Estados Unidos de América.
†Biosource Internacional, Estados Unidos de América.
‡ GenBank AF299398.

cells were collected and stored at 70°C for their future use in the allogeneic stimulatory assays. The adherent cells were incubated in DMEM medium in presence of 20 ng/mL of each one of the porcine recombinant cytokines IL-4 and GM-CSF. Cells were cultured during seven days, with changes of fresh medium with cytokines at the second and fifth day of culture. At the fifth day of culture the cells, considering as immature dendritic cells (iDC), were incubated with 3 µg/mL of LPS during two more days. After this period, they were considered as mature dentritic cells (mDC).[27]

Infection of DC with PRRS virus

DC were infected with PRRS virus using a multiplicity of infection (moi) of 0.1 during 1 h at 37°C in an atmosphere of 5% of CO_2 and 95% of humidity. In order to eliminate the non-absorbed virus, cells were washed four times, they were centrifuged at 200 *g* for 5 min. Later, they were re-suspended in 0.5 mL in fresh medium and were cultured for 24 h at 37°C in an atmosphere of 5% of CO_2 and 95% of humidity.

Evaluation of surface markers

Two point five × 10^5 DC/mL were used, which were incubated in presence of mAb anti-CD14, MHC II or anti-CD172a and with the fusion protein which recognizes CD80/86 for 20 min at 4°C. Cells were cold washed twice with 1 mL of phosphate buffer supplemented with 1% albumin (1% PBA). Next, they were incubated with the conjugated antibody for 20 min at 4°C in darkness and washed twice. Finally were fixed with 200 µL of paraformaldehyde at 1%, and kept at 4°C and in darkness, until analyzed by flow cytometry in a maximum of 5 days.[28]

Detection of porcine cytokines by RT-PCR

The porcine cytokines were analyzed in non-infected and infected mDC. After 24 h of infection, the infected and non-infected mDC were washed once with PBS and re-suspended in TRIzol for the RNA extraction following the manufacturer specifications.* The RNA was re-suspended in 20 µL of DEPC water.** For the cytokine analysis, a reverse transcription was done using the enzyme Superscript II reverse transcriptase*** in a total volume of 20 µL, following the manufacturer specifications. The complementary DNA was stored at –20 °C until its use in PCR reactions. The PCR reactions were done in a final volume of 50 µL using 10 mM HCl Tris, 50 mM KCl (pH 8.3), 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM of each nucleotide, dATP, dTTP, dCTP and dGTP, 30 µM of each iniciator (Table 1), 0.25 U Taq DNA polymerase† and 2 µL of complementary

sin SFB y con antibióticos. Las células mononucleares (CMN) se obtuvieron utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque en relación 1:4 y centrifugando a 500 *g* por 20 min a 4ºC. Las CMN fueron resuspendidas en cloruro de amonio durante 5 min para lisar el remanente de eritrocitos (en caso de ser necesario), se lavaron con DMEM sin suero y se centrifugaron durante 10 min a 200 *g*.[26] Finalmente, las CMN se resuspendieron en medio DMEM con 10% de SFB y se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm^2 a densidad celular de 5 × 10^6/mL. Se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 para obtener las células adherentes. Las células no adherentes se recolectaron y almacenaron a –70ºC para su uso posterior en los ensayos de estimulación alogénica. Las células adherentes se incubaron en medio DMEM en presencia de 20 ng/mL de cada una de las citocinas recombinantes porcinas IL-4 y GM-CSF. Las células se cultivaron durante siete días, con cambios de medio fresco con citocinas al segundo y quinto días de cultivo. Al quinto día de cultivo las células, consideradas células dendríticas inmaduras (iDC), se incubaron con 3 µg/mL de LPS durante dos días más. Después se consideraron células dendríticas maduras (mDC).[27]

Infección de DC con el virus PRRS

Las DC fueron infectadas con el virus PRRS usando un índice de multiplicidad (moi) de 0.1 durante 1 h a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad. Para eliminar el virus no absorbido, las células se lavaron cuatro veces, se centrifugaron a 200 *g* por 5 min. Después se resuspendieron en 0.5 mL de medio fresco y se cultivaron por 24 h a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad.

Evaluación de marcadores de superficie

Se utilizaron 2.5 × 10^5 DC/mL, las cuales se incubaron en presencia de un mAb anti-CD14, MHC II o anti-CD172a y con la proteína de fusión que reconoce CD80/86 durante 20 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos con albúmina bovina al 1% (PBA-1%) en frío. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo conjugado durante 20 min a 4°C en oscuridad y se lavaron dos veces. Finalmente se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 1%, se mantuvieron a 4°C y en oscuridad, hasta su análisis por citometría de flujo en un máximo de 5 días.[28]

Detección de citocinas porcinas por RT-PCR

Las citocinas porcinas se analizaron en mDC no infectadas e infectadas. Después de 24 h de infección, las

Cuadro 1

SECUENCIA DE LOS INICIADORES DE CITOCINAS PARA RT-PCR

SEQUENCE OF CYTOKINE PRIMERS FOR RT-PCR

	Forward primer	*Reverse primer*
IL-1	CAACGTGCAGTCTATGGAGT	GAGGTGCTGATGTACCAGTT
IL-6	GGCTGCTTCTGGTGATGGCTA	TTGCCTCAGGGTCTGGATCAGT
TNF-α	CCACGTTGTAGCCAATGTCA	CAGCAAAGTCCAGATAGTCG
IL-10	GAAGGACCAGATGGGCGACTT	CACCTCCTCCACGGCCCTTG
GAPDH	GTCTTCACCACATGGAG	CCAAAGTTGTCATGGATGACC

DNA. PCR reaction was done as follows: 35 cycles at 94°C during 3 min, 94°C during 30 sec, 55°C during 30 sec, 72°C during 1 min and a final elongation at 72°C during 10 min. PCR products (10 µL) were ran in agarose gel at 1.2% and were stained with ethidium bromide. To assess the level of mRNA of each cytokine, PCR products were semi-quantified comparing the intensity value of the bands by a densitometry analysis and they were normalized with the obtained values of a constitutive gene (GADPH). The results are presented as cytokine/GADPH ratio.

Allogeneic stimulatory assay

The non-adherent cells were stained with 0.1 µM of CFSE during 10 min at 37°C, 5% of CO_2 and 95% of humidity. Subsequently, the excess of CFSE was inactivated with RPMI medium with 10% FBS. The non-adherent cells (5×10^5) were co-cultured with infected and non-infected mDC in a 1:10 ratio of mDC/lymphocyte during 5 days. At the fifth day of culture, cells were analyzed by flow cytometry. The proliferation percentage was determined by WinMDI 2.8.

