

## Efecto del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) genotipo Americano y Europeo en la regulación de la respuesta inmune de células dendríticas

E. Silva<sup>1</sup>, M. Reséndiz<sup>1</sup>, L. Flores<sup>1</sup>, L. Fraile<sup>2,3</sup>, M. Montoya<sup>2,3</sup>, J. Hernández<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología, CIAD A.C. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>2</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries (IRTA), Barcelona, Spain.

C-electrónico: jhdez@ciad.mx

### Introducción

La respuesta inmune adaptativa de cerdos infectados con el virus de PRRS sugiere que existe un mecanismo inmunosupresor o que el virus es capaz de modular la respuesta inmune (Mateu, 2007). Las células dendríticas (DCs) son cruciales para iniciar una respuesta inmune antiviral, por lo tanto, el virus de PRRS puede interferir en la función de las DCs y con ello evadir la respuesta inmune, afectando la respuesta de las DCs. El objetivo de este estudio fue determinar si las DCs infectadas con virus de PRRS inducen células T reguladoras (Tregs) *in vitro* y evaluar las citocinas involucradas utilizando cepas Americanas y Europeas de PRRS.

### Materiales y métodos

Se utilizaron dos cepas Americanas y cinco Europeas del virus de PRRS. Se aislaron células mononucleares a partir de sangre de cerdos (n=6) provenientes de granjas libres de PRRS. Se generaron DCs a partir de células adherentes, estimulando con IL-4 y GM-CSF (Flores, 2008). Las DCs fueron infectadas 1 h a un m.o.i. de 0.1, lavando dos veces y posteriormente cultivadas durante 24 h. En algunos casos las DCs fueron tratadas con IFN- $\alpha$  (200U/mL) durante 30 min antes y después de la infección. Después de las 24 h, se cocultivaron con células no adherentes (95% CD3+) durante 5 días. Se evaluó proliferación celular utilizando CFSE. Además se determinó la presencia de células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> utilizando el anticuerpo anti-Foxp3 humano y anti-CD25 de cerdo. La producción de IL-10, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  se determinó en los sobrenadantes de los cocultivos al tercer día por ELISA (Biosource and R&D systems). La expresión relativa del RNAm de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  fue evaluada por PCR en tiempo real utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Se utilizó como control el gen constitutivo PPIA (Peptidil isomerasa A) y se compararon los tratamientos respecto al mock. También se evaluó la expresión relativa del RNAm de Foxp3, TBX21 y GATA3 como se describió antes. La capacidad supresora se determinó utilizando CFSE.

### Resultados

Los resultados muestran que los virus genotipo Americano provocan una reducción en la proliferación de células T homólogas con respecto al mock. Al tratar las DCs con IFN- $\alpha$  o con virus de PRRS inactivado por calor no producen un incremento ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en dos cepas europeas la proliferación incrementó y en las otras tres no disminuye con respecto al mock ( $p < 0.05$ ).

Las DCs infectadas con virus genotipo Americanos, inducen un incremento en el número de células Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> comparadas con el mock ( $p > 0.05$ ). Este efecto disminuyó al tratar las DCs con IFN- $\alpha$  o con virus inactivado ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el caso de las cepas europeas no se observó la inducción de células Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ).

El Análisis de la producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2 and IL-10) no mostró diferencias significativas entre las cepas Americanas y Europeas, excepto por una cepa Europea que fue capaz de inducir la producción de IL-10. Por otro lado, la expresión relativa de TGF- $\beta$  y el factor de transcripción Foxp3 incrementó en los cultivos donde las DCs fueron infectadas con cepas Americanas. El análisis de citocinas en el sobrenadante reveló un incremento en la producción de TGF- $\beta$ . Finalmente, las células con fenotipo Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fueron capaces de inhibir la proliferación de células antólogas.

### Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar las diferencias entre las DCs infectadas con virus de PRRS genotipo Americano y Europeo en la inducción de células T reguladoras, producción y expresión de citocinas, y proliferación *in vitro*. Muy poco se sabe acerca del mecanismo que el virus del PRRS utiliza para evadir la respuesta inmune.

Nuestros resultados muestran claramente que los virus genotipo Americano inducen más cambios en las DCs infectadas que los virus genotipo Europeo, y estos cambios pueden ayudar a explicar la diferencia en la virulencia entre los dos genotipos.

Estas alteraciones que causa el virus de PRRS se pueden evitar con la adición de IFN- $\alpha$  o con la inactivación del virus, lo que sugiere que algunas diferencias están relacionadas con la replicación viral. Las DCs infectadas con virus de PRRS genotipo Americano inducen la generación de células T con fenotipo regulador, las cuales tienen además la capacidad de inhibir la proliferación de células antólogas. Este hecho podría explicar parcialmente la patogénesis del virus. Interesantemente, las cepas Europeas utilizadas no parecen utilizar este mecanismo para escapar del sistema inmune.

### References

Mateu E et al, 2007. Vet J. Ahead of print.  
Flores, 2008. Clin Vac Immunol, April, 720-25