

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS**

**EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULADORAS EN
EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO
PORCINO**

**ROLE OF IMMUNOREGULATORY CELLS DURING
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY
SYNDROME**

Irene Magdalena Rodríguez Gómez

Tesis Doctoral

Córdoba, 29 de Noviembre de 2012

TITULO: *EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULADORAS EN EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO*

AUTOR: *IRENE MAGDALENA RODRÍGUEZ GÓMEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Ilustraciones de la portada: formato modificado de las imágenes originales tomadas de Rhiniseng® (Laboratorios Hipra) y virus del PRRS (Van Breedam et al., 2010).

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA



**EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULATORAS EN
EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO
PORCINO**

**ROLE OF IMMUNOREGULATORY CELLS DURING
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY
SYNDROME**

Tesis presentada por la Licenciada en Veterinaria **Dña. Irene
Magdalena Rodríguez Gómez** para optar al Grado de Doctor por la
Universidad de Córdoba

**Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas
Córdoba, 29 de Noviembre de 2012**



**Dpto. Anatomía y Anatomía
Patológica Comparadas**
Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba

Campus Universitario de Rabanales
Ctra. de Madrid - Cádiz, Km. 396
Teléfono 957 21 81 62
14014 - CÓRDOBA

Librado Carrasco Otero, Catedrático de Universidad, adscrito al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba

Informa:

Que Dña. **Irene Magdalena Rodríguez Gómez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULADORAS EN EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO”**, que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

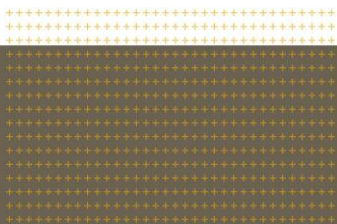
Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba, a 20 de Octubre de 2012.

Jaime Gómez Laguna, Doctor por la Universidad de Córdoba, responsable del área de producción primaria del Departamento de I+D+i del Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de los Pedroches (CICAP), Pozoblanco (Córdoba)

Informa:

Que Dña. **Irene Magdalena Rodríguez Gómez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULADORAS EN EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO”** que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Pozoblanco, a 20 de Octubre de 2012.





Departament de Sanitat i D' Anatomia Animals
Universitat Autònoma de Barcelona



Enrique M^a Mateu de Antonio, profesor titular del Departament de Sanitat i D' Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Hago constar:

Que Dña. **Irene Magdalena Rodríguez Gómez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**EL PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNOREGULADORAS EN EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO**”, que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Bellaterra, a 20 de Octubre de 2012.

INTRODUCTION

INTRODUCCIÓN



INTRODUCTION

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most economically important diseases of swine industry. PRRS is caused by PRRS virus (PRRSV), which is nowadays divided into two distinct genotypes: type 1 or PRRSV-1 and type 2 or PRRSV-2 (also named as European and American, respectively), both sharing between 55-70% of genetic homology.

The main hallmarks of the pathogenesis of PRRSV infections are the sustained viremia, the capability to cause persistent infections and the inefficient immune response. Neutralizing antibodies are raised at later stages, and cell-mediated immunity is delayed in comparison with other viral infections.

PRRSV has a specific tropism for differentiated macrophages from lung and lymphoid organs, being controversial the role of antigen presenting cells (APCs) during PRRSV infection. Due to its role in the transition from the innate to the adaptive immune response, APCs could give us detailed information regarding the immunopathogenesis of PRRSV infection.

The involvement of regulatory T cells (Tregs), likewise, is pretty important since they can block, inhibit or suppress the function of activated T cells.

The behaviour of APCs during PRRSV infection has been studied in different *in vitro* studies, nevertheless there are no *ex vivo* or *in vivo* studies about its role during PRRSV infection. In addition, the study of the interaction between these cells and PRRSV, during the first stages after infection, as well as, the engrossment of Tregs during PRRS, is determining to deep in the knowledge of the immunobiology of this syndrome.

This PhD Thesis was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science, project number AGL2009-12438/GAN. The PhD student, Irene Magdalena Rodríguez Gómez, performed her predoctoral studies supported by a fellowship from the program “Formación del Profesorado Universitario” from the Spanish Ministry of Science and Innovation (AP-2007-02607).

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes del sector porcino mundial. El PRRS está causado por un virus, conocido con el mismo nombre que la enfermedad (virus del PRRS, PRRSV), en el que actualmente, se distinguen dos genotipos, el tipo 1 o genotipo Europeo y el tipo 2 o genotipo Americano, los cuales comparten entre un 55-70% de homología.

Este síndrome está caracterizado por cursar con una viremia prolongada, ocasionar infecciones persistentes y una respuesta inmune ineficaz tras la infección. Respuesta inmune en la que la aparición de anticuerpos neutralizantes es tardía y la respuesta celular errática durante las primeras semanas de infección.

El PRRSV tiene un tropismo marcado por las células de la estirpe monocito/macrófago del pulmón y de los órganos linfoides, existiendo en la actualidad controversia sobre el papel de las células presentadoras de antígeno (del inglés *antigen presenting cells*, APCs)

en la patogenia de esta enfermedad. Las APCs desarrollan un papel único durante la respuesta inmune, debido a que son el puente de unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Por tanto, su estudio durante el transcurso del PRRS podría darnos información sobre aspectos aún desconocidos de la patogenia de esta enfermedad.

De igual manera, el estudio de las células efectoras es crucial para comprender por qué es ineficaz la respuesta inmune en el PRRS. En este sentido, se ha descrito la existencia de una población celular, los linfocitos T reguladores o células T reguladoras (del inglés *regulatory T cells*, Tregs) que podrían modular la respuesta inmune mediante el bloqueo, inhibición o supresión de las células T activadas.

Aunque existen varios estudios *in vitro* sobre el papel y los cambios que experimentan las APCs durante el transcurso del PRRS, no existen estudios *ex vivo* o *in vivo* que muestren el comportamiento de estas células. Asimismo, es necesario estudiar la interacción PRRSV-APCs durante las primeras horas post-infección, así como,

el papel potencial de las Tregs durante el curso de la infección por PRRSV, para conocer mejor la inmunopatogenia de esta enfermedad.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al Proyecto de Investigación AGL2009-12438/GAN. La doctoranda, Irene Magdalena Rodríguez Gómez, desarrolló sus estudios de doctorado gracias a una beca del programa “Formación de Profesorado Universitario” del Ministerio de Ciencia e Innovación (AP-2007-02607).

1.- BACKGROUND - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.- SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

1.2.- LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

1.3.- LAS CÉLULAS T REGULADORAS



1.- BACKGROUND - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.- SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO

PORCINO

1.1.1.- Reseña histórica del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

A finales de la década de los 80 un nuevo síndrome, caracterizado por fallos reproductivos en cerdas, y problemas respiratorios en cerdos, reduciendo el rendimiento e incrementando la mortalidad, fue descrito por primera vez en Estados Unidos (Keffaber, 1989; Hill, 1990; Loula, 1991). En el año 1990, un síndrome de características similares, fue reseñado en Europa (White, 1991). Después de denominarlo con diversos nombres, tales como “Enfermedad misteriosa del cerdo” o “Enfermedad de las orejas azules del cerdo”, fue finalmente bautizado como “Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino” (del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, PRRS) (Benfield et al., 1999; Hill, 1990).

El agente causal fue aislado por primera vez en el Instituto Central Veterinario de Holanda, en Lelystad (Wensvoort et al., 1991), aislándose poco tiempo después un virus similar a partir de los casos americanos (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992). Al agente aislado en Holanda se le llamó Lelystad virus (LV), mientras que al aislado en EEUU recibió el nombre de ATCC-VR-2332 (Wensvoort et al., 1991; Collins et al., 1992).

Actualmente, se considera una enfermedad endémica, distribuida a nivel mundial, ya que sólo Chile, Suecia, Suiza, Nueva Zelanda y Australia son considerados países libres del PRRS (Garner et al., 1997; Mota et al., 1997; Corbellini et al., 2006; Neumann y Morris, 2008; Frössling et al., 2009).

Según diferentes estudios, el PRRS es la enfermedad que más costes ocasiona al sector porcino mundial, estando cifradas sus pérdidas en unos 560 millones de dólares al año en EEUU (Neumann et al., 2005). Un estudio económico reciente señala que los brotes epidémicos que se presentaron en granjas danesas supusieron unas pérdidas de unos 126 euros por cerda (Nieuwenhuis et al., 2012).

Además, en los últimos cinco años las pérdidas económicas se han agravado debido a la aparición de cepas altamente virulentas. Así, la reciente pandemia de la “Enfermedad de las orejas azules” o “Síndrome de la fiebre elevada”, que se presentó en China en 2006 y que afectó a millones de cerdos, se caracterizó por causar una mortalidad de entre el 20% y el 100% (Tian et al., 2007; Tong et al., 2007; An et al., 2010). Del mismo modo, la infección con el aislado altamente virulento 1-18-2 que emergió en EEUU en 2007 llevó igualmente a importantes pérdidas económicas (Murtaugh et al., 2010).

Todo ello, justifica los estudios realizados y en curso sobre esta enfermedad que sigue suponiendo un reto para el sector porcino a nivel mundial. Con el fin de evitar, controlar y, en la medida de lo posible, erradicar esta enfermedad, se está haciendo uso de todas las estrategias disponibles, incluida, la vacunación.

1.1.2.- Etiología

El agente causal del PRRS, conocido como PRRS virus (PRRSV), es un virus ARN de pequeño tamaño (50-65nm), cadena sencilla, sentido positivo y envuelta (Meulenbergh et al., 1993)

(Figura 1). El PRRSV pertenece al Orden *Nidovirales*, Familia *Arteriviridae* y Género *Arterivirus* (Fauquet et al., 2005). Comparte género con otros arterivirus como el virus de la Arteritis Vírca Equina, el virus de la Fiebre hemorrágica del simio o el virus elevador de lactato-deshidrogenasa del ratón (Benfield et al., 1992; Meulenbergh et al., 1994; Cavanagh, 1997).

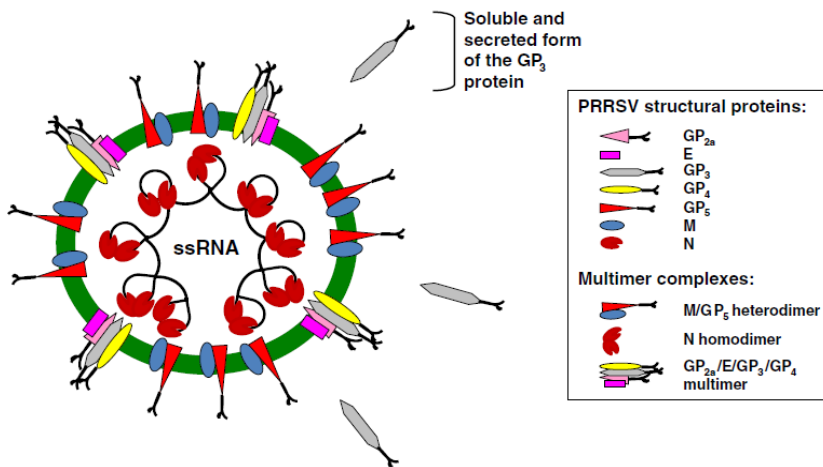


Figura 1.- Representación esquemática de la partícula del PRRSV (Music y Gagnon, 2010).

El ARN de este virus, de aproximadamente 15kb, presenta 9 fragmentos de lectura abierta (del inglés *Open Reading Frames*, ORFs) que codifican tanto proteínas no estructurales como estructurales. El 75% del genoma lo comprenden los fragmentos 1a y

1b, los cuales son traducidos en 14 proteínas no estructurales que son requeridas para la replicación viral y que poseen actividades replicasa, proteasa y polimerasa (Snijder y Meulenberg, 1998; Music y Gagnon, 2010). El resto del genoma (fragmentos 2a, 2b, 3-7), codifica proteínas estructurales no glicosiladas y glicosiladas. Los fragmentos 2b y 6 codifican las proteínas no glicosiladas E y M, respectivamente, ambas situadas en la envuelta. Los fragmentos 2a, 3, 4 y 5 codifican las proteínas estructurales glicosiladas GP_{2a}, GP₃, GP₄ y GP₅, también dispuestas en la membrana del virión, siendo la última de mayor tamaño que el resto. Las proteínas GP₅ y M están asociadas formando un heterodímero. Por último, el fragmento 7, codifica la proteína N de la nucleocápside (Kapur et al., 1996; Meulenberg y Besten, 1996; Andreyev et al., 1997; Dea et al., 2000a; Wu et al., 2001; Music y Gagnon, 2010). Las funciones de estas proteínas son muy diversas, el heterodímero GP₅-M es requerido para la infectividad de los arterivirus (Snijder et al., 2003); la proteína E es esencial para facilitar la unión del virus a su célula diana (Lee y Yoo, 2006); las proteínas N, M y GP₅ son necesarias para la formación de la partícula vírica (Wissink et al., 2005); y la

proteína N es altamente inmunógena, teniendo un alto valor diagnóstico y siendo utilizada para la detección de anticuerpos frente a esta enfermedad (Dea et al., 2000b). Cabe mencionar que, a diferencia de lo que se venía creyendo, la proteína N no conforma una hermética cápside de morfología icosaédrica, sino que se dispone de forma asimétrica tapizando el ARN viral (Dokland, 2010; Music y Gagnon, 2010).

Se conocen 2 genotipos de este virus, el tipo 1 o genotipo Europeo (PRRSV-1) que emergió en Europa, cuyo prototipo es el virus LV, y el tipo 2 o genotipo Americano (PRRSV-2), cuyo prototipo es el aislado ATCC-VR-2332 (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991; White, 1991; Collins et al., 1992; Fauquet et al., 2005; King et al., 2012). Ambos genotipos comparten entre un 55-70% de homología (Meng et al., 1994; Andreyev et al., 1997; Nelsen et al., 1999; Mateu et al., 2006), existiendo, dentro del genotipo Europeo, una marcada diversidad genética y patogénica entre las cepas aisladas en el Este y el Oeste de Europa. Esta diversidad se pone de manifiesto con problemas en el diagnóstico, tanto a nivel serológico como mediante PCR (Truyen et al., 2006), y justifica la actual

división del PRRSV-1 en diferentes subtipos (Stadejek et al., 2006). Así, utilizando la ORF7 como marcador independiente del PRRSV-1, se reconocen tres subtipos dentro del genotipo Europeo: subtipo 1 o Europeo y, subtipos 2 y 3 o de Europa del Este (Stadejek et al., 2008).

Como la mayoría de virus ARN, no es un virus resistente a condiciones desfavorables de temperatura, pH y exposición a ciertos detergentes. A temperaturas por encima de 37 °C apenas sobrevive entre 25 minutos y 24 horas (Benfield et al., 1992). Asimismo, el cloroformo y el éter parecen ser bastante eficaces a la hora de romper la envuelta e inactivar la replicación viral (Benfield et al., 1992). Sin embargo, el virus es estable entre pH 6.5 – 7.5 (Bloemraad et al., 1994) y soporta bajas temperaturas (entre -20 °C y -70 °C) durante largos periodos de tiempo (Benfield et al., 1992).

1.1.3.- Epidemiología del PRRS

1.1.3.1.- Comportamiento o patrón epidemiológico

Mientras que la mayoría de enfermedades infecciosas pueden clasificarse según el tipo de presentación en epidémicas o endémicas,

el PRRS cuenta con aspectos de ambas formas (Blaha, 2000), ya que cursa de forma epidémica cuando infecta por primera vez un colectivo de cerdos susceptibles o cuando una cepa, para la cual no había protección inmunológica cruzada, circula por primera vez en una granja afectada de PRRS. Este comportamiento epidémico está asociado con la forma reproductiva de la enfermedad, donde se suele producir un pico de abortos, momificaciones, mortinatos y nacidos débiles que se resuelve en el tiempo y que confiere una cierta inmunidad (Dewey, 1999). Por otro lado, el comportamiento endémico de la enfermedad está asociado a la forma respiratoria y, en la cual, la casuística, entendida como el número de animales que muestran sintomatología respiratoria, no es tan elevada pero siempre hay casos debido a un fallo en la respuesta inmunológica frente a la enfermedad (Drew, 2000).

1.1.3.2.- Transmisión

La transmisión de esta enfermedad, como a continuación se describe, puede ocurrir de forma directa, tanto vertical como horizontal, o bien de forma indirecta a través de fómites, insectos,

vehículos de transporte o el aire, en los cuales el virus es capaz de sobrevivir durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, y diseminarse.

En cuanto a la transmisión directa, por contacto de animales sanos con secreciones y/o excreciones de animales enfermos, podemos diferenciar la transmisión vertical, de la madre al feto, la cual ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios entre el segundo y tercer tercio de la gestación (Christianson et al., 1993; Karniychuk et al., 2011) y la transmisión horizontal, por contacto de un cerdo sano con sangre, saliva, aerosoles, orina, semen, heces, leche o calostro de cerdos infectados (Yaeger et al., 1993; Yoon et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Swenson et al., 1994; Wills et al., 1997; Bierk et al., 2001; Wagstrom et al., 2001).

El PRRSV ha sido aislado de suero hasta 3 meses post-infección, de saliva y muestras tomadas de orofaringe hasta 42 y 84 días post-inoculación (dpi), respectivamente, y de muestras de orina obtenidas por cistocentesis hasta 14 dpi (Duan et al., 1997; Wills et al., 1997; Labarque et al., 2000). En la tonsila, en concreto, se ha llegado a detectar el virus más allá de los 251 dpi mediante PCR,

aunque el aislamiento sólo se consiguió hasta los 56 dpi (Wills et al., 2003). En el caso del semen procedente de cerdos infectados experimentalmente, el virus se aisló entre 43 y 92 dpi (Swenson et al., 1994; Christopher-Hennings et al., 1995; Prieto y Castro, 2005). Con respecto a las heces, existe controversia según los estudios revisados, ya que mientras que en algunos se señala la presencia del virus entre 28 a 35 dpi, en otros, no se detectó el virus en las muestras fecales (Yoon et al., 1993; Wills et al., 2000). En el caso del calostro o de la leche, el virus se ha aislado de cerdas infectadas experimentalmente y vacunadas mediante vacunas vivas atenuadas, sin embargo, la inoculación después de la vacunación hizo que no se detectara en las secreciones lácteas (Wagstrom et al., 2001; Kang et al., 2010).

Con respecto a la transmisión indirecta, ésta tiene lugar ya que diversos tipos de fómites (botas, monos, guantes, agujas, etc.), vehículos de transporte, insectos (*Aedes vexans*, *Musca domestica*, etc.) e incluso el aire, son capaces de transportar partículas víricas viables (Otake et al., 2002a; 2002b; Dee et al., 2005a). De este modo, se ha descrito la importancia de las botas y los monos de trabajo

como fuentes de transmisión del virus (Otake et al., 2002a). El mal uso de las agujas también supone un modo de transmisión de la enfermedad (Otake et al., 2002b; Dee et al., 2003). El uso de medios de transporte contaminados que no han sido sometidos a un secado con aire caliente a alta velocidad y/o desinfectados con amonios cuaternarios, supone una fuente de transmisión mecánica (Dee et al., 2004a; 2005a; 2005b). Además, las moscas (*Musca domestica*) y mosquitos (*Aedes vexans*) también pueden actuar como vectores bajo situaciones experimentales (Otake et al., 2002c; 2003a; 2003b; 2004; Schurrer et al., 2005). Sin embargo, pequeños mamíferos como roedores, perros, gatos y aves parecen no ser capaces de servir como vectores mecánicos o biológicos (Wills et al., 2000) y aunque planteada como hipótesis de transmisión y diseminación, que los patos contaminasen el agua que posteriormente beberían los cerdos, ésta parece una vía de transmisión poco probable (Zimmerman et al., 1997; Trincado et al., 2004). Sí se conoce que el PRRSV puede vivir en aguas residuales y limpias entre 7 y 11 días, respectivamente (Pirtle y Beran, 1996; Dee et al., 2005c). Por último, cabe citar la transmisión mediante el aire, la cual es una de las grandes incógnitas,

debido a los resultados tan dispares que muestran los estudios y, en los cuales la virulencia de la cepa implicada podría tener también connotaciones importantes (Dee et al., 2009; Pitkin et al., 2009; Otake et al., 2010). En general, se ha visto que un uso adecuado y controlado de estas fuentes que pueden actuar como origen de transmisión, así como, el desarrollo de estrategias de manejo, reducen el nivel de contaminación del PRRSV y su diseminación mecánica (Otake, et al., 2002d; Dee et al., 2004b; Schurrer et al., 2006).

1.1.4.- Patogenia

Como todos los arterivirus, este virus que se replica de forma general en células de la línea monocito/macrófago, induce una prolongada viremia y da lugar a infecciones persistentes (Plagemann y Moenning, 1992).

La replicación del virus se caracteriza por tener dos periodos bien delimitados, las dos primeras semanas post-infección, donde se produce un pico de replicación vírica, y una cola de replicación, que

puede extenderse hasta 6-7 semanas post-infección (Duan et al., 1997; Labarque et al., 2000).

Estudios realizados *in vivo* demuestran que la célula diana de este virus es el macrófago alveolar porcino (del inglés *porcine alveolar macrophage*, PAM), pero también se replica en otros macrófagos residentes del pulmón (como son los macrófagos intersticiales e intravasculares), subpoblaciones de macrófagos de la tonsila, nódulos linfáticos y bazo y, macrófagos intravasculares de la placenta y el cordón umbilical (Duan et al., 1997; Lawson et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2000; Gómez-Laguna, et al., 2010a). Además, se ha descrito un cierto tropismo de algunas cepas altamente virulentas (aislado JXwn06-81c) a células epiteliales (Li et al., 2007). Aunque el antígeno vírico ha sido identificado en células dendríticas interdigitantes (Haynes et al., 1997), si se produce o no una replicación efectiva en estas células aún es un tema de controversia. Un estudio *in vitro* llevado a cabo por Loving et al. (2007) muestra como a diferencia de las células dendríticas derivadas de monocitos (del inglés *Monocyte-derived Dendritic Cells*, MoDCs), las células dendríticas aisladas directamente de pulmón no

fueron permisivas para el PRRSV. Sin embargo, diversos estudios *in vitro* demuestran como el virus sí es capaz de replicarse en monocitos (Chareerntantanakul et al., 2006), macrófagos derivados de monocitos (Chareerntantanakul et al., 2006), MoDCs (Chareerntantanakul et al., 2006; Loving et al., 2007; Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2009; 2010; Wongyanin et al., 2010) y, células dendríticas derivadas de médula ósea (del inglés *Bone Marrow-derived Dendritic Cells*, BMDC) (Chang et al., 2008; Gimeno et al., 2011). El PRRSV también es capaz de replicarse en líneas celulares, si bien es cierto que esta replicación está limitada a la línea celular MA-104 (células de riñón de mono verde) y sus derivadas, las células MARC-145, CL2621 y CRL11171 (Kim et al., 1993; Mengeling et al., 1995).

La infección comienza con la internalización del virus dentro del macrófago y la consiguiente liberación del material genético en el citoplasma. El primer contacto se establece entre el virus y el heparán sulfato, aminoglucósido caracterizado por su asociación a proteínas de la membrana plasmática de la célula (Vanderheijden et

al., 2001; Delputte et al., 2002). A continuación, el complejo formado por el heterodímero GP₅-M se unirá a la parte amino terminal de la proteína sialoadhesina, lo cual proporciona una unión de mayor estabilidad que la formada por el heparán sulfato (Vanderheijden et al., 2003; Delputte et al., 2005; Van Breedam et al., 2010). Esta estabilización activa un proceso de endocitosis mediado por clatrina y el virus se internaliza en el macrófago dentro de un endosoma. En este endosoma las proteínas GP₂ y GP₄ entran en contacto con la molécula receptora del virus CD163. Esta última unión, junto con un microambiente ácido, serán determinantes para la liberación del ARN en el citoplasma del macrófago (Nauwynck et al., 1999; Calvert et al., 2007; Van Gorp et al., 2008; 2009; Das et al., 2010; Van Breedam et al., 2010; Van Gorp et al., 2010). Al tratarse de un virus ARN de cadena simple y sentido positivo, el propio ARN viral actúa como ARN mensajero. El ciclo de replicación comienza con la expresión de los genes de las ORF1a y 1b, cuya traducción dará lugar a las diferentes proteínas no estructurales de acción replicasa (Kroese et al., 2008), y posteriormente, el resto del genoma será transcrito y traducido. Tras

el ensamblaje habrá tenido lugar la primera progenie de viriones (Music y Gagnon, 2010).

En el transcurso de la infección podemos señalar dos fases, una primera fase de infección aguda, caracterizada por una viremia que puede durar hasta un mes en animales adultos y hasta 3 meses en lechones, con un pico de replicación vírica más o menos conservado entre cepas a nivel pulmonar durante la primera semana de infección (Duan et al., 1997; Labarque et al., 2000), y una segunda fase, o estadio crónico, en el que aunque la viremia se resuelve, el antígeno vírico puede quedar persistente y ser aislado de los órganos linfoides secundarios incluso hasta 300 días post-infección (Wills et al., 2003).

Desde el medio externo y tomando la vía oro-nasal como puerta de entrada, el virus parece viajar de manera prácticamente directa a los pulmones donde se replica activamente en la población de macrófagos residentes del pulmón, principalmente en PAMs. Durante la replicación, la célula es conducida hacia un estadio de anti-apoptosis, de forma que cuando la replicación ha culminado la célula entra en apoptosis (Costers et al., 2008). A partir de este

momento, los monocitos, procedentes del torrente sanguíneo, infiltrarían el pulmón y se diferenciarían en macrófagos. Esta teoría explicaría las dos fases de replicación del virus, antes descritas y, el por qué de la concomitancia de infecciones secundarias durante las infecciones con el PRRSV (Van Reeth et al., 1996; Thacker, 2001). A continuación, se produciría la diseminación sistémica, viajando al resto de órganos, principalmente, tonsila, nódulos linfáticos y bazo, donde se replicaría en los macrófagos intersticiales de estos órganos, lo cual explicaría su persistencia (Wills et al., 1997; Allende et al., 2003). En este sentido, el ARN vírico ha sido detectado hasta 251 dpi en órganos linfoides (Albina et al., 1994; Wills et al., 1997; Batista et al., 2004) (Figura 2). Bierk et al. (2001) han demostrado como cerdas experimentalmente infectadas son capaces de infectar cerdas centinela hasta 86 dpi. En otro estudio realizado en cerdas que fueron inoculadas entre los 85-90 días de gestación, los lechones fueron ARN positivos en suero hasta 210 días-postparto. Asimismo, cerdos centinela que fueron alojados con los mismos a los 98 días post-parto desarrollaron anticuerpos específicos frente al PRRSV 14 días después (Benfield et al., 1997).

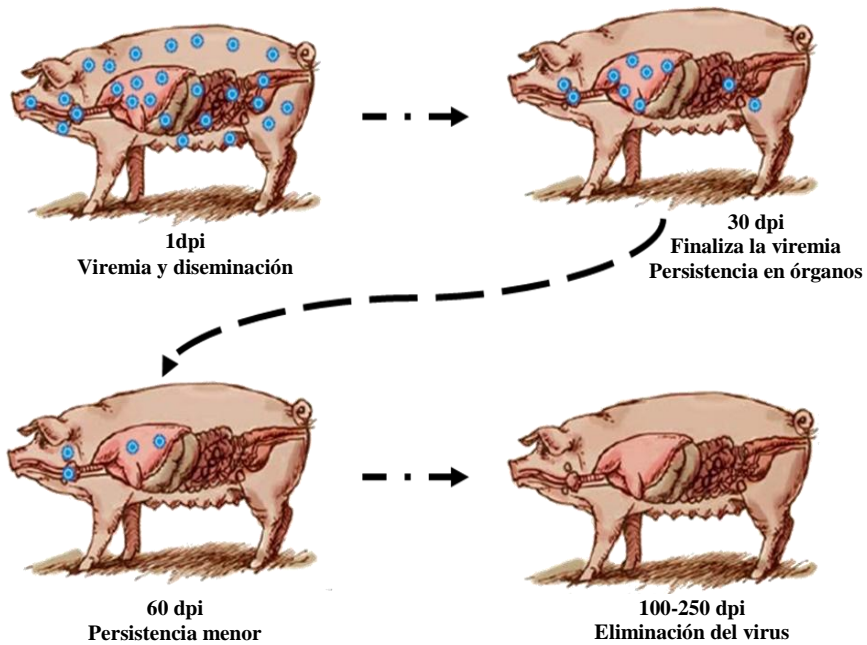


Figura 2.- Representación esquemática modelo de la vía de diseminación del PRRSV en el cerdo (modificado de Prieto et al., 2005).

1.1.5.- Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad varían dependiendo del aislado implicado (tipo 1 vs tipo 2; subtipo 1 vs subtipos 2 y 3; condiciones de campo vs condiciones a nivel experimental) y del colectivo afectado (edad/fase productiva, estado del sistema inmune, etc.). De hecho, diversos estudios experimentales ponen de manifiesto como la cepa utilizada afecta a la clínica presentada, hallazgos macroscópicos y microscópicos

(Halbur et al., 1995a; Mengeling et al., 1996; Karniychuk et al., 2010). A pesar de que la mayoría de signos clínicos descritos en campo han sido reproducidos a nivel experimental, a nivel de campo las infecciones y co-infecciones con otros virus y bacterias podría confundir, enmascarar y complicar la presentación clínica (Rossow, 1998).

