

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Respuesta innata de las células dendríticas DEC205⁺ contra el virus
del síndrome reproductivo y respiratorio porcino



Presenta

Lucinda del Carmen Puebla Clark

Hermosillo, Sonora

Junio de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

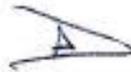


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **M. C. Lucinda del Puebla Clark**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Atentamente:



Dr. Jesús Hernández López
Director Académico



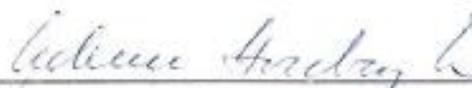
Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Secretario



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella
Sinodal



Dra. Erika Silva Campa
Sinodal



Dra. Adriana Garibay Escobar
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar el financiamiento al proyecto 222973 con el cual se realizó el presente trabajo de investigación.

A la Universidad de Sonora por permitir mi desarrollo académico en el Posgrado en Ciencias de la Salud.

Al Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme llevar a cabo mi trabajo experimental en sus instalaciones.

Al Dr. Jesús Hernández y la Dra. Olivia Valenzuela, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y su asesoría durante todo este tiempo.

A los miembros del comité sinodal Dr. Alexel Burgara Estrella, la Dra. Erika Silva Campa y la Dra. Adriana Garibay Escobar, por sus valiosas observaciones y consejos durante toda esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Barcelona, el Dr. Enric Mateu y la Dra. Yanli Li, por permitirme realizar una estancia de investigación y entrenarme en diferentes técnicas.

A la M. en C. Mónica Guadalupe Reséndiz Sandoval por su apoyo en la realización de técnicas de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Héctor, Lorena, Edgar y Majó por su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A Glenda, Mariela y Lulú, su apoyo y amistad son invaluable. Juan, Isaac, Efraín, Alex, Sandybell, Nataly y Lily, tener colegas por amigos es de las mejores experiencias del posgrado.

Esta tesis se llevó a cabo bajo la codirección de la Dra. Olivia Valenzuela Antelo de la Universidad de Sonora y el Dr. Jesús Hernández López del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Esta tesis se realizó con el financiamiento del proyecto aprobado por CONACyT a través del fondo de Ciencia Básica No. 222973 e INFRA-2015-01-254826.

DEDICATORIA

A mis padres Lucinda y Rafael, quienes son el pilar de mi vida, este triunfo es de ustedes.

A mis hermanos Rafael, Miguel y Jorge, no sé qué haría sin ustedes.

A mis cuñadas Verónica, Georgina, Carolina y Yadira, quienes me han permitido el gran honor de ser tía de las mejores 7 personitas que hay en el mundo.

A Amelia Clark Rivera, todo un ejemplo de cariño y entereza.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS	x
General	x
Específicos	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
Respuesta Inmune	3
Células Dendríticas: Origen	4
Células Dendríticas: Clasificación en Cerdo	6
DEC205: Receptor de Lectina Tipo C en Células Dendríticas	8
Células Dendríticas y su Respuesta a Virus	9
Respuesta Inmune al Virus PRRS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Animales	16
Virus e Infección	16
Aislamiento de DCs de Tejidos	16
Caracterización Fenotípica por Citometría de Flujo y Purificación (Sorting)	18
Extracción de ARN y PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR)	20
Análisis Estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Caracterización de cDCs, cDC1 y cDC2 de Tejido Linfático de Cerdo	23
Distribución de cDCs, cDC1 y cDC2 en Tejido Linfático Porcino	27
Expresión de DEC205 en cDCs, cDC1 y cDC2	29
Las cDCs de Tonsila de Animales Infectados son Negativas al PRRSV	30
PRRSV no Afecta el Número de cDCs en Tonsila	33
Las cDCs de Tonsila Expresan IL-12 en Respuesta a PRRSV	33

CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40
APÉNDICES	49

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Secuencias de Iniciadores para PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa	22
---------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fenotipo de las cDCs, cDC1 y cDC2 de tejido linfático porcino	24
Figura 2	Expresión de transcritos característicos de las cDCs	26
Figura 3	Distribución de las cDCs, cDC1 y cDC2 en diferentes tejidos linfáticos.	28
Figura 4	Expresión del receptor DEC205 en cDC, y las poblaciones de cDC1 y cDC2 en tejido linfoide	31
Figura 5	Fenotipo y expresión del FLT3 en cDCs DEC205 ⁺ de tonsila de cerdo	32
Figura 6	Evaluación de infección por PRRSV en DCs, células CD163 ⁺ de tonsila y PAMs	35
Figura 7	Frecuencia de células CD163 ⁺ , MHCII ⁺ CADM1 ^{high} , cDCs DEC205 ⁺ , células DEC205 ⁻ de tonsila y PAMs	36
Figura 8	Expresión de citocinas en células CD163 ⁺ , cDCs DEC205 ⁺ , células DEC205 ⁻ de tonsila de cerdos infectados y no infectados con PRRSV	37

OBJETIVOS

General

Analizar la participación de las células dendríticas DEC205⁺ de cerdo en respuesta al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

Específicos

1. Caracterizar fenotípicamente a las cDCs DEC205⁺ en tonsila de cerdo.
2. Evaluar la susceptibilidad de las cDCs al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
3. Evaluar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-12 e IFN- α y anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β de las cDCs DEC205⁺ contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

RESUMEN

Las células dendríticas convencionales o clásicas (cDCs) se dividen en dos subtipos: cDC1 y cDC2. Las cDC1 se caracterizan por estimular respuestas del tipo Th1, mientras que las cDC2 promueven las respuestas del tipo Th2 y Th17. Debido a su importancia como puente de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa, las cDCs han sido caracterizadas en distintos tejidos de distintas especies, mas no en tejidos linfáticos de cerdo. Una de las formas de clasificar a estas células es por medio de la expresión de receptores, un receptor muy importante es el DEC205 pertenece a la familia de lectina tipo C. Este receptor se caracteriza por estimular la presentación cruzada y la respuesta del tipo citotóxica, la cual es muy importante en la inmunidad contra virus. Un virus muy importante en la industria porcina es del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) el cual afecta algunas funciones de las DCs generadas *in vitro* y macrófagos tisulares, lo que ha supuesto una forma que utiliza el PRRSV para evadir el sistema inmune. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de las células dendríticas DEC205⁺ de cerdo en la respuesta PRRSV. Para conseguirlo primeramente se caracterizaron, por medio de citometría de flujo, a las cDCs, cDC1 y cDC2 de tejidos linfáticos porcino El fenotipo se confirmó por la expresión de ARNm de FLT3 y se demostró que las cDCs que expresan DEC205 son las células *bona fide*. Se evaluó la susceptibilidad de estas células a la infección de PRRSV y nuestros resultados indican que en un modelo *in vivo* las cDCs de tonsila no son infectadas por este virus, pero sí responden al virus con un incremento en la expresión de IL-12 a los 5 días post-infección. En conclusión, es recomendable utilizar el DEC205 para seleccionar de forma correcta las cDCs de tejido linfático porcino. Por otro lado, a pesar de que estas células no son infectadas por PRRSV, son capaces de responder frente al virus.

INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) tienen la habilidad de capturar y procesar antígenos, y migrar a tejidos linfoides para estimular la respuesta inmune adaptativa. Se distinguen de otras células presentadoras de antígeno por que producen IL-12 y estimulan linfocitos T naive *in vivo* (Steinman and Witmer, 1978, Steinman and Hemmi, 2006)

Las DCs clásicas o convencionales (cDCs) se dividen en dos subtipos: cDC1 y cDC2. Las cDC1 son capaces de estimular la respuesta adaptativa del tipo Th1, mientras que las cDC2 activan la respuesta Th2 y Th17 (Schlitzer and Ginhoux, 2014, Schlitzer et al., 2015). El DEC205 es un receptor que aumenta la capacidad de presentar antígenos así como la presentación cruzada de las cDCs en ratón (Macri et al., 2016). Las subpoblaciones de cDCs de cerdo se han caracterizado en varios tejidos y mantienen, en términos generales, el mismo fenotipo. Las cDC1 se han definido con el fenotipo FLT3⁺CADM1⁺MHCII⁺CD172a^{-low} y las cDC2 como FLT3⁺CADM1⁺MHCII⁺CD172a⁺ (Parra-Sánchez et al., 2018, Reséndiz et al., 2018, Auray et al., 2016, Maisonnasse et al., 2015). En tonsila y sangre de cerdo, se reportó que las cDCs expresan el receptor DEC205 (Puebla-Clark et al., 2019, Auray et al., 2016), lo cual sugiere que se puede utilizar para identificar cDCs en porcinos.

La presencia de DCs en la piel, sangre y en mucosas les permite estar en contacto con agentes patógenos invasores, como los virus (Klagge and Schneider-Schaulies, 1999). Las DCs reconocen antígenos como los virus, por medio de sus receptores específicos, los cuales les permiten iniciar la respuesta anti-viral activando a linfocitos T y B (Silvin et al., 2017). Por otro lado, existen algunos virus que pueden evadir la respuesta inmune, ya sea provocando apoptosis o modulando la expresión de factores de transcripción necesarios para la respuesta como TYROBP que es un activador de NF-κB y PIK3C2A que está involucrado en la proliferación y migración celular (Lunney et al., 2016). Un ejemplo de virus capaces de modular la respuesta inmune es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) (Lunney et al., 2016, Rodriguez-Gomez et al., 2013). La

mayoría de los estudios sobre la respuesta de PRRSV en DC se han realizado en DCs derivadas de monocitos (moDCs) (Flores-Mendoza et al., 2008, Silva-Campa et al., 2010, Wang et al., 2007). Considerando la importancia de las cDCs, en el presente estudio se estableció la caracterización de las cDCs en tejidos linfáticos demostrando que es recomendable utilizar el receptor DEC205 dentro del panel de anticuerpos para identificar a estas células. A su vez se estableció que en una infección experimental con el PRRSV, las cDCs no son infectadas, pero presentan un incremento en la expresión de IL-12 a los 5dpi indicando que responden a la presencia del virus.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Respuesta Inmune

El sistema inmune ha evolucionado para reconocer y contener la agresión de agentes infecciosos. La mayoría de las infecciones en un organismo ocurren al ingresar agentes patógenos al huésped por las mucosas, mientras que otros lo hacen a través de la piel utilizando insectos como vectores o ingresan a la dermis a través de una herida superficial (Iwasaki, 2007). Los seres vivos nos encontramos en contacto con una amplia gama de agentes patógenos, si estos invaden al organismo el sistema inmune desencadena una serie de reacciones para contener y neutralizar al patógeno para preservar la homeostasis del huésped (Dress et al., 2018, Iwasaki, 2007).

La primera fase de la respuesta inmune es conocida como innata, la cual consiste en una serie de defensas pre-existentes de rápida acción. Algunas células que participan en la respuesta innata son los neutrófilos, mastocitos, las células asesinas naturales (NK) y las células presentadoras de antígeno (APCs) como macrófagos (MØs) y DCs. Todas estas células expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores tipo Toll (TLRs, que van del 1 al 9), los de lectina tipo C (CLR) y los “scavenger” o basureros. Estos receptores reconocen las distintas moléculas microbianas que son conservadas y compartidas entre diferentes clases de patógenos, las cuales se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento de estos patrones da como resultado la liberación o activación de numerosas moléculas efectoras como citocinas, defensinas, así como los componentes de la cascada del complemento, entre otras, que ayudan a la activación de la siguiente fase de la respuesta inmune. Las DCs fagocitan proteínas microbianas y las procesan en pequeñas cadenas peptídicas llamadas péptidos, los cuales son presentados en la superficie celular asociadas a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Kapsenberg, 2003, Oppenheim et al., 2003, Applequist et al., 2002).

La siguiente fase de la respuesta inmune es la adaptativa, la cual se lleva a cabo en los nódulos linfáticos con la presentación un péptido unido al MHC específico para el linfocito T, lo que induce su diferenciación y proliferación (Terrazas et al., 2010, Oppenheim et al., 2003). En este proceso ocurre la pérdida de los receptores encargados de la fagocitosis y endocitosis, así como el cambio en la expresión del receptor de quimiocina (por ejemplo, de CCR6 a CCR7) para promover la migración de las DCs a los tejidos linfoides. También aumenta la producción de moléculas coestimuladoras y la extensión de dendritas aumentando la superficie de contacto para su interacción con las células T (Kelsall and Leon, 2005, Kapsenberg, 2003).

Células Dendríticas: Origen

La ontogenia y desarrollo del sistema inmune del cerdo ha sido muy poco estudiada (Sinkora et al., 2002, Sinkora and Butler, 2009, Fairbairn et al., 2011, Wu et al., 1999) y la información que tenemos hoy en día se basa en los experimentos hechos principalmente en ratón y en menor medida en el humano (Merad et al., 2013, Breton et al., 2015, Balan et al., 2018, Takeuchi and Furue, 2007, Ardavín, 2003, Dakic et al., 2004). La hematopoyesis en el cerdo se da en tres etapas: primeramente, en el saco vitelino donde se desarrollan las células madre, las cuales migran al hígado como parte de la segunda etapa, y finaliza en la médula ósea. Las células del sistema inmune innato del cerdo, como las DCs y MØs, aparecen juntas con la actividad hematopoyética de la médula ósea (Sinkora and Butler, 2009). Es por ello que a las DCs se les puede definir como leucocitos derivados de médula ósea necesarios en el desarrollo de la inmunidad (Rossi and Young, 2005). Las DCs fueron descubiertas en el bazo de ratón por su forma estrellada y su capacidad de adherencia a superficies de vidrio (Steinman and Cohn, 1973); posteriormente su gran capacidad de activar linfocitos T vírgenes las distinguió de otras células fagocíticas, como los MØs (Steinman and Witmer, 1978). Las DCs son de vida corta (3-9 días) (Kamath et al., 2002), por lo que su presencia en el organismo depende de

los progenitores de médula ósea, específicamente, las células madre hematopoyéticas (HSCs). En el modelo clásico, las DCs se desarrollan de progenitores bi-potenciales, o los llamados progenitores de MØs y DCs (MDPs); de estos surgen las células precursoras de DCs (CDPs) las cuales están comprometidas a la generación de DCs plasmocitoides (pDCs) y DCs clásicas o convencionales (cDCs) (Poltorak and Schraml, 2015, Schlitzer et al., 2015).

Las pDCs se desarrollan completamente en la médula ósea y después llegan a los distintos tejidos por medio del torrente sanguíneo; mientras que las cDCs surgen de otro intermediario llamado pre-cDC, éste migra de la médula ósea a través del torrente sanguíneo para ingresar a los tejidos y terminar su desarrollo (Poltorak and Schraml, 2015). En la actualidad se sabe que existen dos subtipos de cDCs: cDC1 y cDC2. Este descubrimiento ha llevado a la búsqueda del desarrollo ontogénico de estos subtipos. Si bien se creía que ambos surgían de la misma pre-cDC, se ha descubierto que existe otra precursora en la etapa intermedia del desarrollo de estas células: pre-cDC1 y pre-cDC2 (Schlitzer et al., 2015, Schultze and Aschenbrenner, 2019).

La generación de DCs depende del factor de crecimiento FLT3L (ligando de tirosina cinasa 3 tipo síndrome de fibromialgia o FMS) y su receptor (CD135); durante el desarrollo mielóide, más de la mitad de los progenitores mieloides comunes (CMPs) expresan FLT3 (Karsunky et al., 2003). La expresión de FLT3 también se puede encontrar en las células progenitoras linfoides comunes (CLPs), de las cuales también pueden desarrollarse las pDCs. Sin embargo en los linfocitos B y T maduros, en granulocitos, monocitos y MØs, no hay expresión de FLT3 a nivel de proteína ni de ARNm. Al hacer una evaluación de la expresión de FLT3 en diferentes células ya diferenciadas de bazo de ratón, no se encontró expresión de este en linfocitos, células asesinas naturales (NK), NKTs, granulocitos, monocitos y MØs. Las únicas células que expresan FLT3 son las cDCs (subtipos cDC1 y cDC2), incluso está presente en las células de Langerhans o DCs de piel, y su expresión es baja en las pDCs (Karsunky et al., 2003). Por lo anterior, el

FLT3 se ha convertido en uno de los principales marcadores para identificar las DCs y sus subtipos en diferentes especies, incluido el cerdo.