Statistical analyses

In order to identify significant differences between non-infected and infected mDC and between immature, mature and infected mature, a Mann Whytney test was carried out. SigmaSTAT version 3.1 statistical package was used, considering a $P < 0.05$ as statistically significant.

Results

Morphology of porcine dendritic cells

After eliminating non-adherent cells and before stimulating the differentiation to DC, the adherent cells

mDC infectadas y las no infectadas se lavaron una vez con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y fueron resuspendidas en TRIzol para la extracción de ARN siguiendo las especificaciones del fabricante.* El ARN fue resuspendido en 20 µL de agua DEPC.**. Para el análisis de citocinas se hizo una transcripción reversa usando la enzima Superscript II reverse transcriptase*** en un volumen total de 20 µL, siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN complementario fue almacenado a –20 ºC hasta su uso en las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 50 µL usando 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl (pH 8.3), 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM de cada nucleótido, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 30 µM de cada iniciador (Cuadro 1), 0.25 U Taq DNA polimerasa† y 2 µL de ADN complementario. La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 35 ciclos a 94ºC por 3 min, 94ºC por 30 seg, 55ºC por 30 seg, 72ºC por 1 min y una elongación final a 72ºC por 10 min. Los productos de la PCR (10 µL) se corrieron en geles de agarosa al 1.2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Para estimar el nivel de expresión de ARNm de cada citocina, los productos de PCR se semicuantificaron comparando el valor de intensidad de las bandas mediante un análisis densitométrico y se normalizaron con los valores obtenidos de un gen constitutivo (GADPH). Los resultados se presentan como la relación citocina/GADPH.

Ensayo de estimulación alogénico

Las células no adherentes se tiñeron con 0.1 µM de CFSE durante 10 min a 37ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad. Posteriormente, el exceso de CFSE se inactivó con medio RPMI con 10% de SFB. Las células no

*Invitrogen, Estados Unidos de América.
**Invitrogen, Estados Unidos de América.
***Invitrogen, Estados Unidos de América.
†Invitrogen, Estados Unidos de América.

(day 0) have a small round shape (Figure 1a). Obtained results in laboratory have confirmed that more than 95% of the adherent cells express marker CD14 (data not shown). At fifth day of incubation in presence of IL-4 and GM-CSF (Figure 1b), the adherent cells acquire an elongated cell morphology, with projections. When these cells were stimulated during 48 h with LPS, a morphology change was observed and several detached. The LPS stimulus provoked that cells with DC morphology were detached and observed floating (Figure 1c).

The PRRS virus regulates the expression of certain surface markers in DC

In order to confirm that the described morphological characteristics correspond to iDC and mDC phenotype, the expression of co-stimulatory molecule CD80/86 and the presenting molecule MHC-II was determined. Also, the expression of the molecules CD172a and CD14 was determined. Additionally, the PRRS virus effect in the expression of these molecules after 24 h of infection was assessed. The expression of CD172a, myeloid marker, as expected, kept constant in iDC, mDC and infected mDC (85% of positive cells), with median fluorescent intensity (MFI) of 40. The obtained results for the expression of CD14 showed that there is no significant difference (P >

adherentes (5×10^5) se cocultivaron con mDC infectadas y no infectadas en una relación de mDC/linfocito 1:10 durante cinco días. Al quinto día de cultivo, las células se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de proliferación se determinó con el programa WinMDI 2.8.

Análisis estadístico

Para identificar diferencias significativas entre mDC no infectadas e infectadas y entre inmaduras, maduras y maduras infectadas, se realizó la prueba Mann Whytney. Para ello se utilizó el paquete estadístico SigmaSTAT versión 3.1, considerando una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

Resultados

Morfología de las células dendríticas de cerdo

Después de eliminar las células no adherentes y antes de estimular la diferenciación a DC, las células adherentes (día 0) tienen un aspecto redondeado y pequeño (Figura 1a). Resultados obtenidos en el laboratorio han confirmado que más de 95% de las células adherentes expresan el marcador CD14 (datos no mostrados). Al quinto día de incubación en presencia de IL-4 y GM-CSF (Figura 1b), las células adherentes

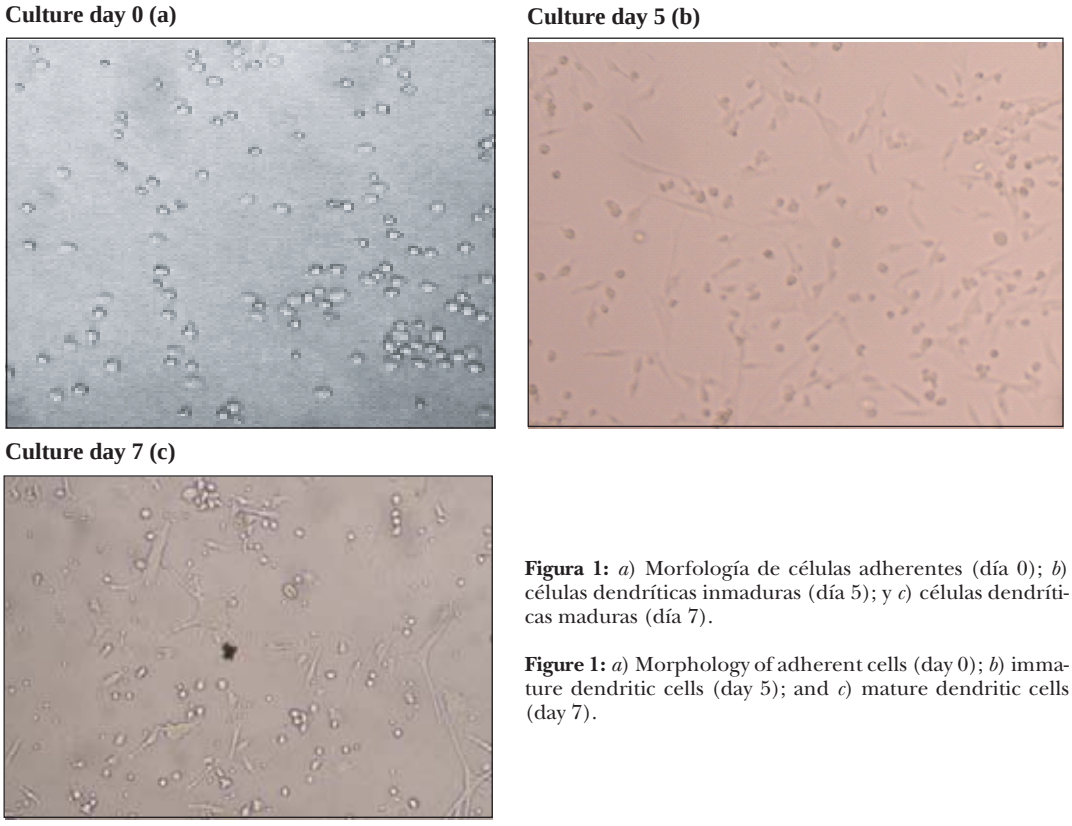

Figura 1: *a*) Morfología de células adherentes (día 0); *b*) células dendríticas inmaduras (día 5); y *c*) células dendríticas maduras (día 7).