La forma reproductiva está caracterizada por abortos durante el tercer tercio de gestación, partos prematuros y un incremento en el número de mortinatos, fetos parcialmente autolisados y/o momificados y nacidos débiles en cerdas tanto nulíparas como multíparas (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Plana-Duran et al., 1992). La exposición de las cerdas al virus parece provocar una infección transplacentaria y un fallo reproductivo al final de la gestación, mientras que, tras la inoculación *in utero*, tanto la madre como los fetos son susceptibles a la infección en cualquier momento independientemente del tiempo de gestación (Christianson et al., 1993; Lager y Mengeling, 1995). Las cerdas afectadas pueden desde no mostrar sintomatología a presentar anorexia, fiebre, letargia, neumonía, agalaxia, edema subcutáneo y en las

extremidades, retrasos en la vuelta a celo y, en contadas ocasiones, la muerte (Terpstra et al., 1991; Mengeling et al., 1994).

Los cerdos infectados en útero o bien a las pocas horas o días después del nacimiento muestran una sintomatología muy dispar dependiendo del aislado implicado y que varía desde una severa disnea y taquipnea, hasta en ocasiones edema periocular y palpebral, conjuntivitis, inapetencia, fiebre, eritema cutáneo, diarrea y signos nerviosos. La mortalidad en estos animales se acerca al 100% (Rossow et al., 1994a; 1995; 1996b; 1997).

En cuanto a las manifestaciones respiratorias, éstas se presentan, principalmente, en cerdos en las fases de transición y cebo. En ellos se observa fiebre, letargia, retraso en el crecimiento y una marcada disnea, a consecuencia de la neumonía que sufren los animales (distrés respiratorio) (Rossow et al., 1994a; Van Reeth et al., 1996; Labarque et al., 2002). En condiciones de campo, estas infecciones por PRRSV suelen ir acompañadas de infecciones secundarias, tanto víricas (virus de la gripe, SIV; circovirus porcino tipo 2, PCV2; coronavirus respiratorio porcino, PRCV; virus de la

enfermedad de Aujeszky, ADV) como bacterianas (*Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella* spp.) que complican el cuadro y aumentan la mortalidad (Zeman et al., 1993; Done y Paton, 1995; Thacker et al., 1999; Brockmeier et al., 2000; Thanawongnuwech et al., 2000; Xu et al., 2010; Fablet et al., 2011).

Los animales de mayor edad y los verracos suelen ser asintomáticos y sólo en algunos casos se ha descrito una disminución de la libido (Feitsma et al., 1992; Hopper et al., 1992). El semen procedente de verracos infectados experimentalmente con el PRRSV muestra espermatozoides con motilidad disminuida, anomalías morfológicas y acrosoma defectuoso (Prieto et al., 1996), aunque otros autores no han encontrado alteraciones (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994).

Merecen mención especial la clínica y signos clínicos observados durante el transcurso de la infección con cepas altamente patógenas como las responsables de los brotes de China y Europa del

Este, especialmente, Bielorrusia (Li, et al., 2007; Tong, et al., 2007; An et al., 2010; Karniychuk et al., 2010; Zhou y Yang, 2010). Se trata de una presentación sobreaguda, donde todos los animales de la granja se ven afectados en el transcurso de 3 a 5 días, independientemente del momento productivo en el que se encuentren, y teniendo una duración de 1 a 2 semanas. Los datos de morbilidad y mortalidad, se establecen entre el 50-100% y el 20-100%, respectivamente. Con respecto a la mortalidad, ésta es prácticamente del 100% en los lechones de las naves de paridera, 70% en las naves de cerdos en transición y 20% en las naves de cerdos de engorde. En el caso de las cerdas en gestación, se cita en la literatura que más del 40% abortan e incluso un 10% mueren. En los cerdos afectados, la temperatura corporal alcanza los 41-42 °C, además los animales se muestran letárgicos, anoréxicos, deprimidos y con la zona de las orejas, jeta, extremidades, glándulas mamarias, vulva y resto de piel del cuerpo rojizas. La sintomatología respiratoria es evidente, con tos, estornudos y severa disnea. También aparece secreción ocular, edema periocular y conjuntivitis, así como, diarrea, constipación o sintomatología nerviosa en algunos

animales (Li, et al., 2007; Karniychuk et al., 2010; Zhou y Yang, 2010).

1.1.6.- Cuadro lesional

Al igual que la sintomatología, las lesiones dependen, en gran medida, de la cepa implicada, la edad del animal y factores genéticos y ambientales. Además, las situaciones de estrés supondrán una mayor incidencia de infecciones secundarias (Halbur et al., 1995a; 1995b; Kristensen, 1995; Rossow et al., 1995; Wills et al., 1997).

El pulmón, considerado como órgano diana, puede aparecer desde normal hasta con una neumonía intersticial de multifocal a difusa, la consistencia es gomosa y no colapsa (Figura 3). En la mayoría de las ocasiones, las lesiones pulmonares aparecen enmascaradas por las lesiones debidas a infecciones secundarias o concomitantes por otros virus y/o bacterias que dan lugar al denominado complejo respiratorio porcino (Halbur et al., 1993; Done y Paton, 1995; Halbur et al., 1995a; 1996; Gómez-Laguna et al., 2009; Martínez-Lobo et al., 2011). Además, según demuestran diversos trabajos, las cepas del tipo 2 parecen ser más

neumovirulentas que las del tipo 1 (Halbur et al., 1995c; 1996; Johnson et al., 2004; Martínez-Lobo et al., 2011).

Los nódulos linfáticos se muestran aumentados de tamaño y con consistencia desde sólida a poliquística (Rossow et al., 1994b; Done y Paton 1995; Halbur et al., 1995b; 1995c; Rossow et al., 1995). Otras lesiones macroscópicas observadas es la presencia de edema subcutáneo, sobre todo a nivel ocular (Rossow et al., 1994b; 1995). La hemorragia en el cordón umbilical, que se ha observado en algunos casos podría ser debida a infecciones por el PRRSV en hembras gestantes, pero debido a que ésta puede ser ocasionada por desgarros en el momento del parto, no se considera una lesión específica de este síndrome (Lager y Halbur, 1996) (Resumen, tabla 1).

		Hallazgos macroscópicos	Lesiones microscópicas
Lechones (transición/cebo)	Pulmón	No colapsa Consistencia gomosa Neumonía intersticial	Neumonía intersticial (engrosamiento septos, hiperplasia e hipertrofia neumocitos tipo II, infiltrado alveolos)
	Nódulos linfáticos	Aumento de tamaño Consistencia sólida- poliquística	Hiperplasia e hipertrofia centros germinales Necrosis de centros germinales
	Otras	Edema subcutáneo Edema periocular	Vasculitis
Fetos		No característicos Hemorragia cordón umbilical	Vasculitis
Cerdas		Endometritis Lesiones en placenta	Necrosis y apoptosis células epiteliales
Verracos		No característicos No relevantes	No característicos No relevantes

Tabla 1.- Resumen de los hallazgos macroscópicos y lesiones microscópicas relevantes durante el transcurso del PRRS (Fuente propia).

A nivel microscópico las lesiones más importantes se corresponden con una neumonía de tipo intersticial y lesiones en

órganos linfoides. Lesiones encontradas en otros órganos como vasos sanguíneos, corazón, o cerebro dependen claramente de la virulencia y patogenicidad de la cepa implicada (Rossow, 1998).

La neumonía intersticial, se caracteriza por un engrosamiento del septo debido a una infiltración de macrófagos y, en menor medida, de linfocitos, que se acompaña de una hiperplasia e hipertrofia de los neumocitos tipo II, así como de la presencia de detritus, material proteináceo, macrófagos alveolares y, ocasionalmente, células sincitiales en el alveolo (Figura 3). En ocasiones se ha descrito una hipertrofia del tejido linfoide asociado a bronquios (Collins et al., 1992; Halbur et al., 1993; Zeman et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Cooper et al., 1995; Done y Paton, 1995; Halbur et al., 1995c; Rossow et al., 1995; 1998). A nivel de la mucosa nasal, también se ha descrito la presencia de un infiltrado inflamatorio, constituido por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, y pérdida de los cilios de las células epiteliales de la mucosa (Halbur et al., 1995c; Rossow et al., 1996b). El daño de la barrera mucociliar facilita la infección pulmonar por patógenos oportunistas.

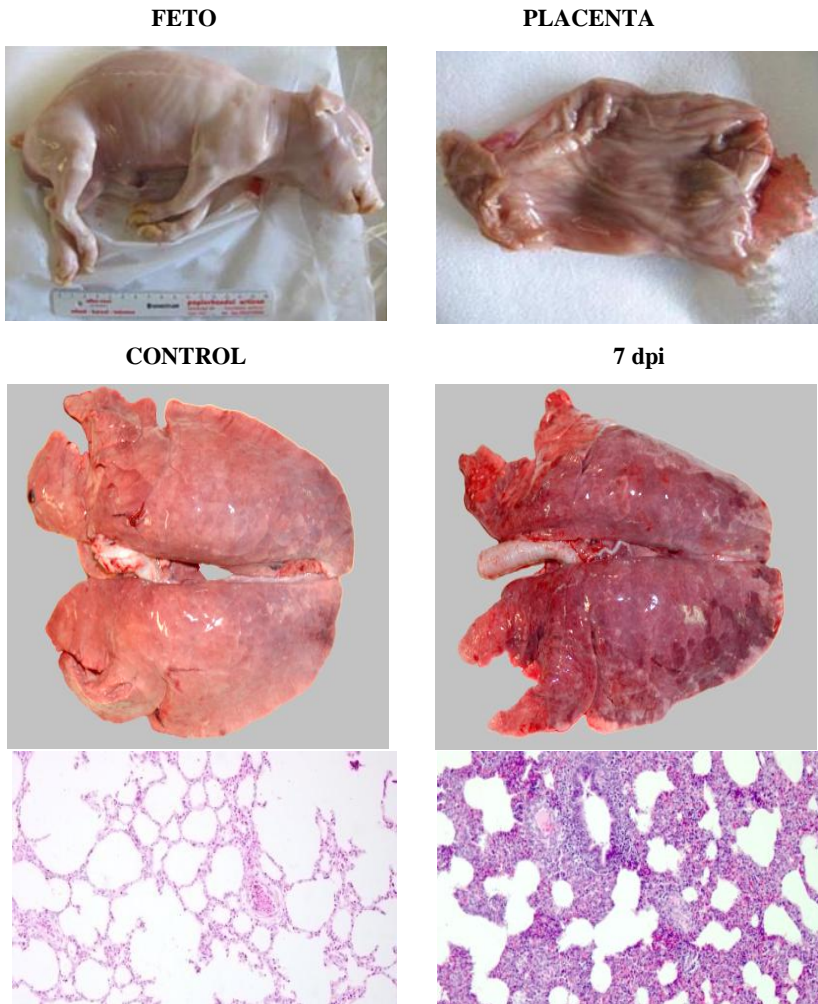


Figura 3.- Imágenes de un feto y una muestra de placenta de una cerda infectada con el PRRSV (UU Karniychuk, Universidad de Gante). Imágenes a nivel macroscópico y microscópico de cerdos no inoculados (CONTROL) o inoculados con el PRRSV (7 dpi), donde se observan las lesiones típicas del PRRSV, ausencia de colapso pulmonar (hallazgo macroscópico – 7 dpi) y engrosamiento de los septos (lesiones microscópicas – 7 dpi) (Fuente propia).

En la tonsila y en diferentes nódulos linfáticos (retrofaríngeos, mediastínicos, traqueobronquiales, aórticos, etc.) se observa una hiperplasia e hipertrofia de los centros germinales, señalándose, en ocasiones, la necrosis de los mismos y la presencia de sincitios celulares (Collins et al., 1992; Rossow et al., 1994b; Cooper et al., 1995; Halbur et al., 1995b; 1995c; Rossow et al., 1995; Lawson et al., 1997).

La presencia de vasculitis se ha descrito con ciertos aislados considerados de mayor virulencia, tanto en fetos abortados como en lechones. Las lesiones consisten en un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en la túnica media de los vasos afectados, que se puede extender de forma transmural y acompañarse de necrosis fibrinoide en raras ocasiones (Christianson et al., 1992; Goovaerts y Visser, 1992; Halbur et al., 1993; Rossow et al., 1995; Lager y Halbur, 1996; Rossow et al., 1996a; 1996b).

A nivel cardíaco se puede encontrar un infiltrado de células linfoides a nivel subendocárdico, subepicárdico y miocárdico. Este hallazgo se ha observado en estadios tardíos de la infección (± 21 dpi) y en fetos abortados en el tercer tercio de gestación (Christianson et

al., 1992; Halbur et al., 1993; Rossow et al., 1994a; Cooper et al., 1995; Halbur et al., 1995c; Rossow et al., 1995; Lager y Halbur, 1996; Rossow et al., 1996b; 1997).

Las lesiones a nivel de tejido nervioso son poco frecuentes, aunque destaca la infiltración de los plexos coroideos por histiocitos, la existencia de manguitos perivasculares, de tipo mononuclear, y focos de gliosis. Al igual que ocurría con las lesiones en vasos sanguíneos y corazón, éstas pueden ser encontradas tanto en fetos abortados como en lechones en transición y cebo, en estadios avanzados de la enfermedad (Christianson et al., 1992; Collins et al., 1992; Rossow et al., 1994a; Cooper et al., 1995; Halbur et al., 1995c; Rossow et al., 1995; Lager y Halbur, 1996; Rossow et al., 1996b; 1997).

En el caso de hembras infectadas por el PRRSV, en la mayoría de las ocasiones no se observa ninguna lesión o tan sólo una endometritis de tipo linfoplasmocitario y lesiones a nivel de la placenta, donde se ha descrito necrosis y apoptosis de las células epiteliales con micro-separaciones entre el endometrio y la placenta,

lo que contribuiría a las manifestaciones clínicas de abortos que se observan durante el transcurso de este síndrome (Stockhoff-Zurweiden et al., 1993; Karniychuk et al., 2011).

En el macho no se han descrito hallazgos macroscópicos ni lesiones microscópicas relevantes (Swenson et al., 1994).

Aunque como hemos descrito, el PRRSV puede causar lesiones en múltiples tejidos y órganos, la lesión más importante se localiza en el pulmón, la cual se puede ver agravada por la presencia, de forma concomitante, de otros patógenos, lo que ocasiona altos índices de mortalidad y retrasos en el crecimiento en las explotaciones de porcino.

1.1.7.- Respuesta inmune frente al PRRSV

De forma general podríamos decir que el PRRSV es capaz de disminuir la producción de citoquinas inflamatorias como los interferones (IFN) tipo 1, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleuquina (IL) 1 (IL-1) (Van Reeth et al., 1999; Thanawongnuwech et al., 2001; Gómez-Laguna et al., 2010a). La respuesta específica de tipo celular, medida como el número de

células que secretan IFN- γ , no es suficiente para eliminar el virus (Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005) y, el desarrollo de una respuesta eficaz de anticuerpos neutralizantes (del inglés *neutralizing antibodies*, NAs) anti-PRRSV no suele aparecer antes de las 3-4 semanas post-infección (Meier et al., 2003).

1.1.7.1.- Respuesta inmune innata

La importancia de la respuesta inmune innata radica no sólo en la propia respuesta temprana (e inespecífica) frente a cualquier agresión que sufra el organismo, sino que la calidad de la misma determinará la subsiguiente respuesta inmune adaptativa, tanto celular como humoral. En este punto tienen también gran importancia la liberación de citoquinas y la existencia o no de células T reguladoras (del inglés *regulatory T cells*, Tregs) que posteriormente desarrollaremos en un capítulo propio.

La infección por el PRRSV supone una escasa liberación de IFN- α , citoquina considerada de interés por su efecto antiviral. Varios estudios demuestran que las proteínas no estructurales 1 α , 1 β , 2, 11, así como, la proteína N

provocan una potente inhibición de IFN- α (Albina et al., 1998; Yoo et al., 2010). Si se comparan los niveles de IFN- α tras la infección con PRRSV, PRCV o SIV, los valores son más elevados en el transcurso de estas dos últimas que si los comparamos con el PRRSV (Van Reeth et al., 1999). También se describe que 5 (1 α , 1 β , 2, 4, 11) de las 14 proteínas no estructurales del PRRSV son capaces de inhibir la producción de IFN- β y que la proteína no estructural 2 provoca una disminución en la secreción de IL-1 β y TNF- α (Subramanian et al., 2009; Beura et al., 2010; Chen et al., 2010; Sun et al., 2010). Este desequilibrio en la expresión temprana de citoquinas implica el desarrollo de una respuesta inmune innata débil que repercute negativamente en el control del virus.

Otra citoquina que parece tener un importante papel en la patogenia del PRRS es la IL-10 (Suradhat y Thanawongnuwech, 2003a; Suradhat et al., 2003b; Gómez-Laguna et al., 2010a). Se ha descrito que ciertas cepas Europeas del PRRSV son potentes inductoras de IL-10 en

PBMCs procedentes de cerdos que no tuvieron un contacto previo con la enfermedad (Díaz et al., 2006). Además, los PBMCs de cerdos vacunados con cepas inductoras de IL-10 dieron lugar a niveles más bajos de células secretoras de IFN- γ que las procedentes de cerdos vacunados con cepas no inductoras de IL-10 (Díaz et al., 2006).

1.1.7.2.- Respuesta inmune celular

Considerada como débil, retardada y muy variable, la respuesta inmune celular tiene lugar en el PRRS entre las 2-8 semanas post-infección (Bautista y Molitor, 1997; Xiao et al., 2004). Dicha respuesta no se correlaciona con los niveles de replicación víricos encontrados en diferentes órganos linfoides (Xiao et al., 2004). Así, mientras que sí se ha descrito un aumento en la subpoblación de linfocitos T CD8^{high} tras la infección con el PRRSV (Lamontagne et al., 2003; Gómez-Laguna et al., 2009), parece ser que estos linfocitos serían no funcionales (Costers et al., 2009). Además, el aumento de células secretoras de IFN- γ específicas frente al PRRSV se ha detectado de forma tardía

(a los 14 dpi) y con poca intensidad al ser comparada entre animales control y animales vacunados (Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005; 2006). Aunque la respuesta celular se ha detectado frente a todas las proteínas estructurales del virus (Bautista y Molitor, 1997; Bautista et al., 1999; López-Fuertes et al., 1999; Vashisht et al., 2008; Díaz et al., 2009), muchos estudios recientes centran sus trabajos en la búsqueda de epítomos conservados entre diferentes cepas del PRRSV, tanto en proteínas estructurales (Díaz et al., 2009; Kimman et al., 2009), como no estructurales (Burgara-Estrella et al., 2012).

1.1.7.3.-Respuesta inmune humoral

El aspecto fundamental que caracteriza a esta respuesta es la presencia o no de NAs. Así, tras la infección con el PRRSV se detecta una respuesta de anticuerpos específicos no neutralizantes de forma temprana, principalmente frente a la proteína N y la proteína no estructural 2 (Yoon et al., 1992; 1995; Oleksiewicz et al., 2001; de Lima et al., 2006). En la segunda semana post-

infección, los animales seroconvierten y hasta las 2-4 semanas no aparecen, en caso de hacerlo, los NAs (Meier et al., 2003; López y Osorio, 2004; Díaz et al., 2005; 2006). Estos NAs suelen resultar en títulos de 1/32 – 1/64 o incluso inferiores (Loemba et al., 1996; Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005) y están sujetos a una elevada variabilidad entre cerdos según el aislado viral utilizado (Plagemann, 2006).

Los NAs se han detectado frente a la GP₃, GP₄, GP₅ y proteína M, sin embargo, parece que el epítipo neutralizante más potente es frente a la GP₅ (Meulenberg et al., 1997; Gonin et al., 1999; Kwang et al., 1999; Weiland et al., 1999; Yang et al., 2000; Ostrowsky et al., 2002; Cancel-Tirado et al., 2004; Plagemann, 2004a; 2004b; Kim y Yoon, 2008; Costers et al., 2010). Vanhee et al. (2010) encontraron una respuesta de NAs elevada frente a la GP₄, lo cual la posicionó en el desarrollo de vacunas, sin embargo, debido a que esta glicoproteína está poco conservada entre cepas, los resultados no fueron los esperados. En términos generales, parece que esta respuesta de NAs tan tardía y, en ocasiones, poco eficaz,

se debe a otra particularidad de este virus, ya que las glicoproteínas frente a las cuales estos anticuerpos son dirigidas no se encuentran en la membrana plasmática, sino que quedan retenidas en el retículo endoplásmico rugoso y, como consecuencia, a no ser que se produzca la lisis de la célula, los anticuerpos no tendrán acceso a ellas (Nauwynck et al., 2012).

1.1.8.- Vacunas frente al PRRSV

La vacunación es una de las herramientas más importantes con la que se cuenta para luchar contra una determinada enfermedad. Si bien las vacunas frente a diversos patógenos (PCV2, enfermedad de Aujeszky, etc.) son de una eficacia garantizada, las características intrínsecas del PRRSV, es decir, su variabilidad genética y antigénica, hacen que las vacunas frente al mismo sean mejorables y, que la idea de crear una vacuna universal esté abandonada.

Actualmente se encuentran en el mercado dos tipos de vacunas frente al PRRSV, vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas (Kimman et al., 2009). Únicamente existen 2

excepciones, una vacuna de subunidades compuesta por un heterodímero de la glicoproteína 5 y la proteína M, tan sólo comercializada en EEUU, y un concentrado de inmunoglobulinas aviares contra cepas del genotipo americano, comercializada sólo en México (Rodríguez-Gómez y Díaz, 2012). En el caso de las vacunas de subunidades, animales que fueron inmunizados con GP₅ junto con M y GP₃ desarrollaron títulos de NAs frente al PRRSV más altos, así como, una proliferación linfocitaria más fuerte que los animales que fueron inmunizados con cada uno de los antígenos por separado (Jiang et al., 2006; Shen et al., 2007; Jiang et al., 2008). Sin embargo, la mayor limitación de este tipo de vacunas es que la mayoría están basadas en una única cepa de PRRSV y, por tanto, se duda que el nivel de protección sea suficiente frente a aislados de campo (Huang y Meng, 2010).

En el año 1993 se comercializó la primera vacuna inactivada frente al PRRSV (Cyblue[®], Cyanamid) creada a partir de una cepa española. Un año más tarde se comercializó la primera vacuna viva atenuada frente al PRRSV (Ingelvac PRRS[®], Boehringer Ingelheim). Las vacunas vivas atenuadas son generalmente efectivas frente a

cepas homólogas, sin embargo, su éxito frente a cepas heterólogas es limitado e incluso, en ocasiones, inefectivo. Las actuales vacunas vivas atenuadas han sido asociadas con numerosos problemas de distribución de virus vacunal, infecciones persistentes, protección incompleta, y reversión de la virulencia (Huang y Meng, 2010). Como ejemplos se encuentran en la bibliografía los brotes agudos que tuvieron lugar en granjas danesas, donde una cepa vacunal revirtió a un fenotipo patogénico (Botner et al., 1997; Storgaard et al., 1999). Además, se han aislado virus derivados de cepas vacunales de cerdos persistentemente infectados y no sintomáticos (Key et al., 2001; 2003; Zimmerman et al., 2006), y a nivel experimental, cerdos que fueron infectados con un aislado derivado de cepa vacunal sufrieron la enfermedad (Opriessnig et al., 2002). Además, diversos estudios nos muestran que las vacunas vivas atenuadas frente al PRRSV creadas a partir de una única cepa no protegen completamente frente a infecciones con cepas heterólogas (Labarque et al., 2004; Kimman et al., 2009; Díaz et al., 2012).

Las vacunas comerciales inactivadas no están disponibles en EEUU, excepto en aquellas ocasiones en las que son productos

creados para la granja en cuestión, y los resultados obtenidos en los países en lo que están comercializadas no son prometedores (Kimman et al., 2009; Huang y Meng, 2010). Dado el amplio grado de diversidad genética observado entre las cepas de PRRSV, es poco probable que una vacuna basada en una única cepa confiera protección frente a aislados de campo con una amplia diversidad genética y antigénica, que es la realidad de las granjas porcinas a nivel mundial. La eficacia de una vacuna frente a cepas heterólogas depende de la proximidad genética y antigénica de la cepa implicada y la cepa de la cual los animales fueron vacunados, y este es sin duda, el gran obstáculo al que nos enfrentamos actualmente en el control del PRRS. Por tanto, el diseño de futuras vacunas debe tener en consideración este punto.

Teniendo en cuenta el papel que desempeñan las células dendríticas en el engranaje de la respuesta inmune, es razonable que el desarrollo de futuras vacunas esté relacionado de forma directa con estas células. En este sentido, Revilla et al. (2009) mostraron que el receptor CD169 podría incrementar la eficacia de nuevas vacunas. Otros receptores de capital importancia podrían ser los receptores de

tipo Toll (del inglés *Toll-like receptors*, TLRs), como TLR3 y TLR7 que han sido involucrados en la infección del PRRSV (Sang et al., 2008; Chaung et al., 2010).

Por otro lado, a día de hoy no se sabe si durante el transcurso de la infección por el PRRSV los Tregs cumplen un papel importante, lo que representaría un obstáculo en la inmunización con vacunas vivas atenuadas (Huang y Meng, 2010). De este modo, deberían estudiarse diversas estrategias que tengan como objetivo el control del desarrollo de Tregs. Toka et al. (2004) mostraron como la depleción de Tregs usando anticuerpos anti-CD25 antes de la vacunación frente al herpesvirus simple tipo 1 supuso un aumento en la respuesta de células T CD8⁺ frente al mismo. Sin embargo, es posible que los costes de estas aproximaciones en el ámbito en el que nos desenvolvemos sean prohibitivos y, quizá habría que reconducir el estudio a la identificación de los componentes virales que están asociados con la inducción de Tregs, con la idea de rediseñar nuevas vacunas vivas atenuadas recombinantes.

1.2.- LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

1.2.1.- Generalidades

Durante varias décadas la inmunología se centró en el estudio de los antígenos y de los linfocitos, sin embargo, estos dos “sujetos” sin la presencia de las células presentadoras de antígeno (del inglés *antigen presenting cells*, APCs) no llevarían a ningún tipo de inmunidad (Banchereau y Steinman, 1998).

La respuesta inmune innata o inespecífica representa la primera línea de defensa frente a una infección. El conjunto de mecanismos que se llevan a cabo durante la respuesta inmune innata no son específicos de un patógeno particular sino que incluyen componentes celulares y moleculares, que reconocen clases de moléculas comunes a los patógenos que se encuentran con frecuencia (Kindt et al., 2006; Tizard et al., 2009). La respuesta inmune adaptativa o específica es aquella capaz de reconocer y eliminar de manera selectiva microorganismos y moléculas extrañas específicas, es decir, antígenos ajenos o extraños al organismo (Kindt et al., 2006; Tizard et al., 2009) y, para que esto sea posible se necesita la

presencia de las APCs. Las APCs, por tanto, son las células encargadas de iniciar y modular la respuesta inmune adaptativa actuando como puente entre ésta y la respuesta inmune innata. Su misión consiste en capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T con la finalidad de instaurar una respuesta inmune eficaz frente al antígeno en cuestión (Steinman, 1991; Hart, 1997; Banchereau et al., 2000; Reid et al., 2000).

La APC por excelencia es la célula dendrítica (del inglés *Dendritic Cell*, DC), también referida como APC profesional. No obstante, y de forma general, bajo determinadas condiciones, como por ejemplo el transcurso de algunas enfermedades, los macrófagos y los linfocitos B también pueden presentar antígenos, aunque su habilidad para ello es bastante inferior si lo comparamos con la de las DCs (Inaba et al., 1997; Banchereau y Steinman, 1998; Tizard et al., 2009; Harding y Ramachandra, 2010).

El mecanismo por el cual los linfocitos B y T reconocen los diferentes antígenos y, por tanto, desarrollan una respuesta inmune difiere entre ellos. Así, mientras que los linfocitos B pueden

directamente reconocer los antígenos por medio de su receptor de células B, los linfocitos T necesitan que el antígeno sea procesado y presentado mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility Complex*, MHC) formando un complejo con el mismo (complejo péptido-MHC) que, finalmente, será expuesto en la superficie celular. Además, se requerirá una segunda señal en la que participa la molécula co-estimuladora CD80/86 por parte de la DC y la molécula CD28 por parte del linfocito T. El péptido antigénico puede ir asociado al MHC de clase I (MHC-I) o de clase II (MHC-II) activando a los linfocitos T citotóxicos o colaboradores (del inglés *helper*, Th), respectivamente (Banchereau y Steinman, 1998; Kindt et al., 2006) (Figura 4).