Células Dendríticas: Clasificación en Cerdo

De manera general, las DCs se dividen en pDCs y cDCs. Las pDC tienen como función principal la detección de virus y la producción alta producción (3-10 pg) de interferón (IFN) tipo I (α y β), y expresan principalmente TLR9 (Kapsenberg, 2003, Calzada-Nova et al., 2010). Las pDCs de cerdo se pueden definir con el fenotipo $CADM1^-CD172a^+CD1a^-$ (Summerfield et al., 2015). Las cDCs están especializadas en la presentación de antígenos y expresan TLRs del 2 al 7 en humano y ratón (Kapsenberg, 2003), mientras que en cDCs de tráquea de cerdo se reportó la expresión de los TLRs del 2 al 4 (Reséndiz et al., 2018). Las cDCs se dividen en dos subtipos: cDC1 y cDC2 (Shortman and Heath, 2010); las cDC1 son conocidas por su capacidad de inducir respuestas tipo Th1 y diferenciar linfocitos T CD8 a través de la presentación cruzada. La subpoblación cDC2 se especializa en la activación de respuestas tipo Th2 y promueven el tipo de respuesta Th17 (Schlitzer and Ginhoux, 2014, Schlitzer et al., 2015). Summerfield y cols. (Summerfield et al., 2015) realizaron una compilación de datos proponiendo una clasificación para distinguir entre las subpoblaciones de cDCs de cerdo por la expresión de distintos receptores. Este estudio clasificó a la subpoblación cDC1 como: $CD172a^+CD163^{low}CD1a^+CADM1^+$, y a la subpoblación cDC2 como: $CD172a^{-/low}CD163^-CD1a^-CADM1^{high}$.

En nuestro grupo de trabajo, López-Robles y cols. (Lopez-Robles et al., 2015) realizaron una clasificación de APCs del sistema respiratorio del cerdo, sin distinguir entre DCs y macrófagos y analizando células de pulmón, de ganglio mediastinal y de lavado bronquio alveolar. Ellos reportaron una población de APCs con el fenotipo $MHCII^{high}CD172a^+CD1a^{low}CD163^{low}$ en pulmón que muestra similitudes con una subpoblación de DCs dermales (Marquet et al., 2011) con el fenotipo

MHCII^{high}CD172a⁺CD163^{low}. También reportaron una población de APCs en ganglio mediastinal con el fenotipo MHCII^{high}CD172a⁺CD1a⁺CD163^{low/-} que comparan con una subpoblación de DCs en linfa (Marquet et al., 2011) con el fenotipo MHCII^{high}CD172a⁺CD163^{low/-} (Lopez-Robles et al., 2015). Recientemente se realizó una caracterización de las DCs y macrófagos del sistema respiratorio de cerdo (Maisonasse et al., 2015), utilizando receptores de superficie y la expresión de algunos genes por PCR en tiempo real. Ellos clasificaron a los macrófagos como MHCII^{high}CD163^{high}, las cDC1 como CD172a⁻CD163⁻CD1a⁻CADM1⁺ y las cDC2 como CD172a⁺CD163⁻CD1a⁺CADM1⁺, esta clasificación difiere con las reportadas anteriormente (Summerfield et al., 2015). Sin embargo, la clasificación de Maisonasse y cols. (Maisonasse et al., 2015) permite distinguir entre macrófagos, cDC1 y cDC2, facilitando el estudio de estas subpoblaciones y sobretodo, permite una clara separación entre DCs y macrófagos.

Posterior a la clasificación de cDCs de pulmón, Auray y cols. (Auray et al., 2016) caracterizaron a las cDC1, cDC2, pDCs y monocitos de sangre de cerdo. Ellos clasificaron las cDC1 como FLT3⁺CD14⁻CD172a^{low}CADM1⁺wCD11R1⁺DEC205⁺ y a las cDC2 como FLT3⁺CD14⁻CD172a⁺CADM1⁺CD115⁺wCD11R1⁺CD1⁺DEC205⁺. En la misma publicación realizaron un análisis de secuenciación de ARN y encontraron una similitud entre las cDCs en ratón, humano y cerdo. Si bien el subtipo cDC1 es similar en las tres especies, el tipo cDC2 tiene un mayor porcentaje de similitud entre humano y cerdo, que entre humano y ratón (Auray et al., 2016). Esta información es una evidencia más de que el cerdo puede ser utilizado como modelo de estudio para enfermedades del humano.

En nuestro grupo de trabajo realizamos la caracterización de los subtipos de cDCs en tonsila, bazo, ganglio mesentérico, ganglio submaxilar (Parra-Sánchez et al., 2018) y tráquea de cerdo (Reséndiz et al., 2018). Para la obtención de las cDCs en tejidos linfáticos fue necesario excluir a las poblaciones de linfocitos T (CD3⁺) y B (CD21⁺), ya que este tipo de célula es la que predomina en esos tejidos, también se excluyó a la población CD163⁺ que se expresa mayoritariamente en macrófagos y células derivadas de monocitos

(Maisonnette et al., 2015). Las cDC1 se clasificaron como MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low} y las cDC2 como MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺. Además, se comprobó que estas células eran cDCs *bona fide*, ya que expresaron ARNm de FLT3. Las células caracterizadas como cDC1 expresan el transcrito XCR1, mientras que las cDC2 expresan FCεR1α, como ha sido reportado por otros autores en varias especies (Maisonnette et al., 2015, Auray et al., 2016, Guilliams et al., 2016).

DEC205: Receptor de Lectina Tipo C en Células Dendríticas

Los receptores de lectina tipo C (CLRs) son capaces de reconocer hidratos de carbono que se encuentran en algunos patógenos y necesitan de la presencia de calcio para poder realizar dicha función. Existe una amplia gama de receptores de esta familia, y se dividen de acuerdo a su estructura o el ligando que reconocen. Estos receptores pueden estar presentes en transmembrana o ser secretados como proteínas solubles. Algunos ejemplos de los CLRs transmembrana son las selectinas, la familia de receptores de manosa (MR) y el receptor DC-SIGN. Una de las funciones de los CLRs es la internalización de agentes patógenos, que son degradados en fragmentos o antígenos, para su presentación a los linfocitos T por medio de las DCs (Cambi et al., 2005, East et al., 2002).

Dentro de los CLRs se encuentra el receptor DEC205 (CD205) el cual cuenta con un dominio citoplasmático corto, una región extracelular con un dominio rico en cisteína, un dominio fibronectina tipo II y 10 dominios de reconocimiento. El DEC205 funciona como un receptor que promueve la endocitosis de antígenos extracelulares y participa en la presentación de estos a los linfocitos T. Sin embargo, no se conocen ligandos específicos para este receptor (Cambi et al., 2005, Gliddon et al., 2004, East et al., 2002).

El DEC205 se expresa en varias subpoblaciones de DCs de varios tejidos, y el nivel de expresión puede variar dependiendo de la especie. Este receptor fue descrito y

clonado primeramente en células epiteliales de timo de ratón (Jiang et al., 1995). En ganado bovino se observó una alta expresión de este receptor en diversas subpoblaciones de DCs presentes en vasos linfáticos aferentes (Gliddon et al., 2004). En humanos el DEC205 se encuentra con una alta expresión en DCs mieloides y monocitos de sangre y con baja expresión en pDC de sangre (Kato et al., 2006). En cerdo, el ARNm de DEC205 se expresa en nódulos linfáticos mesentéricos, inguinales y sublinguales; así como en el timo y bazo; además, se detectaron altos niveles en células Langerhans (DC en piel) (Flores-Mendoza et al., 2010), en las subpoblaciones de cDCs de tejidos linfáticos (Parras-Sánchez et al., 2018, Puebla-Clark et al., 2019) y sangre (Auray et al., 2016). Debido a la presencia de este receptor en diversas poblaciones de DCs, y en la función conjunta que tiene con estas células, se ha estudiado la posibilidad de utilizar a las DCs DEC205⁺ como vectores para vacunación (Niezold et al., 2015, Macri et al., 2016).

Células Dendríticas y su Respuesta a Virus

La presencia de las DCs en la piel, sangre y las superficies mucosas permite que estas células sean de las primeras en entrar en contacto con agentes virales y las primeras en activar las reacciones antivirales (Klagge and Schneider-Schaulies, 1999). Las DCs responden a los virus y vacunas por medio de sus receptores y producción de citocinas, los cuales les permiten iniciar la respuesta anti-viral activando a linfocitos T y B. Aún no está bien elucidado como es que los subtipos de DCs son capaces de desarrollar funciones especializadas y específicas; especialmente en infecciones virales ya que estas células pueden ser susceptibles a la infección viral y al mismo tiempo esenciales para montar la respuesta inmune (Silvin et al., 2017). Los virus pueden ser reconocidos fuera de las células por receptores tipo Toll (TLRs), mientras que en el interior de la célula son reconocidos por receptores en el citoplasma como los de tipo RIG-I (RLRs), NOD (NLRs) y AIM2 (ALRs) (Aoshi et al., 2011). Estos receptores activan diferentes cascadas de señalización para la producción de citocinas, como el factor nuclear kappa B (NF-κB), el

factor regulador de interferón (IRF) para la producción de IFN- α/β , así como la cascada de inflammasoma/caspasa-1 para producir IL-1 β (Versteeg and García-Sastre, 2010). Es importante destacar que existen algunos virus capaces de truncar estas cascadas de señalización en las células infectadas, permitiéndoles sobrevivir y replicarse libremente (Versteeg and García-Sastre, 2010, Aoshi et al., 2011).

Las cDCs pueden reconocer virus principalmente por la expresión de TLR3, el cual reconoce virus de ARN de doble cadena. TLR3 activa la vía de señalización de NF- κ B para la producción de citocinas pro-inflamatorias, especialmente IL-12 generando una respuesta anti-viral (Koyama et al., 2008); aunque también puede inducir la producción de IFN- β (Aoshi et al., 2011). En la población general de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), hay baja presencia de las pDC (0.2-0.8%), sin embargo estas células pueden liberar una gran cantidad de IFN tipo I (de 100 a 1000 veces más que cualquier otra célula en la sangre) en sólo unas horas de estar en contacto con los virus. Esto se debe principalmente a la expresión de los TLRs 7 y 9 que interactúan con los ARN de una sola cadena con altos porcentajes de guanosina, uridina o ADN de una sola cadena con motivos CpG sin metilar (Calzada-Nova et al., 2010, Gilliet et al., 2008). También se liberan otras citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, sin embargo la producción en altas cantidades de IFN tipo I como IFN- α son lo que permite poner al organismo en un estado antiviral (Calzada-Nova et al., 2010).

En un estudio se observó la capacidad de las APCs de bazo de ratón BALB/c, para activar a linfocitos T CD8 y su capacidad citotóxica contra el virus de la influenza (Nonacs et al., 1992), las DCs fueron las únicas APCs capaces de llevar a cabo tal función *in vitro*. Un resultado similar se observó en un estudio realizado con ratones infectados por influenza tipo A y comparar los distintos tipos de APC en pulmón y ganglios mediastinales (Hamilton-Easton and Eichelberger, 1995). Las DCs fueron las principales en iniciar una respuesta citotóxica en los nódulos linfáticos. Sin embargo, aún existen muchos tipos de virus que logran evadir la respuesta inmune alterando las funciones de algunas células como las DCs. Un ejemplo de esto es el PRRSV, que provoca una baja producción de IFN

tipo I y de citocinas pro-inflamatorias; esto puede deberse a la replicación del virus dentro de las APCs. PRRSV también provoca la baja expresión de algunos receptores como MHCII y los coestimuladores CD80/86, los cuales podrían afectar que se desencadene la respuesta inmune de manera efectiva (Rodriguez-Gomez et al., 2013).

El tipo de respuesta producido por las DCs ante las infecciones virales puede variar dependiendo del subtipo. Silvin y cols., demostraron que el subtipo cDC1 (CD141⁺) no se infecta con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) e influenza, contrario a las cDC2 (CD1c⁺) que permiten la replicación viral lo que conlleva a la modulación negativa de la respuesta inmune (Silvin et al., 2017). En una infección *in vivo* con el virus del PRRSV, las cDC1 y cDC2 de tráquea no fueron infectadas, lo que sugiere que en otros tejidos estas células no sean susceptibles al virus (Reséndiz et al., 2018). Ya que las cDC1 y cDC2, así como los otros tipos de DCs, tienen funciones distintas, es probable que su respuesta o susceptibilidad a los virus lo será también, por lo que es necesario seguir realizando estudios con distintos virus para conocer los mecanismos de respuesta a estos.

Respuesta Inmune al Virus PRRS

El PRRS es un virus envuelto de ARN monocatenario positivo perteneciente a la familia *Arteriviridae*, es clasificado dentro del género *Porartevirus* y dividido en dos especies (antes era clasificado en dos genotipos): PRRSV-1 (Europeo) y PRRSV-2 (Americano) (Adams et al., 2017, Crisci et al., 2019). Este virus es de forma esférica/oval con un diámetro de 50-60 nm, con un genoma mide alrededor de 15 kb con dos regiones no codificantes, una en la región 5' y otra en la 3' que protegen la región codificante que consta de al menos diez marcos de lectura abierta (ORF) (Snijder et al., 2013). Su genoma está compactado dentro de la nucleocápside, la cual está rodeada por glicoproteínas de superficie y otras proteínas de membrana que están insertadas en la envoltura en forma de bicapa lipídica (Lunney et al., 2016, Shi et al., 2010). Para su replicación el virus cuenta

con un gen que codifica para una replicasa en los ORFs 1a y 1b. De los marcos ORF 2 al 7, se codifican cuatro glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2a, GP3, GP4 y GP5), tres proteínas de membrana no glicosiladas (E, ORF5a y M) y la proteína de la nucleocápside N (Butler et al., 2014, Lunney et al., 2016, Crisci et al., 2019). Este virus induce abortos en los últimos períodos de gestación, así como neumonía en cerdos jóvenes que se puede complicar en infecciones bacterianas recurrentes (Rossow, 1998). El virus se transmite por las secreciones oro-nasales y por el semen (Lunney et al., 2016) y ocasiona grandes pérdidas económicas para el sector porcícola (Neumann et al., 2005).

La infección por PRRSV puede clasificarse en tres etapas; la primera se denomina “aguda” en donde el virus reside principalmente en el pulmón del animal, resultando en una viremia a partir de las 6-12 horas post infección (hpi). La siguiente etapa se conoce como “persistente” donde el virus baja su tasa de replicación hasta el punto en el que no se le detecta en sangre o pulmones y el cerdo no muestra señales clínicas de la enfermedad, la replicación viral se lleva a cabo principalmente en tejidos linfáticos. La etapa final es la “extinción”, en la cual la replicación del virus disminuye hasta el punto de extinción, no se sabe exactamente cuando desaparece el virus, pero la replicación viral puede mantenerse hasta los 250 días post infección (dpi) (Wills et al., 2003, Lunney et al., 2016, Allende et al., 2000). En animales infectados por una cepa de PRRSV-2 se encontró expresión de ARNm del virus hasta el día 84 dpi y a nivel sistémico hasta el 150 dpi en algunos animales (Allende et al., 2000). Otra cepa de la misma especie se reportó la presencia del virus en tonsila a los 60 dpi (Lamontagne et al., 2003), otros reportan la expresión de ARNm viral hasta los 105 dpi (Horter et al., 2002)

Se ha reportado que este virus es capaz de inducir la muerte celular de las APCs por lo que no se produce una respuesta inmune eficaz (Rodriguez-Gomez et al., 2013). En un experimento utilizando MØs alveolares (PAMs) que se infectaron con una cepa de PRRSV-1, se observó que la capacidad fagocítica de las células disminuyó significativamente, comparándolas con PAMs sin infectar (De Baere et al., 2012). Existen dos tipos de MØs: M1 que se especializa en una respuesta pro-inflamatoria a patógenos

intracelulares, y M2 que se caracterizan por secretar citocinas anti-inflamatorias (Mantovani et al., 2004). En un estudio donde polarizaron PAMs hacia los subtipos M1 y M2, observaron que el PRRSV no se replica en las M1, pero sí en las M2; también observaron que el virus inhibe la producción de interferones en la célula y sesga su polarización hacia M2 promoviendo la replicación viral (Wang et al., 2017). Estos efectos que tiene el virus sobre las APCs puede explicar el hecho de que las co-infecciones de PRRSV con otros virus o bacterias sean comunes (Dobrescu et al., 2014, Jung et al., 2009).