Figure 1: *a*) Morphology of adherent cells (day 0); *b*) immature dendritic cells (day 5); and *c*) mature dendritic cells (day 7).

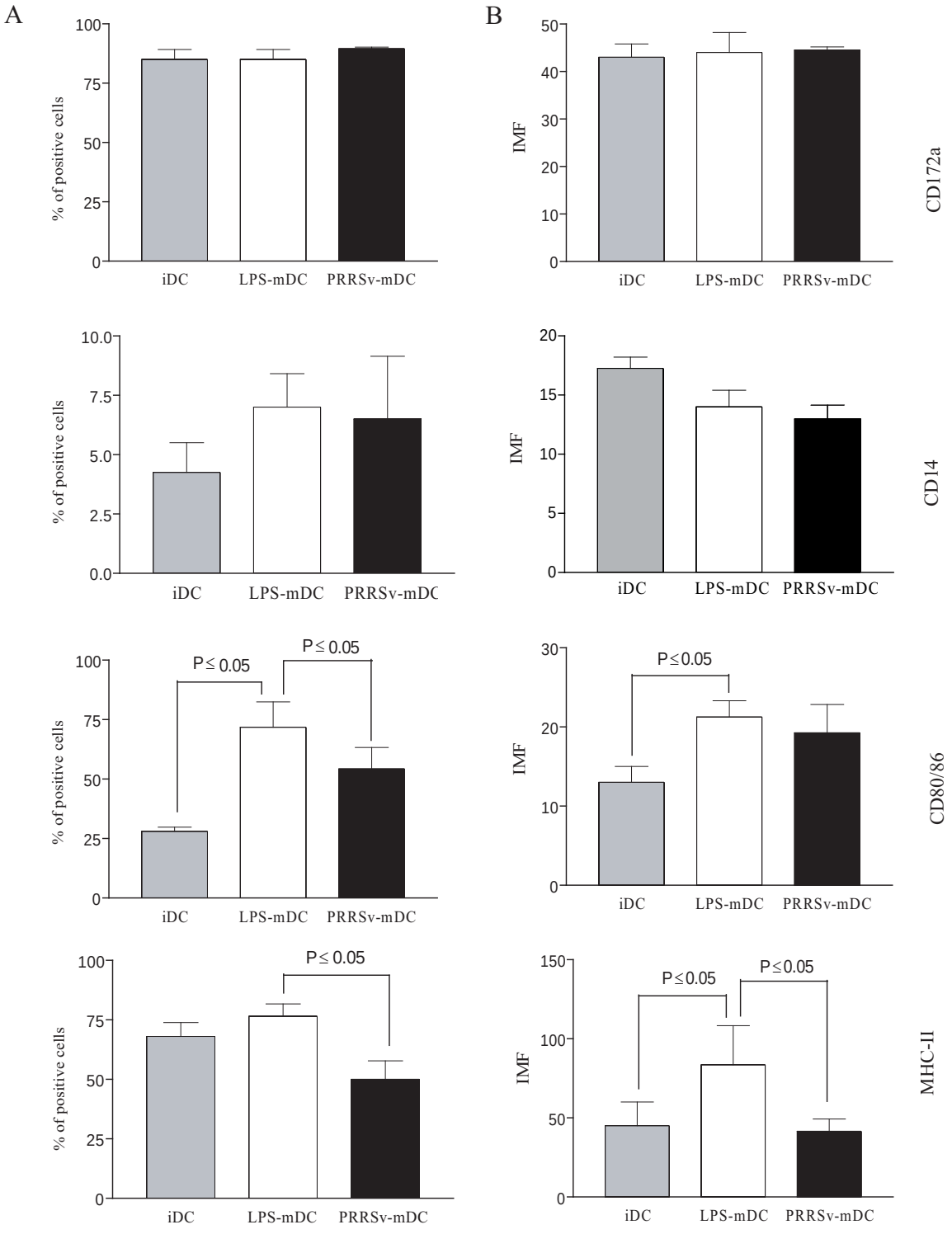

Figura 2: Expresión de marcadores de superficie: CD172a, CD14, MHC II y CD80/86 en iDC, mDC y mDC infectadas con virus PRRS a moi de 0.1. A) Porcentaje de células positivas a cada marcador, B) Intensidad media de fluorescencia (MIF). La figura muestra medias y desviación estándar (n = 4).

Figure 2: Expression of surface markers: CD172a, CD14, MHC II y CD80/86 in iDC, mDC and infected mDC with PRRS virus at a moi of 0.1. A) Percentage of positive cells for each marker, B) Median fluorescent intensity (MFI). The figure shows mean and standard deviation (n = 4).

0.05) between the positive cell percentage nor in the MFI of iDC, mDC and infected mDC (Figure 2a and 2b). In the case of MHC II there were no significant differences ($P > 0.05$) in the percentage of cells between iDC and mDC, but mDC showed a significant increase ($P < 0.05$) in MFI in relation to iDC (Figure 2a and 2b). In infected mDC, a significant decrease ($P < 0.05$) in the percentage of positive cells (25%) and in MFI (approximately 40) was observed. The percentage of cells that express CD80/86 and MFI significantly increased when the maturity of DC was induced (in 50% and 10%, respectively; $P < 0.05$). In infected mDC by PRRS virus, the percentage of positive cells significantly decreased (in 10%; $P < 0.05$), but not for MFI (Figure 2a and 2b).

The PRRS virus decreases the allogeneic proliferation in non-adherent cells

The proliferation of non-adherent cells stimulated by non infected mDC and infected mDC during 24 h was evaluated, to determine the capacity to stimulate allogeneic responses by infected DC. The results of the co-cultures (mDC/non-adherent cells) showed that the PRRS virus produced a 50% decrease ($P < 0.05$) of proliferation in relation to non infected DC (Figure 3).

The infection with PRRS virus modulates the expression of cytokines in mDC

The proinflamatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) and anti-inflammatory cytokine IL-10, production was evaluated, in infected mDC with PRRS virus to determine if this is capable of modulating the production of this type of cytokines. The obtained results show that in the pro-inflammatory cytokines there were no significant decrease in the expression of IL-1β and IL-6 in infected mDC in relation to the control-treated. On the other hand, a non significant increase in the expression of TNF-α in infected DC, in relation to the mock or control treated (Figure 4) was observed. For IL-10 a significant increase ($P < 0.05$) was observed in infected mDC with respect to mock or control treated (Figure 4).