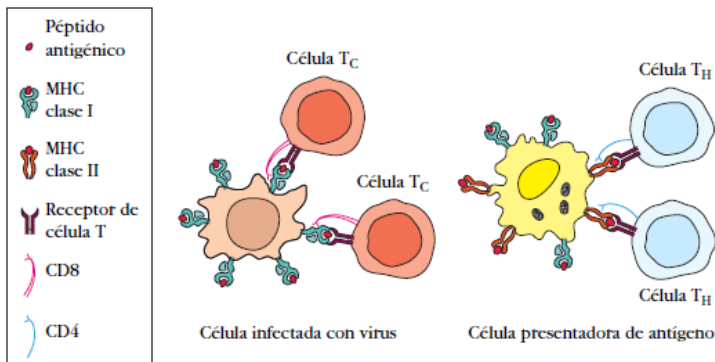


Figura 4.- Función de las moléculas del MHC en el reconocimiento de antígeno por linfocitos T (Kindt et al., 2006).

1.2.2.- Naturaleza de las células dendríticas

Las DCs conforman un grupo muy heterogéneo de células. Todas ellas expresan diferentes familias de moléculas en su superficie celular, las cuales les permiten llevar a cabo su función de presentación antigénica. Algunas de estas moléculas son los receptores de patrón de reconocimiento de patógenos específicos (del inglés *Pattern-recognition receptors*, PRRs), los receptores TLR, los receptores de lectinas del tipo C, los receptores Fc y los receptores del complemento, entre otros (Lee y Iwasaki, 2007; Trinchieri, 2007; Kumar et al., 2010).

Las DCs, al ser las células involucradas en la presentación antigénica, son de gran interés como objeto de estudio frente a cualquier infección ya que una disminución en su número o alteración de su función podría suponer una presentación antigénica ineficaz y, por tanto, un fallo en la instauración de la respuesta inmune adaptativa.

Actualmente, son pocas las publicaciones en las que se ha conseguido un aislamiento satisfactorio de DCs de tejidos porcinos

(Makala et al., 1998; Haverson et al., 2000), por ello, y asumiendo que el micro-ambiente de un experimento *in vitro* en ocasiones puede resultar artefactual si lo comparamos con lo que sucedería *in vivo*, en la última década se han desarrollado numerosos estudios *in vitro* en los que participan las MoDCs y/o BMDCs.

Estas dos subpoblaciones celulares, al igual que las DCs tisulares expresan tanto MHC-II como CD80/86, por tanto, son potenciales APCs cuyo estudio nos puede dar información de lo que podría ocurrir *in vivo* (Tabla 2). Las MoDCs, así como, las BMDCs de humano, rata, ratón, mono y, más recientemente de porcino y bovino, han sido usadas para estudiar la interacción DC-virus (Banchereau et al., 2000; Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001; Werling et al., 2002).

Un elemento clave es la diferenciación funcional y fenotípica entre las diferentes subpoblaciones de DCs. En líneas generales podemos diferenciar entre la DC convencional (DCc) y la DC plasmacitoide. El primer término engloba a todas las DCs cuya función principal es la de presentar antígenos propiamente dicha y

cuyo origen es mieloide. El segundo representa a las células especializadas en la producción de IFN tipo 1 (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; 2002; Liu, 2005; Summerfield y McCullough, 2009), su origen es linfoide y, en cierto modo, también tienen la habilidad de presentar antígenos. Dentro de las DCc existe una gran heterogeneidad dependiendo de su localización en los diferentes tejidos (Tabla 2).

	CD172a	CD1	CD4	CD11R1	CD14	CD16	MHCII	CD80/86
MoDC	+	+	-	-	+/low	+	+	+
GM-CSF BMDC	+	+	-	-	+	+	+	+
Flt3L BMDC	+	+	-	-	+/- ^a	+	+	+
blood cDC	low	+/- ^b	-	-	-	+/- ^b	high	+
pDC	low/- ^c	+/- ^b	+	-	-	+/- ^b	+	low
thyroid gland DC	+	n.d. ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.
thymus DC	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.
skin DC	+	+	n.d.	n.d.	±	n.d.	+	+
mucosal tissue DC	+/- ^e	- ^f	n.d.	+/- ^e	- ^f	+	+	+
mucosal lymph DC	+/- ^g	+/-	n.d.	+	n.d.	+/- ^g	+	+
monocytes	+	-	-	-	+	+	+/-	low
macrophages	+	+/-	-	-	+/-	+	low	low
fibrocytes	+	+	n.d.	n.d.	+	+	+	+

^a Two subsets.

^b Variable, two subsets with some animals (see also Fig. 1).

^c Can be negative in mucosal tissue [55].

^d Not determined.

^e Four subsets based on CD172a/CD11R1 expression and dependent on localization in LP, PP and MLN [47].

^f Negative on LP DC [46].

^g Two subsets: CD172a⁺CD1⁺CD16⁺ and CD172a⁻CD1⁻CD16⁻.

Tabla 2.- Localización tisular y diferenciación fenotípica de las diferentes subpoblaciones de DCs y otras APCs (Summerfield y McCullough., 2009).

Por su parte, las células dendríticas foliculares (del inglés *Follicular Dendritic Cells*, FDCs) son células residentes del folículo linfoide de los órganos linfoides, parecen tener un origen mesenquimal y su mecanismo de acción difiere completamente de las

DCs de origen mielóide (Liu et al., 1996; Tew et al., 1997; Gómez-Lucía et al., 2007).

En líneas generales, la DC es una célula con morfología estrellada debido a las evaginaciones que presenta su citoplasma, lo que le permite tener una mayor superficie para capturar antígenos extraños al organismo. Su núcleo es redondeado y de localización central (Tizard et al., 2009).

1.2.2.1.- Mecanismo de acción de las DCs (origen mielóide)

Desde su origen en la médula ósea y utilizando la sangre como medio de transporte las DCs colonizan la mayoría de los tejidos del organismo, principalmente las mucosas, donde actúan como centinelas a la espera de cualquier antígeno extraño al organismo (Banchereau y Steinman, 1998; Kindt et al., 2006). En estos tejidos, la DC se encuentra en su estado inmaduro, de forma que tras la captura de un antígeno, éste es degradado y procesado formando los antes mencionados complejos péptido-MHC que, finalmente, exhiben en su superficie. En este momento, las DCs se consideran como “maduras”, aumentando la expresión de moléculas

co-estimuladoras, como el CD80/86, y de factores de adhesión (CD54 y CD58) y migran a los nódulos linfáticos y bazo, donde ahora sí, serán capaces de activar a los linfocitos T y B de forma antígeno-específica (Banchereau y Steinman, 1998; Keller, 2001; Buckwalter y Albert, 2009) (Figura 5).

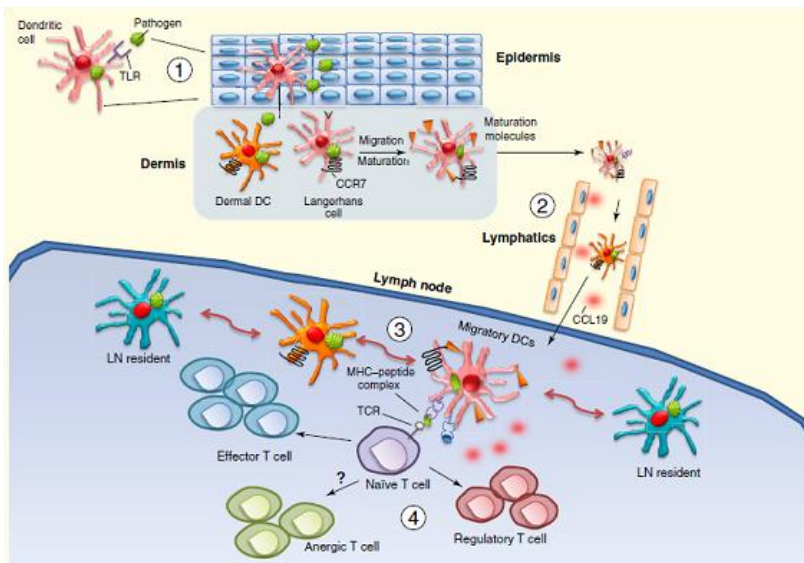


Figura 5.- Esquema que muestra de forma secuencial el ciclo vital de las DCs, en él se ve la interacción con el antígeno, maduración y migración, así como, la interacción con los linfocitos T (Buckwalter y Albert, 2009).

Es importante mencionar que las DCs tienen una doble pero limitada función. Las DCs inmaduras son potentes células fagocíticas, su función es capturar y procesar antígenos, mientras

que, la función principal de las DCs maduras es presentar esos antígenos procesados en forma de péptidos unidos al MHC (Banchereau y Steinman, 1998). Este intercambio de funciones dentro de una misma célula se corresponde con el proceso de maduración de las DCs. En este sentido, Romani et al. (1989) evidenciaron como las DCs inmaduras capturan antígenos y las maduras son inefectivas. En contraste, las DCs maduras son potentes estimuladoras de la respuesta T específica frente a los antígenos capturados, y las inmaduras, totalmente ineficientes. Este hallazgo fue el que hizo que la comunidad científica reconociera que existen dos pasos diferentes y totalmente necesarios, la captura del antígeno y la presentación, la cual va ligada con otras funciones accesorias (Steinman, 2012). Además, hay que puntualizar que la maduración fenotípica de las DCs es un proceso diferente a la maduración funcional de las mismas (Steinman, 2012). En la bibliografía se cita que, tras la presentación antigénica a los linfocitos T en las áreas T de los órganos linfoides secundarios, la mayoría de las DCs desaparecen, probablemente debido a fenómenos de apoptosis (Keller, 2001).

1.2.2.2.- Mecanismo de acción de las FDCs, linfocitos B y macrófagos

Las FDCs pueden ser consideradas como una potente fuente de activación de linfocitos B. Estas células carecen del marcador de leucocitos CD45, pero en contraste, exhiben en su superficie gran cantidad de receptores para el complemento, receptores Fc, CD11b, y CD35, entre otros (Liu et al., 1996; Liu y Arpin, 1997).

La FDC atrapa complejos antígeno-anticuerpo, mediante su receptor Fc y del complemento, y exponen el complejo completo en su superficie durante largos periodos de tiempo. Los linfocitos B reconocen estos complejos inmunes y procesan el antígeno, presentándolo en forma de péptido-MHC, al igual que hacen las DCs a los linfocitos T de las inmediaciones (Tew et al., 1997; Banchereau y Steinman, 1998).

El mecanismo de acción que lleva a cabo el macrófago, célula redondeada a poligonal con amplio citoplasma y núcleo de localización centrada y con forma de herradura o arriñonado, es similar al visto para la DC de origen mieloide y los linfocitos B.

Aunque los macrófagos y los linfocitos B actúan como APCs, la expresión de complejos péptido-MHC es entre 10-100 veces mayor en las DCs (Inaba et al., 1997). Además, las DCs maduras sintetizan grandes cantidades de IL-12 que aumentan tanto la respuesta inmune innata mediada por células asesinas naturales (del inglés *natural killer*, NK) como la respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos T y B (Cella et al., 1996; Koch et al., 1996; Reis e Sousa et al., 1997; Degli-Esposti y Smyth, 2005).

1.2.3.- Interacción entre las APCs y los linfocitos T

Tradicionalmente se ha considerado que las DCs eran las únicas células con la capacidad de activar a los linfocitos T CD4⁺ y a los linfocitos T CD8⁺ naïve, o vírgenes, tanto *in vitro* como *in vivo* (Reid et al., 2000; Tizard et al., 2009). No obstante, si los macrófagos están activos, también pueden actuar activando a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes (Pozzi et al., 2005).

Para que la activación del linfocito T se complete se requieren diferentes señales, la primera de ellas es la unión entre el complejo péptido-MHC y el receptor del linfocito T (TCR). Esta interacción

entre el linfocito T y la APC está facilitada por la liberación de diferentes quemoquinas por las APCs maduras. Las quemoquinas liberadas atraen a linfocitos T que expresan los receptores CCR7 y CCR4 (Tang y Cyster, 1999; Sallusto et al., 2000), y facilitan una serie de interacciones secundarias entre el linfocito T y la APC a través de moléculas de adhesión como ICAM-3, DC-SIGN (Geitjtenbeek et al., 2000) expresadas por las DCs, y las moléculas CD2, CD11 y CD49 expresadas por los linfocitos T. En este sentido destaca por su importancia la unión entre las moléculas co-estimuladoras CD80/86 por parte de la DC y del CD28 por parte del linfocito T. Esta interacción junto con la unión del complejo péptido-MHC y el TCR son requeridas para la activación adecuada del linfocito T, de forma que si sólo una de las señales está presente, el linfocito T no será activado y permanecerá en estado de anergia (Banchereau y Steinman, 1998; Buckwalter y Albert, 2009).

Por otro lado, la unión del CD40 y su ligando (CD40L) también se produce durante esta interacción, la cual favorece la secreción de ciertas citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-12, que parecen tener un papel en la supervivencia de las DCs (Keller, 2001).

1.2.4.- Interacción del PRRSV con las APCs

1.2.4.1.- Susceptibilidad y viabilidad de las APCs tras la infección con el PRRSV

Como ya citamos en la sección anterior, el PRRSV puede replicarse en macrófagos, MoDCs y BMDCs (Charemtantanakul et al., 2006; Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2009; 2010). Pero qué ocurre durante y después de la infección con el PRRSV.

Numerosos estudios apuntan que tanto las células infectadas por el PRRSV como las células colindantes mueren por apoptosis, por necrosis o por ambas vías, como a continuación detallaremos.

La muerte celular puede suceder por dos mecanismos muy diferentes entre sí, la apoptosis y la necrosis (Wyllie et al., 1980). Mientras que la apoptosis es la muerte celular programada, en la que la célula *per se* participa de forma activa en su autodestrucción, la necrosis es la muerte prematura de forma pasiva de una célula (Logue y Martin, 2008). No obstante, al respecto, se han mencionado algunas discrepancias, ya que algunos autores señalan que el término

necrosis engloba los cambios que la célula sufre con motivo de su muerte (Majno y Joris, 1995).

Suárez et al. (1996) describieron por primera vez la relación entre el PRRSV y la inducción de apoptosis, en la cual la proteína p25 (producto proteico de la ORF5) estaba involucrada. Desde ese momento han sido numerosos los estudios que se están llevando a cabo sobre el PRRSV, la muerte celular y las vías por las cuales ésta podría tener lugar.

Durante el transcurso de la infección por el PRRSV se ha detectado la presencia de células en apoptosis tanto en el testículo (Sur et al., 1997), como en el pulmón y órganos linfoides (Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1998; Labarque et al., 2003; Gómez-Laguna et al., 2012). Sin embargo, en estos estudios no había co-localización entre las células positivas a los fenómenos de apoptosis y la expresión de PRRSV, lo cual manifestaba una vía indirecta de inducción de apoptosis, que Choi y Chae, (2002) relacionaron con la secreción de TNF-alpha, citoquina con propiedades pro-apoptóticas.

Estudios *in vitro* han demostrado la presencia de apoptosis en células de la línea ATCC CRL11171 inoculadas pero no infectadas por el PRRSV (Sirinarumitr et al., 1998), y macrófagos y células de la línea MARC-145 en las que el antígeno vírico fue co-localizado al mismo tiempo (Costers et al., 2008). En este último estudio se observó como el PRRSV inducía a la célula a un estado de anti-apoptosis temprano y una vez que la replicación había tenido lugar, la conducía a apoptosis.

Kim et al. (2002) observó la inducción de la apoptosis, aunque esta rápidamente culminaba en necrosis de células MARC-145 tras la infección con el PRRSV, hallazgo que también ha sido descrito por otros autores (Miller y Fox, 2004; Lee y Kleiboeker, 2007).

El estudio de los fenómenos de muerte celular ha sido estudiado también, pero de manera poco profunda, en MoDCs infectadas con diferentes cepas del PRRSV. En estos estudios se han visto tanto fenómenos de apoptosis (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008) como de necrosis (Wang et al., 2007). Sin

embargo, en ninguno de los estudios se realizó una co-localización de la expresión de antígeno vírico y los fenómenos de muerte celular.

Todo ello nos hace pensar que dependiendo del aislado en cuestión los resultados podrían ser diferentes, y que la frecuencia en los porcentajes de apoptosis/necrosis podría variar según la estirpe celular estudiada.

1.2.4.2.- Cambios en la expresión de marcadores de activación de las APCs tras la infección con el PRRSV

En el transcurso de la infección de MoDC se ha detectado que tanto cepas del genotipo Europeo como cepas del genotipo Americano son capaces de disminuir la expresión del MHC-I (Wang et al., 2007, Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2010). En el caso del MHC-II, la expresión del mismo o bien disminuye (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008), o bien su expresión permanece sin cambios (Silva-Campa et al., 2010). Por otro lado, Chang et al., (2008) observaron una disminución del MHC-I en BMDCs infectadas con una cepa Americana del virus, sin embargo, no identificaron ningún cambio en la expresión de MHC-II.

Recientemente se ha descrito que algunas cepas del genotipo Europeo del PRRSV son capaces de aumentar la expresión de SLA-II (del inglés *Swine Leucocyte Antigen* - antígeno leucocitario porcino) mientras que otras no inducen ningún tipo de variación (Gimeno et al., 2011). Lo que es más llamativo de este mismo estudio es que, dependiendo de si se trata de una cepa inductora de IL-10 y/o TNF- α , o bien de ninguna de estas citoquinas, el comportamiento de las BMDCs es diferente.

En el caso del estudio de moléculas co-estimuladoras, como el CD80/86, los resultados también muestran cierta controversia, ya que mientras que algunos autores señalan un aumento en la expresión de CD80/86 tanto en MoDC como en BMDCs (Chang et al., 2008; Park et al., 2008), otros trabajos describen una disminución de la expresión de esta molécula (Flores-Mendoza et al., 2008) (Tabla 3).

Autores	Tipo de DCs	Cepa	MHC-I	MHC-II	CD80/86
Gimeno et al., 2011	BMDC	EU	↓/SC	↑/SC	↓/↑
Silva-Campa et al., 2010	MoDC	EU	↓	SC	-
Silva-Campa et al., 2009	MoDC	US	-	-	-
Park et al., 2008	MoDC	US	↓	↓	↑
Flores-Mendoza et al., 2008	MoDC	US	-	↓	↓
Chang et al., 2008	BMDC	US	↓	SC	↑
Wang et al., 2007	MoDC	US	↓	↓	-

Tabla 3.- Resumen de los diferentes estudios *in vitro* entre la interacción del PRRSV y diferentes subpoblaciones de APCs (EU: Europeo; US: Americano; SC: Sin Cambios) (Fuente propia).

1.3.- LAS CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

Entre la década de los 70 y 80 varios investigadores (Gershon y Kondo, 1970; Möller, 1988) mostraron un interés creciente por la posible existencia de una población de linfocitos T con características supresoras. A mediados de los 90, el interés de la comunidad científica por esta población de linfocitos T supresores resurge (Sakaguchi et al., 1995) y se incrementa notablemente, manteniéndose hasta la actualidad (Chevalier y Weiss, 2012).

Conocidas como “células T reguladoras” o “linfocitos T reguladores” (Tregs), se trata de una pequeña población de linfocitos T cuyas características diferenciales son la expresión del factor de transcripción intranuclear forkhead box P3 (Foxp3) y su habilidad para suprimir la respuesta inmune (Hori et al., 2003; Fontenot y Rudensky, 2005). En humanos y ratones, se diferencian dos subpoblaciones de Tregs: (1) los Tregs naturales (del inglés *natural Tregs*, nTregs), que se desarrollan en el timo, están involucrados en la supresión de enfermedades autoinmunes y fenotípicamente se podrían identificar por la expresión de CD4, CD25 (Sakaguchi et al.,

1995) y Foxp3 (Brunkow et al., 2001); y, (2) los Tregs inducidos (del inglés *induced Tregs*, iTregs), que se desarrollan en los órganos linfoides tras la estimulación de linfocitos T en presencia de IL-2 y TGF- β . Esta segunda subpoblación no tiene un fenotipo tan marcado, pudiendo ser encontrados tanto en linfocitos T CD4⁺ como linfocitos T CD8⁺, aunque sí presentan capacidad supresora y son capaces de producir citoquinas inmunosupresoras o reguladoras, como la IL-10 (linfocitos T_R1) o el TGF- β (linfocitos Th3) (Mills, 2004), estando involucrados en infecciones crónicas, en el mantenimiento de un ambiente anti-inflamatorio, así como, en la tolerancia a los trasplantes (Shevach, 2006; Belkaid, 2007; Andersson et al., 2008; Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009). Esta capacidad supresora puede ocurrir por una o más de las siguientes vías: mecanismos dependientes de contacto celular, secreción de factores solubles con actividad supresora, y competición por factores de crecimiento (Sojka et al., 2008).

Durante el transcurso de ciertas enfermedades como la inmunodeficiencia humana (Weiss et al., 2004), la hepatitis C (Ward et al., 2007) o la inmunodeficiencia felina (Mikkelsen et al., 2011) se

ha señalado un aumento en la población de Tregs que parece explicar la supresión de la respuesta inmune del hospedador.

Es importante mencionar que, al igual que en el resto de células T, la activación de estas células se produce mediante la interacción específica del TCR del linfocito y el complejo péptido-MHC-II de la APC (Malek y Bayer, 2004), así como, por la participación de otras moléculas co-estimuladoras. Además, la capacidad supresora de esta población no sólo afecta a linfocitos Th sino también a otras subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B, DCs, macrófagos, células cebadas, células NK, y linfocitos T NK (Shevach, 2009).

1.3.1.- Fenotipo y distribución de los Tregs porcinos

El estudio de los Tregs en el ganado porcino comenzó hace menos de 5 años, al examinar la presencia de la molécula Foxp3 en diferentes subpoblaciones de linfocitos T. En el año 2008, Käser et al. (2008a) confirmaron, mediante estudios de RT-PCR y Southern Blot, la expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4⁺ CD25⁺, es decir, células con características similares al fenotipo que Sakaguchi et al.

(1995) describieron es su modelo murino. Posteriormente, se observó la expresión de Foxp3 a nivel celular (Käser et al., 2008b) mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-rata/ratón (clon FJK-16s, eBioscience, San Diego, CA) con reactividad cruzada probada con tejidos de porcino (Bolzer et al., 2009) (Figura 6).

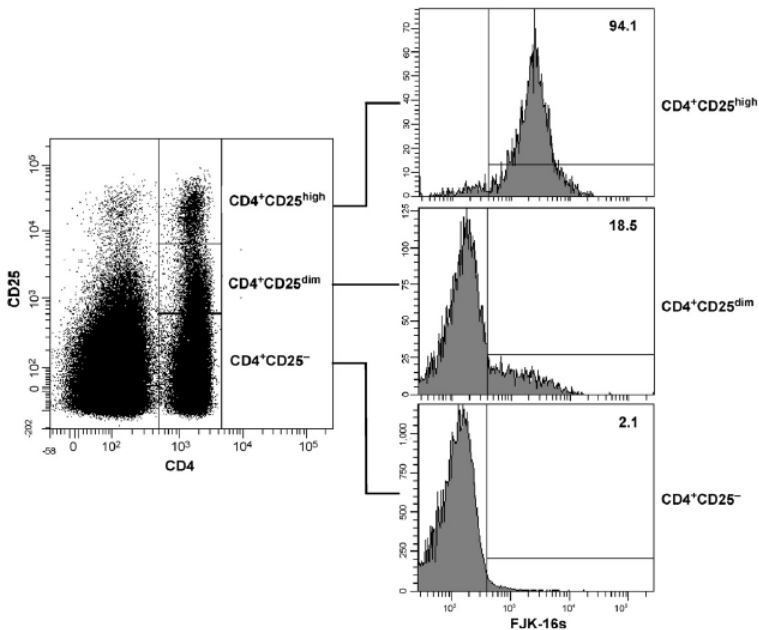


Figura 6.- Expresión del antígeno FJK-16s en las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25^{dim}, CD4⁺CD25^{high}. Los números de la esquina superior derecha de cada histograma indica el porcentaje de células FJK-16s⁺ en el respectivo gate (Käser et al., 2008a).

Este hecho supuso la identificación de Tregs en sangre, bazo, nódulos linfáticos y timo. Demostrándose no sólo la existencia de

linfocitos T CD4⁺CD8^αFoxp3⁺, sino también de linfocitos T CD4⁺CD8^αFoxp3⁺ (Käser et al., 2008b). Además, en el caso de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, estos expresaron porcentajes variables de expresión en las moléculas CD45RC, CD8^α y MHC-II (Käser et al., 2008a; 2008b), moléculas que representan marcadores de activación de las células Th (Saalmüller et al., 1987, 1991, 2002).

1.3.2.- Mecanismos de supresión de los Tregs porcinos

Al igual que se ha visto en humanos y ratones, los Tregs porcinos pueden inducir un estado de supresión por los tres mecanismos antes mencionados (contacto célula-célula; liberación de factores solubles con actividad supresora; competición por factores de crecimiento), sin embargo, a diferencia de humanos y ratones, la producción de IL-10 se ha detectado en el cerdo principalmente en la subpoblación CD4⁺CD25^{dim} (Käser et al., 2008b; 2011).

In vitro se ha observado que los Tregs porcinos podrían regular tanto la respuesta inmune adaptativa como innata dada su capacidad para suprimir no sólo la proliferación de linfocitos Th, sino también la de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T – TCR $\gamma\delta$ (Käser et al., 2011).

1.3.3.- Tregs y el virus del PRRS

En porcino, se ha descrito la disminución o aumento de Tregs durante el transcurso de infecciones parasitarias por *Isoospora suis* y *Ascaris suum*, respectivamente (Dawson et al., 2009; Worliczek et al., 2010). Por ello, debido a la regulación de la respuesta inmune del hospedador que se asocia con la infección por el PRRSV, se pensó que este virus podría inducir la proliferación de Tregs y con ello, frenar la respuesta inmune adaptativa (Darwich et al., 2010).

Silva-Campa et al. (2009) observaron que tras co-cultivar MoDCs que habían sido infectadas con 2 cepas diferentes del genotipo americano, con linfocitos de sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Lymphocytes*, PBLs) autólogos se producía un incremento en la población de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Si en lugar de utilizar virus vivo, éste era inactivado o se añadía IFN- α al co-cultivo la inducción de estas células era suprimida. Además, en el análisis del sobrenadante de estos co-cultivos se observó un incremento en la producción de TGF- β con respecto al grupo control. Sin embargo, cuando este mismo modelo *in vitro* se llevó a cabo

utilizando cuatro aislados diferentes pertenecientes al genotipo europeo, no se observó un aumento en la expresión de Foxp3 (Silva-Campa et al., 2010), lo que indicaría que la capacidad del virus para inducir Tregs podría ser dependiente de ciertos epítomos específicos presentes en uno u otro genotipo del virus.

Posteriormente, Wongyanin et al. (2010) realizaron un estudio tanto *in vitro* como *ex vivo*, en el que analizaron la respuesta reguladora al poner en contacto PBMCs con una cepa del genotipo americano, observando un aumento en la expresión de Foxp3.

Hasta ahora, la población reguladora durante el transcurso del PRRS había sido identificada como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Sin embargo, recientemente se ha señalado no sólo el desarrollo de estas células, sino también de la subpoblación CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, las cuales podrían ser denominadas como células reguladoras de memoria (Silva-Campa et al., 2012). Además, esta subpoblación ha sido correlacionada de manera positiva con la viremia y la producción de TGF-β en un modelo *ex vivo* (Silva-Campa et al., 2012). Por último, se ha señalado que la proteína N del virus podría

estar involucrada tanto en la producción de IL-10, como en el desarrollo de linfocitos Tregs. En este sentido, se ha demostrado como al co-cultivar MoDCs con una proteína N recombinante se produce tanto un incremento en la secreción de IL-10, como un aumento en la subpoblación de linfocitos $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, cuyo efecto es revertido mediante el uso de un anticuerpo anti-IL-10 (Wongyanin et al., 2012).

OBJECTIVES

OBJETIVOS



OBJECTIVES

The objectives of this thesis were:

1. To evaluate the changes in the subpopulations of antigen presenting cells, and T-cells in tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-infected pigs.
2. To assess the *in vitro* effect of two Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus strains, one from each genotype, on the expression of differentiation and activation antigens of monocyte-derived dendritic cells.
3. To analyse the influence of two strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus infected-monocyte-derived dendritic cells on T-cell and regulatory T cell proliferation.
4. To determine *in vitro* the susceptibility and viability of bone marrow-derived dendritic cells to different Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus type 1 isolates.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis fueron:

1. Estudiar los cambios que se producen en las diferentes subpoblaciones de células presentadoras de antígeno y linfocitos T, de la tonsila y nódulos linfáticos retrofaríngeo y mediastínico de cerdos infectados con una cepa de campo del tipo 1 del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
2. Estudiar a nivel *in vitro* el efecto en la expresión de diferentes antígenos de diferenciación y activación en células dendríticas derivadas de monocitos infectadas con dos aislados, uno de cada genotipo, del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
3. Analizar la proliferación de linfocitos T y células T reguladoras durante el co-cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos infectadas con dos cepas del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y linfocitos de sangre periférica autólogos.

4. Determinar la susceptibilidad y viabilidad de células dendríticas derivadas de médula ósea a la infección *in vitro* con diferentes cepas del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino englobadas en el tipo 1.