Los PAMs son las células blanco del PRRSV, esto es debido a su alta expresión del receptor CD163 y CD169 (Patton et al., 2009, Wang et al., 2018, Bordet et al., 2018b). El receptor CD163 es un receptor tipo “scavenger” miembro de la familia rica en cisteína clase B, el cual se expresa en monocitos y subpoblaciones de MØs (Sánchez et al., 1999). Al inducir la expresión de este receptor, en distintas células que naturalmente no lo expresan, permite la infección de éstas por PRRSV, lo que indica que este receptor tiene un papel en la entrada del virus a la célula (Calvert et al., 2007, Van Breedam et al., 2010). Además del receptor CD163, se conocen otros dos mediadores celulares implicados en la infección por PRRSV: los glicosaminoglicanos de sulfato de heparina que ayudan a las primeras etapas de unión del virus a la célula y el receptor CD169 (Siglec-1) que interactúa con el ácido siálico presentes en el virus permitiendo una unión estable con la célula. Esta unión del virus con CD169 permite la interacción de PRRSV con el receptor CD163, el cual está implicado en la internalización del virus, la pérdida de la cápside viral y liberación del material genómico vírico (Van Breedam et al., 2010, De Baere et al., 2012).

Se ha observado que el PRRSV puede afectar las funciones básicas de las DCs por medio de la regulación de la expresión del complejo MHCII y CD80/86 que ayuda con la activación de las células T (Rodríguez-Gomez et al., 2013). Distintas cepas de PRRSV-2 son capaces de infectar y replicarse en DCs derivadas de monocitos (moDCs) *in vitro*, incluso después de madurar a las células con lipopolisacárido (LPS), bajando la expresión de MHCII, MHCI, CD80/86. El virus también afecta la estimulación/proliferación de

linfocitos T alogénicos, se estimuló la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, finalmente la infección provocó la apoptosis y necrosis de las moDCs (Flores-Mendoza et al., 2008, Wang et al., 2007, Silva-Campa et al., 2010). Una cepa altamente virulenta de PRRSV-1 infectó DCs derivadas de médula ósea (BMDCs), a pesar de no estimular la producción de citocinas anti-inflamatorias tampoco lo hizo con pro-inflamatorias (IFN- α). Al igual que con las moDCs, en las BMDCs hubo una baja expresión de MHCII, CD80/86 y un alto porcentaje de apoptosis (Weesendorp et al., 2013). Una cepa de PRRSV-2 tuvo un efecto similar en las BMDCs, al utilizar estas células en estado inmaduro, se observó una clara infección y replicación viral. Las células tuvieron una baja expresión de MHCI aunque acompañada con un aumento en la expresión de CD80/86, así como de IL-10; la suma de estos efectos puede ser una de las estrategias del virus para evadir la respuesta inmune (Chang et al., 2008).

Durante mucho tiempo se tuvo la duda de si las cDCs podrían ser o no infectadas por PRRSV. Un estudio de infección *in vitro* con PRRSV-2 en células clasificadas como DCs de pulmón (utilizando el anticuerpo CD11c de humano) y moDCs, reportó que las DCs no se infectaron con PRRSV, mientras que las moDCs sí. Ellos observaron en las DCs un incremento en la expresión de IFN- β a las 12hpi, pero este bajó considerablemente a las 24hpi. El virus no alteró la expresión de receptor CD80/86, pero sí bajó la expresión de MHC-I sin afectar la habilidad de las células de promover la proliferación de linfocitos T alogénicos (Loving et al., 2007). Se obtuvo un resultado distinto al infectar DCs pulmonares (clasificadas de forma similar al grupo anterior) con una cepa de la especie PRRSV-1, en donde el virus infectó y se replicó dentro de las células (Pröll et al., 2017). Este estudio también se comparó la susceptibilidad de las DCs entre dos razas distintas de cerdo: Pietrain y Duroc. La raza Pietrain presentó una mayor replicación viral a las 12hpi la cual disminuyó a las 24hpi; caso contrario para la raza Duroc cuya replicación viral siguió incrementando a las 24hpi. Los autores discuten que la diferencia en los resultados obtenidos, comparando con el trabajo previamente publicado, puede deberse a que se utilizaron cepas de especies distintas de PRRSV, sin embargo, es el único trabajo al día de hoy que reporta infección por PRRSV en DCs de tejido (Pröll et al., 2017).

En otro estudio *in vitro*, los subtipos cDC1 y cDC2 de tráquea de cerdo no se infectaron al utilizar una cepa de la especie PRRSV-2, sin embargo, las células tuvieron una respuesta hacia la infección. Las cDC1 tuvieron una alta expresión de la citocina pro-inflamatoria IFN- α , mientras que las cDC2 tuvieron un incremento en la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 después de 24 hpi (Reséndiz et al., 2018). Una infección *in vivo* con una cepa de la especie PRRSV-1 demostró por medio de marcaje intracelular de la proteína N del virus y PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR) que las cDC1, cDC2 y moDCs de pulmón, no son infectadas por el virus. En particular las cDC1 tuvieron un incremento en la expresión de ARNm de citocinas inflamatorias: IFN- α , IL-12, TNF- α e IL-8; mientras que las cDC2 tuvieron un incremento en la citocina TGF- β en animales con 10 dpi (Bordet et al., 2018a). Aún se necesitan estudios para poder elucidar en papel que juegan las cDCs ante la infección por PRRSV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cerdos sanos entre 2 y 4 meses de edad provenientes de una granja libre de influenza y PRRSV. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. con agua y alimento *ad libitum*.

Virus e Infección

Para el ensayo de infección se utilizó la cepa CIAD008 (GenBank accession no.DQ250071.1) del tipo PRRSV-2. El virus se propagó en células MARC-145 utilizando medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100 IU de penicilina mL⁻¹ y 100 µg estreptomicina mL⁻¹. Una vez observado el efecto citopático, las células fueron lisadas por congelación/descongelación y los lisados se centrifugaron a 650 g por 20 min a 4°C (Benchtop centrifuge, Beckman coulter cat. 366816). Los sobrenadantes se titularon y guardaron a -70°C. Seis animales fueron infectados por vía intranasal con 4 mL de 2×10^5 TCID₅₀ del virus por cada 2 mL, tres cerdos fueron sacrificados a los 5dpi y otros tres a los 7 dpi. La eutanasia se realizó en una sala de necropsias de acuerdo a lo establecido en la NOM-033-91 ZOO-1995 para el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Aislamiento de DCs de Tejidos

Inmediatamente después de la eutanasia se extrajeron los ganglios submaxilares y mesentéricos, la tonsila y el bazo; los tejidos fueron colocados en un tubo Falcon de 50 mL con 10 mL de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (NaCl 80 gr, KH₂PO₄

2gr, Na_2HPO_4 11.5 gr, KCl 2 gr) frío y estéril con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (PBS/GENTA). En ambiente estéril todos los tejidos fueron lavados dos veces con PBS/GENTA por medio de agitación manual para remover la sangre que quedó en los tejidos. A cada tejido se le retiró el tejido conectivo remanente y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm^2 y fueron puestos en un disociador de nylon de $100\mu\text{m}$ colocado sobre un tubo Falcon de 50 mL como recolector. Los tejidos fueron macerados con la ayuda de un émbolo de una jeringa pasando un volumen de 50mL de medio RPMI 1640 suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amfotericina B (RPMI) más 2mM de EDTA (RPMI/EDTA); los tubos se centrifugaron a 328 g por 10 min a 25°C . Se lisaron los glóbulos rojos de macerado de bazo con 5 mL de buffer de lisis (10mM NaHCO_3 , 155mM NH_4Cl y 10mM EDTA) por 4 min, interrumpiendo la reacción con 10 mL de RPMI más 10% de suero fetal bovino (SFB).

De los macerados de ganglio submaxilar se retiraron los linfocitos T ($\text{CD}3^+$) y B ($\text{CD}21^+$), marcando las suspensión celular total con los anticuerpos anti-CD3 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (IgG1, clona 145-2C11; Southern Biotech) y anti-CD21 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (IgG1, clona BB6-11C9.6; Southern Biotech,) (tiempo de incubación y lavados se desglosará en el siguiente apartado). Después del marcaje las células se incubaron con la cantidad de perlas MACS anti-IgG (20 μl de perlas por cada 10×10^6 de células por anticuerpo) (Miltenyi Biotec) especificadas por el fabricante, por 15 min a 4°C , posteriormente se lavaron y centrifugaron a 300 g por 10 min. Las células se pasaron por una columna MS colocada en el magneto y se conservó la selección negativa dentro de la cual se encontraban las DCs.

Para enriquecer las DCs de tonsila, las células del macerado se sometieron a un gradiente de densidad con el medio OptiPrep™ (Cat No. D1556, Sigma) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante con algunas modificaciones. Se utilizó RPMI como diluyente para la fracción de 11.5% de iodixanol y solución salina balanceada de Hank sin calcio y sin magnesio (HBSS) con 5% de SFB y 2mM de EDTA

(HBSS/SFB/EDTA) como solución de suspensión. Se mezclaron 3 mL de HBSS/SFB/EDTA con 1 mL del medio OptiPrep™ y se colocaron al fondo de un tubo Falcon de 15 mL. Sobre esta solución se colocaron 5 mL de una dilución al 11.5% de OptiPrep™, sobre de esta se colocaron 3 mL de HBSS/SFB/EDTA. Se centrifugó a 600 g por 15 min a 20°C sin freno. Las DCs se colectaron por encima de la capa de 11.5% de OptiPrep™, se contaron con una dilución 1:10 de azul de tripán al 0.4% en una cámara de Neubauer y se procedió inmediatamente con los siguientes ensayos.

Para obtener PAMs como control de infección se pinzó la tráquea, se extrajeron los pulmones y se colocaron en un vaso de 1 L con 200 mL de PBS/GENTA frío y estéril. En ambiente estéril se realizaron lavados de las vías respiratorias con 250 mL de PBS adicionado con 2mM de EDTA, el contenido se colocó en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 328 g por 10 min a 25°C; las células viables de todos los tejidos se contaron.

Caracterización Fenotípica por Citometría de Flujo y Purificación (Sorting)

Para hacer el marcaje de las células con los anticuerpos de interés se incubaron en PBS con 10% de suero porcino por 10 min, posteriormente se lavaron con PBS adicionado con 5% de SFB y 2 mM EDTA (PBA/EDTA) para bloquear los receptores FC (fracción cristalizable) de la células. Los receptores FC pueden unir una gran cantidad de anticuerpos de forma inespecífica, esto se evitó al realizar su bloqueo con suero de cerdo. Se centrifugaron a 328 x g por 10 min a 25°C y se resuspendieron las células para dejarlas en una densidad de 1×10^6 células en 100 μ L. Para la caracterización de las cDC1 y cDC2, las células se marcaron con los anticuerpos anti-CD172a (10 μ g/ml) (IgG2b, clona 742215A; Monoclonal Antibody Center), anti-MHCII (10 μ g/ml) (IgG2a, clona H42A; Monoclonal Antibody Center), anti-CADM1 (10 μ g/ml) (IgY, clona 3E1; MBL), anti-CD3 (3 μ g/ml) (IgG1, clona 145-2C11; Southern Biotech), anti-CD21 (1 μ g/ml) (IgG1, clona BB6-11C9.6; Southern Biotech,) y anti-CD163 (10 μ g/ml) (IgG1, clona MCA2311; Bio-Rad). Posteriormente se añadieron los anticuerpos secundarios: anti-IgG2b Alexa

Fluor 647 (5 µg/ml) (Cat No 1090-31; Southern Biotech,), anti-IgG1 FITC (5 µg/ml) (Cat No 1070-02; BioLegend) para anti-CD3, CD21 y CD163, anti-IgG2a PerCP-Cy 5.5 (4 µg/ml) (Cat No 407111; BioLegend) y anti-IgY Biotin (5 µg/ml) (Cat No 610008; Southern Biotech) para CADM1. Finalmente se añadió estreptavidina marcada con Brilliant Violet 421 (5 µg/ml) (Cat No 405226; BioLegend) para CADM1. El tiempo de incubación, en todos los marcajes, fue de 15 min a temperatura ambiente, seguida de dos lavados consecutivos con 2 mL de PBA/EDTA, centrifugando a 328 g por 10 min a 25°C. Para la purificación y recuperación de los subtipos cDC1 y cDC2 se excluyeron a las células que expresaban los receptores CD163, CD3 y CD21, posteriormente se eligieron a las MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low} como cDC1 y las MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺ como cDC2.

En algunos experimentos para la caracterización de cDC1 y cDC2 el anticuerpo anti-DEC205 (10 µg/ml) (clona 9HZF7, producido en nuestro laboratorio), fue conjugado con el fluorocromo PE (conjugation kit, Bio-Rad) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se prepararon los controles de fluorescencia menos uno (FMOs), los cuales consisten en utilizar todas las combinaciones posibles de fluorocromos siempre evitando uno, para detectar si hay un fluorocromo que emite fluorescencia en otro canal. También se realizaron los controles de isotipo: anti-mouse IgG2a (Cat No 401501), IgG1 (Cat No 400101), IgG2b (Cat No 402201), and anti-chicken IgG (Cat No 402101) (todos de BioLegend).

Para el ensayo de infección, después del bloqueo, se excluyeron las células muertas de las vivas utilizando el marcador de viabilidad Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (1:75) (Cat No 423101; BioLegend), se incubó por 15 min a temperatura ambiente con PBS, posteriormente se lavaron las células una vez con PBA/EDTA. Se realizó el marcaje de cDCs totales con anti-MHCII, anti-CADM1, anti-CD3, anti-CD21 y anti-CD163 y los anticuerpos secundarios correspondientes mencionados anteriormente. Para el marcaje de las cDCs DEC205⁺ se utilizó el anticuerpo anti-DEC205 conjugado con PE. Para la purificación y recuperación se excluyeron a las células que expresaban los receptores

CD163, CD3 y CD21, y posteriormente se seleccionaron a las poblaciones MHCII⁺CADM1^{high}DEC205⁺ y MHCII⁺CADM1^{high}DEC205⁻. Para recuperar células tipo MØs de tonsila y PAMs de lavado bronquio-alveolar, se marcaron algunos tubos con anti-MHCII y anti-CD163, con sus correspondientes anticuerpos secundarios, se recuperó a la población doble positiva. Para identificar a las células infectadas por el virus de PRRSV, se fijaron y permeabilizaron las células con el kit Leucoperm™ (Cat No BUF09B; Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó el marcaje de PRRSV con un anticuerpo anti-proteína N conjugado con FITC (20 µg/ml) (Cat No SDOW17-A, Rural Technologies Inc). Los análisis de fenotipo, purificación/recuperación y marcaje de infección se llevaron a cabo en el citómetro de flujo con sorter FACSAria III™ (BD Biosciences) utilizando el programa FACSDiva.

Extracción de ARN y PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR)

Se extrajo el ARN de las células recuperadas con el kit de aislamiento Arcturus PicoPure (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ARN se cuantificó utilizando un equipo de espectrofotometría Nanodrop; se utilizaron 10 ng de ARN para la amplificación de transcritos ARNm utilizando el kit real-time qPCR with the SYBR Green RT-PCR one-step kit (Agilent, USA). El protocolo de amplificación utilizado para los análisis en la caracterización de cDC1 y cDC2 fue: 50 °C por 30 min y 35 ciclos de 94 °C por 30 min y 55 °C por 1 min. Para el análisis de la expresión de citocinas en las células infectadas el protocolo de amplificación fue: 48 °C por 30 min y 35 ciclos a 94 °C por 30 min y 60 °C por 1 min. Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron reportados previamente (Maisonnasse et al., 2015) se encuentran en la Tabla I. La cuantificación final se llevó a cabo utilizando los valores de CT; primero se restó el valor CT para el gen constitutivo del gen de interés, a éste se le aplicó la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ como se ha reportado antes (Silva-Campa et al., 2010). Los resultados de la expresión de ARNm en la caracterización de cDC1 y cDC2 están representados en expresión relativa en

unidades arbitrarias del gen, utilizando el valor más alto como el 100%. Para los resultados de la expresión de citocinas se reportó el valor final de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Análisis Estadístico

Todos los análisis se hicieron con el programa GraphPad Prism v6.0. Para el ensayo de la caracterización de cDC1 y cDC2, la comparación de los porcentajes de las cDCs totales y la expresión de DEC205 en cDC1 y cDC2 se realizó con un ANOVA de una vía y pruebas de Tukey. La comparación de la frecuencia de cDC1 y cDC2, así como el análisis de la expresión de DEC205 en cada tejido se realizó con pruebas de t de Student. Para el ensayo con cerdos infectados la comparación de la expresión de citocinas y FLT3 se realizó con un ANOVA de una vía y el Test LSD de Fisher. La comparación de los porcentajes de las células infectadas se realizó con pruebas de t de Student.