Discussion

The first records on the generation of DC in pig were done in 2001,[3,27] but in the last few years these reports have been growing.[3,27,29-36] The advantage of counting with this methodology opened the possibility of analyzing the interaction of DC with different viruses, such as the PRRS virus, and, through this relationship, understand the immunopathology of the disease.

adquieren una morfología de células alargadas, con proyecciones. Cuando estas células se estimularon durante 48 h con LPS, se observó un cambio en su morfología y muchas se desprendieron. El estímulo con LPS provocó que las células con morfología de DC se desprendieran y se observaran flotando (Figura 1c).

El virus PRRS regula la expresión de ciertos marcadores de superficie en DC

Para confirmar que las características morfológicas descritas corresponden al fenotipo iDC y mDC, se determinó la expresión de la molécula de coestimulación CD80/86 y de la molécula de presentación MHC-II. También se determinó la expresión de las moléculas CD172a y CD14. Adicionalmente, se determinó el efecto del virus PRRS en la expresión de estas moléculas después de 24 h de infección. La expresión de CD172a, un marcador de células mieloides, como se esperaba, se mantuvo constante en iDC, mDC y mDC infectadas (85% de células positivas), con intensidad media de fluorescencia (IMF) de 40. Los resultados obtenidos para la expresión de CD14 muestran que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el porcentaje de células positivas ni en la IMF de las iDC, mDC y mDC infectadas (Figuras 2a y 2b). En el caso del MHC II no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de células entre las iDC y mDC, pero sí un incremento significativo ($P < 0.05$) en el IMF en las mDC respecto de las iDC (Figuras 2a y2b). En las mDC infectadas se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de células positivas (25%) y en el IMF (aproximadamente 40). El porcentaje de células que expresan CD80⁄86 y el IMF aumentó significativamente cuando se indujo la maduración de las DC (en 50% y 10%, respectivamente; $P < 0.05$). En las mDC infectadas con el virus PRRS, el porcentaje de células positivas disminuyó significativamente (en 10%; $P < 0.05$), no así para el IMF (Figuras 2a y 2b).

El virus PRRS disminuye la proliferación alogénica en las células no adherentes

Se evaluó la proliferación de células no adherentes estimuladas con mDC sin infectar y mDC infectadas durante 24 h, para determinar la capacidad de estimular respuestas alogénicas por parte de las DC infectadas. Los resultados de los cocultivos (mDC/células no adherentes) mostraron que el virus PRRS provocó una disminución en 50% ($P < 0.05$) de la proliferación respecto de las DC sin infectar (Figura 3).

it decreases the expression of CD80/86 and MHC II. These results coincide with the low allogeneic stimulation found in T cells. Besides, the PRRS virus affected the production of cytokines, decreasing the mRNA expression of IL-6 and IL-1β ($P > 0.05$), and increasing the expression of TNF-α and IL-10 (only the increase of IL-10 was significant, $P < 0.05$).

At the fifth day of culture, the adherent cells stimulated with IL-4 and GM-CSF, acquired an elongated cell morphology, with similar projections to the ones of the phenotype described for porcine iDC and other species.[10] After the stimulation with LPS, a change in its morphology was observed. The cells detached from the surface and were observed floating. In this case, the LPS effect suggests that the cells have left the immature phenotype and passed to be dendritic mature cells.[38-40] To confirm that the described morphological characteristics correspond to phenotype iDC and mDC, the expression of certain surface markers (CD80/86, MHC II, CD172a and CD14) was determined. These molecules were also evaluated in mDC infected to determine the virus effect in the expression of them. The PRRS virus did not affect the marker expression of CD172a, which was natural since this molecule is expressed in monocytes/macrophages, granulocytes and dendritic cells, and its expression is not modulated by the infection.[41]

In this context, the CD14 is expressed in monocytes and macrophages, although there is controversy in its DC expression, since in DC from human and murine origin, its expression decreases when maturity is induced.[42] While in pig, Foss *et al.*[6] found decrease in the expression of this molecule, Carrasco *et al.*[27] did not observed change in the expression. These differences can be due to the cytokine concentration used in the differentiation, inclusive by the expression system of some of the cytokines, or of the clone of the antibody used. In certain occasions the expression of CD14 in the dendritic cells is kept even after its infection, like in the case of the vesicular stomatitis virus (VSV) and porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV).[27,30] This last coincides with this study, since there were no significant differences ($P \geq 0.05$) between the percentage of positive cells and MFI, of iDC, mDC and infected mDC. Nevertheless, it is necessary to highlight that in this study the percentage of positive cells was very low, approximately 7 % with a MFI of 15. These results could be explained by the way in which maturity of DC was induced, since the expression of CD14 is regulated by the concentration of LPS used to induce maturity. The lower the concentration of LPS used, the lower the expression of CD14 will be, which could explain the low expression of this molecule in generated DC, since the used concentration of LPS was low.[30,38,39]

tran que en las citocinas proinflamatorias hubo una disminución no significativa en la expresión de IL-1-β IL-6 en mDC infectadas respecto de las tratadas con el testigo. Por el contrario, se observó aumento no significativo en la expresión de TNF-α en DC infectadas, respecto de las tratadas con mock o testigo (Figura 4). En la IL-10 se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en las mDC infectadas respecto de las tratadas con el mock o testigo (Figura 4).

Discusión

Los primeros registros sobre la generación de DC en el cerdo se hicieron en 2001,[3,27] pero en los últimos años estos informes han ido en aumento.[3,27,29-36] La ventaja de contar con esta metodología abrió la posibilidad de analizar la interacción de las DC con diferentes virus, como con el virus PRRS, y entender mediante esta relación la inmunopatología de la enfermedad. En estudios previos realizados por este grupo de trabajo, se demostró que las DC son susceptibles al virus PRRS,[37] lo cual concuerda con los trabajos publicados por Charerntantarakul *et al.*,[23] Wang *et al.*[24] y Loving *et al.*[22] Aquí se obtuvieron DC derivadas de monocitos, las cuales se infectaron con el virus PRRS para determinar cómo se alteran sus funciones por efecto del virus. Se encontró que el virus no modifica la expresión de CD14 y CD172a, mientras que disminuye la expresión de CD80/86 y MHC II. Estos resultados coinciden con la baja estimulación alogénica de células T encontrada. Además el virus PRRS afectó la producción de citocinas, disminuyendo la expresión de ARNm de IL-6 e IL-1 ($P > 0.05$), y aumentando la expresión del TNF-α e IL-10 (sólo el aumento de IL-10 fue significativo, $P < 0.05$).