2.- EXPERIMENTAL STUDIES

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

2.1.- In vivo study: Downregulation of antigen presenting cells in tonsil and lymph nodes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs

2.2.- In vitro study: Effect of monocyte-derived dendritic cell infection with PRRSV on the expression of differentiation and activation antigens and the influence on T-cell activation

2.3.- Ongoing in vitro study and preliminary results: Susceptibility and viability analyses of bone marrow-derived dendritic cells to different Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus type 1 isolates



2.- EXPERIMENTAL STUDIES

2.1.- In vivo study: Downregulation of antigen presenting cells in tonsil and lymph nodes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs

Published on: Transboundary and Emerging diseases, 2012 Jul 23.

Doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01363.x.

Introduction

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most important diseases in swine industry, causing economic losses that can ascend to 560 million dollars per year (Neumann et al., 2005). PRRS is caused by a virus, named PRRS-virus (PRRSV), which belongs to the order *Nidovirales*, family *Arteriviridae* and genus *Arterivirus* (Fauquet et al., 2005). There are two genotypes, European genotype (or type 1) and American genotype (or type 2), sharing both genotypes 55-70% of nucleotide identity (Mateu et al., 2006).

PRRS is characterized by a prolonged viraemia and persistent infection (Meulenberg et al., 1993; Albina et al., 1994; Rossow et al., 1995). The immune response against PRRSV infection appears to be inefficient in inducing viral clearance from lymphoid tissues during the acute and chronic phases of the disease (Batista et al., 2004). Although PRRSV has a restricting tissue and cellular tropism to cells of the monocyte/macrophage lineage in the lung and lymphoid organs, the role of antigen presenting cells (APCs) in lymphoid organs of PRRSV-infected pigs is unclear.

The main function of APCs consists of the capture of different antigens and their presentation to T lymphocytes in order to trigger off an effective immune response. The main APC is the dendritic cell (DC) but macrophages and B lymphocytes also may act like APCs (Banchereau and Steinman, 1998; Tizard et al., 2009; Harding and Ramachandra, 2010; Kumar et al., 2010). The Major Histocompatibility Complex (MHC) class II molecule is expressed in the surface of APCs and support antigen presentation to CD4 T lymphocytes in order to induce an immune response (Tizard et al., 2009; Kumar et al., 2010).

PRRSV is able to replicate in pig monocyte-derived DCs (Mo-DCs) and to induce a down-regulation in the expression of MHC class II (Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008). On the other hand, Silva-Campa et al. (2010) observed that the expression of SLA-II remained unaltered in Mo-DCs infected by four different type 1 PRRSV strains. Indeed, a recent article reviewed in the literature shows that SLA-II can be decreased or unchanged in bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) and, that the behaviour of BM-DCs against PRRSV-infection differs depending on the strains (Gimeno et al., 2011). However, to our knowledge, there are no *in vivo* and *in situ* studies concerning the role of antigen presenting cells in this disease.

In this study, we have evaluated the changes in the different subpopulations of APCs, T and B lymphocytes in the tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes of pigs experimentally infected with a European PRRSV field isolate.

Materials and Methods

Virus, animals and experimental design

Thirty-two 5 week-old specific pathogen free pigs from a historically PRRSV seronegative farm were used in this study. The animals were housed 10 days prior to challenge in biocontainment level III facilities of the Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA; Valdeolmos, Madrid, Spain) in order to guarantee the health status and the adaptation of the animals to the stable. After that, the animals were randomly separated in eight groups of four animals into each group. Seven groups were inoculated intramuscularly with 1 ml of the third passage of a PRRSV field isolate 2982 (kindly provided by Dr. E. Mateu) at $10^{3.0}$ TCID₅₀ (GenBank accession number EF429108). The remaining group was inoculated with 1 ml of sterile RPMI 1640 medium and used as control group. Inoculated animals were killed at 3, 7, 10, 14, 17, 21 and 24 days post-inoculation (dpi). Control group was killed at the end of the experiment (24 dpi). All animals were sedated with tiletamine-zolazepam (Zoletil™; Vet Limited, Leyland, Lancashire) followed by a lethal dose of 5% sodium thiopental (Thiovet, Vet Limited, Leyland, Lancashire). The experiment was carried out

according to the guidelines of the European Union (Directive 86/609/EEC) and was approved by the local ethical committee.

Clinical signs, gross pathology and histopathology of lymphoid organs

The pigs were monitored daily for clinical signs, and a clinical respiratory score was established throughout the experiment, as described previously (Halbur et al., 1995c). Post mortem examination was performed following standard operational procedures. At necropsy, macroscopic lesions from tonsil and lymph nodes were evaluated recording any significant lesion i.e. enlargement, hyperaemia or haemorrhages. Tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes samples were collected and fixed in 10% buffered formaldehyde and Bouin's solution for the histopathological and immunohistochemical examination. Formalin-fixed samples were sectioned and stained with haematoxylin and eosin for the histopathological study. Microscopically, the size, presence of depletion, germinal center activation, presence of apoptotic bodies, pyknotic cells, necrotic areas and mitotic figures were evaluated in

the lymphoid follicle. In the lymphoreticular area of the tonsils or paracortex of lymph nodes, histiocytic changes, necrosis, pyknotic cells and mitosis were assessed. Sections were blindly examined and given an estimated score by two pathologists: 0 = no microscopic changes, 0.25 = mild microscopic changes, 0.50 = moderate microscopic changes, 0.75 = moderate to high microscopic changes and 1 = high microscopic changes.

Serum samples and viraemia

Blood samples were collected prior to inoculation and at the different time-points (3, 7, 11, 14, 17, 21 and 24 dpi). Blood samples were taken in whole blood tubes without anticoagulant (Vacutainer™, Becton, Dickinson and Company), allowing them to clot at room temperature, centrifuge, collection of the serum and freeze at -80° C until use. Viraemia was measured in serum samples in a previous study from our research group (Gómez-Laguna et al., 2009). Briefly, the virus titration was performed by cultivating 50 µl of tenfold serial dilutions of serum samples on porcine alveolar macrophages (PAMs) from PRRSV-negative pigs, and were incubated at 37°C for 1 hour

(h). The samples were replaced by medium, and the PAMs were incubated for 72 h at 37° C for developing cytopathic effect, and then were washed once with PBS, and further stained using an IPMA (Wensvoort et al., 1991). For specific antibody binding, 50 µl of serial fourfold dilution of serum samples were incubated on MARC-145 cells for 1 h at 37° C, and were stained using an IPMA.

Immunohistochemical study

Four µm formalin or Bouin's-fixed sections from tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes were dewaxed in xylene for 30 minutes (min) followed by absolute ethanol for 10 min. The endogenous peroxidase activity was quenched in H₂O₂ 3% in methanol for 45 minutes. Subsequently, sections were rehydrated in 96% ethanol and 70% ethanol. The slides were exposed to different antigen retrieval methods or left untreated (without antigen retrieval) as summarized in Table 1.

Specificity	Type of Antibody	Origin	Fixative	Dilution	Antigen retrieval
Anti-PRRSV (clone SDOW 17/SR-30)	mAb	Rural Tech. Inc.	Bouin	1 in 1000	HTAR pH 6 MW
Anti-S100	pAb	Dako	Bouin	1 in 500	Tween 20 0.01%
Anti-human HLA-DR (Clone TAL. 1B5)	mAb	Dako	Formaldehyde 10%	1 in 20	HTAR pH 3.2 MW
Anti-pig SWC3 (Clone BL1H7)	mAb	Dako	Bouin	1 in 10	HTAR pH 3.2 MW
Anti-CD3 (Clone 68B6A3)	mAb	Dako	Formaldehyde 10%	1 in 200	None
Anti- λ -chain	pAb	Dako	Formaldehyde 10%	1 in 1000	HTAR pH 3.2 MW

Table 1.- Summary of immunohistochemical study - mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody; HTAR, high temperature antigen retrieval with citrate buffer; Tween, incubation in Tween 20 diluted 0.01% in phosphate buffered saline for 10 min; MW, microwave oven.

Sections were washed with phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4, 0.01M) and incubated for 30 min at room temperature with 100 µl of blocking solution in a humid chamber. Table 1 (page 96) summarizes the primary antibodies details. All primary antibodies were incubated overnight at 4 °C in a humid chamber. Biotinylated secondary antibody was incubated for 30 min at room temperature and avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, California) was applied for 1 h at room temperature. Immunostaining was “visualized” by application of the NovaRED™ substrate kit (Vector Laboratories). Sections were counterstained with Harris’s haematoxylin, dehydrated and mounted. For negative controls, the primary antibody was replaced by blocking solution and normal serum. Antibody specificity was verified by substituting the primary antibody with isotype-matched reagents of irrelevant specificity.

Cell Counting

The number of labelled cells was determined as described previously (Salguero et al., 2005). Briefly, the labelled cells were

counted in 25 non-overlapping and consecutively selected high magnification fields of 0.20 mm² (lymphoreticular areas of tonsils and paracortex and medulla of lymph nodes) or 25 non-overlapping consecutive selected structures (lymphoid follicles of tonsils and lymph nodes) for each animal. Results are expressed as the number of cells per mm² for follicular dendritic cells, interstitial dendritic cells, macrophages and B lymphocytes. T lymphocytes counts are expressed using the following score: 1 ($\leq 33\%$ positive cells/mm²), 2 (>33 up to $\leq 66\%$ positive cells/mm²), and 3 ($>66\%$ positive cells/mm²). Immunolabelled cells were indentified and counted morphologically as macrophages-like cells, follicular dendritic cells, interstitial dendritic cells, lymphocytes or plasma cells.

Statistical Analysis

The data were statistically evaluated using GraphPad Instat 3.05 software (GraphPad Instat 3.05, San Diego, California). These values were evaluated for normality of distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between the means of control and inoculated animals were assessed by the Mann-Whitney-U non

parametric test. Correlation between immune cell markers and PRRSV expression in the tonsil and lymph nodes was assessed by the Spearman test (GraphPad InStat 3.05). Differences in results that had P values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Clinical signs, gross pathology and histopathology

Control animals did reveal neither clinical signs nor gross pathology lesions throughout the experiment. More than 20% of inoculated animals exhibited mild dullness and weight loss from 3 dpi onwards (Gómez-Laguna et al., 2009). Both, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes presented mild-to-moderate enlargement from 10 dpi until the end of the experiment. Histopathological findings showed an increase in the number of apoptotic bodies at the end of the experiment in tonsil (21 dpi; $P<0.05$), retropharyngeal and mediastinal lymph nodes (24 dpi; $P<0.05$). The number of pyknotic cells was also enhanced from 3 to 21 dpi in the mediastinal lymph node ($P<0.05$) (Barranco, I., unpublished results).

Viraemia

Control animals remained uninfected throughout the study. Virus was first detected in inoculated animals at 3dpi (4 out of 8 pigs), at 7 and 10 dpi all inoculated animals were viraemic decreasing from this time-point until the end of the experiment where 2 out of 4 animals remained viraemic (Gómez-Laguna et al., 2009).

Immunohistochemical study of the tonsil

The expression of PRRSV antigen, mainly expressed by macrophages-like cells of the lymphoreticular area, was detected from 3 dpi showing a significant enhancement from 14 dpi until the end of the study (Figs. 1A and 4A).

The antibody against S100 protein was used to identify follicular dendritic cells (FDCs), as previously described (Ramos et al., 1992; Pérez et al., 2001). These cells were identified within the lymphoid follicles of the studied organs with typical star-shaped and long branched projection cells. No changes were observed in the counts of FDCs in the tonsil of PRRSV-inoculated animals with respect to control group throughout the study (Figs. 1B, 4C and 4D).

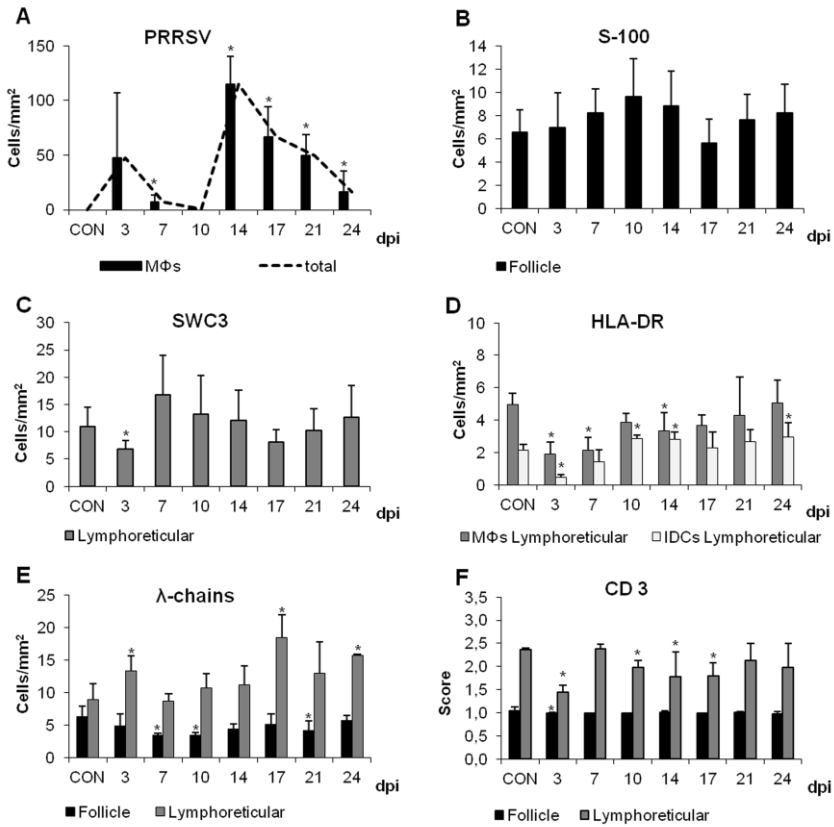


Fig. 1.- Tonsil. Counts for PRRSV (A), S-100 (B), SWC3 (C), HLA-DR (D), λ -light chains (E) and CD3 (F) of the tonsil from control (CON) and inoculated pigs with PRRSV field isolate 2982. * Indicates statistically significant differences with respect to control group ($P < 0.05$).

SWC3 antibody was used to stain macrophage cells (Álvarez et al., 2000; Domenech et al., 2003; Tingstedt et al., 2003; Salguero et al., 2005). The expression of SWC3 showed a significant decrease

with respect to control group only at 3 dpi in the lymphoreticular tissue, recovering baseline values from 7 dpi onwards. Scattered positive cells were also found within the lymphoid follicles (Figs. 1C, 4E and 4F). Macrophages were recognized as cells with unique jagged nucleus and wide cytoplasm.

Immunopositive cells for the HLA-DR antibody (Fig. 1D), which has specificity for the α -chain of human MHC-II and cross reacts with swine tissue (Tanimoto and Ohtsuky, 1996), were also morphologically differentiated into three different subpopulations: HLA-DR positive FDCs, HLA-DR positive interstitial dendritic cells (IDCs) and HLA-DR positive macrophages. Although B cells also displayed immunolabelling against HLA-DR antibody, this subset was excluded from the figures since its counts were in all the cases lower than 1 cell per mm². IDCs were identified as star-shaped cells, with small nuclei and dispersed euchromatin within the lymphoreticular or paracortical tissue of tonsil or lymph nodes, respectively. The other two cell subsets were recognized as described above. No FDCs were immunolabelled either in the control group or in inoculated animals. The immunolabelling of IDCs and HLA-DR

positive macrophages showed a similar trend with a significant decrease from 3 dpi and a significant enhancement from 10 dpi only in IDCs. Although the kinetics followed by these subpopulations was similar, the number of macrophages was higher than the number of dendritic cells.

Immunostaining for λ -light chains, used to characterize the changes observed in the subpopulations of plasma cells, displayed a significant decrease at the beginning of the experiment (7-10 dpi) in lymphoid follicles. In the lymphoreticular tissue, the expression of λ -light chains were higher than in follicles and showed a progressive enhancement until the end of the experiment ($P<0.05$) (Fig. 1E).

CD3 positive T lymphocytes, mainly immunolabelled in the lymphoreticular tissue of the tonsil, were under basal levels throughout the experiment. The kinetic of these cells was irregular showing a significant decrease at 3, 10, 14 and 17 dpi (Fig. 1F).

Immunohistochemical study of the retropharyngeal lymph node

The expression of the virus displayed a similar kinetics than the one previously described for the tonsil. The expression of

PRRSV was detected from 3 dpi showing a significant increase at 14 dpi and decreasing until the end of the study (Figs. 2A and 4B). Immunolabelled cells corresponded mainly with macrophages-like cells of the paracortex of the lymph node.

The expression of S100 (FDCs) was under basal levels throughout the study, with a significant decrease at all time points except at 10 and 17 dpi (Fig. 2B).

The number of SWC3 immunolabelled cells decreased progressively throughout the study, being statistically significant at 3, 10 and 14 dpi in the paracortex and at all time-points except for 21 dpi in the medulla (Fig. 2C).

HLA-DR positive macrophages displayed a similar trend both in the paracortex and the medulla of the lymph node showing an erratic curve with a significant decrease along the study (at 3, 7, 14, 21 and 24 dpi). The expression of HLA-DR antibody by IDCs in the paracortex tissue displayed a similar kinetics than the one observed for macrophages (Figs. 2D, 5A and 5B).

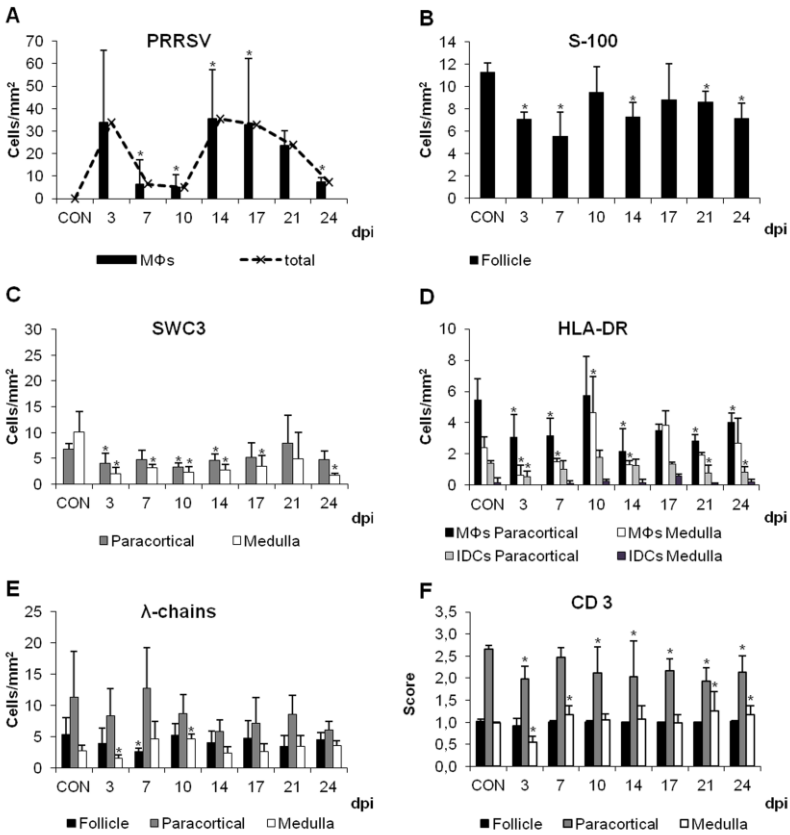


Fig. 2.- Retropharyngeal lymph node. Counts for PRRSV (A), S-100 (B), SWC3 (C), HLA-DR (D), λ -light chains (E) and CD3 (F) of the retropharyngeal lymph node from control (CON) and inoculated pigs with PRRSV field isolate 2982. * Indicates statistically significant differences with respect to control group ($P < 0.05$).

Positive labelling for λ -light chains showed a decrease at the beginning of the study at 3 and 10 dpi in the medulla and follicle, respectively, reaching normal values at the end of the study (Fig. 2E).

In the paracortex of the lymph node, immunolabelling for CD3 positive T cells was significantly diminished with respect to control group at 3, and from 10 to 24 dpi. On the other hand, the expression of CD3 in the medulla displayed a significant decrease at 3 dpi, showing onwards a moderate increase (7, 21 and 24 dpi; $P<0.05$) (Fig. 2F).

Immunohistochemical study of the mediastinal lymph node

The expression of PRRSV antigen showed a positive reaction in the cytoplasm of macrophages-like cells in the medulla of the lymph node from 3 dpi, showing a maximum at 7 dpi and decreasing onwards (Fig. 3A).

The expression of S100 protein (FDCs) in the lymphoid follicles of mediastinal lymph node was significantly decreased in inoculated animals with respect to control animals throughout the experiment (10, 14 and 21 dpi; $P<0.05$) (Fig. 3B).

The expression of SWC3 displayed a decreasing kinetics throughout the study both in the medulla and the paracortex (Fig.

3C), showing inoculated animals lower expression of SWC3 than the control group (14 to 21 dpi; $P<0.05$).

Immunolabelling for HLA-DR positive macrophages was significantly decreased throughout the study in the medulla and paracortex of the lymph node, which was more accentuated at 7 and 14 dpi. The expression of HLA-DR by IDCs in inoculated animals was below the levels showed by control group throughout the experiment, both in the medulla (3, 7, and 14 dpi; $P<0.05$) and the paracortex (7, 21 and 24 dpi) of the mediastinal lymph node (Fig. 3D).

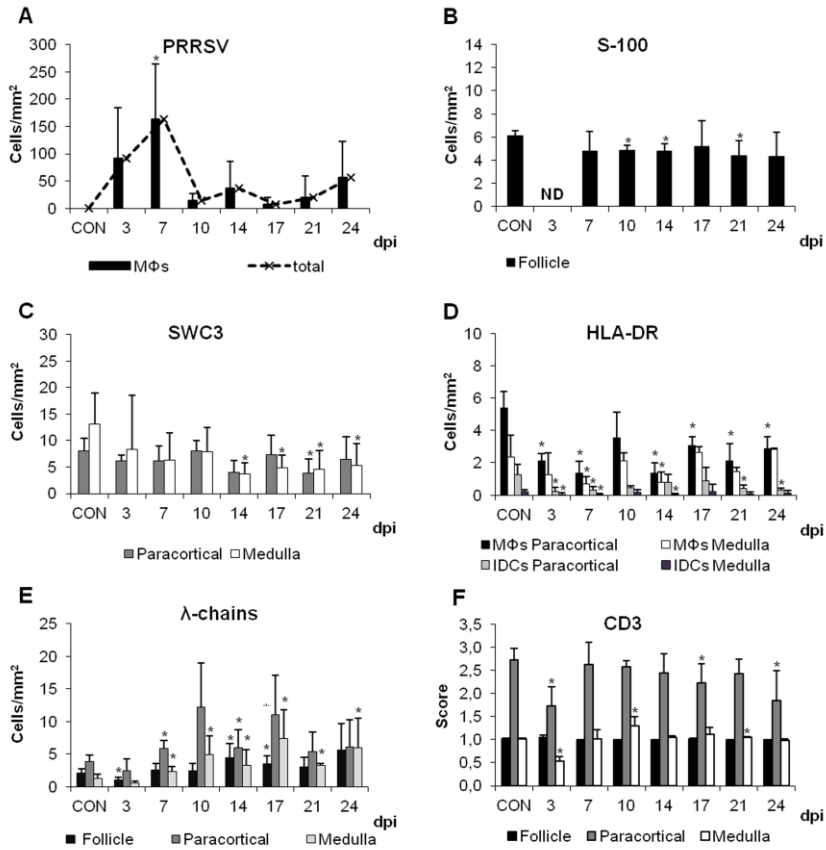


Fig. 3.- Mediastinal lymph node. Counts for PRRSV (A), S-100 (B), SWC3 (C), HLA-DR (D), λ -light chains (E) and CD3 (F) of the mediastinal lymph node from control (CON) and inoculated pigs with PRRSV field isolate 2982. * Indicates statistically significant differences with respect to control group ($P < 0.05$).

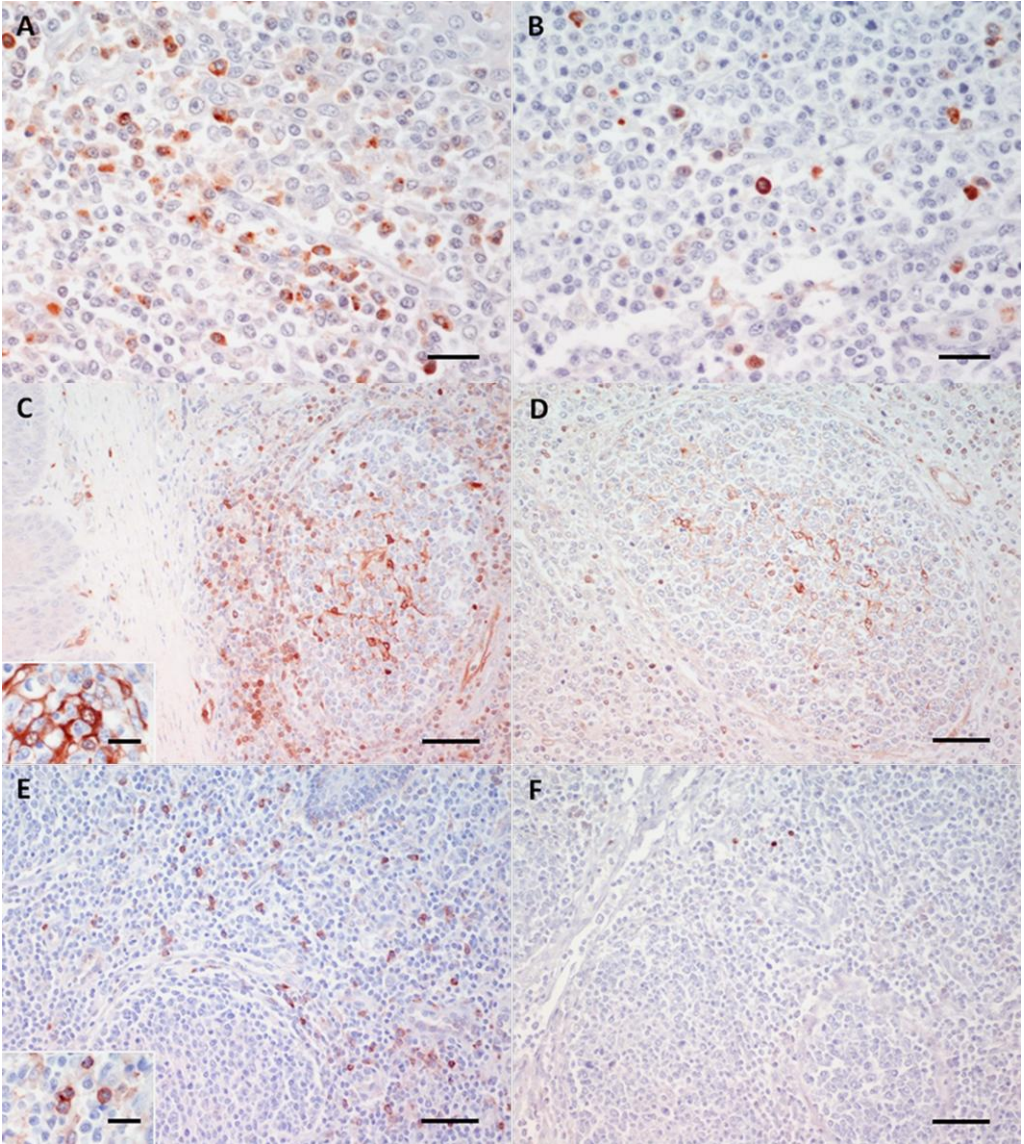


Fig. 4.- Legend in page 107.

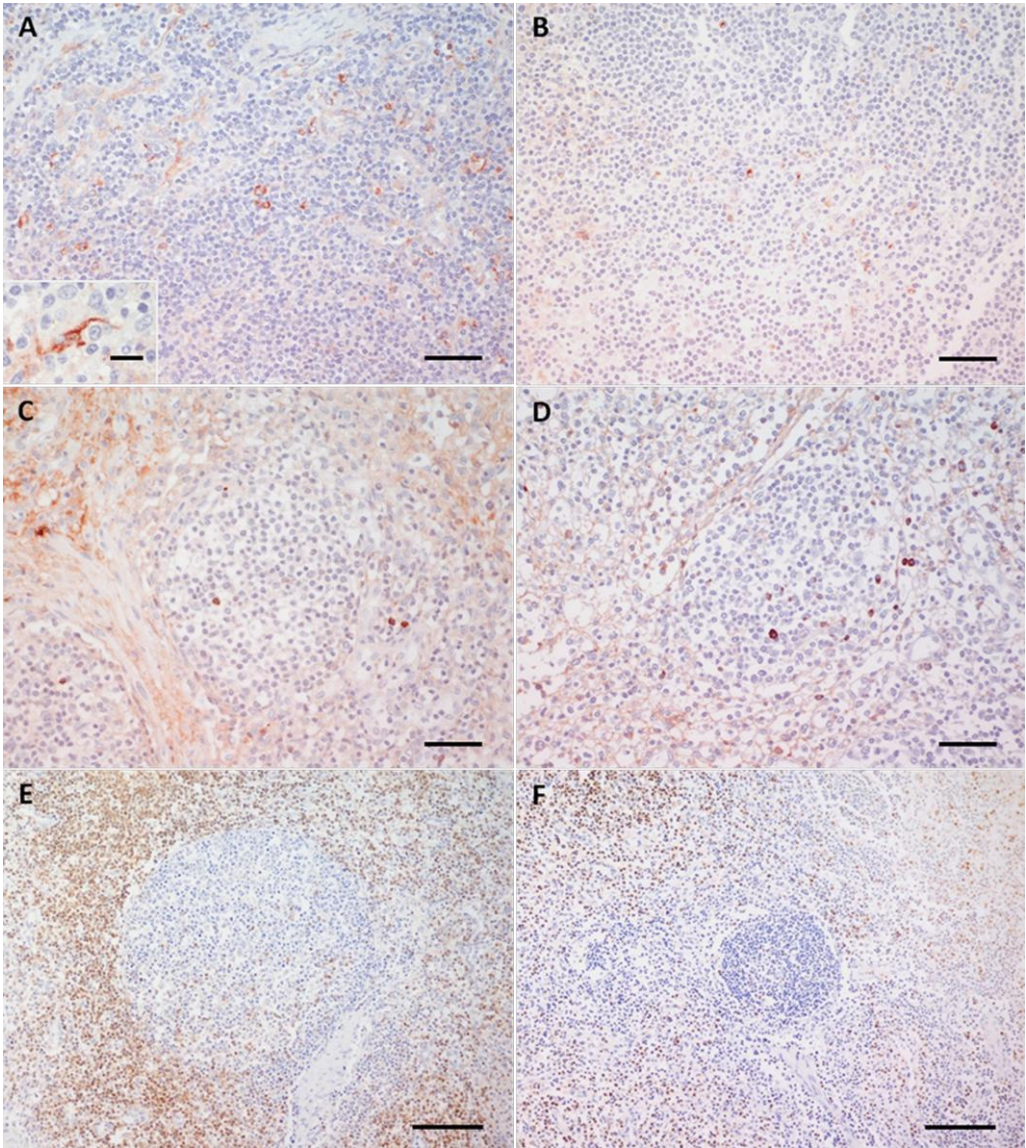


Fig. 5.- Legend in page 107.