Tabla I. Secuencias de Iniciadores para PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa

Gen	Secuencia 3'-5'	Secuencia 5'-3'
PPIA ¹	GCCATGGGACGCTTTGGG	TTATTAGATTTGTCCACAGTCAGCAAT
FLT3 ²	TGTTACACGCTGAATATAAGAAGGAA	GGAGCAGGAAGCCTGACTTG
XCR1 ²	CGATGCCGTCTTCCACAAG	GGAACCACTGGCGTTCTGA
FCeR1 α ²	AATTTACAGACCCACAGCCTAGCT	TGCTATCGCAGATGTTTCTTGAG
TGF β ¹	AGGGCTACCATGCCAATTTCT	CCGGGTTGTGCTGGTTGTACA
IL-10 ¹	TGAGAACAGCTGCATCCACTTC	TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA
CCR7 ³	TGTGCTTCAAGAAGGACGTG	AAGGGTCAGGAGGAAGAGGA
IL-12 ⁴	TCTTGGGAGGGTCTGGTTTG	AAGCTGTTACAAGCTCAAGTATGA

¹ (Silva-Campa et al., 2009)

² (Maisonnasse et al., 2015)

³ (Beltrán-Beck et al., 2014)

⁴ (Ahlberg et al., 2017)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de cDCs, cDC1 y cDC2 de Tejido Linfático de Cerdo

Para la caracterización de las cDCs utilizamos ganglios submaxilares y mesentéricos, la tonsila y el bazo; con un marcaje de 4 colores para identificar las subpoblaciones de cDCs mediante citometría de flujo. Primeramente, se seleccionaron células grandes por medio de su tamaño y complejidad (forward y side scatter, respectivamente) (Figura 1a), y después se eliminaron aquellos eventos en los cuales las células fueron adquiridas en cúmulos de dos o más (doublet cells) (Figura 1b). En tejidos linfáticos existe una alta presencia de linfocitos T y B (Neiburger et al., 1976), por lo que la exclusión de estas células se realizó marcándolas con los anticuerpos anti-CD3 (linfocitos T) y anti-CD21 (linfocitos B) para eliminarlas de la población de interés por medio de citometría de flujo o perlas magnéticas (MACS beads para submaxilar). También se excluyeron a las células CD163⁺ ya que se ha reportado que no sólo los MØs expresan este receptor, sino también las moDCs y moMØs de tejido (Maisonasse et al., 2015) (Figura 1c). Posteriormente se seleccionaron las DCs totales por medio de la expresión de los receptores MHCII y CADM1, ya que en varias especies se ha reportado la expresión de estos receptores en las cDCs. Para finalizar, la separación de cDC1 y cDC2 se realizó por medio de la expresión del receptor CD172a (Figura 1d) (Guilliams et al., 2016, Maisonasse et al., 2015, Auray et al., 2016, Summerfield et al., 2015). El fenotipo final para cDC1 fue MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low}, para cDC2 MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺.

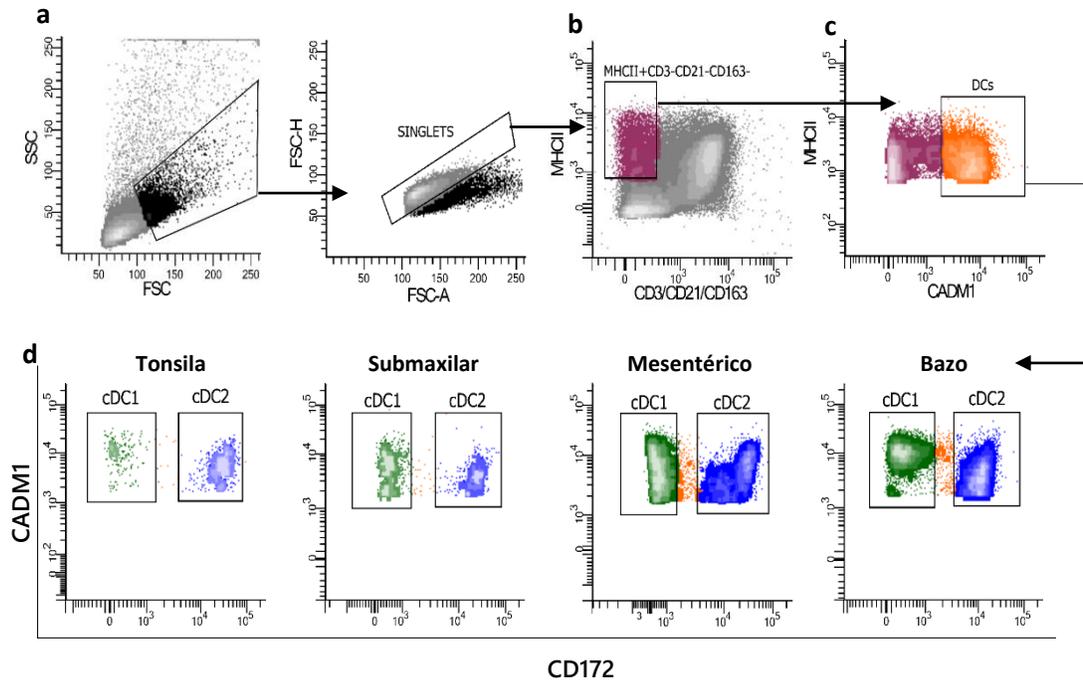


Figura 1. Fenotipo de las cDCs, y los subtipos cDC1 y cDC2 de tejido linfático porcino. Análisis representativo de la selección de células (a) remoción de dobletes (b), exclusión de células CD3⁺, CD21⁺ y CD163⁺ (c). Selección de cDCs: MHCII^{high}CADM1^{high} (d) cDC1 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low}) y cDC2 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺) de tonsila (TLN), submaxilar (SLN), mesentérico (MLN) y bazo (SPL). n=3.

Para confirmar la identidad de cada subpoblación se realizó el análisis de la expresión de transcritos de genes característicos de cDC1 (FLT3 y XCR1) y cDC2 (FLT3 y FcεR1α). Se utilizaron células de tonsila (n=3) y submaxilar (n=3), de las cuales se extrajo el ARN para cuantificar dichos mensajeros por medio de qRT-PCR. Las cDC1 y cDC2 expresaron FLT3, lo que confirma el linaje de cDCs de acuerdo a lo que se conoce acerca de la expresión de este marcador en cDCs (Karsunky et al., 2003) (Figura 2a y b). La subpoblación cDC1 fue positiva para el gen XCR1, mientras que cDC2 fueron positivas a FcεR1α (Figura 2a y b), esto confirmó la identidad de cada subpoblación de acuerdo con lo reportado anteriormente en cerdo (Maisonasse et al., 2015, Auray et al., 2016) y otras especies (Guilliams et al., 2016); sin embargo, existe una variación en la expresión reportada del receptor CD172a para cDC1 en cerdo.

Previo al desarrollo de esta tesis, se describió una clasificación de DCs en lámina propia, placas de Peyer, cúpulas subepiteliales y regiones interfoliculares que forman parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y ganglios mesentéricos porcinos (Bimczok et al., 2005). Los autores clasificaron 4 subpoblaciones de DCs por medio de la expresión de los receptores CD11R1 (análogo a CD11b en humano) y CD172a; ambos receptores son expresados por monocitos (Summerfield and McCullough, 2009) así como moDCs y moMØs (Maisonasse et al., 2015). Posteriormente se identificó a las DCs en tonsila, bazo y nódulos linfáticos de cerdo como CD172a⁺CD11R1⁺CD1a^{+/-}CD80/86^{+/-} (Jamin et al., 2006). La clona de CD11R1 utilizada para esta clasificación se expresa en neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos de cerdo (Haverson et al., 1994). El receptor CD1a también es expresado en algunos timocitos, linfocitos B, MØs y células de Langerhans (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008). Debido a la escasez de anticuerpos específicos para DCs de cerdo (como FLT3), es necesario utilizar una combinación de varios receptores, así como la correcta depuración de otras poblaciones celulares, más la evaluación de la expresión de varios transcritos de DCs para su correcta clasificación.

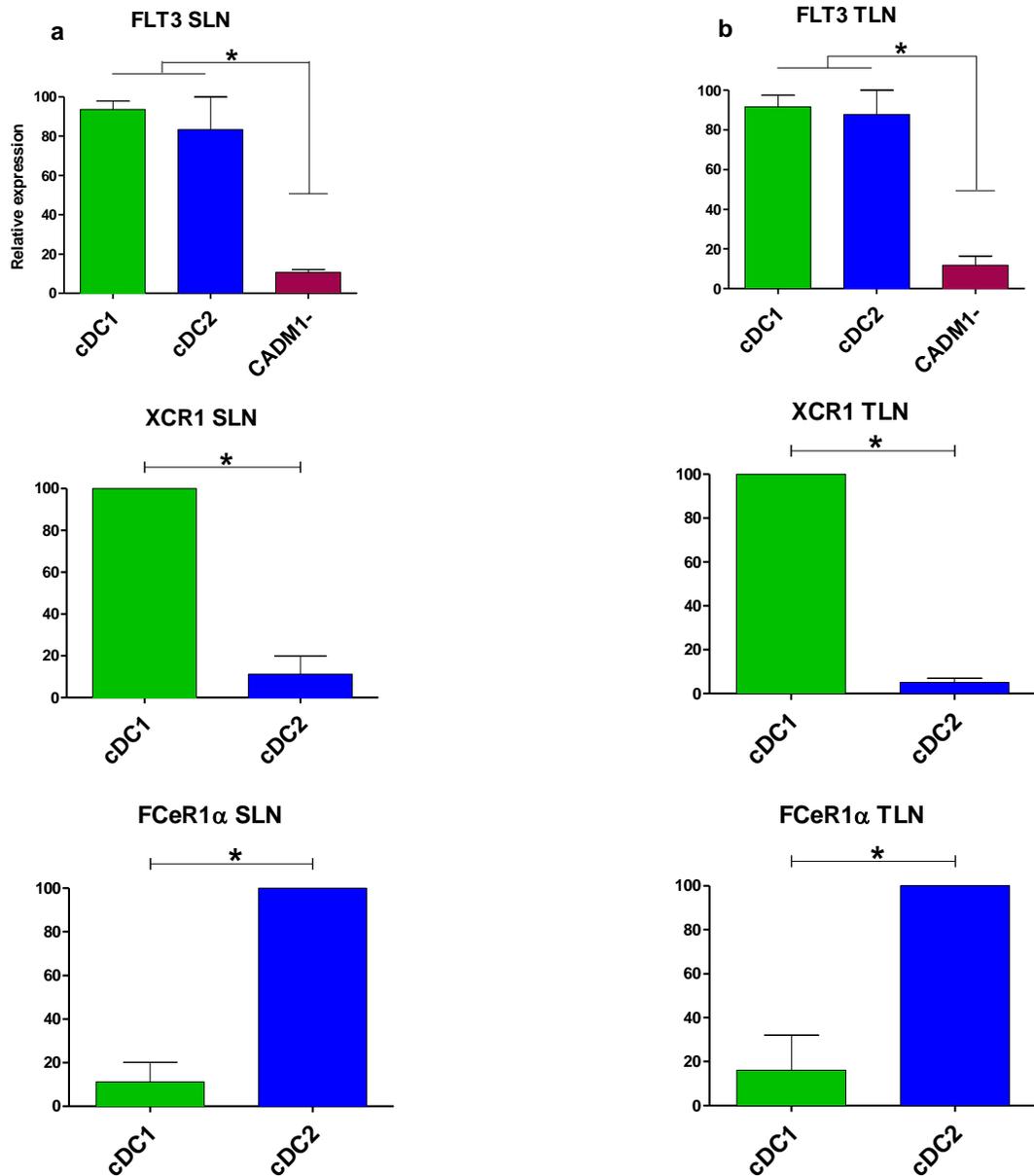


Figura 2: Expresión de transcritos característicos de las cDCs. Expresión de FLT3 en las subpoblaciones seleccionadas como cDC1, cDC2 y la población MHCII^{high}CD3⁻CD21⁻CD163⁻CADM1⁻ como control. Expresión de los transcritos XCR1 y FCeR1α en cDC1 y cDC2 en submaxilar (SLN) (a) y tonsila (TLN) (b). * indica p < 0.05

En pulmón (Maisonasse et al., 2015) y piel (Marquet et al., 2011) se reportó que las cDC1 son CD172a⁻, mientras que en sangre (Auray et al., 2016) y nuestros resultados en tejido linfático cDC1 es CD172a^{-low}. En sangre se reportó que las cDC2 son CD163⁺, mientras que en tráquea de cerdo se probó que las células CD163⁺ son FLT3⁻ (Reséndiz et al., 2018). En pulmón CD163 es expresado por MØs, moDCs y moMØs (Maisonasse et al., 2015) y en PAMs obtenidas de lavado bronquio-alveolar (Maisonasse et al., 2016). Si bien se puede discutir que la diferencia de expresión de ciertos receptores puede deberse al tejido utilizado, la estrategia de marcaje y la manipulación de las células, es importante analizar estas células por separado para saber si actúan como MØs o DCs.

Distribución de cDCs, cDC1 y cDC2 en Tejido Linfático Porcino

La frecuencia de cDCs totales (MHCII^{high}CADM1^{high}CD3⁻CD21⁻CD163⁻) fue evaluada en los cuatro tejidos linfáticos: tonsila (n=4; 10.65 ± 8.9), submaxilar (n=5; 12.28 ± 9.1), mesentérico (n=3; 11.43 ± 11.8) y bazo (n=3; 39.43 ± 12.08). El tejido con mayor presencia de cDCs fue el bazo (p=0.006) (Figura 3a), esto puede deberse a que la estructura interna del bazo es distinta a la de un nódulo linfático (Mebius and Kraal, 2005) y a su función como un filtro por el que entran muchas DCs por la sangre y son retenidas (Alvarez et al., 2008).

Al analizar la distribución de cDC1 y cDC2 en los tejidos se observó mayor presencia de cDC1 que cDC2, con diferencia significativa en submaxilar (p=0.0003) y bazo (p=0.03), mientras en mesentérico y tonsila no hubo diferencia significativa (Figura 3b). Esto es contrario con lo reportado en pulmón y lavado bronquio-alveolar de cerdo (Maisonasse et al., 2015, Maisonasse et al., 2016), bazo de ratón (Guilliams et al., 2016) y algunos tejidos linfáticos de humano (Granot et al., 2017), mientras que en mesentérico de ratón se reportó una mayor presencia de cDC1 (Bode et al., 2008). El alto porcentaje de un subtipo u otro en distintos tejidos, incluso en la sangre, puede ser indicativo de que tipo de respuesta predomina en ellos (Yang et al., 2018).