Al quinto día de cultivo, las células adherentes estimuladas con IL-4 y GM-CSF, adquirieron una morfología de células alargadas, con proyecciones similares a las del fenotipo descrito para las iDC en cerdo y otras especies.[10] Después de la estimulación con LPS, se observó cambio en su morfología. Las células se desprendieron de la superficie y se observaron flotando. En este caso, el efecto del LPS supone que las células han dejado el fenotipo inmaduro y pasaron a ser células dendríticas maduras.[38-40] Para confirmar que las características morfológicas descritas corresponden al fenotipo iDC y mDC, se determinó la expresión de ciertos marcadores de superficie (CD80/86, MHC II, CD172a y CD14). Estas moléculas también fueron evaluadas en mDC infectadas para determinar el efecto del virus en la expresión de ellas. El virus PRRS no afectó la expresión del marcador CD172a, lo cual era natural pues esta molécula se expresa en monocitos/macrófagos, granulocitos y células dendríticas, y su expresión no está modulada por la infección.[41]

In the case of MHC II there was no increase in the percentage of positive cells between iDC and mDC, but it was an increase in the MFI between both. The aforementioned suggests that only the stimulation with LPS increases the relative number of this molecule in mDC.[6,13,39] The PRRS virus significantly decreased the percentage of positive cells and MFI. Therefore, it can be said that the virus regulates the expression of MHC II; subsequently, it could evade the immune response, like varicella-zoster or hepatitis C viruses.[16,17] Similar results have been described by Wang *et al.*[24] in the expression of MHC II using PRRS virus at a moi of 1.

In the case of CD80/86, the percentage of cells increased when maturity was induced, in a similar way as of previous works,[2,6,13,27] while the PRRS virus significantly decreased the percentage of cells which express these molecules. This low expression of presenting and co-stimulatory molecules is reflected in the low capacity of the infected mDC to promote lymphocyte proliferation, since this significantly decreased ($P < 0.05$) in relation to co-cultures where non-infected treated DC were used. Similar responses are observed with viruses such as varicella zoster, herpes simplex, or hepatitis type C viruses.[43,44]

The aforementioned coincides with Loving *et al.*[22] data, except they used poly IC-treated DC treated instead of non-infected DC. On the other hand, the results of proliferation of this study differ to the ones published by Wang *et al.*,[24] since they did not find significant differences between infected an non-infected DC. These discrepancies may be due to the virus strain used, the concentration of the virus, and the time of infection of DC. In base of the last, it can be said that the PRRS virus causes that DC are not capable of presenting antigens and correctly co-stimulate T lymphocytes, being this a way to modulate the immune response. To sustain this hypothesis, the capacity of the infected DC to stimulate allogeneic response was analyzed. The results indicate that the lymphocyte proliferation decreases when infected mDC are stimulated, as a result of the low expression of MHC and co-stimulatory molecules that PRRS virus induces, which coincides with the reports by Wang *et al.*[24] but differs with the published by Loving *et al.*,[22] who did not find changes in the proliferation among infected cells. They utilized DC isolated from lung, which are not infected by the PRRS virus, that could explain, in part, that they did not find decrease in the expression of these molecules or in the proliferation.

An important part of dendritic cell function is the production of cytokines to induce T lymphocyte differentiation. When DC synthesize IL-12 and express CD80/86 molecules, they promote the differentiation of Th1 cells. On the contrary, if DC synthesize IL-10 and express levels of CD80/86, the differentiation of

En este contexto, el CD14 es expresado en monocitos y macrófagos, aunque existe controversia en su expresión en DC, pues en las DC de origen humano y murino, disminuye su expresión cuando se induce su maduración.[42] Mientras que en el cerdo Foss *et al.*[6] encontraron disminución en la expresión de esta molécula, Carrasco *et al.*[27] no observaron cambio en la expresión. Estas diferencias pueden deberse a la concentración de citocina utilizada en la diferenciación, incluso por el sistema de expresión de alguna de las citocinas, o de la clona del anticuerpo utilizado. En ciertas ocasiones la expresión del CD14 en las células dendríticas se mantiene incluso después de su infección, como en el caso del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGFV).[27,30] Esto último coincide con lo encontrado aquí, ya que no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre el porcentaje de células positivas y en el IMF, de las iDC, mDC y mDC infectadas. Sin embargo, es necesario resaltar que en este estudio el porcentaje de células positivas fue muy bajo, alrededor de 7%, con un IMF de 15. Estos resultados se podrían explicar por la manera en que se indujo la maduración de las DC, ya que la expresión de CD14 está regulada por la concentración de LPS utilizada para inducir la maduración. Entre más baja sea la concentración de LPS, disminuye la expresión de CD14, lo que podría explicar la baja expresión de esta molécula en las DC generadas, ya que la concentración de LPS utilizada fue baja.[30,38,39]

En el caso del MHC II no hubo aumento en el porcentaje de células positivas entre las iDC y mDC, pero sí en el IMF entre ambas. Lo anterior sugiere que sólo la estimulación con LPS aumenta el número relativo de esta molécula en las mDC.[6,13,39] El virus PRRS disminuyó significativamente el porcentaje de células positivas y el IMF. Por ello se puede suponer que el virus regula la expresión del MHC II y así podría evadir la respuesta inmune, como el virus de la varicela zoster o el de la hepatitis C.[16,17] Resultados similares han sido descritos por Wang *et al.*[24] en la expresión del MHC II utilizando el virus PRRS a un moi de 1.

En el caso del CD80⁄86, el porcentaje de células aumentó al inducir la maduración, de forma similar a trabajos previos.[2,6,13,27] Mientras que el virus PRRS disminuyó significativamente el porcentaje de células que expresan estas moléculas. Esta expresión baja de moléculas de presentación y coestimulación se refleja en la baja capacidad de las mDC infectadas para promover la proliferación de linfocitos, pues ésta disminuyó significativamente ($P < 0.05$) respecto de los cocultivos donde se utilizaron DC tratadas no infectadas. Respuestas similares se observan con virus como el de la varicela zoster, herpes simple, o virus de la hepatitis tipo C.[43,44]