Fig. 4.- (A) Macrophages of the tonsil expressing PRRSV antigen in a pig killed at 17dpi. IHC. Bar, 25 μ m. (B) Macrophages of the retropharyngeal lymph node expressing PRRSV antigen in a pig killed at 14dpi. IHC. Bar, 25 μ m. (C, D) FDCs expressing S-100 in the lymphoid follicle of the tonsil in a control pig and a pig killed at 17dpi, respectively. IHC. Bar, 60 μ m. *Inset (C)*: Detail of several FDCs immunolabelled against S-100 in the lymphoid follicle of the tonsil of a control animal. IHC. Bar, 8 μ m. (E, F) Macrophages expressing SWC3 in the lymphoreticular area of the tonsil in a control pig and a pig killed at 3dpi, respectively. IHC. Bar, 60 μ m. *Inset (E)*: Detail of several macrophages displaying a cytoplasmic immunostaining against SWC3 antibody in the tonsil of a control animal. IHC. Bar, 8 μ m.

Fig. 5.- (A, B) Macrophages expressing HLA-DR in the paracortical area of the retropharyngeal lymph node in a control pig and a pig killed at 10dpi, respectively. IHC. Bar, 60 μ m. *Inset (A)*: Detail of an IDC with elongated cytoplasmic projections and intracytoplasmic HLA-DR immunolabelling in the lymph node of a control animal. IHC. Bar, 8 μ m. (C, D) Plasma cells expressing λ -light chains in the lymphoid follicle and paracortical area of the mediastinal lymph node in a control pig and a pig killed at 17dpi, respectively. IHC. Bar, 60 μ m. (E, F) T cells expressing CD3 in the lymphoid follicle and paracortical area of the mediastinal lymph node in a control pig and a pig killed at 24dpi, respectively. IHC. Bar, 100 μ m.

The expression of λ -light chains was significantly enhanced in inoculated animals, showing a curve with two peaks at 10 and 17 dpi ($P<0.05$), and remaining at high levels until the end of the study in the medulla. In the paracortex there was also an increased kinetics

from 7 dpi onwards (Figs. 3E, 5C and 5D). These changes were more marked in the paracortex, followed by the medulla and in a lesser extent in the lymphoid follicles.

The expression of CD3 antigen in the paracortex of the lymph node of inoculated animals was decreased with respect to control group, showing significant differences at 3, 17 and 24 dpi. In the medulla, the expression of CD3 displayed an erratic curve with a statistically significant decrease at 3 and 21 dpi, and increasing significantly at 10dpi (Figs. 3F, 5E and 5F).

Correlation study

A significant negative correlation between HLA-DR and PRRSV antigen expression was found in both retropharyngeal ($r=-0.79$; $P=0.028$) and mediastinal ($r=-0.88$; $P=0.007$) lymph nodes of PRRSV-infected pigs (Figs. 6A, 6B and 6C). Contrary, no correlation was found between HLA-DR and viral antigen expression in tonsil of inoculated animals ($r = -0.31$; $P=0.46$). Moreover, no significant correlation was observed between the remaining immune cell markers and PRRSV.

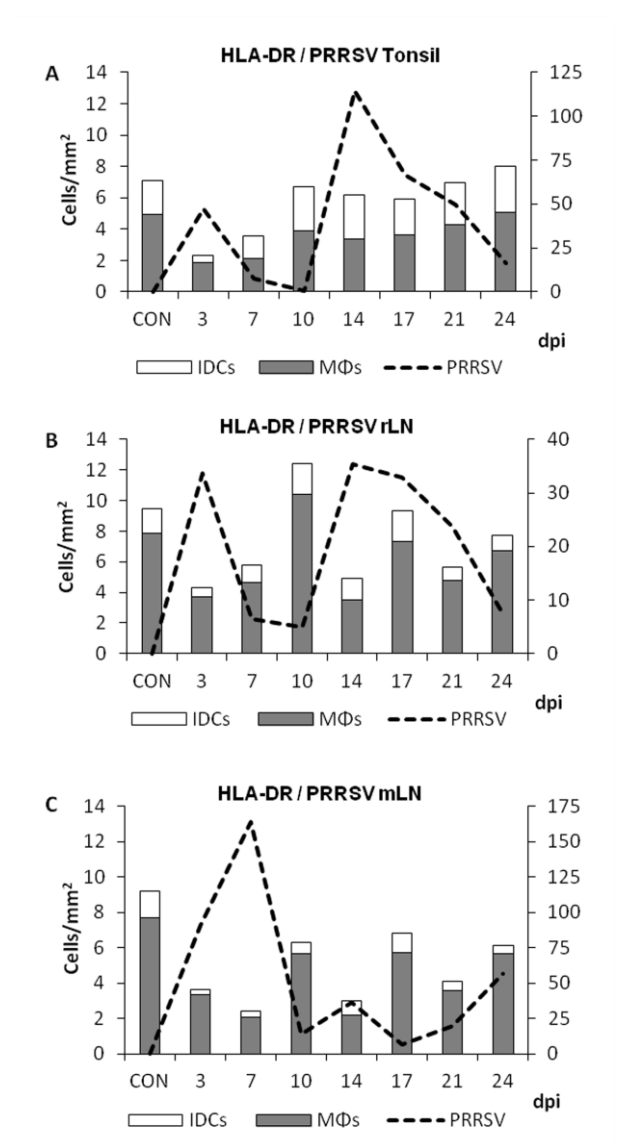


Fig. 6.- (A, B, C) Total expression of HLA-DR by macrophages and IDCs (columns, primary axis) together with PRRSV expression (dashed line, secondary axis) of the tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes respectively. rLN: retropharyngeal lymph node; mLN: mediastinal lymph node.

Discussion

Our study showed that the expression of S100, SWC3, HLA-DR and CD3 in pigs experimentally infected with a type 1 PRRSV strain was decreased in the tonsil, retropharyngeal and mediastinal lymph nodes.

A significant decrease in the number of FDCs (S100 positive cells) was found in both retropharyngeal and mediastinal lymph nodes without changes in tonsil of inoculated animals. However, FDCs displayed no positive immunolabelling to HLA-DR. This finding may be due to the fact that this subset of DCs is not specialized in presenting antigens (Liu et al., 1996; Gómez-Lucia et al., 2007), and thus FDCs lack of the expression of MHC class II molecules but present intact antigens to B cells (Liu et al., 1996; Tizard et al., 2009).

SWC3 positive macrophages significantly decreased at 3 dpi in tonsil, throughout the experiment in retropharyngeal lymph node, and between 14 to 24 dpi in mediastinal lymph node with respect to control group. Interestingly, at these time-points the number of HLA-

DR positive macrophages was also reduced. Therefore not only is the number of macrophages diminished but also the expression of HLA-DR by them, which might suggest a disruption on their antigen presentation ability. Furthermore, the number of HLA-DR positive IDCs, which has a higher capacity to present antigens, showed a significant decrease at the beginning of the study in all the examined tissues. In addition, we found a significant negative correlation between viral antigen and HLA-DR expression in both retropharyngeal ($r=0.79$; $P=0.028$) and mediastinal ($r=0.88$; $P=0.007$) lymph nodes of PRRSV-infected pigs but not in tonsil maybe due to different cellular organization between these organs. Altogether, these findings point to a downregulation of MHC-II by PRRSV replication, which may subsequently have an impact in T cell subpopulation. Our results agree with several *in vitro* experiments in which the expression of MHC-II molecule was diminished in immature and mature dendritic cells derived from porcine monocytes (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008) and monocyte cultures (Charentantanakul et al., 2006) and infected with PRRS strains. Contrary, Gimeno et al. (2011) observed an

increase in SLA-II expression by BM-DCs with some PRRSV strains, but as it is mentioned in their work the results seem to be clearly strain-dependent, therefore it could be that the strain used in this study has a different behaviour on the expression of SLA-II.

The expression of CD3 positive cells was decreased with respect to control group throughout the experiment in all studied organs. Moreover, the kinetics followed by the different subsets of APCs was similar to the one displayed by CD3 positive cells. In addition, other authors have previously reported a decrease in T cell response induced by PRRSV in co-culture with Mo-DCs (Charerntantanakul et al., 2006; Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008).

How PRRSV affects the ability of antigen presentation is a big issue. In other viral infections, several reports showed that virus replication and even the presence of virus-encoded glycoproteins interrupt antigen-presenting ability of DCs, just as in infections by cytomegalovirus, hepatitis C virus (HCV) and herpes simplex virus (Ahn et al., 1996; Salio et al., 1999; Sevilla et al., 2000; Andrews et

al., 2001). Other viruses, such as canarypoxvirus, can induce apoptosis of infected DCs (Villamide-Herrera et al., 2004). However, other viruses such as classical swine fever or porcine circovirus type 2 can infect DCs and neither induce cell death nor affect significantly immune activity of DCs (Vincent et al., 2003; Carrasco et al., 2004).

According to several studies, PRRSV is able to infect and productively replicate *in vitro* in monocytes, monocytes-derived macrophages, Mo-DCs and bone marrow-DCs (Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008) and *in vivo* in macrophages and IDCs (Meulenbergh et al., 1993; Haynes et al., 1997). In this sense, PRRSV infected-macrophages decrease their phagocytic ability compared with uninfected macrophages (Thanawongnuwech et al., 1997; Chiou et al., 2000). Moreover, PRRSV replication induces apoptosis, necrosis or both of them in DCs (Charentantanakul et al., 2006; Loving et al., 2007; Wang et al., 2007) and macrophages (Suárez et al., 1996; Choi et al., 2002). In our study we found an increased number of apoptotic bodies and pyknotic cells in lymphoid organs throughout the experiment, whereas necrosis was lacking or observed just in low levels. These

findings suggest that the changes observed in the studied immune cells in our study may be also influenced by the apoptosis phenomena trigger off by the viral infection.

With respect to λ -light chains, we found a progressive increase throughout the experiment. That is in agreement with some reports in which specific antibodies against PRRSV in experimentally infected-pigs were detected from 3 dpi (Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005; Gómez-Laguna et al., 2009). According to Yoon et al. (1994) these antibodies could be antibodies with low neutralizing capacity or non-neutralizing antibodies. It is well-known that the appearance of neutralizing antibodies (NA) in PRRS infection occurs around the third or fourth week after infection (Loemba et al., 1996; Takikawa et al., 1996; Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005; Mulupuri et al., 2008), so that viral replication can take place and persist in the organism.

The state of viral persistence together with the failure in T cell response and the delay in the appearance of NA reported in PRRSV infections may increase the development of secondary

infections. In this sense, several investigations showed that pigs infected with PRRSV had enhanced incidence of secondary infections with *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella* spp., and swine influenza virus (Zeman et al., 1993; Done et al., 1995; Thanawongnuwech et al., 2000; Xu et al., 2010). Moreover, during PRRSV infection, bactericide activity by macrophages is also impaired leading to a higher incidence of bacterial infections (Thanawongnuwech et al., 1997; Chiou et al., 2000). The decrease in the counts of APCs and T cells in our study support a modulation of the host immune response which may favor these secondary bacterial or viral infections.

In conclusion, the existence of a negative correlation between PRRSV antigen and HLA-DR expressing cells, as well as, the decrease in the number of APCs may indicate that PRRSV suppresses *in vivo* the number of APCs expressing MHC-II with its subsequent impact in T cells reaction. It will be important to further examine other pathways of immune evasion and PRRSV strains

using *in vivo* models in order to extrapolate those results obtained by means of *in vitro* approaches.

2.2.- In vitro study: Effect of monocyte-derived dendritic cell infection with PRRSV on the expression of differentiation and activation antigens and the influence on T-cell activation

Introduction

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) belongs to the genus *Arterivirus* and comprises two different genotypes designated as type 1 (PRRSV-1) and type 2 (PRRSV-2) (formerly European and American, respectively) (Fauquet et al., 2005; King et al., 2012). PRRSV is the causative agent of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) (Wensvoort et al., 1991; Benfield et al., 1992) and leads to tremendous economical losses in swine production. PRRSV is able to persist in the organism for a long period of time (Christopher-Hennings et al., 1995; Beyer et al., 2000) supported by a delayed onset of both, humoral and cellular immune responses against PRRSV (Wills et al., 1997; Murtaugh et al., 2002; Meier et al., 2003).

The mechanisms of this delay are still under investigation. One possible reason could be a decreased stimulation of T-helper cells by antigen presenting cells (APCs). APCs represent the bridge between the innate and adaptive immune response (Banchereau and Steinman, 1998) mainly by the expression of MHC-II and CD80/86, both mandatory for effective T-helper cell stimulation (Banchereau and Steinman, 1998; Keller, 2001; Buckwalter and Albert, 2009). The role of MHC-II and CD80/86 expression in immunosuppression during PRRSV-infection is controversially discussed (Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2010; Gimeno et al., 2011).

Another possible explanation for the ineffective adaptive immune response may be the activation or induction of regulatory T-cells (Tregs) since Tregs are not only involved in the suppression of autoimmune diseases (natural Tregs, or nTregs) but also the controlled downregulation of immune responses against pathogens (induced Tregs, or iTregs) (Shevach, 2006; Belkaid, 2007; Soyka et al., 2012). It has already been shown that viruses such as the human immunodeficiency virus, hepatitis C virus or feline

immunodeficiency virus (Weiss et al., 2004; Ward et al., 2007; Mikkelsen et al., 2011) use the induction of Tregs in order to suppress or evade the immune response by the host. Since the discovery of porcine Tregs in 2008 (Käser et al., 2008a; 2008b) and the analysis of their suppressive capabilities (Käser et al., 2011) the scientific community has shown an increasing interest in the study of this T-cell subset during PRRSV infection. Hence, some reports showed an increased frequency of and cytokine production by Tregs after PRRSV infection using PRRSV-2 strains (Silva-Campa et al., 2009; 2012; Wongyanin et al., 2010; 2012) but not PRRSV-1 strains (Silva-Campa et al., 2010). The most recent studies indicate an increase of CD4⁺CD8 α ⁺ Tregs (memory-like Tregs) during the course of PRRSV infection and that the N-protein of PRRSV could be involved in the immunosuppressive activity of Tregs (Silva-Campa et al., 2012 Wongyanin et al., 2012).

Due to the controversial discussion of the effect of PRRSV-infection of APCs on their MHC-II and CD80/86 expression, the aim of this study was to assess the influence of *in vitro* infection of Monocyte-derived Dendritic Cells (MoDCs), which have been

already used in various studies on APC-virus interactions (Banchereau et al., 2000; Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001; Werling et al., 2002; Summerfield and McCullough, 2009), with PRRSV-1 and PRRSV-2 strains on the survival, phenotype and function of these APCs by up-to-date multi-colour flow cytometry. Furthermore, the effect of this MoDC-infection on the proliferation and function of T cells and Tregs was assessed by the same methodology.

Materials and Methods

Blood and porcine PBMCs isolation

Six-month-old healthy pigs from an abattoir served as blood donors for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Animals were subjected to electric high voltage anesthesia followed by exsanguination. This procedure is in accordance to the Austrian Animal Welfare Slaughter Regulation. Heparinized blood was collected at the moment of slaughter and tested for the presence of antibodies against PRRSV by an external laboratory for veterinary diagnostic (LABOVET GMBH, Vienna, Austria). Only negative

animals were used for the study. In order to isolate monocytes, PBMCs were separated by gradient density centrifugation using lymphocyte separation medium 1077 (PAA, Pasching, Austria). The PBMC band was carefully collected, washed and resuspended in complete medium (CM) containing RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (300 mg/l) (PAA), 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (PAA), 100 IU/ml penicillin (PAA), and 100 µg/ml streptomycin (PAA). Monocytes were separated from peripheral blood lymphocytes (PBLs) by plastic adherence enrichment for 90 minutes at 37 °C in 5 % CO₂. Afterwards, PBLs were removed and frozen in freezing medium containing 50% RPMI 1640, 40% FCS and 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) until use.

Generation of MoDCs

MoDCs were generated as previously described by Carrasco et al., (2001). Briefly, adhered monocytes were cultured in CM supplemented with 40 ng/ml of recombinant porcine (rp) GM-CSF and 40 ng/ml of rp interleukin-4 (rpIL-4) (R&D Systems) at 37 °C in

5% CO₂. Cells were incubated for 6 days replacing the medium and the cytokines on day 3. For further studies, MoDCs were harvested and resuspended in fresh CM.

Viruses

Two PRRSV strains, one belonging to PRRSV-1 (MA/04P73-Lot 1612-10) and the other to PRRSV-2 (PRRSV-USA-Lot 3011-09) were used in this study. Viruses were cultivated on MARC-145 cells. Supernatants containing the viruses, as well as, mock control were collected, titrated, and stored at -80 °C until use.

Effect of PRRSV infection of MoDCs on their survival and phenotype

MoDCs were seeded onto 96-well tissue culture plates (2×10^5 cells/well) and either non-infected, mock-infected or infected with either PRRSV-1 or PRRSV-2 strain at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 at 37 °C in 5% CO₂. After 12, 24 and 48 hours post-inoculation (hpi) MoDCs were harvested and stained in order to evaluate virus infectivity and its influence on MoDC survival and phenotype by multi-colour flow cytometry. For details of antibodies

and reagents used in this study, as well as, a staining protocol please see section “Flow cytometry analysis” below.

Effect of PRRSV infection of MoDC on the proliferation of T cells and the proliferation and suppressive activity of Tregs

For enabling cell proliferation analysis by flow cytometry, PBLs were labeled with a proliferation marker (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Invitrogen) following manufacturer’s recommendation. Afterwards, PBLs were co-cultured for three days with non-infected, mock-infected MoDCs or PRRSV-infected MoDCs in the presence of plate-bound anti-CD3 antibodies (clone PPT7, IgG1, 1.5 µg/ml; as previously described Yang et al., 1996) for T-cells stimulation. After co-cultivation, cells were stained for flow cytometry as stated in the next section.

Flow cytometry analysis (FCM)

Harvested MoDCs were stained for FCM analysis with monoclonal antibodies against CD1 (clone 76-7-4, IgG2a, Pescovitz et al., 1984), CD14 (clone CAM36A, IgG1, VMRD, Pullman, WA), CD172a (clone 74-22-15A, IgG2b, Pescovitz et al., 1984), or

CD80/86 (CD152/Fc Chimera, IgG2a, Sigma-Aldrich) and MHC-II (clone MSA-3, IgG2a, Hammerberg and Schurig, 1986). As secondary antibodies isotype-specific fluorochrome- or biotin-labelled goat anti-mouse antibodies (α IgG1-biotin, α IgG2a-biotin, SBA, Birmingham, AL; α IgG2a-Alexa 647, α IgG2b-Alexa 647, α IgG2b-phycoerythrin, Invitrogen, Carlsbad, CA) were used. Biotin-labelled secondary antibodies were further marked with Streptavidin Brilliant Violet 421 (BioLegend, Biozym Biotech Trading GmbH, Vienna, Austria). After surface labelling, whole mouse IgG molecules were added in vast excess ($>1 \mu\text{g}$ in $\sim 20 \mu\text{l}$ staining volume) for blocking remaining antibody binding sites of secondary antibodies. Additionally, cells were stained with Live/Dead[®] Fixable Near-IR (Invitrogen-Life technologies[™], Vienna, Austria) for discrimination of live and dead cells. Afterwards, cells were fixed and permeabilized using a commercial kit (eBioscience, San Diego, CA) and stained for PRRSV N-protein (anti-PRRSV-N-Alexa 488, clone HyP10/b1c7c3, IgG1, Friedrich-Loeffler-Institut, Germany). In the study of T-cell and Tregs proliferation assays, cells were stained with anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone 74-12-4, IgG2b; Pescovitz et al.,

1984) an antibody against CD3 (clone PPT3, IgG1, Yang et al., 1996) which was secondarily labelled by α IgG1-phycoerithrin. Afterwards, whole mouse IgG molecules were added in vast excess ($>1 \mu\text{g}$ in $\sim 20 \mu\text{l}$ staining volume) for blocking remaining antibody binding sites and cells were stained with Live/Dead[®] Fixable Near-IR (Invitrogen). After fixation and permeabilization using the eBioscience Foxp3 Staining Buffer Set, antibodies against PRRSV N-protein (HyP10/b1c7c3-Alexa 488) and Foxp3 (α Foxp3-Alexa 647, clone FJK16s, eBioscience, Vienna, Austria) were added. FCM analysis was carried out on a FACSCanto[™] II (BD Biosciences, San Jose, CA) and further analysis were performed using FlowJo software version 7.6 (Treestar, Ashland, OR).

Results

Generation of MoDCs

It has been shown that PRRSV is able to infect MoDCs. Therefore, we had to ensure that we successfully generated MoDCs from the blood monocytes. We analysed the morphology at the beginning of the culture and after seven days of culture in the

presence of rpGM-CSF and rpIL-4. Figure 1a shows the round morphology of monocytes before culture the cells while after culture the cells had various dendrocytes which are typical for MoDCs. Additionally, we looked at the phenotype of the cultured cells. Figure 1b shows that after culture, the cells were CD1⁺CD14⁺CD172⁺ as described for MoDCs by Summerfield and McCullough in 2009.

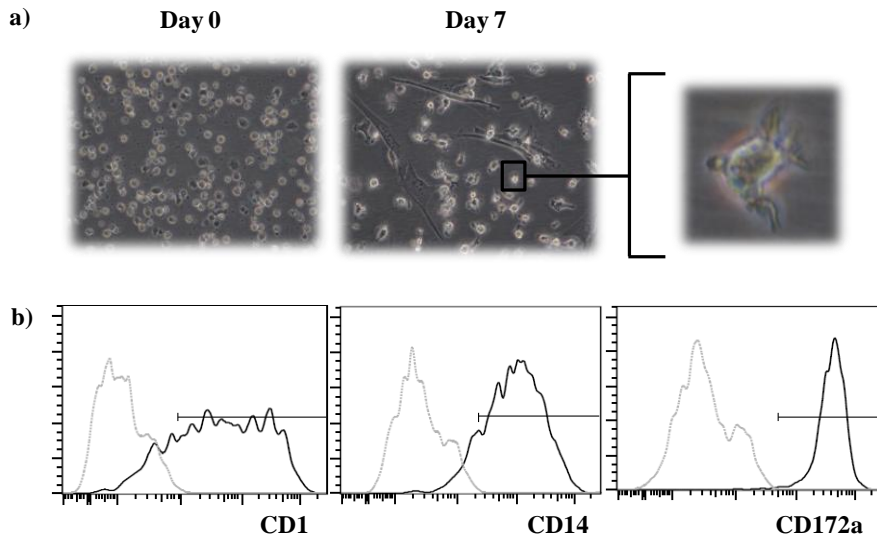


Fig. 1.- *In vitro* generation of MoDCs was verified a) by microscopy analysis of the cultures at 0 and 7 days and b) by flow cytometry analysis at 7 d. Shown are histograms [% of maximum] of control stainings (grey dotted lines) and positive stainings (black solid lines) for CD1, CD14 and CD172a.

PRRSV infection kinetics of MoDCs

MoDCs were infected with PRRSV from PRRSV-1 (MA/04P73-Lot 1612-10) and PRRSV-2 (PRRSV-USA-Lot 3011-09). After 12, 24 and 48 hpi living MoDCs were analysed for PRRSV infection by means of flow cytometry. Both strains followed a comparable time kinetic with an infection rate maximum after 24 hpi (Figure 2a and b).

The percentage (Figure 2b) as well as the amount of virus particles per cell, which corresponds to the Geo-MFI (Mean Fluorescence Intensity) (Figure 2c) of the PRRSV-N-protein staining, of PRRSV-infected living Mo-DCs was higher for PRRSV-1 strain compared to PRRSV-2. In the case of PRRSV-1, all studied pigs (n=4) showed similar percentages of infection after 12 hpi. However, after 24 hpi these percentages differed from one pig to another with a mean of 38.3 %. After 48 hpi, the percentages between pigs were also different showing a mean of 9.3 % (Table 1). For PRRSV-2 strain, the mean of infection was 1.4 % after 12 hpi, 3.4 % after 24 hpi, and 1.0 % after 48 hpi (Table 1).

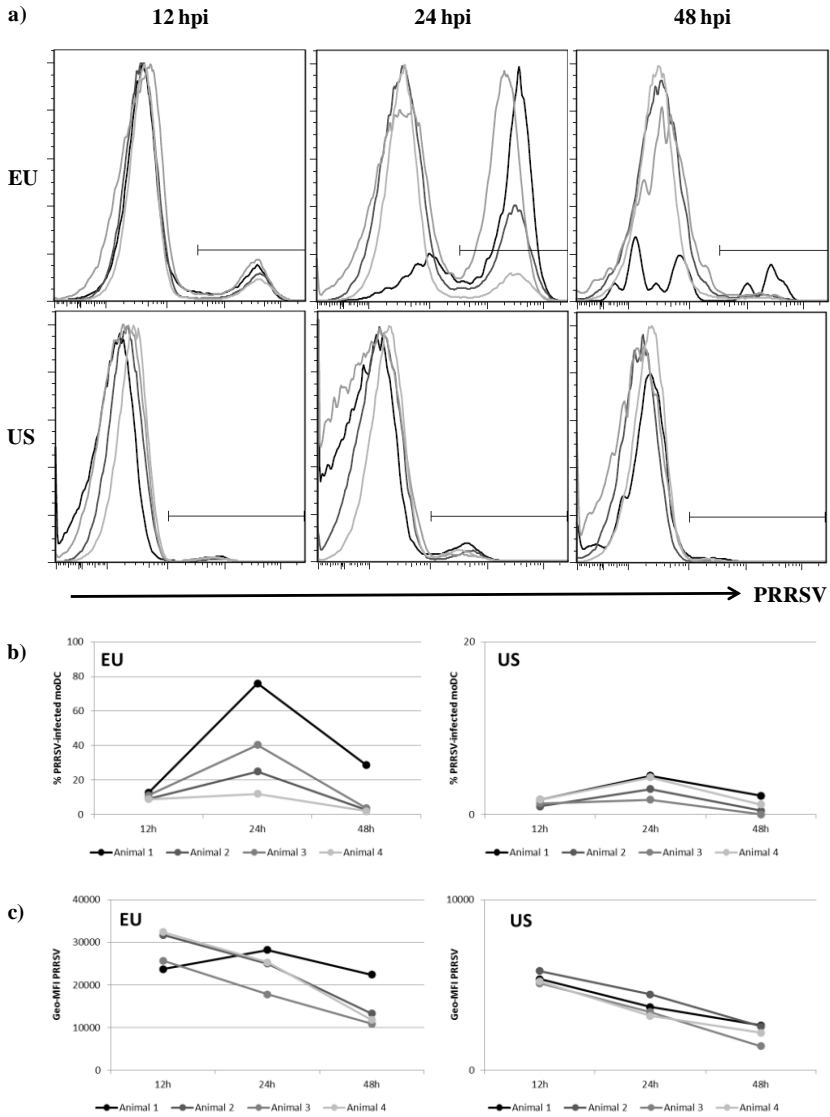


Fig. 2.- Shown are histograms [% of maximum] a) and graphical analysis b) of flow cytometric staining for PRRSV-N protein of living moDC. c) shows the Geo-Mean Fluorescence Intensity (Geo-MFI) of PRRSV-N protein staining of living infected MoDC. (n=4).