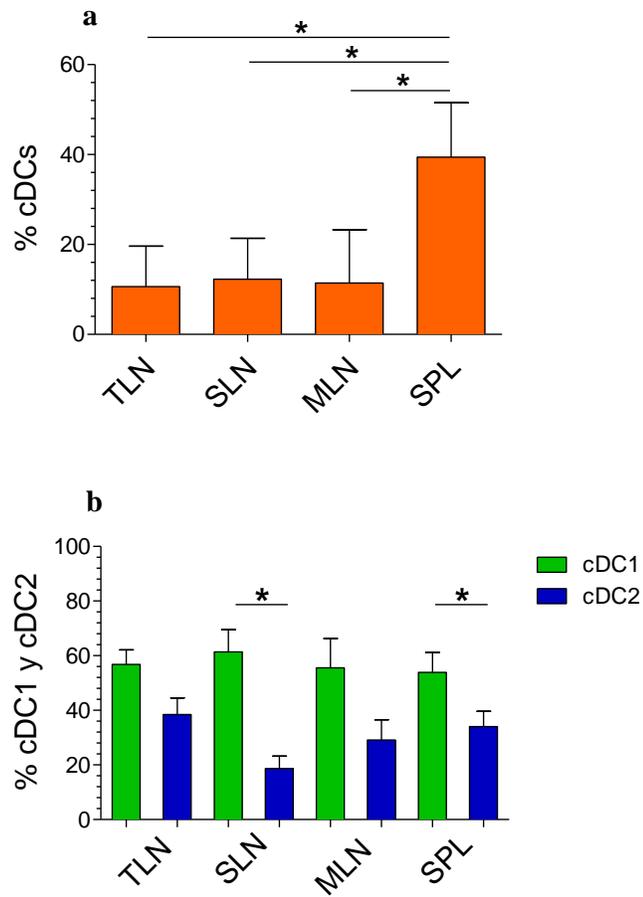


Figura 3: Distribución de las cDCs, cDC1 y cDC2 en diferentes tejidos linfáticos. Porcentajes de cDCs MHCII^{high}CADM1^{high} en tonsila (TLN), submaxilar (SLN), mesentérico (MLN) y bazo (SPL) (a). Evaluación de los porcentajes de cDC1 (barras negras) y cDC2 (barras blancas) en los diferentes tejidos. Se representan las medias \pm derivación estándar de siete (SLN), seis (TLN), tres (MLN), y cuatro (SPL) animales. * indica $p < 0.05$.

Expresión de DEC205 en cDCs, cDC1 y cDC2

El receptor DEC205 es un receptor de lectina tipo C se expresa en varios subtipos de DCs (Gutierrez-Martinez et al., 2015, Figdor et al., 2002) y es uno de los receptores más utilizados para el direccionamiento de antígenos (Bonifaz et al., 2004, Jáuregui-Zúñiga et al., 2017, Njongmeta et al., 2012). Por su importancia en las DCs, evaluamos la expresión de este receptor en cDCs, cDC1 y cDC2 de los distintos tejidos linfáticos (Figura 4). En todos los tejidos analizados hubo cDCs DEC205⁺, aunque hubo una gran variabilidad entre animales y tejidos (Figura 4b). En tejido submaxilar y mesentérico la expresión del receptor fue aparentemente más baja en las cDC1 mientras que en tonsila fue en las cDC2 (no significativo) (Figura 4c). En este ensayo encontramos cDCs, cDC1 y cDC2 DEC205⁺ y DEC205⁻, mientras que en sangre de cerdo se reportó que ambos subtipos de cDCs son DEC205⁺ (Auray et al., 2016). Debido a esta discrepancia decidimos analizar a las cDCs totales (MHCII^{high}CADM1^{high}) de tonsila con base a la expresión de DEC205, separando en dos fenotipos: MHCII^{high}CADM1^{high}DEC205⁺ y MHCII^{high}CADM1^{high}DEC205⁻ (Figura 5b). Al realizar un análisis de la expresión de FLT3 en estas dos poblaciones se encontró que solo las células con el fenotipo MHCII^{high}CADM1^{high}DEC205⁺ son FLT3⁺, es decir, las cDCs DEC205⁺ son las *bona fide* (Figura 5c).

A pesar de que nuestro análisis previo mostró que las células seleccionadas como cDCs, cDC1 y cDC2 (Figura 1d) son FLT3⁺ (Figura 2a y 2b) y que la mayoría de estas son DEC205⁺ (Figura 4b y 4c), este nuevo análisis (Figura 5b y 5c) indica que el poco porcentaje de células MHCII^{high}CADM1^{high}DEC205⁻ es otra población celular que afecta la pureza de la selección. Con este resultado confirmamos lo reportado en sangre y concluimos que las cDCs, cDC1 y cDC2 de tejido linfático de cerdo son DEC205⁺ y es necesario utilizar la expresión de este receptor para la correcta selección de cDCs *bona fide*.

Las cDCs de Tonsila de Animales Infeccionados son Negativas al PRRSV

El enfoque de nuestro estudio para evaluar la respuesta de las cDCs frente al PRRSV fue en células provenientes de tonsila provenientes de animales infectados (0, 5 y 7 dpi). Se eligió este tejido porque la tonsila es muy importante para la replicación y la permanencia en latencia del virus (Allende et al., 2000, Molina et al., 2008). Realizamos un marcaje intracelular de la proteína N del virus para analizar si las cDCs eran infectadas por éste; en este análisis no fue posible separar a las cDCs *bona fide* (DEC205⁺) por lo que trabajamos con la población MHCII^{high}CADM1^{high} (Figura 5a). Si bien la mayoría de las células de tonsila con ese fenotipo son DEC205⁺ (Figura 4b), existe un porcentaje de contaminación de otra población celular en nuestra selección; sin embargo, este estudio nos muestra una idea general de como las cDCs responden ante el PRRSV. Ensayos *in vitro* con moDCs (Flores-Mendoza et al., 2008, Loving et al., 2007) y BMDCs (Chang et al., 2008) han reportado que estas células son susceptibles a PRRSV, mientras que las cDCs de tejido de tráquea no lo son (Reséndiz et al., 2018).

Al igual con lo reportado en las cDCs de tráquea y pulmón (Reséndiz et al., 2018, Bordet et al., 2018a) la población celular que contiene a las cDCs de tonsila (MHCII^{high}CADM1^{high}) no fue infectada por PRRSV (Figura 6a y 6b). Caso contrario a las células CD163⁺ de tonsila donde dos de tres cerdos presentaron células PRRSV⁺ a los 5 dpi y uno a los 7 dpi, mientras que hubo PAMs PRRSV⁺ en ambos tiempos de infección (Figura 6). Nuestros resultados corroboran que los MØs de tonsila son células blanco para la infección por PRRSV al igual que otras células CD163⁺ de bazo (Yuste et al., 2017) y de tráquea (Reséndiz et al., 2018). El alto porcentaje de PAMs PRRSV⁺ reafirman que estas células son el blanco principal para la replicación viral, como ha sido reportado en otros estudios (Patton et al., 2009).

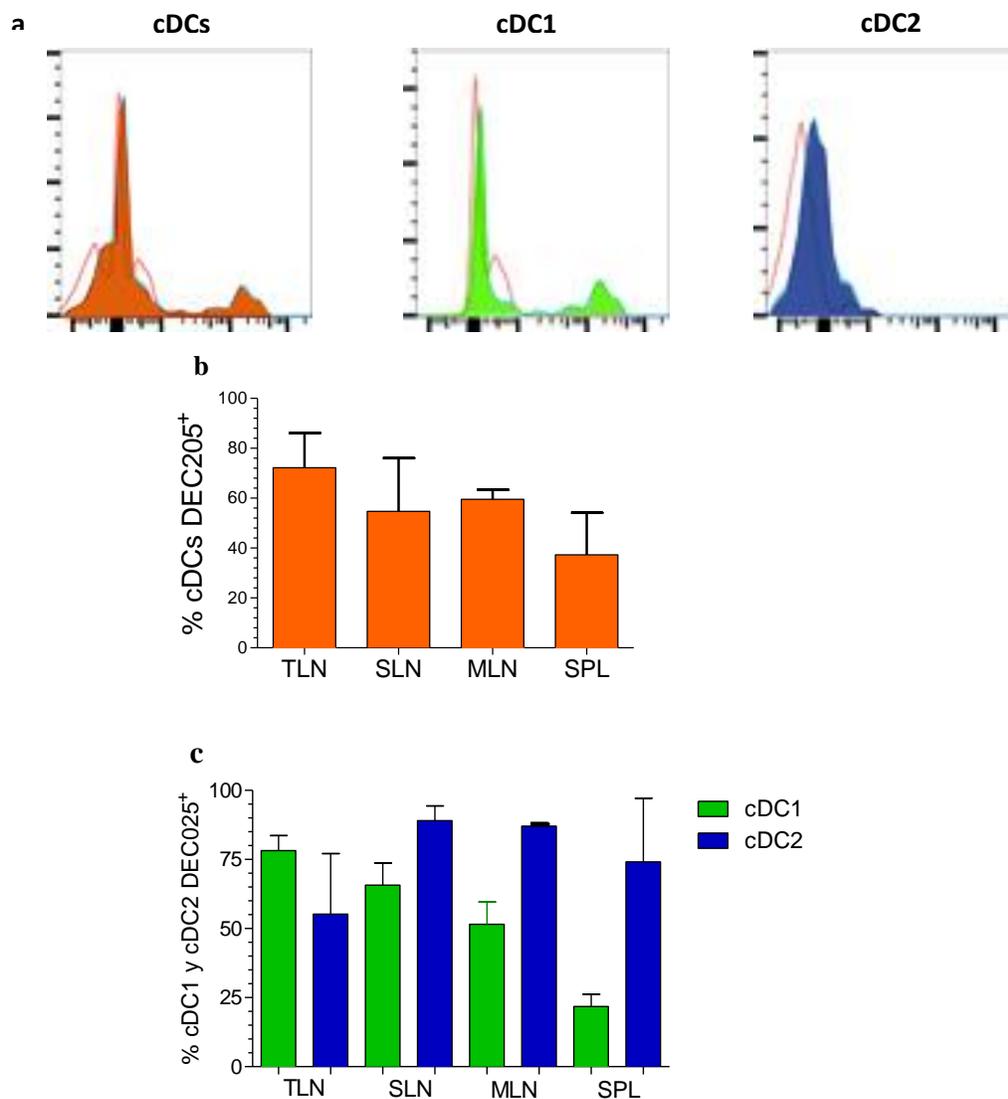


Figura 4: Expresión del receptor DEC205 en cDC, y las poblaciones de cDC1 y cDC2 en tejido linfoide. Histogramas representativos de la expresión de DEC205 en cDCs, cDC1 y cDC2 de tonsila (a). Porcentaje de cDCs (b), cDC1 y cDC2 (c) que expresan DEC205 en tonsila (TLN), ganglios submaxilares (SLN), mesentéricos (MLN) y bazo (SPL) en todos los tejidos linfoides. Los resultados son representativos de tres (TLN y SLN) o dos animales diferentes (MLN y SPL).

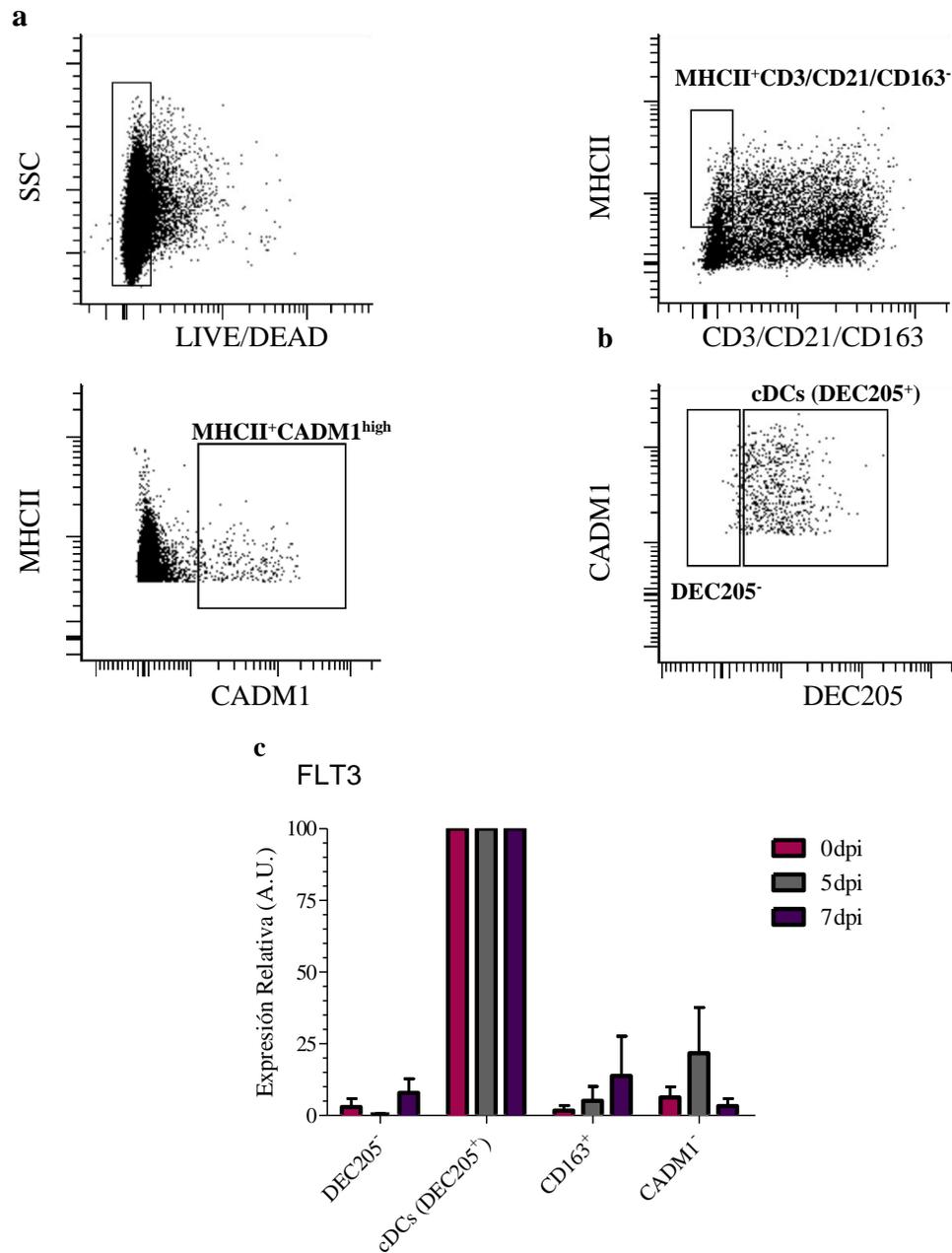


Figura 5: Fenotipo y expresión del FLT3 en cDCs DEC205⁺ de tonsila de cerdo. Análisis representativo de la recuperación de cDCs seleccionando primeramente a las células vivas seguida de la exclusión de células CD3⁺, CD21⁺ y CD163⁺ para la posterior selección de la población MHCII^{high}CADM1^{high} (a). Separación de las cDCs *bona fide* por la expresión de DEC205 (b). Evaluación de la expresión de FLT3 durante la infección en las cDCs DEC205⁺, células DEC205⁻, CD163⁺ y CADM1⁻ de tonsila, los resultados están expresados en Unidades Relativas tomando la población con la expresión más alta como el 100, el resto se normalizó a esta. El error estándar está indicado (c).

PRRSV no Afecta el Número de cDCs en Tonsila

Uno de los efectos reportados sobre la infección por PRRSV, es la inducción de apoptosis de APCs en pulmón, y tejido linfático incluyendo la tonsila (Rodríguez-Gómez et al., 2013, Morgan et al., 2016, Duan et al., 1997). Al comparar el porcentaje de PAMs se observó una disminución en la cantidad de células a los 5 y 7 dpi; mientras que las células CD163⁺ de tonsila no sufrieron ningún cambio durante la infección (Figura 7). Para evaluar el número de cDCs posterior a la infección, primeramente se analizó a la población MHCII⁺CADM1⁺ cuya proporción fue del 2% al 4% de las células MHCII⁺ totales. Posteriormente de esa población se evaluaron a las cDCs DEC205⁺ cuya frecuencia fue del 85% al 95% y no fue afectada durante la infección (Figura 7). Estos resultados pueden deberse a un recambio celular durante los tiempos analizados, o que en las primeras etapas de la infección las células de la tonsila no sufren un proceso de apoptosis que lleva a su reducción en número. Se ha reportado que en tejido linfático hay una moderada disminución de linfocitos (Morgan et al., 2016), caso contrario a lo que observamos en cDCs de tonsila.