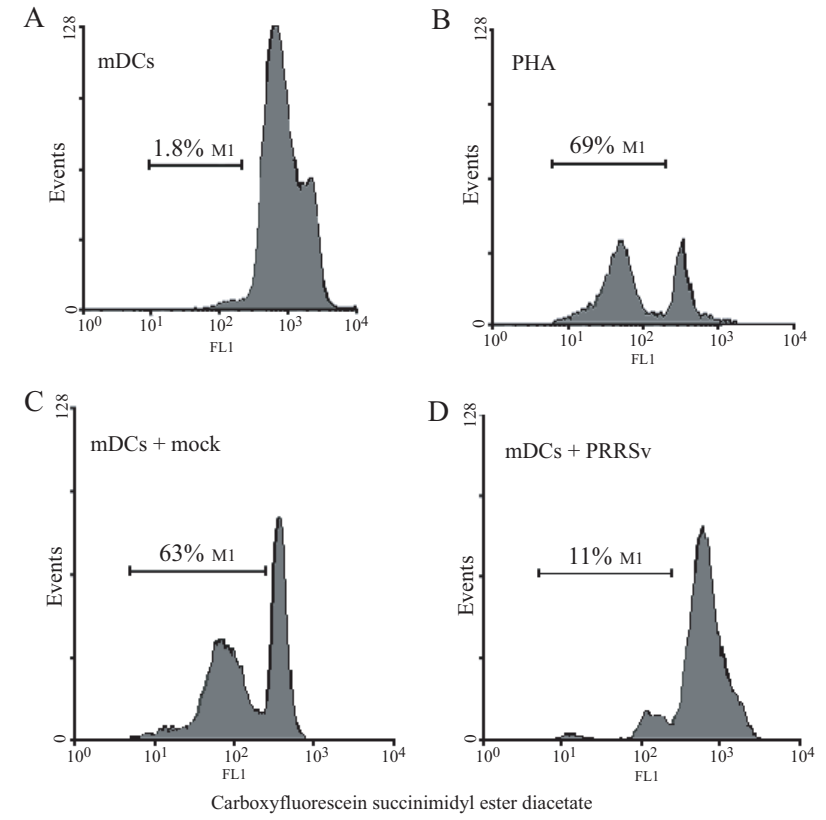

Figura 3: Respuesta alogénica de células T. Proliferación de células T estimulada durante cinco días y evaluada mediante CFSE, a una relación DC: linfocitos de 1:10. El porcentaje de proliferación fue determinado para los siguientes estímulos: A) sólo mDC, B) PHA, C) mDC tratadas con el mock o testigo, D) mDC infectadas con el virus PRRS. Experimento representativo de tres realizados, $P \leq 0.05$

Figure 3: Allogeneic T cells response. Proliferation of T cells stimulated during five days and evaluated by means of CFSE, to a 1:10 DC:lymphocytes ratio. The percentage of proliferation was determined for the following stimuli: A) only mDC, B) PHA, C) mock- or control-treated mDC, D) PRRS virus-infected mDC. A representative experiment of three performed, $P \leq 0.05$ is shown.

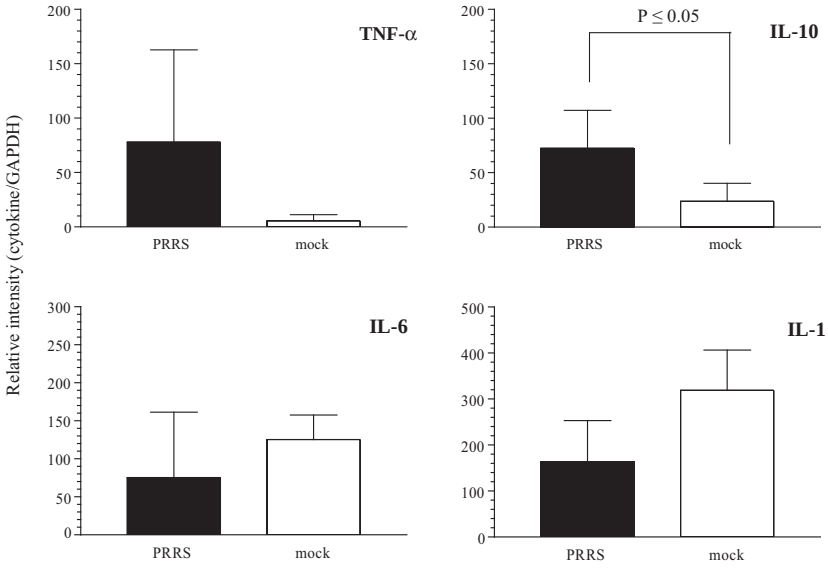

Figura 4: Expresión de las citocinas TNF-α, IL-10, IL-6 e IL-1 en mDC infectadas con el virus PRRS a un moi de 0.1 y tratadas con mock o testigo. Los resultados se expresan como intensidad relativa en base a la relación citocina/GADPH. Se muestra la media y desviación estándar (n = 4).

Figure 4: TNF-α, IL-10, IL-6 and IL-1 cytokines expression in PRRS virus-infected mDC with at a moi of 0.1 and mock- or control-treated. Results are expressed as relative intensity based to the cytokine/GADPH ratio. Mean and standard deviation are shown (n = 4).

In previous studies it was demonstrated that the DC are susceptible to PRRS virus,[37] which agrees with the studies published by Charerntantanakul *et al.*,[23] Wang *et al.*[24] and Loving *et al.*[22] DC were obtained here from monocytes, which were infected with PRRS virus to determine how their functions are altered by the effect of the virus. It was found that the virus does not modify the expression of CD14 and CD172a, while

La infección con el virus PRRS modula la expresión de citocinas en mDC

Se evaluó la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF-α) y la citocina anti-inflamatoria IL-10, en mDC infectadas con el virus PRRS para determinar si éste es capaz de modular la producción de este tipo de citocinas. Los resultados obtenidos mues-

Th2 cells will be stimulated. The low expression of CD80/86, synthesis of IL-10 and TGF-β, will induce the generation of regulatory T lymphocytes (Treg).[45] In this study, the pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF-α) and anti-inflammatory cytokine IL-10 in infected mCD production was evaluated to determine if the virus is capable of modulating the cytokine production. A significant increase ($P < 0.05$) was observed in the transcript expression of IL–10 in infected mDC in relation to control-treated (non-infected control). The aforementioned coincides with the results found by this work group for mDC, where only these and not iDC, are capable of producing IL-10.[46]

A non-significant decrease of the inflammatory cytokines IL-1 and IL-6 was observed, while the expression TNF-α had a non-significant increase. These results coincide with those from Wang *et al.*,[24] who described increase in the production of TNF-α; nevertheless, they do not detect increment in the expression of IL-10. These differences could be due to the fact that they used ELISA to determine IL-10, and in the present study it was analyzed through conventional RT-PCR. Likewise, Charerntantanakul *et al.*[23] did not find increase in the expression of IL-10, only when they used monocytes/lymphocytes co-cultures; however, in this case it is not possible to discriminate between monocytes and lymphocytes as a source of IL-10.

The IL-10 is a cytokine capable to modulate DC response against viruses because it inhibits the production of IL-12,[47] and thus it can compromise the differentiation of lymphocytes to Th1, essential for antiviral response.[48] Also, IL-10 produced by DC during the activation and differentiation of lymphocytes, generates Treg cells, inhibiting with this the immune response.[45] IL-10 also regulates the expression of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF-α, affecting the inflammatory resoponse.[23] It decreases the expression of co-stimulatory molecules and MHC, inducing a decrease in presenting antigens and a null immune response.[43] According to the high levels of IL-10 transcripts found in infected mDC, it is possible that by this mechanism the PRRS virus ablates the immune response and be an evasion mechanism. The aforementioned could help to explain the immunopathology of the disease, since by modulating the DC response, by high levels of IL-10, combined with the low expression of presenting and co-stimulatory molecules, the PRRS virus would be modulating, in part, the immune response against itself.