EU	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Mean	SD
12h	12.7	9.2	11.2	8.86	10.5	1.8
24h	75.9	25	40.4	12	38.3	27.6
48h	28.6	2.79	3.67	2.02	9.3	12.9
US	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Mean	SD
12h	1.73	0.956	1.3	1.71	1.4	0.4
24h	4.49	2.96	1.71	4.31	3.4	1.3
48h	2.19	0.45	0.033	1.17	1.0	0.9

Table 1.- Summary of PRRSV infection kinetics of MoDCs.

Survival of infected cells

MoDCs were also analysed on their survival in regard to PRRSV infection after 12, 24 and 48 hpi. Throughout the entire cultivation, nearly all uninfected MoDCs survived (Figure 3a [top left histogram]; b [grey dotted line]). Otherwise, PRRSV-infected cells showed an increased death rate with ~85 % for PRRSV-1 and ~38 % for PRRSV-2 (Figure 3a [lower histograms, black lines]; b [black lines]) after 48 hpi. A bystander effect on the death rate of PRRSV-1-inoculated but non-infected cells was observed since also uninfected cells died more frequently after 48 hpi in the presence of PRRSV-1 (Figure 3a [top middle and top right histograms, black lines]; b [grey solid line with triangles]) than in the absence of PRRSV-1 (Figure 3a [top left histogram]; b [grey dotted line]).

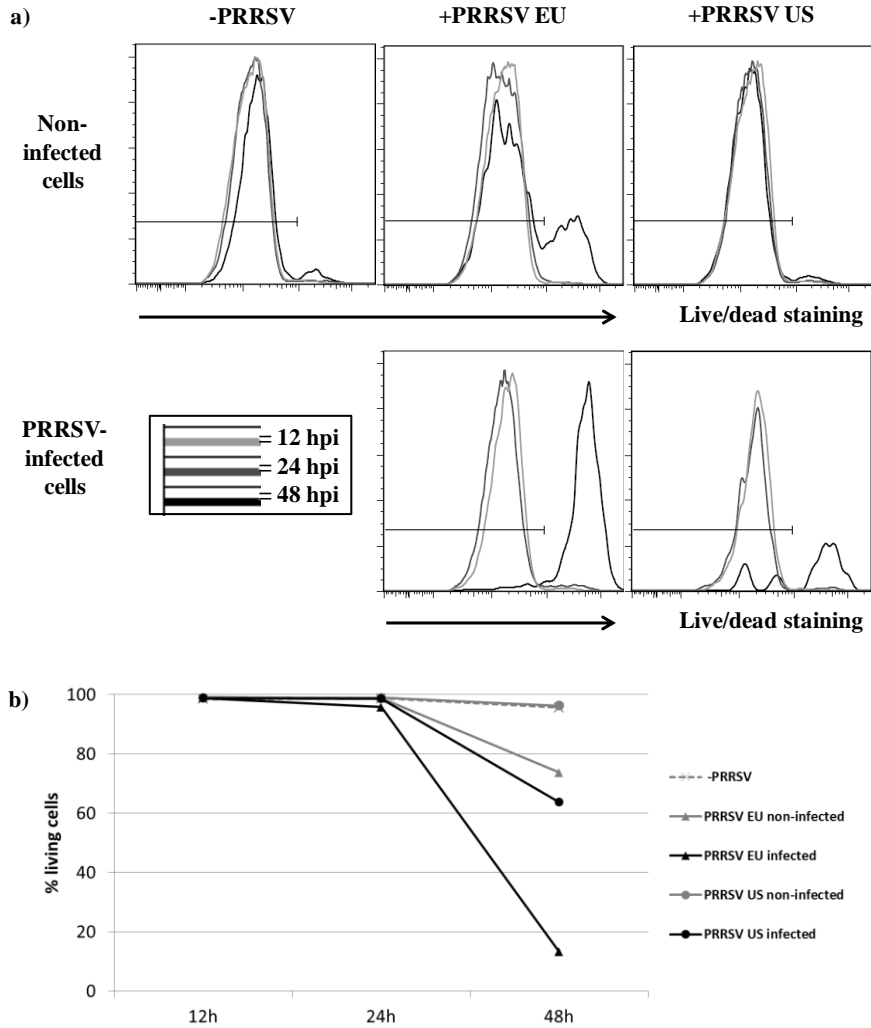


Fig. 3.- a) Shown are histograms [% of maximum] of non-infected [upper panel] and PRRSV-infected [lower panel] cells after 12 hours [light grey], 24 hours [grey] and 48 hours [black] for one representative animal. Cells in gates represent living cells. b) shows the graphical analysis of the time course of the mean precental living cells of the indicated groups (n=4).

Effect of PRRSV-infection on the phenotype of MoDCs

The expression of CD1, CD172a, CD14, CD80/86 and MHC-II on living MoDCs was analysed after 12, 24 and 48 hpi in non-infected, or PRRSV-infected MoDCs using both PRRSV genotypes by means of flow cytometry. Expression of CD1 and CD172a were not affected by PRRSV-infection (data not shown). Figure 4a shows the histograms of MHC-II, CD80/86 and CD14 of this experiment. Figure 4b summarizes these results for the 24 hpi measurement since the effect of PRRSV infection on the phenotype of MoDCs was the most distinct at this time-point. PRRSV-infected living MoDCs showed a higher expression of MHC-II and CD80/86 compared to non-infected MoDCs, mainly after 24 hpi (Figure 4a and b) while inoculated but non-infected MoDCs did not show the enhanced expression of both molecules. On the other hand, the expression of CD14 was decreased in infected and non-infected but inoculated MoDCs compared to uninfected MoDCs (Figure 4a and b).

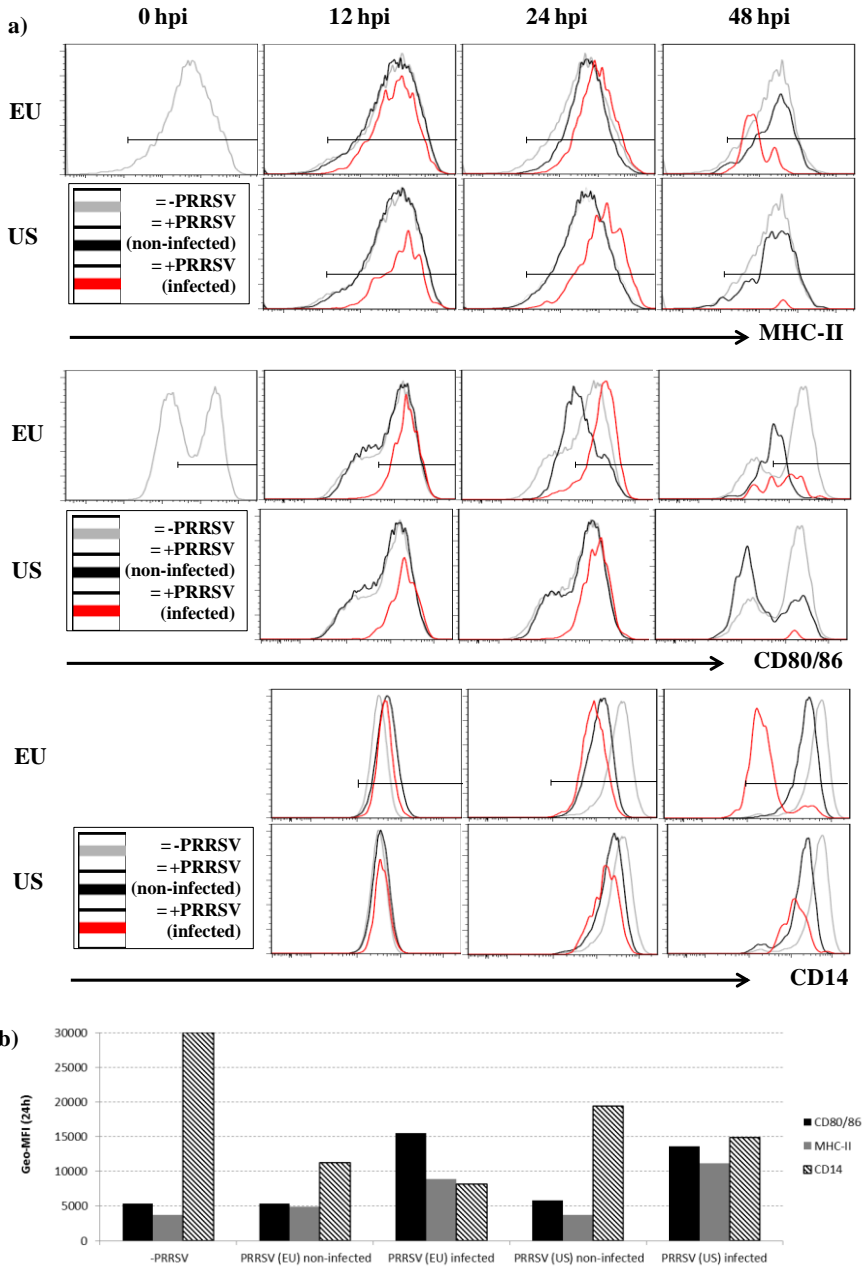


Fig. 4.- Legend on page 133.

Fig. 4.- a) shows MHC-II, b) CD80/86 and c) CD14 expression in histograms [% of maximum] of living MoDC in the absence of PRRSV (grey line), or non-infected (black line) and PRRSV-infected (red line) cells after 24 hpi with PRRSV EU genotype [upper panel] or PRRSV US genotype [lower panel] for one representative animal. d) shows the Geo-Mean Fluorescence Intensity (Geo-MFI) of MHC-II (grey columns), CD80/86 (black columns) and CD14 (striped columns) of living infected moDC after 24 hours post-infection of the same representative animal (n=3).

Analysis of T-cell- and Treg- proliferation after co-cultivation with PRRSV-infected MoDCs

MoDCs were either non-infected, mock-infected, PRRSV-1-infected or PRRSV-2-infected and co-cultivated with autologous PBLs at different ratios (MoDCs: PBLs) for 3 days in the presence of T-cell stimulating anti-CD3-antibodies. After co-cultivation, cell proliferation of target T cells and Tregs was analysed. Since only two subsets of the co-cultivated cell mixture were analysed, a precise gating strategy was applied to exclude dead cells, doublets and to include only either CD3⁺ T cells or Foxp3⁺ Tregs in the analysis (Figure 5). T cells (Figure 6a) as well as Tregs (Figure 6b) proliferated nicely in response to CD3 stimulation (Figure 6a and b, first column [PRRSV, MoDC:PBL = 0:1]). The presence of MoDCs could even increase the proliferation of target T cells and Tregs. However, PRRSV-infection of MoDCs (verified at 24 hpi: mean

infectivity: PRRSV EU: 38%, US: 3.9%, data not shown) did neither alter the proliferation of T cells, nor of Tregs (Figure 6a and b).

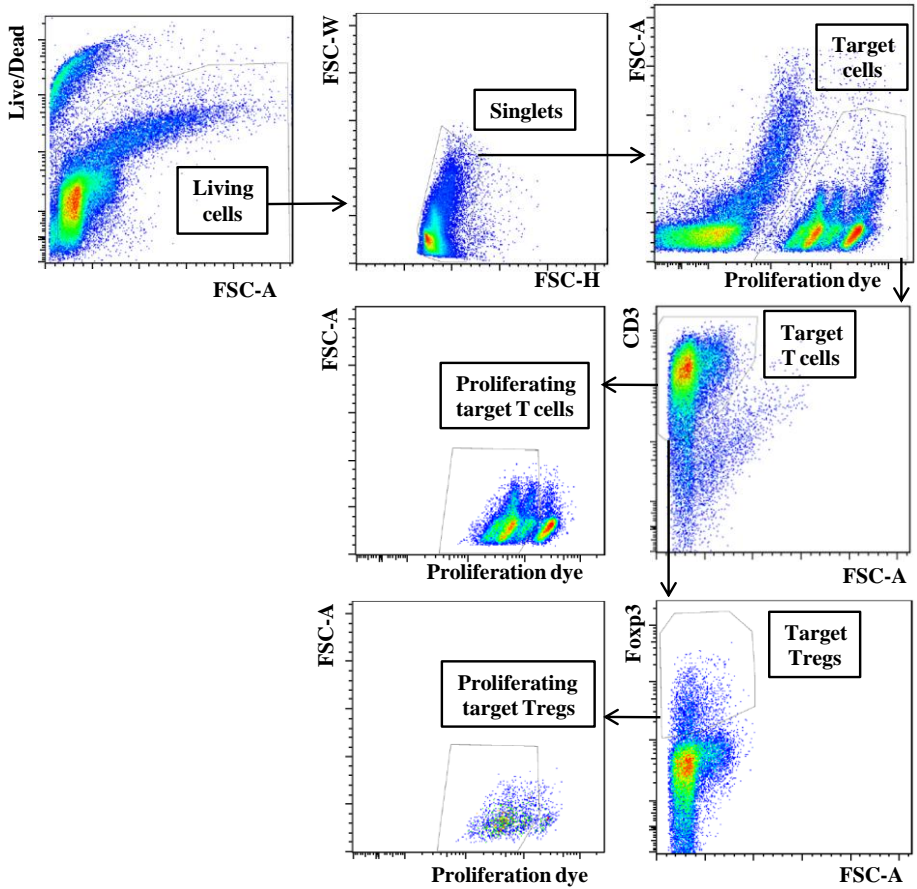


Fig. 5.- Gating hierarchy for the analysis of T-cell and Treg proliferation.

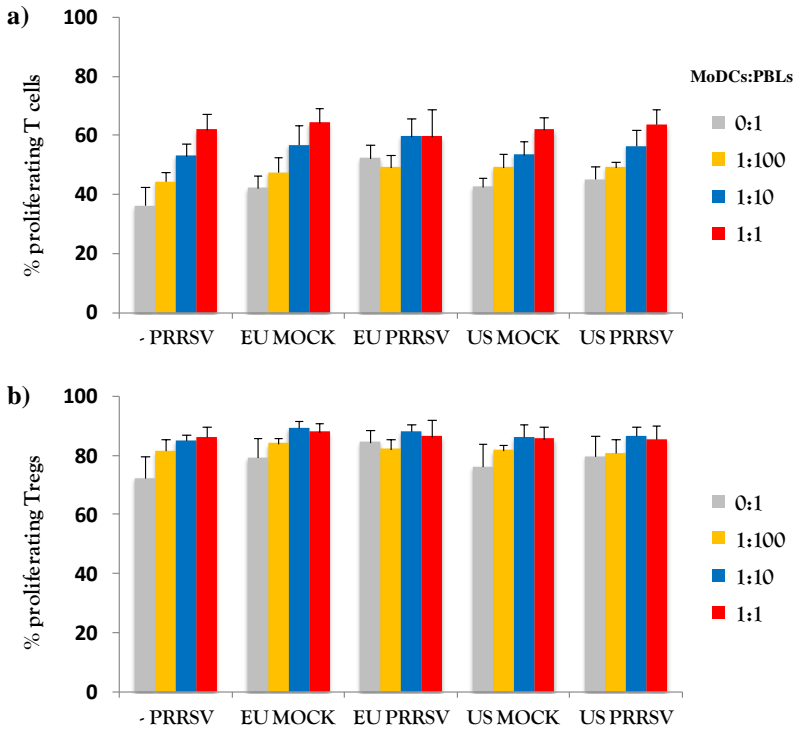


Fig. 6.- After 3 days of co-cultivation, (a) proliferation of T cells and (b) Tregs in the different co-cultures were analysed. Shown are mean percentages of proliferating cells (n=4). Error bars show the standard deviations.

Discussion

This study was conducted in order to investigate the phenotype and function of APCs, as well as, T-cell and Treg proliferation in an *in vitro* model in which MoDCs were infected with two different genotypes of PRRSV.

MoDCs generated in this study presented the typical morphology (round cells with dendrocytes) and phenotype (CD1⁺CD14⁺CD172a⁺) consistent with results of previous reports (Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001; Summerfield and McCullough, 2009). After 24 hpi, a decrease in the expression of CD14 on living MoDCs was found. This decrease was found in infected MoDCs as well as in non-infected but inoculated MoDCs which indicates to be caused by a bystander effect. This result is in agreement with Wang et al. (2007) and partially with Gimeno et al. (2011). In the last one, a similar result was found when bone-marrow dendritic cells were infected with a strain which did neither induce IL-10 nor TNF- α . However, strains with the capability of inducing IL-10 and TNF- α led to an increased expression of CD14 and when IL-10 was blocked, a reduced expression of CD14 was found which could indicate that IL-10 is partially involved in the upregulation of this molecule.

In our *in vitro* study, MoDCs were permissive for both strains of PRRSV which validates the experimental model used as it has been showed before (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008;

Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2009, 2010). However, two items should be discussed. Firstly, although after 12 hpi the percentage of infected MoDCs was similar within animals with regard to both genotypes, after 24 hpi PRRSV-infectivity rate varied strongly from animal to animal. Since similar virus particle (MOI 0.1) led to similar infectivity rates, there was no animal-to-animal variation in the infection of target cells at 12 hpi. On the other hand, at 24 hpi, after the first replication cycle, infectivity rates varied tremendously. This indicates vast animal-to-animal variations in PRRSV-infection. Different authors showed an age-dependent resistance to PRRSV replication and strong genetic component in suffering PRRSV infection (Klinge et al., 2009; Boddicker et al., 2012; Ren et al., 2012), that was not our case since donors had the same age and belongs to the same breed. The second point to discuss is the difference in percentage of infected MoDCs between the two genotypes, with a mean of 38.3 % for PRRSV-1 in contrast to 3.4 % for PRRSV-2. The general view is that PRRSV-2 is more aggressive and leads to higher infectivity rates than PRRSV-1 (Martínez-Lobo et al., 2011). It is thought that myeloid-derived DCs share certain

similarities to porcine alveolar macrophages (PAMs) and macrophages in general, which are the main target cells for PRRSV (Duan et al., 1997; Lawson et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2000; Gómez-Laguna, et al., 2010a) therefore, since PRRSV-2 strain used in this study was grown in MARC-145 cells it could be that it was little adapted to PAMs and consequently, lower percentage of infection could be expected.

Mortality rate of PRRSV-infected MoDCs was higher compared to non-infected cells. Additionally, PRRSV-1 inoculated but non-infected cells showed also a higher mortality when compare to control group, so that a bystander mortality effect was observed in the cell culture. This is in agreement with earlier surveys in which PRRSV-infected PAMs and uninfected bystander cells underwent apoptosis and belatedly necrosis (Miller and Fox, 2004; Costers et al., 2008).

Living infected MoDCs revealed higher expression of both CD80/86 and MHC-II molecules. Some authors have pointed out an increase (Chang et al., 2008; Park et al., 2008; Peng et al., 2009) or

decrease (Flores-Mendoza et al., 2008) of CD80/86, as well as, an increase on infected-BMDCs (Gimeno et al., 2011) or decrease (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008) of MHC-II. However, in these studies there was no differentiation either between infected and non-infected but inoculated MoDCs or living/dead MoDCs/BMDCs which could distort the results.

The combination of infection of MoDCs expressing high levels of MHC-II and CD80/86, both necessary for T-helper cell activation, and the increased mortality rate of infected MoDCs could lead to the hypothesis that PRRSV is able to selectively infect and kill highly T-cell-activating APCs. This capability to damage and destroy the cells which are able to connect the innate and adaptive immune response could explain the immunosuppressive capability of PRRSV as well as the delayed adaptive immune response on PRRSV infection (Drew, 2000; Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005).

On the other hand, the co-culture of infected MoDCs with autologous PBLs for 3 days did not modify the proliferation of T cells and Tregs. Therefore, these results do not support this

hypothesis although it is possible that PRRSV-infection of MoDCs does not influence the proliferative behavior of T cell and Tregs but perhaps their functionality e.g. production of inflammatory cytokines, B-cell activation, etc. Additionally, the missing influence of PRRSV-infection of MoDCs on the proliferation of T cells does not support the results from previous studies which reported an enhanced suppressive activity of Tregs after infection with PRRSV-2 (Silva-Campa et al., 2009) or the induction of Th3 cells (Wongyanin et al., 2010). But our results are in agreement with results published by Silva-Campa et al. (2010) in which four PRRSV-1 isolates did not increase the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ cells compared to controls in an *in vitro* model. This discrepancy for the PRRSV-2 could be caused by several reasons: 1st the low frequency of infected MoDCs, 2nd the use of a different PRRSV strain and 3rd the different experimental setup. Silva-Campa et al. (2009) co-cultured PBMCs with a PBL-MoDC mixture which was previously cultivated for 5 days either in the presence or absence of PRRSV. Our results show that already after two days the majority of MoDCs are dead and also that a lack decrease in APCs in PBL-co cultures leads to a decrease

in proliferation. Therefore, one could speculate that it could be a decrease in T-cell co-stimulation due to PRRSV-infection and killing of APC but not the increased activity of Tregs. On the other hand, we combined the PRRSV-infection with the co-cultivation of target cells labeled with the proliferation dye. Therefore, the second signal for co-activation is present mainly at the important first contact between T cells and MoDCs. Furthermore, the use of a highly sensitive proliferation measurement which has been described as the best available alternative to CFSE in the analysis of cell divisions (Quah and Parish, 2012), and was even better than CFSE in our hands, in combination with a stringent gating hierarchy during FCM analysis could furthermore diminish the analysis of artifacts.

In summary, our data support the hypothesis that PRRSV has an effect on the expression of MHC-II and CD80/86 on MoDCs and in the survival of these cells which are mandatory for T-cell activation. Therefore, according to our data, the mechanism of the immunosuppressive effect of PRRSV is to disturb the interaction of the innate and the adaptive immune response to hamper a specific

adaptive immune response against PRRSV. An involvement of Tregs within this immunosuppression could not be verified by our results.

In order to provide the final proof if Tregs play a role in PRRSV immunosuppression or not, co-culture experiments of infected and non-infected MoDCs with sorted Tregs and proliferation-dye-labeled target cells have to be performed. These experiments are aim of future studies.

2.3.- Ongoing in vitro study and preliminary results:

Susceptibility and viability analyses of bone marrow-derived dendritic cells to different Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus type 1 isolates

Introduction

Cell death succumbs to either apoptosis or necrosis (Wyllie et al., 1980). Apoptosis is a highly controlled and active mode of cell death which is used to eliminate superfluous, aged, injured or infected cells from the body (Logue and Martin, 2008), whereas necrosis is the premature death of cells and living tissue in a passive way; some authors do not describe necrosis as cell death but as the changes that cells present after die (Majno and Joris, 1995).

Phosphatidylserine (PS) is a phospholipid which is translocated from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet during the early stages of apoptosis (Lee and Kleiboeker, 2007; Lu et al., 2010). Due to the high affinity of Annexin V to bind to the membrane PS in the presence of calcium (Tait and Gibson, 1992), the detection of PS is a very sensitive

method for detecting cells entering apoptosis, at a time point considerably ahead of nuclear changes such as DNA degradation (Lu et al., 2010).

The induction of apoptosis by host cells could be a way to limit and to avoid virus production and spread. On the contrary, viruses have evolved numerous mechanisms to survive in the host (Miller and Fox, 2004). Some mechanisms are related to induce apoptosis of immunocompetent cells while others develop anti-apoptotic strategies in order to assure its survival (Teodoro and Branton, 1997; Thomson, 2001). For instance, large and slowly replicating DNA viruses, such as herpesviruses and poxviruses have been related to anti-apoptotic signals (Teodoro and Branton, 1997). Moreover, RNA viruses can also stimulate anti-apoptotic properties in virus-infected cells (Lindemans et al., 2006; Bitko et al., 2007).

PRRSV is a positive-sense RNA virus which belongs to the Family *Arteriviridae* (Meulenberg et al., 1993; Fauquet et al., 2005). PRRSV infection has been associated to the development of apoptosis phenomena, however, there are still some aspects which need to be clarified at this regard.

PRRSV has been reported to induce apoptosis throughout the organism of both infected cells (Suárez et al., 1996; Sur et al., 1997), and even more intensively of bystander cells (Sur et al., 1997, 1998; Sirinarumitr et al., 1998; Labarque et al., 2003), by means of indirect mechanisms such as TNF- α production (Choi and Chae, 2002). Apoptosis phenomena have also been reported to culminate rapidly in a necrotic-like cell death (Kim et al., 2002), and there are several reports in which necrosis was more evident than apoptosis (Miller and Fox, 2004; Lee and Kleiboeker, 2007; Costers et al., 2008).

PRRSV is able to infect *in vitro* MoDC and induce either apoptosis or necrosis, but no colocalization studies were performed to determine if dead cell were or not PRRSV-infected (Wang et al., 2007; Flores-Mendoza et al., 2008). This feature may be of interest to decipher the immunopathogenesis of the disease against different PRRSV genotypes infection. Thus, the aim of this study was to analyse the mode and the frequency of cell death in PRRSV-infected bone marrow-derived dendritic cells at 1, 2 and 7 days post-infection with two PRRSV genotype 1 strains.

Materials and Methods

Animals

Three 4 week-old PRRSV seronegative piglets from a herd historically free of PRRSV were used in this study. The animals were bled using non treated tubes in order to check the serum of the animals against major pig pathogens (PRRSV, PCV2, Aujeszky disease and classical swine fever virus). Afterwards, pigs were sedated with tiletamine-zolazepam (ZoletilTM; Vet Limited, Leyland, Lancashire) followed by a lethal dose of 5% sodium thiopental (Thiovet, Vet Limited, Leyland, Lancashire). Necropsy was performed systematically and the femur and humerus from the pigs were collected and dispose in sterile plastic bags and immediately submitted for bone marrow hematopoietic cells (BMHCs) isolation.

Viruses

Three different strains were used in this study, two European PRRSV strains (3262 and 3267 strains) and a modified live attenuated vaccine of Aujeszky disease (Suvaxyn[®] Aujeszky, Fort Dodge, Vall de Bianya, Girona). The European strain 3262 was

isolated from lung in 2005, and 3267 isolate from serum in 2006, both strains come from different outbreaks which took place in Spain. No epidemiological relationship was known to exist between them. Isolation was performed in PAMs obtained from healthy pigs free from all major diseases including PRRSV, Aujeszky disease and classical swine fever virus. Moreover, all PAMs batches were analysed for the presence of PCV2, hepatitis E virus and torquetenovirus according to previously described PCR protocols (Martín et al., 2007; Quintana et al., 2002; Segalés et al., 2009). Viral stocks were also tested for *Mycoplasma* spp. by PCR. The same viral stock was used during the study for each virus. The titrations were performed by inoculation of serial dilutions of viral stocks in PAMs and readings were done by means of IPMA using the monoclonal antibodies for ORF5 (clone 3AH9, Ingenasa, Madrid, Spain) and ORF7 (clon 1CH5, Ingenasa, Madrid, Spain) as previously described (Wensvoort et al., 1991).

BMHC isolation and generation of bone marrow dendritic cells (BMDCs)

BMHC were isolated from femur and humerus of piglets as previously described (Summerfield and McCullough, 1997). BMDCs were derived by using the protocol reported by Carrasco et al. (2001). Briefly, BMHCs were culture in complete medium (CM) containing RPMI 1640, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Prat del Llobregat, Spain), 40mM/ml L-glutamine (Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen) and supplemented with 100 ng/ml of recombinant porcine (rp) GM-CSF (R&D Systems, Madrid, Spain) at 37 °C in 5% CO₂. After 3 days of culture, the exhausted medium was replaced with fresh CM and the corresponding amount of rpGM-CSF, and at day 6, half of the culture medium was replaced as in day 3. BMDCs were harvested after 8 days of culture.

Infection of BMDCs

BMDCs were seeded onto 24-well tissue culture plated and infected with either PRRSV strain 3262, PRRSV strain 3267 or Aujeszky disease vaccine at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 at 37 °C in 5% CO₂. Infected BMDCs were harvested and analysed

for the expression of Annexin V and Propidium Iodide (PI) after 1, 2 and 7 days post-infection.

Annexin V and PI staining and analysis

BMDCs were harvested and stained for Annexin V and PI (AbD Serotec, Madrid, Spain) following the manufacturer's protocol. Namely, BMDCs were resuspended in pre-diluted binding buffer at a cell density of 2.5×10^5 cells/ml, afterwards Annexin V-FITC was added (5 μ l of AnnexinV-FITC per 195 μ l of pre-diluted binding buffer). The mixture was incubated for 5 minutes in the dark and at room temperature. Then, the cells were washed in 190 μ l of pre-diluted binding buffer, centrifuged and resuspended again in 190 μ l of pre-diluted binding buffer with 10 μ l of PI solution. After 10 min of incubation, BMDCs were analysed by means of Flow Cytometry Analysis (COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer). For a positive control, BMDCs were incubated with 3% formaldehyde in buffer during 30 minutes on ice and afterwards the staining protocol was carried out. Also, non-stained cells were used as negative control. Data analysis was performed by FCS Express 4 Plus Research Edition software.

Results

Infection of BMDCs

BMDCs were infected with 3262 isolate, 3267 isolate, and Aujeszky disease vaccine or remained uninfected. Examination of the cultures after 1, 2 and 7 days post-inoculation under light microscopy showed that BMDCs were permissive for the virus. The rate of death increased with the time in infected BMDCs, however uninfected cells continued to be healthy. After 2 dpi the effect of the infection was observed on the cultures (Figure 1).