Las cDCs de Tonsila Expresan IL-12 en Respuesta a PRRSV

Los trabajos mencionados previamente sobre la infección de moDCs (Flores-Mendoza et al., 2008) y BMDCs (Chang et al., 2008) han reportado que PRRSV puede modular la producción de citocinas, aunque este efecto puede variar dependiendo de la especie y cepa del virus que se utilice. La mayoría de los trabajos reportan una baja producción de citocinas pro-inflamatorias y altos niveles de IL-10 (Chang et al., 2008, Flores-Mendoza et al., 2008, Silva-Campa et al., 2012, Suradhat and Thanawongnuwech, 2003, Silva-Campa et al., 2010, Wang et al., 2007), aunque otros estudios afirman el tipo de citocina depende de la cepa de PRRSV utilizada en el estudio (Gimeno et al., 2011). En este trabajo se evaluó la expresión de las citocinas IFN- α , IL-12, IL-10 y TGF- β , así como la quimiocina CCR7 en cDCs totales de cerdo, para este estudio de infección no se

separaron los subtipos debido a la poca cantidad de células. No hubo cambios significativos en la expresión de IFN- α al evaluar las cDCs totales (Figura 8). En el estudio realizado por Reséndiz y cols. (Reséndiz et al., 2018), encontraron que las cDC1 y cDC2 de tráquea responden de forma distinta a la infección por PRRSV, las cDC1 tuvieron una alta expresión de ARNm de IFN- α , mientras que las cDC2 de IL-10. Las células CD163⁺ (MØs) de tráquea tuvieron una menor expresión de estos transcritos comparándolas con los dos subtipos de cDCs (Reséndiz et al., 2018). Es probable que la funcionalidad de las células CD163⁺ de tráquea se vea afectada al ser infectadas por PRRSV, como se ha reportado en otros estudios (Rodriguez-Gomez et al., 2013). Otro estudio de infección *in vitro* de DCs de pulmón y moDCs muestra un aumento de IFN- β a las 24 hpi, si bien la identidad de estas células no fue confirmada por la expresión de FLT3, es un indicativo de que las DCs de pulmón pueden responder al PRRSV (Loving et al., 2007). También se ha reportado que las cDC1 de pulmón producen mayor IFN- α que las cDC2 a los 10 dpi en una infección *in vivo* (Bordet et al., 2018a). Esto puede significar que al evaluar la expresión o producción de esta citocina por cada subtipo de cDCs, los cambios sean detectables, pero en términos generales en la población total de cDCs no es posible notar un cambio para esta citocina. La expresión de IL-12 aumentó a los 5 dpi y se redujo a los 7 dpi (Figura 8) en las cDCs totales, mientras que en las PAMs y células CD163⁺ no se observó este aumento. La producción de esta citocina ha sido reportada en pulmón de cerdos infectados (Yu et al., 2016) y moDCs (Park et al., 2008).

En nuestro estudio dos de tres cerdos presentaron una elevada expresión de IL-10 a los 0 dpi, esto sugiere que en estado basal es posible que las cDCs tengan alguna función regulatoria o tolerogénica. Las cDCs DEC205⁻ elevaron la expresión de TGF- β (dos de tres cerdos) a los 7dpi (Figura 8), se ha reportado que PRRSV puede estimular la producción de esta citocina como forma de evasión al sistema inmune (Silva-Campa et al., 2009). Fue reportado que las cDC2 de pulmón expresan TGF- β (Bordet et al., 2018a), nuestros resultados sugieren que las células DEC205⁻ también están siendo alteradas por el virus para la producción de citocinas regulatorias. Finalmente analizamos la expresión de ARNm del receptor de quimiocina CCR7, el cual se expresa en DCs que migran a

tejidos linfáticos (Lindstedt et al., 2005), no encontramos cambios en la expresión de este receptor. La variabilidad entre animales hace difícil detectar alguna diferencia estadística; sin embargo, es posible que las células disminuyen la expresión de CCR7 una vez llegan a la tonsila, es necesario contar con algún control positivo para la medición de la expresión de este gen.

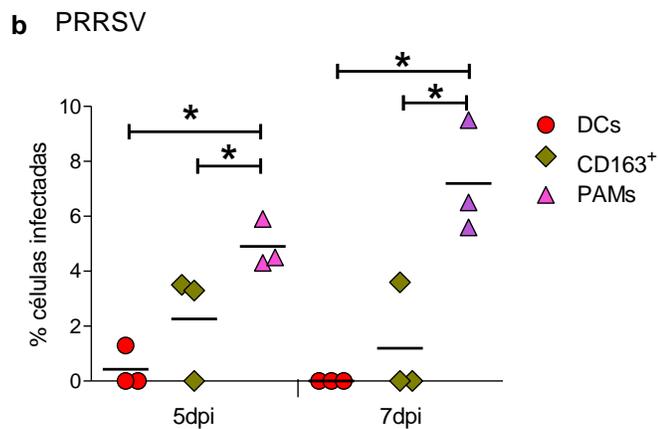
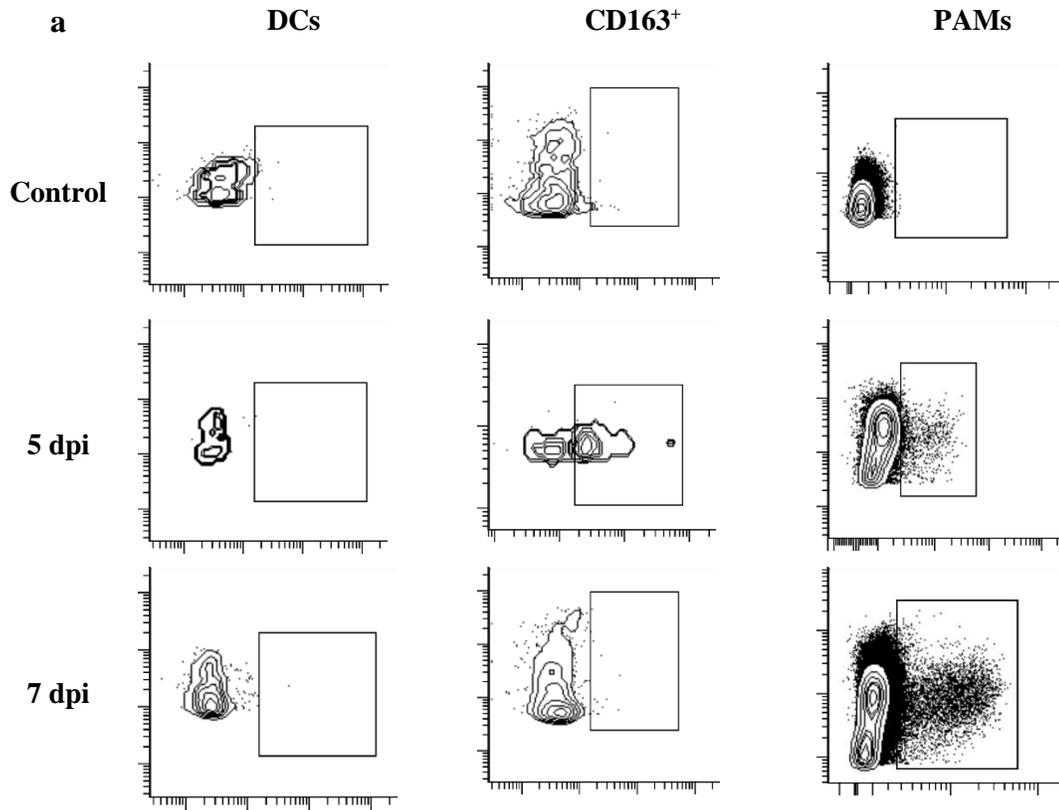


Figura 6: Evaluación de infección por PRRSV en DCs, células CD163⁺ de tonsila y PAMs. Análisis representativo de marcaje intracelular de PRRSV (a). Porcentaje de células PRRSV⁺ de cerdos infectados calculados del marcaje intracelular con anti-proteína N analizado por citometría de flujo. La figura muestra la media y cada símbolo representa un animal. * indica una $p < 0.05$ (b).

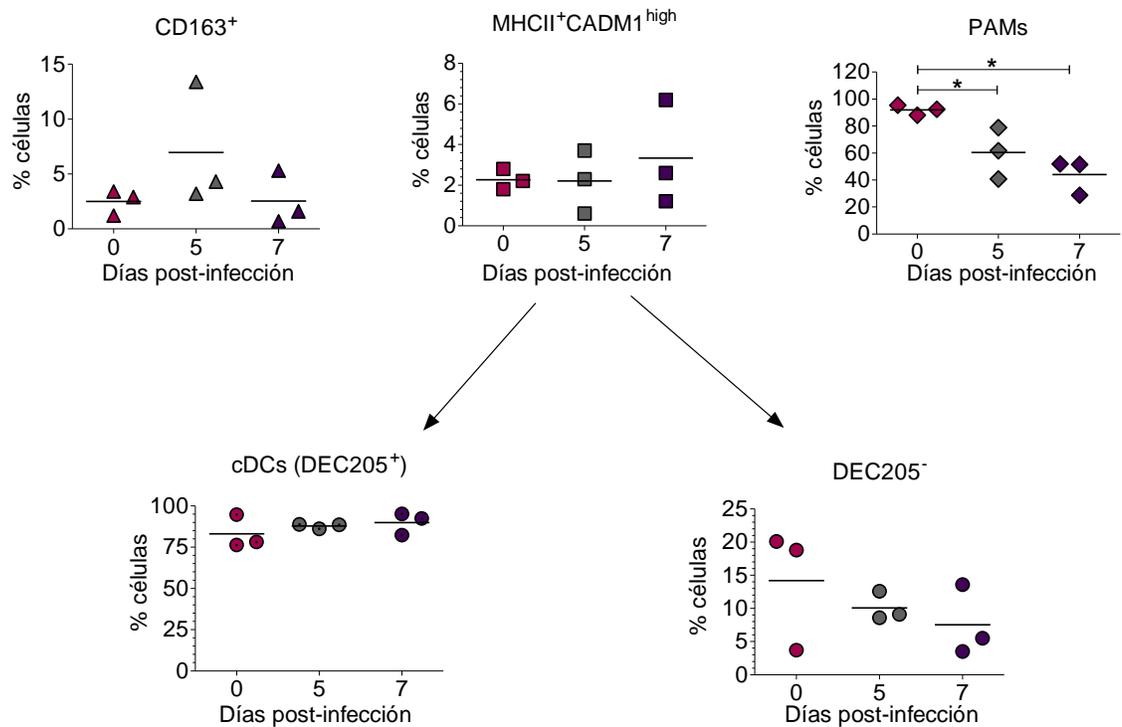


Figura 7: Frecuencia de células CD163⁺, MHCII⁺CADM1^{high}, cDCs DEC205⁺, células DEC205⁻ de tonsila y PAMs. Primero, se analizó el número de células MHCII⁺CADM1^{high} y en esta población, el número de cDCs DEC205⁺ y células DEC205⁻. El análisis incluyó el número de células de CD163⁺ y PAMs en cerdos sanos y cerdos infectados. La figura muestra la media y cada símbolo representa un animal. * indica una p < 0.05

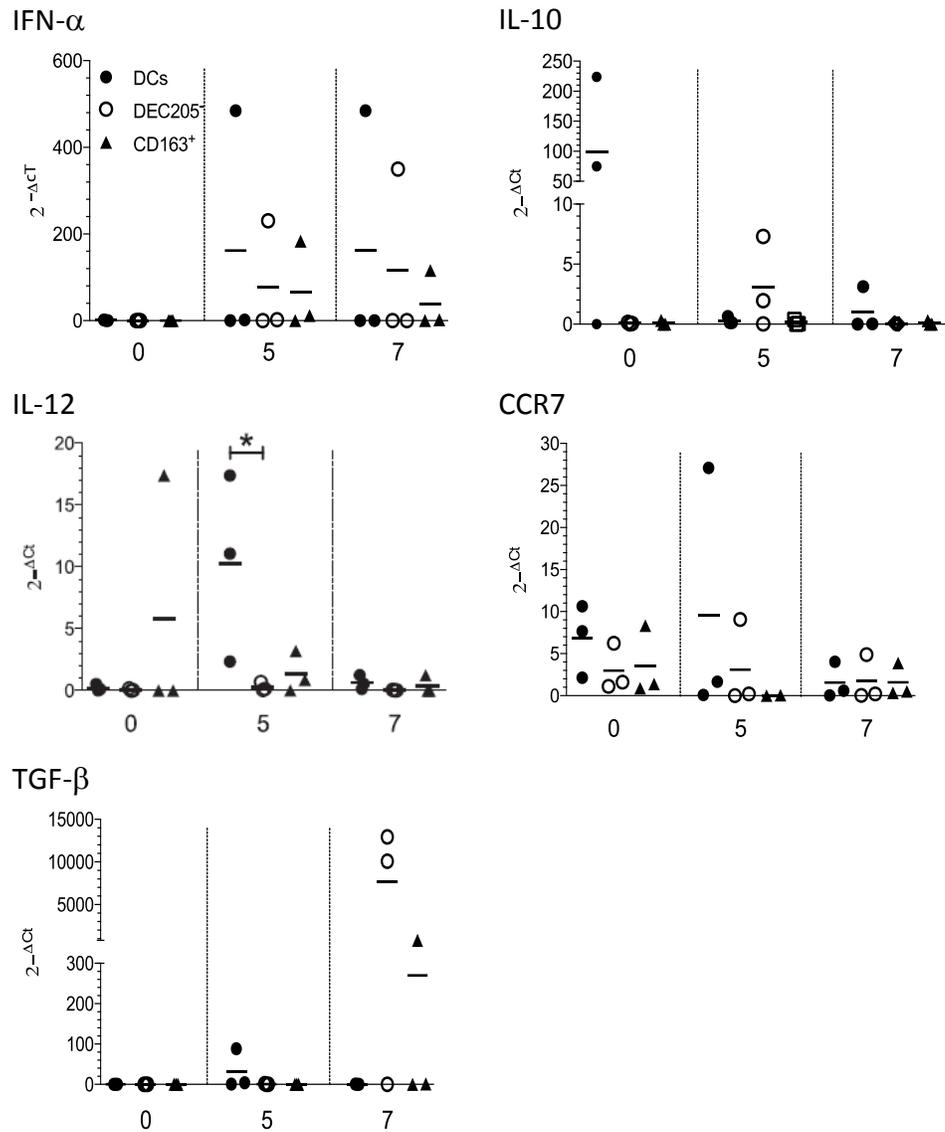


Figura 8: Expresión de citocinas en células CD163⁺, cDCs DEC205⁺, células DEC205⁺ de tonsila de cerdos infectados y no infectados con PRRSV. Los valores resultantes de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ y la media de tres animales se muestran para los niveles de expresión de IFN- α , IL-12, IL-10 y TGF- β citoquinas y CCR7 en el día 0 (control), 5 y 7 días después de la infección. La figura muestra la media y cada símbolo representa un animal. * indica una $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

1. Las cDCs de tonsila, bazo y ganglios submaxilar y mesentérico presentaron el fenotipo $CD3^-CD21^-CD163^-MHCII^{high}CADM1^+DEC205^+FLT3^+$, de esta población se separaron a las cDC1 con el fenotipo $MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low}XCR1^+$ y las cDC2 como $MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^+FCeR1\alpha^+$. Es recomendable el uso del receptor DEC205 para asegurar la selección de cDCs *bona fide*.
2. Nuestro experimento de infección *in vivo* demostró que las cDCs de tonsila de cerdo no son infectadas por PRRSV a los 5 dpi y 7 dpi.
3. No hubo cambios significativos en la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , ni en la pro-inflamatoria IFN- α en las cDCs DEC205⁺, pero hubo un incremento de IL-12 a los 5dpi lo que indica que las células tienen una respuesta frente al virus.

Podemos concluir de manera general que las cDCs DEC205⁺ tienen una respuesta de tipo inflamatoria con el aumento de la expresión de IL-12 a los 5dpi, a pesar de no ser infectadas por PRRSV.

Este trabajo sientan las bases para estudios posteriores con las cDCs y entender la inmunopatología del PRRSV, ya que es pionero en la caracterización de cDCs *bona fide* en tejidos linfáticos porcinos, así como de su resistencia a la infección y respuesta a PRRSV.