In conclusion, this work shows that the PRRS virus modulates the expression of CD80/86 and MHC II, and decreases the proliferation in non-adherent cells. In relation to mDC function, the PRRS virus increased the mRNA expression of IL-10 in infected mDC.

Lo anterior concuerda con los datos de Loving *et al.*,[22] sólo que ellos usaron DC tratadas con PolyIC en lugar de DC no infectadas. Por otra parte, nuestros resultados de proliferación difieren de los publicados por Wang *et al.*,[24] ya que no encontraron diferencias significativas entre DC no infectadas e infectadas. Estas discrepancias se pueden deber a la cepa del virus utilizado, la concentración de éste y el tiempo de infección de las DC. Con base en lo anterior, se puede suponer que el virus PRRS provoca que las DC no sean capaces de presentar antígenos y coestimular correctamente a los linfocitos T, siendo ésta una vía para modular la respuesta inmune. Para apoyar esta hipótesis, se analizó la capacidad de las DC infectadas para estimular respuestas alogénicas. Los resultados indican que la proliferación de linfocitos disminuye cuando se estimulan mDC infectadas, como resultado de la baja expresión de moléculas de MHC y coestimulación que induce el virus PRRS, que concuerda con lo notificado por Wang *et al.*[24] pero difiere de lo publicado por Loving*et al.*,[22] quienes no encontraron cambios en la proliferación entre células infectadas. Ellos utilizaron DC aisladas de pulmón, que no son infectadas por el virus PRRS, lo cual podría explicar, en parte, que no encuentren disminución en la expresión de estas moléculas ni en la proliferación.

Una parte importante de la función de las células dendríticas es la producción de citocinas para inducir la diferenciación de los linfocitos T. Cuando las DC sintetizan IL-12 y expresan moléculas CD80/86, promueven la diferenciación de células Th1. Por el contrario, si las DC sintetizan IL-10 y expresan bajos niveles de CD80/86, se estimulará la diferenciación de células Th2. La baja expresión de CD80/86, síntesis de IL-10 y TGF-β, inducirá la generación de linfocitos T reguladores (Treg).[45] En este estudio se evaluó la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-α) y la citocina antiinflamatoria IL-10 en mDC infectadas para determinar si el virus es capaz de modular la producción de citocinas. Se observó aumento significativo ($P < 0.05$) en la expresión de transcritos de IL-10 en mDC infectadas respecto de las tratadas con el testigo (testigo sin infectar). Lo anterior concuerda con los resultados encontrados por este grupo de trabajo para mDC, en donde sólo éstas y no iDC, son capaces de producir IL-10.[46]

Respecto de los resultados de las citocinas inflamatorias IL-1 e IL-6, se observó disminución no significativa para ambas citocinas, mientras que en la expresión de TNF-α se observó aumento no significativo. Estos resultados concuerdan parcialmente con Wang *et al.*,[24] quienes describen aumento en la producción de TNF-α; sin embargo, no detectan incremento en la expresión de IL-10. Estas diferencias se podrían deber a que ellos utilizaron ELISA para determinar

Acknowledgements

This work was supported by Fondos Sectoriales SEP-Conacyt (Project 43602) and by USDANRICGP (Project 005-01810). Lilian Flores Mendoza and Erika Silva Campa were scholars of Conacyt.

Referencias

1. BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392:245-252.
2. MAKALA LH, NAGASAWA H. Dendritic cells: a specialized complex system of antigen presenting cells. J Vet Med Sci 2002;64:181-193.
3. PAILLOT R, LAVAL F, AUDONNET J, ANDREONI C, JUILLARD V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. Immunology 2001;102:396-404.
4. RANDOLPH GJ, ANGELI V, SWARTZ MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. Nat Rev Immunol 2005;5:617-628.
5. GUERMONPREZ P, VALLADEAU J, ZITVOGEL L, THERY C, AMIGORENA S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 2002;20:621-667.
6. FOSS DL, BENNAARS AM, PENNELL CA, MOODY MD, MURTAUGH MP. Differentiation of porcine dendritic cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed in Pichia pastoris. Vet Immunol Immunopathol 2003;91:205-215.
7. HACKSTEIN H, THOMSON AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. Nat Rev Immunol 2004;4:24-34.
8. BANCHEREAU J, PALUCKA AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol 2005;5:296-306.
9. DEGLI-ESPOSTI MA, SMYTH MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nat Rev Immunol 2005;5:112-124.
10. QI H, EGEN JG, HUANG AY, GERMAIN RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. Science 2006;312:1672-1676.
11. KOKA R, BURKETT P, CHIEN M, CHAI S, BOONE DL, MA A. Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells. J Immunol 2004;173:3594-3598.
12. LUDWIG IS, GEIJTENBEEK TB, VAN KOOYK Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. Curr Opin Pharmacol 2006;6:408-414.
13. JOHANSSON E, DOMEIKA K, BERG M, ALM GV, FOSSUM C. Characterization of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile. Vet Immunol Immunopathol 2003;91:183-197.
14. THURNHER M, ZELLE-RIESER C, RAMONER R, BARTSCH G, HOLTL L. The disabled dendritic cell. Faseb J 2001;15:1054-1061.
15. POLLARA G, KWAN A, NEWTON PJ, HANDLEY ME, CHAIN BM, KATZ DR. Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? Int J Exp Pathol 2005;86:187-204.
16. KLAGGE IM, TER MEULEN V, SCHNEIDER-SCHAULIES S. Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. Eur J Immunol 2000;30:2741-2750.
17. SALIO M, CELLA M, SUTER M, LANZAVECCHIA A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. Eur J Immunol 1999;29:3245-3253.
18. HO LJ, WANG JJ, SHAIO MF, KAO CL, CHANG DM,

la IL-10, y en el presente trabajo se analizó a través de RT-PCR convencional. Asimismo, Charerntantanakul *et al.*[23] no encontraron aumento en la expresión de IL-10, sólo cuando utilizaron cocultivos de monocitos/linfocitos; sin embargo, en este caso no es posible discriminar entre monocitos y linfocitos como fuente de la IL-10.