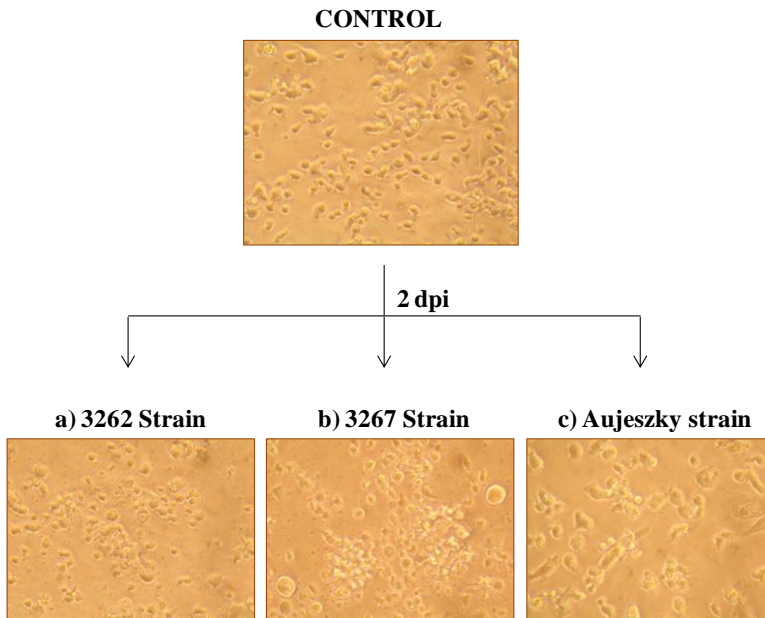


Fig. 1.- Legend on page 151.

Fig. 1.- BMDCs cultures after 2 dpi with 3262 strain (a), 3267 strain (b) and Aujeszky diseases vaccine (c) in comparison to control cells. Images from one representative pig.

Annexin V and PI staining

BMDCs were stained with Annexin V and PI to differentiate between early apoptosis and late apoptosis/necrosis. Preliminary results showed that BMDCs mainly died by late apoptosis/necrosis since the values for PI were higher when compare to control group. Only low expression of Annexin V was found in BMDCs infected with both PRRSV-1 strains. However, we could not identify if the cells which showed signs of death were or not infected. Future studies will be carried on this matter in order to decipher if this death is caused directly by PRRSV or indirectly by the release of different cytokines, such as, TNF- α .

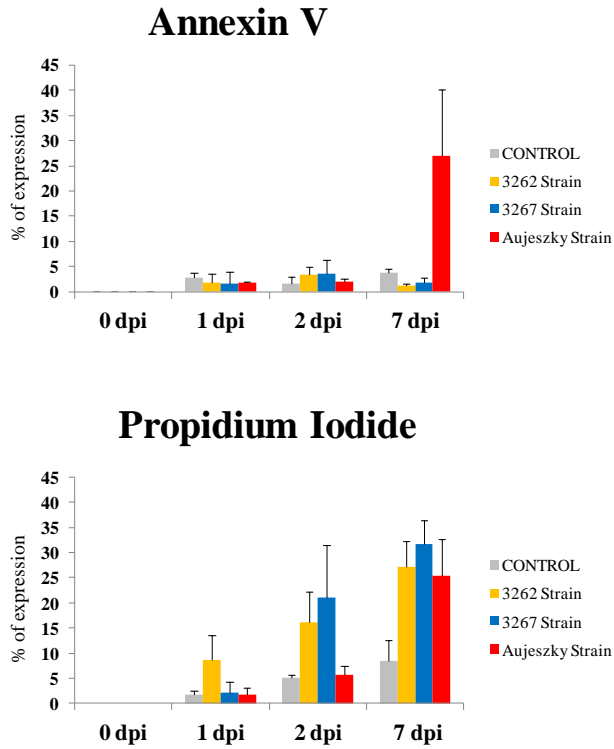


Fig. 2-Graphics of % of (a) Annexin V and (b) PI expression on infected BMDCs after 1, 2 and 7 dpi. Error bars show the standard deviations.

GENERAL DISCUSSION

DISCUSIÓN GENERAL



GENERAL DISCUSSION

Since the discovery of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) as the etiologic agent of PRRS in the early 1990s, PRRSV continues to be a major economic issue for the swine industry worldwide. Despite all efforts of many scientists throughout the world to elucidate virology, epidemiology, pathogenesis, immunology, genetic resistance and vaccinology of this disease, the scientific community still has a long way to cover.

The aim of this study was to assess different mechanisms by which PRRSV could avoid the onset of an effective immune response by the host: interacting with antigen presenting cells (APCs) and/or provoking the proliferation of T cells and regulatory T cells (Tregs). Thus, in order to achieve these objectives two studies, *in vivo* and *in vitro*, were conducted.

In the first experiment tissue samples from PRRSV inoculated-pigs were used. The results from this study showed that PRRSV, or at least genotype 1, is able to induce *in vivo* a decrease in the number of cells expressing HLA-DR molecule of Major Histocompatibility Complex class II (MHC-II). This finding could be

understood as a failure on antigen presentation during PRRS, avoiding the onset of a cellular immune response. To our knowledge, this is the first description about the behaviour of APCs during PRRS *in vivo* and/or *in situ*.

Following the *in vivo* study, and with the idea to analyse the interaction between strains from both PRRSV genotypes and the expression of MHC-II and CD80/86, which are involved in the activation signal pathway of T cells, an *in vitro* experiment was performed. Indeed, different authors have pointed out that PRRSV may disrupt these activation signals (Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Peng et al., 2009; Gimeno et al., 2011).

In our study, and due to the complexity to isolate dendritic cells from tissue samples (Makala et al., 1998; Haverson et al., 2000), we use monocyte derived dendritic cells (MoDCs) which have already been used in the above mentioned studies. After 24hpi, we found an increased expression of both MHC-II and CD80/86 by infected MoDCs. This result could be explained by two different situations: first, PRRSV is able to upregulate the expression of both

molecules which biologically it does not make sense since PRRSV course with prolonged viremia (Plagemann and Moenning, 1992) and ineffective immune response (Drew, 2000; Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005); second, taking into account that we observe an increase in the dead rates of infected cells, PRRSV could selectively infect and kill highly T-cell-activating APCs. This capability to damage and destroy the cells which are able to connect the innate and adaptive immune responses could explain the immunosuppressive properties of PRRSV, which was also seen in our *in vivo* study when no increases in both MHC-II expression and T cells subsets were found.

To gain insight into the pathogenesis of PRRSV, we studied the possible role of T cells and Tregs in the disease. We did not see an increase in the proliferation of either Tregs or T cell subpopulations with both strains in our *in vitro* model. Nevertheless, several reports point out a role for Tregs with genotype 2 (Silva-Campa et al., 2009, 2012; Wongyanin et al., 2010; 2012) but not with genotype 1 infections (Silva-Campa et al., 2010). In our study, we used two different strains, one from each genotype, and did not observe either proliferating Tregs or its suppressor activity. In this

study the methodology and gating strategy were stringent, however, the percentage of infected MoDCs with the genotype 2 strain was low, probably due to the genotype 2 strain used in our study was more adapted to MARC-145 than macrophages, therefore, the use of a strain with higher ratios of infection could determine the differences observed in our study with regard to genotype 2.

One question which can arise to our minds is the extrapolation of *in vitro* results to *in vivo*, and thus, if the development of Tregs has or not a biological significance. Sometimes, the control of all factors, as it happens *in vitro*, results far away from reality. Although necessary, the biology and immunology of pig is more intricate than *in vitro* studies.

Moreover, PRRSV shows a high genetic instability, 2 genotypes (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991; White, 1991; Collins et al., 1992; Fauquet et al., 2005; King et al., 2012) with different subtypes (Stadejek et al., 2008) are recognized. Furthermore, the behaviour between strains is pretty different; consequently, we should be cautious when stating universal truths from single experiments. However, it is essential to invest a lot of

fundamental research in order to come up with breakthroughs and control this disease.

One unresolved question would be to know the pathways by which PRRSV is able to killed APCs. In this line, several authors have pointed out that dead can succumb by apoptosis (Suárez et al., 1996; Sur et al., 1997; Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1998; Labarque et al., 2003; Flores-Mendoza et al., 2008; Gómez-Laguna et al., 2012), necrosis (Miller and Fox, 2004; Lee and Kleiboeker, 2007) or both pathways (Kim et al., 2002; Wang et al., 2007; Costers et al., 2008). Working on this matter, our preliminary results show that PRRSV induces mainly necrosis phenomena in bone-marrow derived dendritic cells. Nonetheless, it is essential to know if the cause of death is due to virus replication or to the release of cytokines, as other authors have already suggested (Choi and Chae, 2002).

In conclusion, and taking our *in vivo* and *in vitro* studies as a whole into account, PRRSV may kill APCs with highly stimulatory properties at the early stage of the disease, that explains the lack of enhancement on the expression of MHC-II in our *in vivo* model. This

fact might be involved in an impairment of the T cell response which would allow the distribution, persistence, and survival of the virus through the organism. The integrated effort of researchers to deep in the knowledge of the pathogenesis and immune response against this disease will pave the way for its control.

DISCUSIÓN GENERAL

Han pasado más de 20 años desde que tuvo lugar la primera descripción de lo que hoy conocemos como Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS). Sin embargo, y a pesar de todos los esfuerzos realizados por la comunidad científica, por aclarar los diferentes aspectos de esta enfermedad, aún necesitamos profundizar en el conocimiento de diversos aspectos de la respuesta inmune frente a este virus, ya que existen una serie de particularidades intrínsecas del agente causal, aún sin esclarecer, que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedador.

El objetivo de este estudio fue profundizar en algunos de los mecanismos por los cuales el virus del PRRS (PRRSV) eludiría la instauración de una respuesta inmune eficaz por parte del organismo: interactuando con las células presentadoras de antígeno y/o promoviendo la proliferación de linfocitos T y T reguladores (Tregs). Para alcanzar este objetivo se planteó la realización de un estudio *in vivo* y un estudio *in vitro*.

Los resultados de nuestro primer estudio, llevado a cabo a partir de muestras de cerdos infectados con un aislado europeo del PRRSV, ponen de manifiesto como el PRRSV, o al menos el genotipo 1, es capaz de inducir *in vivo* una disminución en el número de células que expresan la molécula HLA-DR del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Lo que interpretamos como que en el transcurso de la enfermedad se produciría un fallo en la presentación antigénica, impidiéndose de esta forma el establecimiento de una respuesta inmune celular. Desde nuestro conocimiento, esta sería la primera descripción a nivel *in vivo* o *in situ* del comportamiento de las células presentadoras de antígeno durante el transcurso del PRRS.

Una vez finalizado el estudio *in vivo*, nos planteamos realizar un estudio *in vitro* que nos permitiera abordar la interacción de dos aislados del PRRSV con la expresión de las moléculas del MHC-II y la molécula CD80/86, las cuales están implicadas en la señalización de activación de los linfocitos T. En este sentido, varios autores han señalado que el virus podría alterar estas señales de activación

(Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Peng et al., 2009; Gimeno et al., 2011).

Debido a la complejidad que tiene el aislamiento de células dendríticas de tejido (Makala et al., 1998; Haverson et al., 2000), en nuestro estudio decidimos utilizar cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos, las cuales se han utilizado junto a células dendríticas derivadas de médula ósea como modelo representativo para el estudio de la interacción célula-virus en los estudios arriba mencionados, dadas las similitudes que comparten con las células diana de este virus (Chang et al., 2008). En nuestro estudio, hemos observado un aumento en la expresión de ambas moléculas (MHC-II y CD80/86) tras 24 horas post-infección, lo que podría ser debido a dos situaciones, primera, que el virus fuera capaz de aumentar la expresión de estas moléculas, lo cual biológicamente no tiene sentido durante el transcurso de esta enfermedad, ya que cursa con viremias prolongadas (Plagemann y Moenning, 1992) y no se instaura una respuesta inmune eficaz (Drew, 2000; Meier et al., 2003; Díaz et al., 2005). La segunda posible situación, y teniendo en cuenta el incremento que observamos en los ratios de muerte celular en células

infectadas en nuestro estudio y el retraso en la respuesta inmune frente al PRRSV, sería la capacidad del virus para infectar e inducir la muerte de células con un alto potencial de presentación antigénica, como son las células dendríticas. Este hecho representaría un mecanismo indirecto por el cual el virus provocaría un fallo en la activación de los linfocitos T, mecanismo que nos explicaría el porqué en nuestro estudio *in vivo* no observamos un incremento ni en la expresión de MHC-II ni de la población de linfocitos T.

A la luz de nuestros resultados, se planteó estudiar la posible participación de los linfocitos T y Tregs en la enfermedad. En el estudio *in vitro* realizado, no observamos, con la utilización de cepas de ambos genotipos, un incremento ni de la subpoblación de Tregs ni de otras subpoblaciones de linfocitos T. Sin embargo, diversos estudios apuntan al papel que los linfocitos Tregs tendrían durante el transcurso de infecciones con cepas del PRRSV pertenecientes al genotipo 2 (Silva-Campa et al., 2009, 2012; Wongyanin et al., 2010; 2012) pero no con cepas del genotipo 1 (Silva-Campa et al., 2010). En nuestro estudio, en el que se emplearon dos aislados diferentes, uno de cada genotipo, no observamos ni proliferación de Tregs, ni su

efecto supresor. La validez de nuestro estudio está abalada por la metodología y la estricta estrategia o jerarquía de selección (“gating”) seguida, sin embargo, el porcentaje de células que el virus fue capaz de infectar fue bajo en el caso del genotipo 2, posiblemente debido a que se trataba de una cepa más adaptada a MARC-145 que a macrófagos, por tanto, el uso de una cepa más virulenta o con ratios de infección más elevados determinaría con exactitud la diferencia observada en nuestro estudio con respecto al genotipo 2.

Una cuestión importante a discutir llegados a este punto sería la extrapolación que tendrían los resultados *in vitro* con respecto al uso de modelos *in vivo*, y por tanto, si el desarrollo de linfocitos Tregs tendría una significación biológica en el transcurso de la enfermedad. La mayoría de las veces el uso de estudios *in vitro* en los que todos los factores quedan controlados se aleja de la realidad y simplifica la complicada maquinaria que es un compartimento biológico, como en nuestro caso, el cerdo.

Otra cuestión importante en el estudio de la inmunopatogenia del PRRSV es la idiosincrasia de este virus, ya que estamos ante un

virus en el cual se reconocen 2 genotipos (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991; White, 1991; Collins et al., 1992; Fauquet et al., 2005; King et al., 2012) con diferentes subtipos (Stadekeij et al., 2008) y donde el comportamiento entre cepas es muy diferente, por tanto, hemos de ser muy cautos al aplicar las conclusiones obtenidas de un estudio como verdades universales. Sin embargo, y siendo optimistas, podemos considerar que se han logrado importantes avances y consensos con respecto a esta enfermedad, y que estamos en el camino de lograr un mayor conocimiento y aplicabilidad de los mismos, lo que facilitará el control de esta enfermedad.

Una de las cuestiones que quedan pendientes, sería conocer cuáles son las vías que el PRRSV utiliza para inducir la muerte de las células presentadoras de antígeno. En este sentido, varios autores han señalado que la muerte se produce por apoptosis (Suárez et al., 1996; Sur et al., 1997; Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1998; Labarque et al., 2003; Flores-Mendoza et al., 2008; Gómez-Laguna et al., 2012), necrosis (Miller y Fox, 2004; Lee y Kleiboeker, 2007) o ambas vías (Kim et al., 2002; Wang et al., 2007; Costers et al., 2008). Para resolver esta cuestión, estamos analizando la interacción

del virus con las células dendríticas. Los resultados preliminares, obtenidos con los cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea, apuntan a que la muerte celular es principalmente debida a fenómenos de necrosis. Sin embargo, sería importante conocer si estos fenómenos de necrosis se producen en células infectadas por el virus, o si por el contrario, la muerte se produce debido a mecanismos indirectos, como pudiera ser la secreción de citoquinas (Choi y Chae, 2002).

En conclusión, y haciendo un análisis conjunto de nuestros resultados *in vivo* e *in vitro*, podemos plantear que el PRRSV sería capaz de eliminar a las células con alta capacidad de presentación antigénica, lo cual conduciría a una activación insuficiente de linfocitos T, que permitiría la distribución y persistencia del virus por el organismo y con ello su supervivencia y propagación. La perseverancia en el estudio de la patogenia y respuesta inmune frente a esta enfermedad nos conducirá al control de la misma.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES



CONCLUSIONS

1.- The decrease in the number of antigen presenting cells, together with the presence of a negative correlation between Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus antigen and HLA-DR-expressing cells in the first study point out that the virus is able to suppress *in vivo* the number of antigen presenting cells expressing Major Histocompatibility Complex class II with its consequent impact in T-cell reaction.

2.- Our *in vitro* model shows that Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus is able to prevent the onset of an effective host adaptive immune response by infecting and killing monocyte-derived dendritic cells with highly expression of Major Histocompatibility Complex class II and CD80/86.

3.- The *in vitro* infection of monocyte-derived dendritic cells with two different strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus had no effect on T-cell proliferation and regulatory T cell proliferation and suppressive activity after CD3 stimulation.

4.- Infection of bone-marrow derived dendritic cells with two type 1 strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus induced strain-specific kinetics of cell death associated mainly to necrosis but not apoptosis phenomena.

CONCLUSIONES

1.- La disminución en el número de células presentadoras de antígeno, junto con la correlación negativa entre el antígeno del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y el número de células positivas a HLA-DR encontrados en nuestro primer estudio indican que el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino es capaz de disminuir *in vivo* el número de células que expresan el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II y, por tanto, repercutir en la reacción de los linfocitos T.

2.- El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino es capaz de impedir la instauración de una respuesta inmune adaptativa eficaz en el hospedador infectando e induciendo la muerte de células dendríticas derivadas de monocitos con elevada expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II y CD80/86.

3.- La infección de células dendríticas derivadas de monocitos con dos cepas del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino no indujo proliferación de la población de células T ni

proliferación y efecto supresor de la subpoblación de linfocitos T reguladores tras la estimulación con la molécula CD3.

4.- Las células dendríticas derivadas de médula ósea infectadas con dos aislados del tipo 1 del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino induce la muerte celular principalmente asociada a fenómenos de necrosis pero no de apoptosis.

SUMMARY

RESUMEN



SUMMARY

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) leads to huge economical losses in swine industry. The causal agent, PRRS virus (PRRSV), comprises two different genotypes, type 1 or European genotype (PRRSV-1) and type 2 or American genotype (PRRSV-2), with strains of diverse virulence. The basis for viral virulence and the determinants facilitating viral escape from the control of the immune system are not well understood. It is known that PRRSV infects antigen presenting cells (APCs) and the study of the interaction of PRRSV and APCs are relevant to improve the current knowledge on the pathogenesis of this disease. *In vivo* and *in vitro* studies focused on the analyses of several differentiation and activation markers, T cell proliferation, as well as, susceptibility assays were conducted in order to achieve this aim.

Results from our *in vivo* study showed a decrease in the number of cells expressing Major Histocompatibility Complex class II (MHC-II) in PRRSV-infected pigs with respect to control group from the first day of study (3 dpi) and throughout the experiment. In

our second study, based on an *in vitro* approach, monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) were permissive for PRRSV and infected cells showed an enhanced expression of MHC-II and CD80/86 which highly decreased and died after 48 hours post-inoculation. In regard to the effects on T cells by the infection of MoDCs with PRRSV, no influence on the proliferative response of T cells or regulatory T cells (Tregs) was detected. Susceptibility assays showed that PRRSV might induce death mainly by means of necrosis phenomena instead of apoptosis in bone marrow-dendritic cells.

On the whole, PRRSV infection is known to lead to immunosuppression and a prolonged viremia. The mechanisms of this immunosuppression are largely unknown. Our data derived from *in vivo* and *in vitro* studies point out that PRRSV infection might induce the death of highly T-cell-activating APCs, a reasonable cause to explain the delayed adaptive immune response against this disease. Although previous reports indicated a role of Tregs in PRRSV immunosuppression we did not see any effect of PRRSV infection on Treg proliferation. Furthermore, proliferation of other T-cell subsets was unaltered as well.

RESUMEN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una de las enfermedades que más pérdidas económicas ocasiona al sector porcino mundial. Su agente causal, el virus del PRRS (PRRSV), comprende 2 genotipos, el tipo 1 o Europeo (PRRSV-1) y el tipo 2 o Americano (PRRSV-2), dentro de los cuales se encuentran cepas de diversa virulencia. El PRRSV es capaz de infectar las células presentadoras de antígeno (APCs), las cuales desempeñan un papel imperativo en la activación de los linfocitos T, por tanto, el estudio de la interacción del PRRSV y las APCs mejorará el actual conocimiento que se tiene sobre la patogenia de esta enfermedad. Para conseguir este objetivo se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* analizando la expresión de diversos marcadores de diferenciación y activación, la proliferación de linfocitos T, así como, ensayos de susceptibilidad a la infección por el virus.

Durante el transcurso de la infección con el PRRSV en el estudio *in vivo* se observó una disminución en el número de células que expresaban el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase

II (MHC-II) en los animales inoculados desde el primer día de estudio (3 dpi) hasta el final del experimento. Los resultados de nuestro segundo estudio mostraron que las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) eran permisivas para el PRRSV y que, las células infectadas por el virus expresaban mayor cantidad de las moléculas MHC-II y CD80/86, las cuales disminuían a las 48 horas post-inoculación. Por otro lado, la infección de MoDCs con el PRRSV no indujo proliferación de linfocitos T ni proliferación y efecto supresor de linfocitos T reguladores (Tregs). En los ensayos de susceptibilidad, llevados a cabo en células dendríticas derivadas de médula ósea, se observó que el PRRSV podría inducir la muerte de las mismas principalmente asociada a fenómenos de necrosis pero no de apoptosis.

Con todo ello, los resultados derivados de nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* señalan que el PRRSV podría inducir la muerte de APCs con elevada capacidad de presentación antigénica y, con ello, provocar un fallo en la instauración de la respuesta inmune adaptativa específica frente al virus. Asimismo, en nuestro estudio no

se observó un efecto en la proliferación de los Tregs ni de otras subpoblaciones de linfocitos T.

BIBLIOGRAPHY

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAPHY - BIBLIOGRAFÍA

Ahn, K., A. Angulo, P. Ghazal, P.A. Peterson, Y. Yang, and K. Früh, 1996: Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10990-10995.

Albina, E., F. Madec, R. Cariolet, and J. Torrison, 1994: Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet. Rec.* 134, 567-573.

Albina, E., C. Carrat, and B. Charley, 1998: Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokines Res.* 18, 485-490.

Allende, R., W. Laegreid, G. Kutish, J. Galeota, R.W. Wills, and F.A. Osorio, 2003: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 72, 10834-10837.

Álvarez, B., C. Sánchez, R. Bullido, A. Marina, J. Lunney, F. Alonso, A. Ezquerro, and J. Dominguez, 2000: A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue antigens.* 55, 342-351.

An, T.Q., Z.J. Tian, Y. Xiao, R. Li, J.M. Peng, T.C. Wei, Y. Zhang, Y.J. Zhou, and G.Z. Tong, 2010: Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 365-367.

Andersson, J., D.Q. Tran, M. Pesu, T.S. Davidson, H. Ramsey, J.J. O'Shea, and E.M. Shevach, 2008: CD4⁺ Foxp3⁺

regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 205, 1975-1981.

Andrews, D.M., C.E. Andoniou, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, and M.A. Degli-Esposti, 2001: Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* 2, 1077-1084.

Andreyev, V.G., R.D. Wesley, W.L. Mengeling, A.C. Vorwald, and K.M. Lager, 1997: Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains bases on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.

Banchereau, J., and R.M. Steinman, 1998: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.-J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, 2000: Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

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

Bautista, E.M., and T.W. Molitor, 1997: Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10, 83-94.

Bautista, E.M., P. Suárez, and T.W. Molitor, 1999: T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 144, 117-134.

Belkaid, Y., 2007: Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 875-888.

Benfield, D.A., E. Nelson, J.E. Collins, L. Harris, J.C. Hennings, D.P. Shaw, S.M. Goyal, S. McCullough, R.B. Morrison, H.S. Joo, D. Gorcyca, and D. Chladek, 1992: Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127-133.

Benfield, D.A., J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, R.R.R. Rowland, J.K. Nelson, C.C.L. Chase, K.D. Rossow, and J.E. Collins, 1997: Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Proc. Am. Assoc. Swine. Pract.* 28, 455-458.

Benfield, D.A., J.E. Collins, S.A. Dee, P.G. Halbur, H.S. Joo, K.M. Lager, W.L. Mengeling, M.P. Murtaugh, K.D. Rossow, G.W. Stevenson, and J.J. Zimmerman, 1999: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In: *Diseases of Swine*, 8th ed. Ed: Straw, B.E., S. D'Allaire, W.L. Mengeling, and D.J. Taylor. Iowa, pp. 201-232.

Beura, L.K., S.N. Sarkar, B., Kwon, S. Subramaniam, C. Jones, A.K. Pattnaik, and F.A. Osorio, 2010: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574-1584.

Beyer, J., D. Fichtner, H. Schirrmeier, U. Polster, E. Weiland, and H. Wege, 2000: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47, 9-25.

Bierk, M.D., S.A. Dee, K.D. Rossow, S. Otake, J.E. Collins, and T.W. Molitor, 2001: Transmission of PRRS virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261-266.

Bitko, V., O. Shulyayeva, B. Mazumder, A. Musiyenko, M. Ramaswamy, D.C. Look, and S. Barik, 2007: Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J. Virol.* 81, 1786-1795.

Blaha, T., 2000: The “colorful” epidemiology of PRRS. *Vet. Res.* 31, 77-83.

Bloemraad, M., E.P. de Kluijver, A. Peterson, E. Burkhardt, and G. Wensvoort, 1994: Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet. Microbiol.* 42, 361-371.

Boddicker, N., E.H. Waide, R.R.R. Rowland, J.K. Lunney, D.J. Garrick, J.M. Reecy, and J.C.M. Dekkers, 2012: Evidence for a major QTL associated with host response to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge. *J Anim. Sci.* 90, 1733-1746.

Bolzer, K., T. Käser, A. Saalmüller, and S.E. Hammer, 2009: Molecular characterization of porcine Forkhead-box p3 (Foxp3). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132, 275-281.

Botner, A., B. Strandbygaard, K.J. Sorensen, P. Have, K.G. Madsen, E.S. Madsen, and S. Alexandersen, 1997: Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497-499.

Brockmeier, S.L., M.V. Palmer, and S.R. Bolin, 2000: Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 61, 892-899.

Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell, 2001: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68-73.

Buckwalter, M.R., and M.L. Albert, 2009: Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr. Biol.* 19, R355-R361.

Burgara-Estrella, A.J., I. Díaz, I.M. Rodríguez-Gómez, J. Hernández, and E. Mateu, 2012: Predicted T-cell epitopes from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genotype I and II can induce IFN- γ -secreting cells or produce suppressive responses. In: 22nd International Pig Veterinary Society Congress. 10-13 June 2012, Jeju, South Korea.

Calvert, J.G., D.E. Slade, S.L. Shields, R. Jolie, R.M. Mannan, R.G. Ankenbauer, and S.K. Welch, 2007: CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.* 81, 7371-7379.

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

Carrasco, C.P., R.C. Rigden, R. Schaffner, H. Gerber, V. Neuhaus, S. Inumaru, H. Takamatsu, G. Bertoni, K.C. McCullough, and A. Summerfield, 2001: Porcine dendritic cells generated in vitro:

morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 104, 175-184.

Carrasco, C.P., R.C. Rigden, I.E. Vincent, C. Balmelli, M. Ceppi, O. Bauhofer, V. Tache, B. Hjertner, F. McNeilly, H.G. van Gennip, K.C. McCullough, and A. Summerfield, 2004: Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J. Gen. Virol.* 85, 1633-1641.

Cavanagh, D., 1997: Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.

Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber, 1996: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184, 747-752.

Chang, H.C., Y.T. Peng, H.L. Chaung, and W.B. Chung, 2008: Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 129, 281-293.

Charerntantanakul, W., R. Platt, and J. Roth, 2006: Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Antigen-Presenting Cells on T Cell Activation and Antiviral Cytokine Production. *Viral Immunol.* 19, 646-661.

Chaung, H.C., C.W. Chen, B.L. Hsieh, and W.B. Chung, 2010: Toll-Like Receptor expressions in porcine alveolar macrophages and Dendritic Cells in responding to poly IC stimulation and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 197-213.

Chen, Z., S. Lawson, Z. Sun, X. Zhou, X. Guan, J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, and Y. Fang, 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural proteins 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, 87-97.

Chevalier, M.F., and L. Weiss, 2012: The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* doi: 10.1182/blood-2012-07-409755.

Chiou, M.T., C.R. Jeng, L.L. Chueh, C.H. Cheng, and V.F. Pang, 2000: Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Vet. Microbiol.* 71, 9-25.

Choi, C., and C. Chae, 2002: Expression of tumour necrosis factor-alpha is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res. Vet. Sci.* 72, 45-49.

Choi, C., W.S. Cho, B. Kim, and C. Chae, 2002: Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J. Comp. Pathol.* 127, 106-113.

Christianson, W.T., J.E. Collins, D.A. Benfield, L. Harris, D.E. Gorcyca, D.W. Chladek, R.B. Morrison, and H.S. Joo, 1992: Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53, 485-488.