REFERENCIAS

- ADAMS, M. J., LEFKOWITZ, E. J., KING, A. M. Q., HARRACH, B., HARRISON, R. L., KNOWLES, N. J., KROPINSKI, A. M., KRUPOVIC, M., KUHN, J. H., MUSHEGIAN, A. R., NIBERT, M., SABANADZOVIC, S., SANFAÇON, H., SIDDELL, S. G., SIMMONDS, P., VARSANI, A., ZERBINI, F. M., GORBALENYA, A. E. & DAVISON, A. J. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol*, 162, 2505-2538.
- AHLBERG, V., HJERTNER, B., WALLGREN, P., HELLMAN, S., LÖVGREN BENGTSSON, K. & FOSSUM, C. 2017. Innate immune responses induced by the saponin adjuvant Matrix-M in specific pathogen free pigs. *Vet Res*, 48, 30.
- ALLENDE, R., LAEGREID, W. W., KUTISH, G. F., GALEOTA, J. A., WILLS, R. W. & OSORIO, F. A. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol*, 74, 10834-7.
- ALVAREZ, D., VOLLMANN, E. H. & VON ANDRIAN, U. H. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration %J *Immunity*. 29, 325-42.
- AOSHI, T., KOYAMA, S., KOBIYAMA, K., AKIRA, S. & ISHII, K. J. 2011. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol*, 1, 226-32.
- APPLEQUIST, S. E., WALLIN, R. P. & LJUNGGREN, H. G. 2002. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines %J *Int Immunol*. 14, 1065-74.
- ARDAVÍN, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 3, 582-90.
- AURAY, G., KELLER, I., PYTHON, S., GERBER, M., BRUGGMANN, R., RUGGLI, N. & SUMMERFIELD, A. 2016. Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences. *J Immunol*, 197, 4791-4806.
- BALAN, S., ARNOLD-SCHRAUF, C., ABBAS, A., COUESPEL, N., SAVORET, J., IMPERATORE, F., VILLANI, A. C., VU MANH, T. P., BHARDWAJ, N. & DALOD, M. 2018. Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity. *Cell Rep*, 24, 1902-1915.e6.
- BELTRÁN-BECK, B., ROMERO, B., BOADELLA, M., CASAL, C., BEZOS, J., MAZARIEGOS, M., MARTÍN, M., GALINDO, R. C., PÉREZ DE LA LASTRA, J. M., VILLAR, M., GARRIDO, J. M., SEVILLA, I. A., ASENSIO, F., SICILIA, J., LYASHCHENKO, K. P., DOMÍNGUEZ, L., JUSTE, R. A., DE LA FUENTE, J. & GORTÁZAR, C. 2014. Tonsils of the soft palate do not mediate the response of pigs to oral vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol*, 21, 1128-36.
- BIMCZOK, D., SOWA, E. N., FABER-ZUSCHRATTER, H., PABST, R. & ROTHKOTTER, H. J. 2005. Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system %J *Eur J Immunol*. 35, 1418-27.
- BODE, U., LORCHNER, M., AHRENDT, M., BLESSENOHL, M., KALIES, K., CLAUS, A., OVERBECK, S., RINK, L. & PABST, R. 2008. Dendritic cell subsets in lymph nodes are characterized by the specific draining area and influence the phenotype and fate of primed T cells %J *Immunology*. 123, 480-90.

- BONIFAZ, L. C., BONNYAY, D. P., CHARALAMBOUS, A., DARGUSTE, D. I., FUJII, S., SOARES, H., BRIMNES, M. K., MOLTEDO, B., MORAN, T. M. & STEINMAN, R. M. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*, 199, 815-24.
- BORDET, E., BLANC, F., TIRET, M., CRISCI, E., BOUGUYON, E., RENSON, P., MAISONNASSE, P., BOURGE, M., LEPLAT, J. J., GIUFFRA, E., JOUNEAU, L., SCHWARTZ-CORNIL, I., BOURRY, O. & BERTHO, N. 2018a. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type 1.3 Lena Triggers Conventional Dendritic Cells 1 Activation and T Helper 1 Immune Response Without Infecting Dendritic Cells. *Front Immunol*, 9, 2299.
- BORDET, E., MAISONNASSE, P., RENSON, P., BOUGUYON, E., CRISCI, E., TIRET, M., DESCAMPS, D., BERNELIN-COTTET, C., URIEN, C., LEFÈVRE, F., JOUNEAU, L., BOURRY, O., LEPLAT, J. J., SCHWARTZ-CORNIL, I. & BERTHO, N. 2018b. Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Sci Rep*, 8, 10172.
- BRETON, G., LEE, J., LIU, K. & NUSSENZWEIG, M. C. 2015. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat Protoc*, 10, 1407-22.
- BUTLER, J. E., LAGER, K. M., GOLDE, W., FAABERG, K. S., SINKORA, M., LOVING, C. & ZHANG, Y. I. 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol Res*, 59, 81-108.
- CALVERT, J. G., SLADE, D. E., SHIELDS, S. L., JOLIE, R., MANNAN, R. M., ANKENBAUER, R. G. & WELCH, S. K. 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*, 81, 7371-9.
- CALZADA-NOVA, G., SCHNITZLEIN, W., HUSMANN, R. & ZUCKERMANN, F. A. 2010. Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet Immunol Immunopathol*, 135, 20-33.
- CAMBI, A., KOOPMAN, M. & FIGDOR, C. G. 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol*, 7, 481-8.
- CHANG, H. C., PENG, Y. T., CHANG, H. L., CHAUNG, H. C. & CHUNG, W. B. 2008. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 129, 281-93.
- CRISCI, E., FRAILE, L. & MONTOYA, M. 2019. Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses. *Vet Sci*, 6.
- DAKIC, A., SHAO, Q. X., D'AMICO, A., O'KEEFFE, M., CHEN, W. F., SHORTMAN, K. & WU, L. 2004. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol*, 172, 1018-27.
- DE BAERE, M. I., VAN GORP, H., DELPUTTE, P. L. & NAUWYNCK, H. J. 2012. Interaction of the European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with sialoadhesin (CD169/Siglec-1) inhibits alveolar macrophage phagocytosis. *Vet Res*, 43, 47.
- DOBRESCU, I., LEVAST, B., LAI, K., DELGADO-ORTEGA, M., WALKER, S., BANMAN, S., TOWNSEND, H., SIMON, G., ZHOU, Y., GERDTS, V. & MEURENS, F. 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet Microbiol*, 169, 18-32.

- DRESS, R. J., WONG, A. Y. & GINHOUX, F. 2018. Homeostatic control of dendritic cell numbers and differentiation. *Immunol Cell Biol*, 96, 463-476.
- DUAN, X., NAUWYNCK, H. J. & PENSART, M. B. 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol*, 56, 9-19.
- EAST, L., RUSHTON, S., TAYLOR, M. E. & ISACKE, C. M. 2002. Characterization of sugar binding by the mannose receptor family member, Endo180. *J Biol Chem*, 277, 50469-75.
- FAIRBAIRN, L., KAPETANOVIC, R., SESTER, D. P. & HUME, D. A. 2011. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol*, 89, 855-71.
- FIGDOR, C. G., VAN KOOYK, Y. & ADEMA, G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *J Nat Rev Immunol*, 2, 77-84.
- FLORES-MENDOZA, L., SILVA-CAMPA, E., RESÉNDIZ, M., OSORIO, F. A. & HERNÁNDEZ, J. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 720-5.
- FLORES-MENDOZA, L., SOTELO-MUNDO, R. R., DAWSON, H., MWANGI, W. & HERNANDEZ, J. 2010. Characterization of porcine CD205. *Dev Comp Immunol*, 34, 715-21.
- GILLIET, M., CAO, W. & LIU, Y. J. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, 8, 594-606.
- GIMENO, M., DARWICH, L., DIAZ, I., DE LA TORRE, E., PUJOLS, J., MARTÍN, M., INUMARU, S., CANO, E., DOMINGO, M., MONTOYA, M. & MATEU, E. 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res*, 42, 9.
- GLIDDON, D. R., HOPE, J. C., BROOKE, G. P. & HOWARD, C. J. 2004. DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. *Immunology*, 111, 262-272.
- GRANOT, T., SENDA, T., CARPENTER, D. J., MATSUOKA, N., WEINER, J., GORDON, C. L., MIRON, M., KUMAR, B. V., GRIESEMER, A., HO, S. H., LERNER, H., THOME, J. J., CONNORS, T., REIZIS, B. & FARBER, D. L. 2017. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *J Immunity*, 46, 504-515.
- GUILLIAMS, M., DUTERTRE, C., SCOTT, C., MCGOVERN, N., SICHEN, D., CHAKAROV, S., VAN GASSEN, S., CHEN, J., POIDINGER, M., DE PRIJCK, S., TAVERNIER, S., LOW, I., IRAC, S., MATTAR, C., SUMATOH, H., LOW, G., CHUNG, T., CHAN, D., TAN, K., HON, T., FOSSUM, E., BOGEN, B., CHOOLANI, M., CHAN, J., LARBI, A., LUCHE, H., HENRI, S., SAEYS, Y., NEWELL, E., LAMBRECHT, B., MALISSEN, B. & GINHOUX, F. 2016. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45, 669-684.
- GUTIERREZ-MARTINEZ, E., PLANES, R., ANSELMINI, G., REYNOLDS, M., MENEZES, S., ADIKO, A. C., SAVEANU, L. & GUERMONPREZ, P. 2015. Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *J Front Immunol*, 6, 363.
- HAMILTON-EASTON, A. & EICHELBERGER, M. 1995. Virus-specific antigen presentation by different subsets of cells from lung and mediastinal lymph node tissues of influenza virus-infected mice. *J Virol*, 69, 6359-66.

- HAVERSON, K., BAILEY, M., HIGGINS, V. R., BLAND, P. W. & STOKES, C. R. 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues %J *J Immunol Methods*, 170, 233-45.
- HORTER, D. C., POGRANICHNIY, R. M., CHANG, C. C., EVANS, R. B., YOON, K. J. & ZIMMERMAN, J. J. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol*, 86, 213-28.
- IWASAKI, A. 2007. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 25, 381-418.
- JAMIN, A., GORIN, S., LE POTIER, M. F. & KUNTZ-SIMON, G. 2006. Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood %J *Vet Immunol Immunopathol*, 114, 224-37.
- JIANG, W., SWIGGARD, W. J., HEUFLER, C., PENG, M., MIRZA, A., STEINMAN, R. M. & NUSSENZWEIG, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375, 151-5.
- JUNG, K., RENUKARADHYA, G. J., ALEKSEEV, K. P., FANG, Y., TANG, Y. & SAIF, L. J. 2009. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity and alters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratory coronavirus: implications for respiratory viral co-infections. *J Gen Virol*, 90, 2713-23.
- JÁUREGUI-ZÚÑIGA, D., PEDRAZA-ESCALONA, M., ESPINO-SOLÍS, G. P., QUINTERO-HERNÁNDEZ, V., OLVERA-RODRÍGUEZ, A., DÍAZ-SALINAS, M. A., LÓPEZ, S. & POSSANI, L. D. 2017. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example. *Res Vet Sci*, 111, 55-62.
- KAMATH, A. T., HENRI, S., BATTYE, F., TOUGH, D. F. & SHORTMAN, K. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*, 100, 1734-41.
- KAPSENBERG, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, 3, 984-93.
- KARSUNKY, H., MERAD, M., COZZIO, A., WEISSMAN, I. L. & MANZ, M. G. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 198, 305-13.
- KATO, M., MCDONALD, K. J., KHAN, S., ROSS, I. L., VUCKOVIC, S., CHEN, K., MUNSTER, D., MACDONALD, K. P. & HART, D. N. 2006. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol*, 18, 857-69.
- KELSALL, B. L. & LEON, F. 2005. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews*, 206, 132-148.
- KLAGGE, I. M. & SCHNEIDER-SCHAULIES, S. 1999. Virus interactions with dendritic cells. *Journal of General Virology*, 80, 823-833.
- KOYAMA, S., ISHII, K. J., COBAN, C. & AKIRA, S. 2008. Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43, 336-41.
- LAMONTAGNE, L., PAGE, C., LAROCHELLE, R. & MAGAR, R. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells %J *Viral Immunol*, 16, 395-406.
- LINDSTEDT, M., LUNDBERG, K. & BORREBAECK, C. A. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol*, 175, 4839-46.

- LOPEZ-ROBLES, G., SILVA-CAMPA, E., BURGARA-ESTRELLA, A. & HERNANDEZ, J. 2015. Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system. *Res Vet Sci*, 100, 80-7.
- 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, 217-29.
- LUNNEY, J. K., FANG, Y., LADINIG, A., CHEN, N., LI, Y., ROWLAND, B. & RENUKARADHYA, G. J. 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci*, 4, 129-54.
- MACRI, C., DUMONT, C., JOHNSTON, A. P. R. & MINTERN, J. D. 2016. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness %J Clinical & Translational Immunology. 5, e66.
- MAISONNASSE, P., BORDET, E., BOUGUYON, E. & BERTHO, N. 2016. Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts. *PLoS One*, 11, e0167315.
- MAISONNASSE, P., BOUGUYON, E., PITON, G., EZQUERRA, A., URIEN, C., DELOIZY, C., BOURGE, M., LEPLAT, J. J., SIMON, G., CHEVALIER, C., VINCENT-NAULLEAU, S., CRISCI, E., MONTOYA, M., SCHWARTZ-CORNIL, I. & BERTHO, N. 2015. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunol*.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-86.
- MARQUET, F., BONNEAU, M., PASCALE, F., URIEN, C., KANG, C., SCHWARTZ-CORNIL, I. & BERTHO, N. 2011. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS One*, 6, e16320.
- MEBIUS, R. E. & KRAAL, G. 2005. Structure and function of the spleen %J Nat Rev Immunol. 5, 606-16.
- MERAD, M., SATHE, P., HELFT, J., MILLER, J. & MORTHA, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting %J Annu Rev Immunol. 31, 563-604.
- MOLINA, R. M., CHA, S. H., CHITTICK, W., LAWSON, S., MURTAUGH, M. P., NELSON, E. A., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., YOON, K. J., EVANS, R., ROWLAND, R. R., WU, W. & ZIMMERMAN, J. J. 2008. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 126, 283-92.
- MORGAN, S. B., FROSSARD, J. P., PALLARES, F. J., GOUGH, J., STADEJEK, T., GRAHAM, S. P., STEINBACH, F., DREW, T. W. & SALGUERO, F. J. 2016. Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity. *Transbound Emerg Dis*, 63, 285-95.
- NEIBURGER, J. B., NEIBURGER, R. G., RICHARDSON, S. T., GROSFELD, J. L. & BAEHNER, R. L. 1976. Distribution of T and B lymphocytes in lymphoid tissue of infants and children. *Infect Immun*, 14, 118-21.
- NEUMANN, E. J., KLIEBENSTEIN, J. B., JOHNSON, C. D., MABRY, J. W., BUSH, E. J., SEITZINGER, A. H., GREEN, A. L. & ZIMMERMAN, J. J. 2005. Assessment of the economic impact of

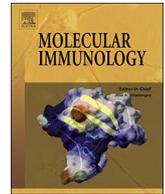
- porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 227, 385-92.
- NIEZOLD, T., STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN, M., MAASKE, A., TEMCHURA, V., HEINECKE, V., HANNAMAN, D., BUER, J., EHRHARDT, C., HANSEN, W., ÜBERLA, K. & TENBUSCH, M. 2015. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: immunity or tolerance? *Immunology*, 145, 519-33.
- NJONGMETA, L. M., BRAY, J., DAVIES, C. J., DAVIS, W. C., HOWARD, C. J., HOPE, J. C., PALMER, G. H., BROWN, W. C. & MWANGI, W. 2012. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4(+) T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. *Vaccine*, 30, 1624-35.
- NONACS, R., HUMBORG, C., TAM, J. P. & STEINMAN, R. M. 1992. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, 176, 519-29.
- OPPENHEIM, J. J., BIRAGYN, A., KWAK, L. W. & YANG, D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62, 17-21.
- PARK, J. Y., KIM, H. S. & SEO, S. H. 2008. Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1709-16.
- PARRA-SÁNCHEZ, H., PUEBLA-CLARK, L., RESÉNDIZ, M., VALENZUELA, O. & HERNÁNDEZ, J. 2018. Characterization and expression of DEC205 in the cDC1 and cDC2 subsets of porcine dendritic cells from spleen, tonsil, and submaxillary and mesenteric lymph nodes. *Mol Immunol*, 96, 1-7.
- PATTON, J. B., ROWLAND, R. R., YOO, D. & CHANG, K. O. 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res*, 140, 161-71.
- PIRIOU-GUZYLACK, L. & SALMON, H. 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *J Vet Res*. 39, 54.
- POLTORAK, M. P. & SCHRAML, B. U. 2015. Fate mapping of dendritic cells. *Front Immunol*, 6, 199.
- PRÖLL, M. J., NEUHÖFF, C., SCHELLANDER, K., UDDIN, M. J., CINAR, M. U., SAHADEVAN, S., QU, X., ISLAM, M. A., POIRIER, M., MÜLLER, M. A., DROSTEN, C., TESFAYE, D., THOLEN, E. & GROÙE-BRINKHAUS, C. 2017. Transcriptome profile of lung dendritic cells after in vitro porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *PLoS One*, 12, e0187735.
- PUEBLA-CLARK, L., PARRA-SANCHEZ, H., RESENDIZ, M., VALENZUELA, O. & HERNANDEZ, J. 2019. Tonsil conventional dendritic cells are not infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 529, 65-72.
- RESÉNDIZ, M., VALENZUELA, O. & HERNÁNDEZ, J. 2018. Response of the cDC1 and cDC2 subtypes of tracheal dendritic cells to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*. 223, 27-33.
- RODRIGUEZ-GOMEZ, I. M., GOMEZ-LAGUNA, J. & CARRASCO, L. 2013. Impact of PRRSV on activation and viability of antigen presenting cells. *World J Virol*, 2, 146-51.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, I. M., GÓMEZ-LAGUNA, J., BARRANCO, I., PALLARÉS, F. J., RAMIS, G., SALGUERO, F. J. & CARRASCO, L. 2013. Downregulation of antigen-presenting cells in