La IL-10 es una citocina capaz de modular la respuesta de las DC contra virus debido a que inhibe a la producción de IL-12,[47] y así puede comprometer la diferenciación de linfocitos a Th 1, esenciales en una respuesta antiviral.[48] Además, la IL-10 producida por las DC durante la activación y diferenciación de los linfocitos, genera células Treg, inhibiendo con esto la respuesta inmune.[45] La IL-10 también regula la expresión de las citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF-α, afectando la respuesta inflamatoria.[23] Disminuye la expresión de moléculas de coestimulación y MHC, induciendo disminución en la presentación de antígenos y una nula respuesta inmune.[43] De acuerdo con los altos niveles de transcritos de IL-10 encontrados en mDC infectadas, es posible que por este mecanismo el virus PRRS suprima la respuesta inmune y sea un mecanismo de evasión. Lo anterior podría ayudar a explicar la inmunopatología de la enfermedad, pues al modular la respuesta de DC, mediante altos niveles de IL-10, combinados con la baja expresión de moléculas de presentación y coestimulación, el virus PRRS estaría modulando, en parte, la respuesta inmune contra sí mismo.

En conclusión, este trabajo muestra que el virus PRRS modula la expresión del CD80/86 y el MHC II, y disminuye la proliferación en las células no adherentes. En cuanto a la función de las mDC, el virus PRRS aumentó la expresión del ARNm de IL-10 en mDC infectadas.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por los Fondos Sectoriales SEP-Conacyt (Proyecto 43602) y por USDANRICGP (Proyecto 005-01810). Lilian Flores Mendoza y Erika Silva Campa fueron becarias del Conacyt, de México.

HAN SW *et al.* Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. J Immunol 2001;166:1499-1506.
19. LAMONTAGNE L, PAGE C, LAROCHELLE R, LONG-TIN D, MAGAR R. Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. Vet Immunol Immunopathol 2001;82:165-182.
20. VAN REETH K, NAUWYNCK H, PENSAERT M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2001;48:283-292.
21. WILLS RW, DOSTER AR, GALEOTA JA, SUR JH, OSORIO FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Clin Microbiol 2003;41:58-62.
22. LOVING CL, BROCKMEIER SL, MA W, RICHT JA, SACCO RE. Innate cytokine responses in porcine macrophage populations: evidence for differential recognition of double-stranded RNA. J Immunol 2006;177:8432-8439.
23. CHARERNTANTANAKUL W, PLATT R, ROTH JA. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. Viral Immunol 2006;19:646-661.
24. WANG X, EATON M, MAYER M, LI H, HE D, NELSON E *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. Arch Virol 2007;152:289-303.
25. ALLENDE R, LEWIS TL, LU Z, ROCK DL, KUTISH GF, ALI A *et al.* North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol 1999;80 (Pt 2):307-315.
26. HERNANDEZ J, GARFIAS Y, NIETO A, MERCADO C, MONTANO LF, ZENTENO E. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. Vet Immunol Immunopathol 2001;79:249-259.
27. CARRASCO CP, RIGDEN RC, SCHAFFNER R, GERBER H, NEUHAUS V, INUMARU S *et al.* Porcine dendritic cells generated *in vitro*: morphological, phenotypic and functional properties. Immunology 2001;104:175-184.
28. HERNANDEZ J, REYES-LEYVA J, ZENTENO R, RAMIREZ H, HERNANDEZ-JAUREGUI P, ZENTENO E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. Vet Immunol Immunopathol 1998;64:367-381.
29. MIRANDA DE CARVALHO C, BONNEFONT-REBEIX C, RIGAL D, CHABANNE L. Dendritic cells in different animal species: an overview. Pathol Biol (Paris) 2006;54:85-93.
30. CARRASCO CP, RIGDEN RC, VINCENT IE, BALMELLI C, CEPPI M, BAUHOFER O *et al.* Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. J Gen Virol 2004;85:1633-1641.
31. GUZYLACK-PIRIOU L, PIERSMA S, MCCULLOUGH K, SUMMERFIELD A. Role of natural interferon-producing cells and T lymphocytes in porcine monocyte-derived dendritic cell maturation. Immunology 2006;118:78-87.
32. RAYMOND CR, WILKIE BN. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. Vet Immunol Immunopathol 2005;107:235-247.
33. SUMMERFIELD A, HORN MP, LOZANO G, CARRASCO CP, ATZE K, MCCULLOUGH K. C-kit positive porcine bone marrow progenitor cells identified and enriched using recombinant stem cell factor. J Immunol Methods 2003;280:113-123.
34. VINCENT IE, CARRASCO CP, GUZYLACK-PIRIOU L, HERRMANN B, MCNEILLY F, ALLAN GM *et al.* Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. Immunology 2005;115:388-398.
35. CEPPI M, DE BRUIN MG, SEUBERLICH T, BALMELLI C, PASCOLO S, RUGGLI N *et al.* Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells. J Gen Virol 2005;86:2525-2534.
36. VINCENT IE, CARRASCO CP, HERRMANN B, MEEHAN BM, ALLAN GM, SUMMERFIELD A *et al.* Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. J Virol 2003;77:13288-13300.
37. FLORES-MENDOZA L. Respuesta de células dendríticas infectadas con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (tesis de maestría). Hermosillo (Sonora) México: CIAD, A.C., 2007.
38. FELNEROVA D, KUDELA P, BIZIK J, HASLBERGER A, HENSEL A, SAALMULLER A *et al.* T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts. Med Sci Monit 2004;10:BR362-370.
39. VERHASSELT V, BUELENS C, WILLEMS F, DE GROOTE D, HAEFFNER-CAVAILLON N, GOLDMAN M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. J Immunol 1997;158:2919-2925.
40. KURT-JONES EA, POPOVA L, KWINN L, HAYNES LM, JONES LP, TRIPP RA *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol 2000;1:398-401.
41. BIMCZOK D, SOWA EN, FABER-ZUSCHRATTER H, PABST R, ROTHKÖTTER HJ. Site-specific expression of CD11b and SIRP (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. Eur J Immunol 2005;35 :1418–1427.
42. DEVITT A, MOFFATT OD, RAYKUNDALIA C, CAPRA JD, SIMMONS DL, GREGORY CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. Nature 1998;392:505-509.

43. MORROW G, SLOBEDMAN B, CUNNINGHAM AL, ABENDROTH A. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. J Virol 2003;77:4950-4959.
44. SAROBE P, LASARTE JJ, ZABALETA A, ARRIBILLAGA L, ARINA A, MELERO I *et al.* Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit *in vivo* induction of cellular immune responses. J Virol 2003;77:10862-10871.
45. KAPSENBERG ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol 2003;3:984-993.
46. FLORES-MENDOZA, L, SILVA-CAMPA E, RESENDIZ M, OSORIO FA, HERNANDEZ J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. Clin Vaccine Immunol 2008; 4:720-725.
47. XIA CQ, KAO KJ. Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. Scand J Immunol 2003;58:23-32.
48. MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001;19:683-765.