- tonsil and lymph nodes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs. *Transbound Emerg Dis*, 60, 425-37.
- ROSSI, M. & YOUNG, J. W. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*, 175, 1373-81.
- ROSSOW, K. D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology*, 35, 1-20.
- SCHLITZER, A. & GINHOUX, F. 2014. Organization of the mouse and human DC network. *Curr Opin Immunol*, 26, 90-9.
- SCHLITZER, A., SIVAKAMASUNDARI, V. & CHEN, J. 2015. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. 16, 718-28.
- SCHULTZE, J. L. & ASCHENBRENNER, A. C. 2019. Systems immunology allows a new view on human dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol*, 86, 15-23.
- SHI, M., LAM, T. T., HON, C. C., HUI, R. K., FAABERG, K. S., WENNBLOM, T., MURTAUGH, M. P., STADEJEK, T. & LEUNG, F. C. 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res*, 154, 7-17.
- SHORTMAN, K. & HEATH, W. R. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev*, 234, 18-31.
- SILVA-CAMPA, E., CORDOBA, L., FRAILE, L., FLORES-MENDOZA, L., MONTOYA, M. & HERNANDEZ, J. 2010. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells %J *Virology*. 396, 264-71.
- SILVA-CAMPA, E., FLORES-MENDOZA, L., RESÉNDIZ, M., PINELLI-SAAVEDRA, A., MATA-HARO, V., MWANGI, W. & HERNÁNDEZ, J. 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 387, 373-9.
- SILVA-CAMPA, E., MATA-HARO, V., MATEU, E. & HERNÁNDEZ, J. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs). *Virology*, 430, 73-80.
- SILVIN, A., YU, C. I., LAHAYE, X., IMPERATORE, F., BRAULT, J. B., CARDINAUD, S., BECKER, C., KWAN, W. H., CONRAD, C., MAURIN, M., GOUDOT, C., MARQUES-LADEIRA, S., WANG, Y., PASCUAL, V., ANGUIANO, E., ALBRECHT, R. A., IANNAcone, M., GARCÍA-SASTRE, A., GOUD, B., DALOD, M., MORIS, A., MERAD, M., PALUCKA, A. K. & MANEL, N. 2017. Constitutive resistance to viral infection in human CD141. *Sci Immunol*, 2.
- SINKORA, J., REHAKOVA, Z., SINKORA, M., CUKROWSKA, B. & TLASKALOVA-HOGENOVA, H. 2002. Early development of immune system in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 87, 301-6.
- SINKORA, M. & BUTLER, J. E. 2009. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol*, 33, 273-83.
- SNIJDER, E. J., KIKKERT, M. & FANG, Y. 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J Gen Virol*, 94, 2141-63.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-62.
- STEINMAN, R. M. & HEMMI, H. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity %J *Curr Top Microbiol Immunol*. 311, 17-58.

- STEINMAN, R. M. & WITMER, M. D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice %J Proc Natl Acad Sci U S A. 75, 5132-6.
- SUMMERFIELD, A., AURAY, G. & RICKLIN, M. 2015. Comparative dendritic cell biology of veterinary mammals. *Annu Rev Anim Biosci*, 3, 533-57.
- SUMMERFIELD, A. & MCCULLOUGH, K. C. 2009. The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol*, 33, 299-309.
- SURADHAT, S. & THANAWONGNUWECH, R. 2003. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 84, 2755-60.
- SÁNCHEZ, C., DOMÉNECH, N., VÁZQUEZ, J., ALONSO, F., EZQUERRA, A. & DOMÍNGUEZ, J. 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol*, 162, 5230-7.
- TAKEUCHI, S. & FURUE, M. 2007. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol Int*, 56, 215-23.
- TERRAZAS, C. A., TERRAZAS, L. I. & GOMEZ-GARCIA, L. 2010. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 357106.
- VAN BREEDAM, W., DELPUTTE, P. L., VAN GORP, H., MISINZO, G., VANDERHEIJDEN, N., DUAN, X. & NAUWYNCK, H. J. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol*, 91, 1659-67.
- VERSTEEG, G. A. & GARCÍA-SASTRE, A. 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol*, 13, 508-16.
- WANG, L., HU, S., LIU, Q., LI, Y., XU, L., ZHANG, Z., CAI, X. & HE, X. 2017. Porcine alveolar macrophage polarization is involved in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication. *J Vet Med Sci*, 79, 1906-1915.
- WANG, T. Y., LIU, Y. G., LI, L., WANG, G., WANG, H. M., ZHANG, H. L., ZHAO, S. F., GAO, J. C., AN, T. Q., TIAN, Z. J., TANG, Y. D. & CAI, X. H. 2018. Porcine alveolar macrophage CD163 abundance is a pivotal switch for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Oncotarget*, 9, 12174-12185.
- WANG, X., EATON, M., MAYER, M., LI, H., HE, D., NELSON, E. & CHRISTOPHER-HENNINGS, J. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol*, 152, 289-303.
- WEESENDORP, E., STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N., POPMA-DE GRAAF, D. J., FIJTEN, H. & REBEL, J. M. 2013. Phenotypic modulation and cytokine profiles of antigen presenting cells by European subtype 1 and 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in vitro and in vivo. *Vet Microbiol*, 167, 638-50.
- WILLS, R. W., DOSTER, A. R., GALEOTA, J. A., SUR, J. H. & OSORIO, F. A. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol*, 41, 58-62.
- WU, H., ZHANG, G., ROSS, C. R. & BLECHA, F. 1999. Cathelicidin gene expression in porcine tissues: roles in ontogeny and tissue specificity. *Infect Immun*, 67, 439-42.
- YANG, Z., DENG, F. & MENG, L. 2018. Effect of dendritic cell immunotherapy on distribution of dendritic cell subsets in non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med*, 15, 4856-4860.

- YU, Z., HUANG, C., ZHANG, Q. & FENG, W. H. 2016. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces IL-12p40 production through JNK-AP-1 and NF- κ B signaling pathways. *Virus Res*, 225, 73-81.
- YUSTE, M., FERNÁNDEZ-CABALLERO, T., PRIETO, C., ÁLVAREZ, B., MARTÍNEZ-LOBO, J., SIMARRO, I., CASTRO, J. M., ALONSO, F., EZQUERRA, Á., DOMÍNGUEZ, J. & REVILLA, C. 2017. Splenic CD163. *Vet Microbiol*, 198, 72-80.

APÉNDICES



Characterization and expression of DEC205 in the cDC1 and cDC2 subsets of porcine dendritic cells from spleen, tonsil, and submaxillary and mesenteric lymph nodes

Héctor Parra-Sánchez^{a,1}, Lucinda Puebla-Clark^{a,1}, Mónica Reséndiz^a, Olivia Valenzuela^b, Jesús Hernández^{a,*}

^a Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Kilómetro 0.6 carretera a la Victoria, 83304, Hermosillo, Sonora, Mexico

^b Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Porcine
Dendritic cells
cDC1
cDC2
DEC205

ABSTRACT

Conventional dendritic cells (cDCs) are divided into the following different subtypes: cDC1, which promotes a Th1 response, and cDC2, which stimulates a Th2 and Th17 response. These cells have not been characterized in porcine lymphoid tissues. DEC205 is a receptor that increases antigen presentation and allows DCs to cross-present antigens. The objectives of this work were to characterize cDCs subsets in the tonsil, submaxillary and mesenteric lymph nodes and spleen lymphoid tissues and to determine their expression of DEC205 by flow cytometry. The cDC1 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/low}) and cDC2 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺) phenotypes were confirmed by the expression of characteristic cDC1 and cDC2 transcripts (FLT3, XCR1 and FCER1 α). Among all lymphoid tissues, the spleen had the highest frequency of total cDCs. The cDC1:cDC2 ratio showed that all lymph tissues had higher levels of cDC1 than levels of cDC2. DEC205⁺ cDCs were found in all analyzed tissues, albeit with different frequencies. Our research will facilitate the study on the function of these cells and the investigation of the strategies for DEC205 targeting and functional studies.

1. Introduction

Dendritic cells (DCs) are distinguished from other antigen-presenting cells by their sentinel role in both non-lymphoid and lymphoid tissues as well as their ability to migrate to the T cell-rich areas of lymph nodes (Steinman, 1991). DCs serve as the link between the innate and adaptive immune response by driving naïve lymphocytes into distinct classes of effector cells to initiate T cell-mediated immunity (Steinman, 1991; Mellman and Steinman, 2001; Vega-Ramos et al., 2014). There are two major DC populations: plasmacytoid DCs (pDCs) and conventional or classical DCs (cDCs). cDCs are divided into two different subtypes or subsets: cDC1 and cDC2 (Schlitzer et al., 2015a). Cross-presentation of antigens to CD8 T cells and the Th1 differentiation of these cells characterize the cDC1 cells, whereas the cDC2 subtype is specialized to activate CD4 T cells and promote Th2 and Th17 differentiation (Schlitzer and Ginhoux, 2014; Schlitzer et al., 2015b).

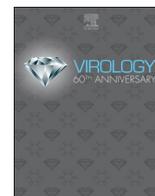
The cDC1 and cDC2 subtypes have been characterized in various species, and several studies have evaluated markers that facilitate the study of these cells, especially in the context of research that uses

animal models for human diseases (Summerfield et al., 2015; Dutertre et al., 2014; Guillems et al., 2016). Guillems et al. (2016) proposed various cell markers that are common between mice, human and macaque to identify the cDC1 and cDC2 subtypes in different tissues. Specifically, the cDC1 subtype is identified as XCR1^{hi}CADM1^{hi}CD172a⁻IRF8^{hi}IRF4^{lo}, and the cDC2 subtype as XCR1⁻CD172a^{hi}IRF8^{lo}IRF4^{hi} (Guillems et al., 2016). Swine are an important animal model for human research due to their physiologic, anatomic and immunologic similarity. In the field of DCs, Marquet et al. (2011, 2014) characterized the skin cDCs and found that the CD172a⁻XCR1⁺ (which is homologous to human BDCA3⁺) and CD172a⁺XCR1⁻ (homologous to human BDCA1⁺) subsets correspond to cDC1 and cDC2, respectively (Marquet et al., 2011; Marquet et al., 2014). Maisonnasse et al. (2016a,b) described similar results in lung and bronchoalveolar lavage (Maisonnasse et al., 2016a; Maisonnasse et al., 2016b). Auray et al. (2016) recently characterized porcine blood cDCs, and classified cDC1 as CD135⁺CD172a^{lo}CADM1⁺ and cDC2 as CD135⁺CD172a⁺CADM1⁺ (Auray et al., 2016); meanwhile, Edwards et al. (2017) classified cDCs as CD1⁻ (Lin⁻CD172a⁺CD1⁻CD4⁻), and

* Corresponding author.

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

¹ These authors contributed equally to this work.



Tonsil conventional dendritic cells are not infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Lucinda Puebla-Clark^a, Héctor Parra-Sánchez^a, Mónica Reséndiz^a, Olivia Valenzuela^b, Jesús Hernández^{a,*}

^a Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria km 0.6 C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, Mexico

^b Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Porcine
Dendritic cells
PRRSV
Tonsil
DEC205
CD163
Macrophages
Alveolar macrophages

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infects monocyte-derived DCs, and previous reports have shown that PRRSV does not infect conventional DCs (cDCs) *in vitro*, but the effects on cDCs from lymphoid tissues are unknown. This study analyzed the response and susceptibility of tonsil DEC205⁺ cDCs from infected pigs. We confirmed the phenotype and lineage of *bona fide* tonsil cDCs with the mRNA expression of FLT3⁺ and the phenotype MHCII⁺CADM1^{high}DEC205⁺ (DEC205⁺cDCs). These cells were not infected by PRRSV, whereas CD163⁺ tonsil cells were infected. The numbers of tonsil cDCs and CD163⁺ cells were not affected by PRRSV, in contrast to the reduction in alveolar macrophage numbers. DEC205⁺cDCs exhibited an increase in the expression of IL-12 at 5 days postinfection, suggesting a proinflammatory response by these cells to the virus. In summary, this study confirms that, *in vitro* and *in vivo*, cDCs are not susceptible to PRRSV but can respond against it.

1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the cause of the greatest losses in the porcine industry. This virus belongs to the *Arteriviridae* family and is classified in the *Porartevirus* genus and divided into PRRSV-1 (European) and PRRSV-2 (American) species (Adams et al., 2017). PRRSV affects pigs of different ages, and the infection can be classified into three stages: an acute stage with viral loads in the serum and virus replication in the lymphoid tissues, a persistent stage with lower replication in the lymph nodes (LNs) and the virus clearance stage (Lunney et al., 2016). After infection by the oronasal route, PRRSV replicates in monocyte/macrophages of the nasal and tracheal mucosa, tonsils, lungs and other lymphoid tissues (Li et al., 2012; Rossow et al., 1994). However, the main replication sites of PRRSV are tissue-resident and alveolar macrophages. A characteristic of PRRSV is its long-term persistence in the lungs and especially in the LNs; in the tonsils, viral RNA has been found until 251 days postinfection (dpi) (Allende et al., 2000).

DCs are the most effective antigen presenting cells (APCs) and are essential to providing innate resistance and activating the adaptive response thanks to their role as the sentinels of the immune system (Banchereau and Steinman, 1998; Schlitzer and Ginhoux, 2014;

Steinman and Hemmi, 2006). DCs are classified as classical/conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). cDCs are located in the LNs and nonlymphoid tissues, and the resident cDCs of the LNs can remain there for their entire lifespan, whereas tissue cDCs constantly migrate throughout the afferent lymphatic vessels into the LNs to present antigens (Förster et al., 2012; Merad et al., 2013). In human tonsils there seems to be no presence of CD141^{hi} cross-presenting migratory DCs (cDC1) (Haniffa et al., 2012); however, a transcriptional analysis of human tonsil cDC1 and cDC2, indicates that these cells express the lymphoid migration receptor CCR7, along with other chemokines and chemokines receptors (Lindstedt et al., 2005). Mice lack of tonsils but their nasal-associated lymphoid tissue (NALT) functions in a very similar way (Velin et al., 1997), DCs from porcine tonsil, and other lymphoid tissues, have been previously characterized by us (Parra-Sanchez et al., 2018) (MHCII^{high}CADM1^{high}CD3⁺CD21⁺CD163⁺), and the expression levels of FLT3 and XCR1 and FCeR1 α can be used to discriminate between cDC1 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a^{-/lo}) and cDC2 (MHCII^{high}CADM1^{high}CD172a⁺) cells in the lineage. We also evaluated the expression of DEC205, a C-type lectin receptor also expressed by blood cDCs (Parra-Sanchez et al., 2018). Recently, Soldevila et al. (2018) defined different myeloid cell populations from porcine tonsil, including cDCs (Soldevila et al., 2018).

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.012>

Received 25 October 2018; Received in revised form 10 January 2019; Accepted 11 January 2019

Available online 14 January 2019

0042-6822/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.