Christianson, W.T., C.S. Choi, J.E. Collins, T.W. Molitor, R.B. Morrison, and H.S. Joo, 1993: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 57, 262-268.

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

Collins, J.E., D.A. Benfield, W.T. Christianson, L. Harris, J. Christopher-Hennings, D.P. Shaw, S.M. Goyal, S. McCullough, R.B. Morrison, H.S. Joo, D. Gorcyca, and D. Chladek, 1992: Isolation of swine infertility and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.

Cooper, V.L., A.R. Doster, R.A. Hesse, and N.B. Harris, 1995: Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 313-320.

Corbellini, L.G., H. Schwermer, P. Presi, B. Thür, K.D. Stärk, and M. Reist, 2006: Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 118, 267-273.

Costers, S., D. Lefebvre, P. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2008: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch. Virol.* 153, 1453-1465.

Costers, S., D.J. Lefebvre, B. Goddeeris, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2009: Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3+CD8high cells. *Vet. Res.* 40:46.

Costers, S., D.J. Lefebvre, J. Van Doorselaere, M. Vanhee, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2010: GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing

epitope that is susceptible to immunoselection in vitro. Arch. Virol. 155, 371-378.

Curotto de Lafaille, M.A., and J.J. Lafaille, 2009: Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity 30, 626-635.

Darwich, L., I. Díaz, and E. Mateu, 2010: Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. Virus Res. 154, 123-132.

Das, P.B., P.X. Dinh, I.H. Ansari, M. de Lima, F.A. Osorio, and A.K. Pattnaik, 2010: The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. J. Virol. 84, 1731-40.

Dawson, H., G. Solano-Aguilar, M. Beal, E. Beshah, V. Vangimalla, E. Jones, S. Botero, and J.F. Jr Urban, 2009: Localized Th1-, Th2- T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in *Ascaris suum*-infected swine are increased by retinoic acid. Infect. Immun. 77, 2576-2587.

Dea, S., C.A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, and D. Rogan, 2000a: Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch. Virol. 145, 659-688.

Dea, S., L. Wilson, D. Therrien, and E. Cornaglia, 2000b: Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E.coli-expressed nucleocapsid protein as antigen. J. Virol. Methods, 87, 109-122.

Dee, S.A., J. Deen, K.D. Rossow, R. Eliason, C. Mahlum, and S. Otake, 2003: Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can. J. Vet. Res.* 67, 12-16.

Dee, S.A., J. Deen, S. Otake, and C. Pijoan, 2004a: An assessment of transport vehicles as a source of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission to susceptible pigs. *Can. J. Vet. Res.* 68, 124-133.

Dee, S.A., J. Deen, and C. Pijoan, 2004b: An evaluation of four intervention strategies to prevent mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 68, 19-26.

Dee, S.A., M. Torremorell, R. Thompson, J. Deen, and C. Pijoan, 2005a: An evaluation of thermo-assisted drying and decontamination for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from contaminated livestock transport vehicles. *Can. J. Vet. Res.* 69, 58-63.

Dee, S.A., J. Deen, D. Burns, G. Douthit, and C. Pijoan, 2005b: An evaluation of disinfectants for the sanitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated transport vehicles at cold temperatures. *Can. J. Vet. Res.* 69, 64-70.

Dee, S.A., B.C. Martínez, and C. Clanton, 2005c: Survival and infectivity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine lagoon effluent. *Vet. Rec.* 156, 56-57.

Dee, S.A., S. Otake, S. Oliveira, and J. Deen, 2009: Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 40, 39.

Degli-Esposti, M.A., and M.J. Smyth, 2005: Close encounters of different kind: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature* 5, 112-124.

De Lima, M., A.K. Pattnaik, E.F. Flores, and F.A. Osorio, 2006: Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 30, 410-421.

Delputte, P.L., N. Vanderheijden, H.J. Nauwynck, and M.B. Pensaert, 2002: Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312-4320.

Delputte, P.L., S. Costers, and H.J. Nauwynck, 2005: Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparán sulphate and sialoadhesina. *J. Gen. Virol.* 86, 1441-1445.

Dewey, C.E., S. Wilson, P. Buck, and J.K. Leyenaar, 1999: The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev. Vet. Med.* 40, 233-241.

Díaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, and E. Mateu, 2005: Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 86, 1943-1951.

Díaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, and E. Mateu, 2006: Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.

Díaz, I., J. Pujols, L. Ganges, M. Gimeno, L. Darwich, M. Domingo, and E. Mateu, 2009: In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocápside protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603-5611.

Díaz, I., M. Gimeno, L. Darwich, N. Navarro, L. Kuzemtseva, S. López, I. Galindo, J. Segalés, M. Martín, J. Pujols, and E. Mateu, 2012: Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 43 (1):30.

Dokland, T., 2010: The structural biology of PRRSV. *Virus Res.* 154, 86-97.

Domenech, N., M.P. Rodríguez-Carreño, P. Filgueira, B. Álvarez, S. Chamorro, and J. Domínguez, 2003: Identification of porcine macrophages with monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 77-81.

Done, S.H., and D.J. Paton, 1995: Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.* 136, 32-35.

Drew, T.W., 2000: A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Res.* 31, 27-39.

Duan, X., H.J. Nauwynck, and M.B. Pensaert, 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.

Fablet, C., C. Marois, G. Kuntz-Simon, N. Rose, V. Dorenlor, F. Eono, E. Eveno, J.P. Jolly, L. Le Devendec, V. Tocqueville, S. Quéguiner, S. Gorin, M. Kobisch, and F. Madec, 2011: Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* 147, 329-339.

Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, 2005: Virus Taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In: Fauquet C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (eds). 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 1259. London: Elsevier Academic Press.

Feitsma, H., H.J. Grooten, F.W.V. Schie, and B. Colenbrander, 1992: The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod.* 12, 1710-1712.

Fitzgerald-Bocarsly, P., 1993: Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol. Ther.* 60, 39-62.

Fitzgerald-Bocarsly, P., 2002: Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques Suppl.* 16-20, 22, 24-9.

Flores-Mendoza, L., E. Silva-Campa, M. Reséndiz, F.A. Osorio, and J. Hernández, 2008: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 720-725.

Fontenot, J.D., and A.Y. Rudensky, 2005: A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 6, 331-337.

Frössling, J., E.C. Agren, L. Eliasson-Selling, and S.S. Lewerin, 2009: Probability of freedom from disease after the first detection and eradication of PRRS in Sweden: scenario-tree modelling of the surveillance system. *Prev. Vet. Med.* 91, 137-145.

Garner, M.G., L.J. Gleeson, P.K. Holyoake, R.M. Cannon, and W.J. Doughty, 1997: A national serological survey to verify Australia's freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome. *Aust. Vet. J.* 75, 596-600.

Geitjtenbeek, T.B., R. Torensma, S.J. Van Vliet, G.C. Van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. Van Kooyk, and C.G. Figdor, 2000: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100, 575-585.

Gershon, R.K., and K. Kondo, 1970: Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.

Gimeno, M., L. Darwich, I. Díaz, E. de la Torre, J. Pujols, M. Martín, S. Inumaru, E. Cano, M. Domingo, M. Montoya, and E. Mateu, 2011: Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42:9.

Gómez-Laguna, J., F.J. Salguero, M. Fernández de Marco, F.J. Pallares, A. Bernabe, and L. Carrasco, 2009: Changes in lymphocytes subsets and cytokines during european porcine reproductive and respiratory syndrome: increased expression of IL-12 and IL-10 and proliferation of CD4⁺CD8^{high}. *Viral Immunol.* 22, 261-271.

Gómez-Laguna, J., F.J. Salguero, I. Barranco, F.J. Pallarés, I.M. Rodríguez-Gómez, A. Bernabé, and L. Carrasco, 2010a:

Cytokine expression by macrophages in the lung of pigs infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Comp. Pathol.* 142, 51-60.

Gómez-Laguna, J., F.J. Salguero, M. Fernández de Marco, I. Barranco, I.M. Rodríguez-Gómez, M. Quezada, and L. Carrasco, 2012: Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection mediated apoptosis in B- and T-Cell areas of lymphoid organs of experimentally infected pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* Doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01338.x.

Gómez-Lucía, E., M.M. Blanco, and A. Doménech, 2007: Células implicadas en la respuesta inmune. In: Gómez-Lucía, E., M.M. Blanco, and A. Doménech. *Manual de Inmunología Veterinaria*, 1st edn. pp. 41-62. Pearsom-Prentice Hall.

Gonin, P., B. Pirzadeh, C.A. Gagnon, and S. Dea, 1999: Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 20-26.

Goovaerts, D., and N. Visser, 1992: Vascular lesions in pigs infected with PRRS. *Proc. Congr. Int. Pig Vet. Soc.* 12, 129.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Andrews, J.J., Sanderson, T.P., Ross, R.F., Schwartz, K.J., Frey, M.L., Erickson, B.J., Hill, H.T., and L.J. Hoffman, 1993: Experimental transmission of an apparent viral pneumonia in conventional and gnotobiotic pigs. *Vet. Rec.* 132, 263-266.

Halbur, P. G., J. Andrews, P. Paul, and J. Rathje, 1995a: Strain variation of PRRS virus: field and research experiences. *Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* 26, 391-394.

Halbur, P.G., L.D. Miller, P.S. Paul, X.J. Meng, E.L. Huffman, and J.J. Andrews, 1995b: Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32, 200-204.

Halbur, P.G., P.S. Paul, and M.L. Frey, 1995c: Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32, 648-660.

Halbur, P.G., P.S. Paul, X.J. Meng, M.A. Lum, J.J. Andrews, and J.A. Rathje, 1996: Comparative pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a 5-week-old cesarean-derived-colostrum deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11-20.

Hammerberg, C., and G.G. Schurig, 1986: Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11, 107-121.

Harding, C.V., and L. Ramachandra, 2010: Presenting exogenous antigen to T cells. *Curr. Protoco. Immunol.* Chapter 16, unit 16:2.

Hart, D.N., 1997: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.

Haverson, K., S. Singha, C.R. Stokes, and M. Bailey, 2000: Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology* 101, 492-500.

Haynes, J.S., P.G. Halbur, T. Sirinarumitr, P.S. Paul, J.X. Meng, and E.L. Huffman, 1997: Temporal and morphologic

characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Vet. Path.* 34, 39-43.

Hill, H., 1990: Overview and history of Mystery Swine Disease (swine infertility/respiratory syndrome). In: proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock Conversation Institute, Denver, CO, pp. 29-31.

Hopper, S.A., M.E.C. White, and W. Twiddy, 1992: An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* 131, 140-144.

Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi, 2003: Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv. Immunol.* 81, 331-371.

Huang, Y.W., and X.J. Meng, 2010: Novel strategies and approaches to develop next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.* 154, 141-149.

Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R.M. Steinman, 1997: High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* 186, 665-672.

Jiang, Y., S. Xiao, L. Fang, X. Yu, Y. Song, C. Niu, and H. Chen, 2006: DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24, 2869-2879.

Jiang, W., P. Jiang, X. Wang, Y. Li, Y. Du, and X. Wang, 2008: Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus Res.* 136, 50-57.

Johnson, W., M. Roof, E. Vaughn, J. Christopher-Hennings, C.R. Johnson, and M.P. Murtaugh, 2004: Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 233-247.

Kang, I., Y. Ha, D. kim, Y. Oh, K.D. Cho, B.H. Lee, J. Lim, S.H. Kim, B. Kwon, and C. Chae, 2010: Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary glands of experimentally infected sows. *Res. Vet. Sci.* 88, 304-306.

Kapur, V., M.R. Elam, T.M. Pawlovich, and M.P. Murtaugh, 1996: Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *J. Gen. Virol.* 77, 1271-1276.

Karniychuk, U.U., M. Geldhof, M. Vanhee, J. Van Doorselaere, T.A. Saveleva, and H.J. Nauwynck, 2010: Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet. Res.* 6:30 1-10.

Karniychuk, U.U., D. Saha, M. Geldhof, M. Vanhee, P. Cornillie, W. Van den Broeck, and H.J. Nauwynck, 2011: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb. Pathog.* 51, 194-202.

Käser, T., W. Gerner, S.E. Hammer, M. Patzl, and A. Saalmüller, 2008a: Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 92-101.

Käser, T., W. Gerner, S.E. Hammer, M. Patzl, and A. Saalmüller, 2008b: Phenotypic and functional characterization of porcine CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122, 153-158.

Käser, T., W. Gerner, and A. Saalmüller, 2011: Porcine regulatory T cells: mechanisms and T-cell targets of suppression. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1166-1172.

Keffaber, K.K., 1989: Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. News* 1, 1-9.

Key, K.F., G. Haqshenas, D.K. Guenette, S.L. Swenson, T.E. Toth, and X.J. Meng, 2001: Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Microbiol.* 83, 249-263.

Key, K.F., D.K. Guenette, K.J. Yoon, P.G. Halbur, T.E. Toth, and X.J. Meng, 2003: Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live-attenuated vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2433-2439.

Keller, R., 2001: Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol. Letters*, 78, 113-122.

Kim, H.S., J. Kwang, I.J. Yoon, H.S. Joo, and M.L. Frey, 1993: Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.

Kim, T.S., D.A. Benfield, and R.R. Rowland, 2002: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res.* 85, 133-140.

Kim, W.I., and K.J. Yoon, 2008: Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes* 37, 380-391.

Kimman, T.G., L.A. Cornelissen, R.J. Moormann, J.M. Rebel, and N. Stockhofe-Zurwieden, 2009: Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704-3718.

Kindt, T.J, B.A. Osborne, and R.A. Goldsby, 2006: Overview of the immune system. In: Kindt, T.J, B.A. Osborne, and R.A. Goldsby, *Kuby Immunology*, 6th edition. Chapter 1.

King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz, 2012: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. In: King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz (eds). *Ninth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*, p. 804. London: Elsevier Academic Press.

Klinge, K.L., E.M. Vaughn, M.B. Roof, E.M. Bautista, and M.P. Murtaugh, 2009: Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virol. J.* 6, 177.

Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kämpgen, N. Romani, and G. Schuler, 1996: High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184, 741-746.

Kristensen, B., 1995: Possible influence of the parental MHC class I type on survival of offspring from sows with natural PRRS-virus infection. *Int. Symp. PRRS* 2, 44.

Kroese, M.V., J.C. Zevenhoven-Dobbe, J.N. Bos-de Ruijter, B.P. Peeters, J.J. Meulenberg, L.A. Cornelissen, and E.J. Snijder, 2008: The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 89, 494-499.

Kumar, V., A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster, 2010: Diseases of the immune system. In: Kumar, V., A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster, Robbins and Cotran, *Pathologic basis of disease*, 8th ed. pp. 183-257. Saunders editorial, Philadelphia.

Kwang, J., F. Zuckermann, G. Ross, S. Yang, F. Osorio, W. Liu, and S. Low, 1999: Antibody and cellular immune responses of swine following immunization with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res. Vet. Sci.* 67, 199-201.

Labarque, G., H.J. Nauwynck, K. Van Reeth, and M.B. Pensaert, 2000: Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J. Gen. Virol.* 81, 249-260.

Labarque, G., K. Van Reeth, S. Van Gucht, H. Nauwynck, and M. Pensaert, 2002: Porcine reproductive-respiratory syndrome virus infection predisposes pigs for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Vet. Microbiol.* 88, 1-12.

Labarque, G., S. Van Gucht, H. Nauwynck, K. Van Reeth, and M. Pensaert, 2003: Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet. Res.* 34, 249-260.

Labarque, G., K.V. Reeth, H. Nauwynck, C. Drexler, S. Van Gucht, and M. Pensaert, 2004: Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183-4190.

Lager, K.M., and W.L. Mengeling, 1995: Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 59, 187-192.

Lager, K.M., and P.G. Halbur, 1996: Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest* 8, 275-282.

Lamontagne, L., C. Pagé, R. Larochelle, and R. Magar, 2003: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8^{high} T cells. *Viral Immunol.* 16, 395-406.

Lawson, S.R., K.D. Rossow, J.E. Collins, D.A. Benfield, and R.R. Rowland, 1997: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and colocalization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res.* 51, 105-113.

Lee, H.K., and A. Iwasaki, 2007: Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin. Immunol.* 19, 48-55.

Lee, S.M., and S.B. Kleiboeker, 2007: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365, 419-434.

Lee, C., and D. Yoo, 2006: The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* 355, 30-43.

Li, Y., X. Wang, K. Bo, X. Wang, B. Tang, B. Yang, W. Jiang, and P. Jiang, 2007: Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet. J.* 174, 577-584.

Lindemans, C.A., P.J. Coffey, I.M. Schellens, P.M. de Graaff, J.L. Kimpen, and L. Koenderman, 2006: Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-KappaB-dependent mechanism. *J. Immunol.* 176, 5526-5537.

Liu, Y.J., G. Grouard, O. de Bouteiller, and J. Banchereau, 1996: Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int. Rev. Cytol.* 166, 139-179.

Liu, Y.J., and C. Arpin, 1997: Germinal center development. *Immunol. Rev.* 156, 111-126.

Liu, Y.J., 2005: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306.

Loemba, H.D., S. Mounir, H. Mardassi, D. Archambault, and S. Dea, 1996: Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 751-761.

Logue, S.E., and S.J. Martin, 2008: Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1-9.

Lopez-Fuertes, L., N. Domenech, B. Alvarez, A. Ezquerro, J. Dominguez, J.M. Castro, and F. Alonso, 1999: Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine reproductive and respiratory syndrome infection. *Virus Res.* 64, 33-42.

Lopez, O.J., and F.A. Osorio, 2004: Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 155-163.

Loula, T., 1991: Mystery pig disease. *Agripractice* 12, 23-34.

Loving, C.L., S.L. Brockmeier, and R.E. Sacco, 2007: Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229.

Lu, K.H., Y.F. Chang, P.H. Yin, T.T. Chen, Y.L. Ho, Y.S. Chang, and C.W. Chi, 2010: In vitro and in vivo apoptosis-inducing antileukemic effects of *Mucuna macrocarpa* stem extract on HL-60 human leukemia cells. *Integr. Cancer Ther.* 9, 298-308.

Majno, G., and I. Joris, 1995: apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15.

Makala, L.H., K. Haverson, C.R. Stokes, M. Bailey, and P.W. Bland, 1998: Isolation and characterization of pig Peyer's patch dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 67-81.

Malek, T.R., and A.L. Bayer, 2004: Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 665-674.

Martín, M., J. Segalés, F.F. Huang, D.K. Guenette, E. Mateu, N. de Deus, and X.J. Meng, 2007: Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 16-24.

Martínez-Lobo, F.J., F. Diez-Fuertes, I. Simarro, J.M. Castro, and C. Prieto, 2011: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates differ in their susceptibility to neutralization. *Vaccine* 29, 6928-6940.

Mateu, E., I. Díaz, L. Darwich, J. Casal, M. Martín, and J. Pujols, 2006: Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res.* 115, 198-206.

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

Meng, X.J., P.S. Paul, and P.G. Halbur, 1994: Molecular cloning and nucleotide sequencing of 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1795-1801.

Mengeling, W.L., K.M. Lager, and A.C. Vorwald, 1994: Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1391-1398.

Mengeling, W.L., K.M. Lager, and A.C. Vorwald, 1995: Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 3-16.

Mengeling, W.L., A.C. Vorwald, K.M. Lager, and L. Brockmeier, 1996: Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* 57, 834-839.

Meulenbergh, J.J., M.M. Hulst, E.J. de Meijer, P.L. Moonen, A. den Besten, E.P. de Kluyver, G. Wensvoort, and R.J. Moormann, 1993: Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72.

Meulenberg, J.J., M.M. Hulst, E.J. de Meijer, P.L. Moonen, A. den Besten, E.P. de Kluyver, G. Wensvoort, and R.J. Moormann, 1994: Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. *Arch. Virol. Suppl.* 9, 441-448.

Meulenberg, J.J., and A. den Besten, 1996: Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF 2 is incorporated in virus particles. *Virology* 225, 44-51.

Meulenberg, J.J., A. Petersen den Besten, E. de Kluyver, A. Van Nieuwstadt, G. Wensvoort, and R.J. Moormann, 1997: Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet. Microbiol.* 55, 197-202.

Mikkelsen, S.R., J.M. Long, L. Zhang, E.R. Galemore, S. VandeWoude, and G.A. Dean, 2011: Partial regulatory T cell depletion prior to acute feline immunodeficiency virus infection does not alter disease pathogenesis. *PLoS One*, 6, e17183.

Miller, L.C., and J.M. Fox, 2004: Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 131-142.

Mills, K.H., 2004: Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4, 841-855.

Möller, G., 1988: Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* 27, 247-250.

Mota, J., K. Stark, and J. Thompson. New Zealand is free from PRRS, TGE and PRRSV. *Surveillance* 24, 10-1.

Mulupuri, P., J.J. Zimmerman, J. Hermann, C.R. Johnson, J.P. Cano, W. Yu, S.A. Dee, and M.P. Murtaugh, 2008: Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol.* 82, 358-370.

Murtaugh, M.P., X. Xhengguo, and F. Zuckermann, 2002: Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15, 533-547.

Murtaugh, M.P., T. Stadejek, J.E. Abrahante, T.T.Y. Lam, and F.C.-C. Leung, 2010: The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 18-30.

Music, N., and C.A. Gagnon, 2010: The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 135-163.

Nauwynck, H.J., X. Duan, H.W. Favoreel, P. Van Oostveldt, and M.B. Pensaert, 1999: Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80, 297-305.

Nauwynck, H.J., H. Van Gorp, M. Vanhee, U. Karniychuk, M. Geldhof, A. Cao, M. Verbeeck, and W. Van Breedam, 2012: Micro-dissecting the pathogenesis and immune response of PRRSV infection paves the way for more efficient PRRSV vaccines. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01292.x.

Nelsen, C.J., M.P. Murtaugh, and K.S. Faaberg, 1999: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol.* 73, 270-280.

Neumann, E.J., J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H. Seitzinger, A.L. Green, and J.J. Zimmerman, 2005:

Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 385-392.

Neumann, E.J., and R.S. Morris, 2008: Re: Re: Analysis of the risk of introduction and spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through importation of raw pigmeat into New Zealand. *N.Z. Vet. J.* 56, 149-150.

Nieuwenhuis, N., T.F. Duinhof, and A. Van Nes, 2012: Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nice sow herds. *Vet. Rec.* 170, 225.

Oleksiewicz, M.B., A. Botner, P. Toft, P. Normann, and T. Storgaard, 2001: Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J. Virol.* 75, 3277-3290.

Opriessnig, T., P. G. Halbur, K.J. Yoon, R.M. Pogranichniy, K.M. Harmon, R. Evans, K.F. Key, F.J. Pallarés, P. Thomas, and X.J. Meng, 2002: Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J. Virol.* 76, 11837-11844.

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

Otake, S., S.A. Dee, K.D. Rossow, J. Deen, H.S. Joo, T.W. Molitor, et al., 2002a: Transmission of porcine reproductive and

respiratory syndrome by fomites (boots and coveralls). Swine Health Prod. 10, 59-65.

Otake, S., S.A. Dee, K.D. Rossow, H.S. Joo, J. Deen, and T.W. Molitor, 2002b: Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. Vet. Rec. 150, 114-115.

Otake, S., S.A. Dee, K.D. Rossow, R.D. Moon, and C. Pijoan, 2002c: Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Can. J. Vet. Res. 66, 191-195.

Otake, S., S.A. Dee, L. Jacobson, M. Torremorell, and C. Pijoan, 2002d: Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. Vet. Rec. 150, 804-808.

Otake, S., S.A. Dee, R.D. Moon, C. Trincado, and C. Pijoan, 2003a: Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Res. 67, 265-270.

Otake, S., S.A. Dee, R.D. Moon, K.D. Rossow, C. Trincado, and M. Farnham, 2003b: Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. Can. J. Vet. Res. 67, 198-203.

Otake, S., S.A. Dee, R.D. Moon, K.D. Rossow, C. Trincado, and C. Pijoan, 2004: Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). Vet. Rec. 154, 80-85.

Otake, S., S. Dee, C. Corzo, S. Oliveira, and J. Deen, 2010: Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and

Mycoplasma hyopneumoniae from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.* 145, 198-208.

Paillot, R., F. Laval, J.C. Audonnet, C. Andreoni, and V. Juillard, 2001: Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology*, 102, 396-404.

Park, J.Y., H.S. Kim, and S.H. Seo, 2008: Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1709-1716.

Peng, Y.T., H.S. Chaung, H.L. Chang, H.C. Chang, and W.B. Chung, 2009: Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 359-365.

Pérez, J., P.M. García, E. Mozos, M.J. Bautista, and L. Carrasco, 2001: Immunohistochemical characterization of hepatic lesions associated with migrating larvae of *Ascaris suum* in pigs. *J. Comp. Pathol.* 124, 200-206.

Pescovitz, M.D., J.K. Lunney, and D.H. Sachs, 1984: Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol.* 133, 368-375.

Pirtle, E.C., and G.W. Beran, 1996: Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the presence of fomites commonly found on farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 390-392.

Pitkin, A., J. Deen, and S. Dee, 2009: Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 1-7.

Plagemann, P.G.W., and V. Moening, 1992: Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 41, 99-191.

Plagemann, P.G., 2004a: GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102, 225-230.

Plagemann, P.G., 2004b: The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 263-275.

Plagemann, P.G., 2006: Neutralizing antibody formation in swine infected with seven strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as measured by indirect ELISA with peptides containing the GP5 neutralization epitope. *Viral Immunol.* 19, 285-293.

Plana-Duran, J., M. Vayreda, J. Vilarrasa, M. Bastons, R. Rosell, M. Martínez, A. San Gabriel, J. Pujols, J.L. Badiola, J.A. Ramos, et al., 1992: Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microbiol.* 33, 203-211.

Pozzi, L.M., J.W. Maciaszek, and K.L. Rock, 2005: Both dendritic cells and macrophages can stimulate naïve CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J. Immunol.* 175, 2071-2081.

Prieto, C., P. Suárez, J.M. Bautista, R. Sánchez, S.M. Rillo, I. Simarro, A. Solana, and J.M. Castro, 1996: Semen changes in boars

after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45, 383-395.

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

Quah, B.J., and C.R. Parish, 2012: New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* using CFSE-like fluorescent dyes. *J. Immunol. Methods* 379, 1-14.

Quintana, J., M. Balasch, J. Segalés, M. Calsamiglia, G.M. Rodríguez-Arrijo, J. Plana-Durán, and M. Domingo, 2002: Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet. Res.* 33, 229-237.

Ramos, J.A., A.J. Ramis, A. Marco, M. Domingo, R. Rabanal, and L. Ferrer, 1992: Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1418-1426.

Reid, S.D., G. Penna, and L. Adorini, 2000: The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 114-121.

Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R.N. Germain, and A. Sher, 1997: *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819-1829.

Ren, Y.W., Y.Y. Zhang, N.A. Affara, C.A. Sargent, L.G. Yang, J.L. Zhao, L.R. Fang, J.J. Wu, R. Fang, Q. Tong, J. Xiao, J.L. Li, Y.B. Jiang, H.C. Chen, and S.J. Zhang, 2012: The polymorphism analysis of CD169 and CD163 related with the risk of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Mol. Biol. Rep.* DOI 10.1007/s11033-012-1857-8.

Revilla, C., T. Poderoso, P. Martínez, B. Álvarez, L. López-Fuertes, F. Alonso, A. Ezquerro, and J. Domínguez, 2009: Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. *Vet. Res.* 40 (3), 14.

Rodríguez-Gómez, I.M., and I. Díaz, 2012: Inmunología y vacunas frente al PRRSV y al PCV2. *Albeitar* 152, 12-14.

Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A.M. Livingstone, C.G. Fathman, K. Inaba, and R.M. Steinman, 1989: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 169, 1169-1178.

Rossow, K.D., E.M. Bautista, S.M. Goyal, T.W. Molitor, M.P. Murtaugh, R.B. Morrison, D.A. Benfield, and J.E. Collins, 1994a: Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-ols pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 3-12.

Rossow, K.D., R.B. Morrison, S.M. Goyal, G.S. Singh, and J.E. Collins, 1994b: Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 368-371.

Rossow, K.D., J.E. Collins, S.M. Goyal, E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, and D.A. Benfield, 1995: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32, 361-373.

Rossow, K.D., D.A. Benfield, S.M. Goyal, E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, and J.E. Collins, 1996a: Chronological

immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33, 551-556.

Rossow, K.D., K.L. Laube, S.M. Goyal, and J.E. Collins, 1996b: Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Vet. Pathol.* 33, 95-99.

Rossow, K.D., J.E. Collins, J.L. Shivers, M.P. Murtaugh, P.E. Yeske, and R.W. Evelsizer, 1997: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus infection characterized by marked neurovirulence. *James Bailey Herd Health Conf.* 1, 91-99.

Rossow, K.D., 1998: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Pathol.* 35, 1-20.

Saalmüller, A., M.J. Reddehase, H.J. Bühring, S. Jonjic, and U.H. Koszinowski, 1987: Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17, 1297-1301.

Saalmüller, A., F. Weiland, and M.J. Reddehase, 1991: Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen. *Immunobiology* 183, 102-114.

Saalmüller, A., T. Werner, and V. Fachinger, 2002: T-helper cells from naïve to committed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 137-145.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, 1995: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151-1164.

Salguero, F.J., P.J. Sánchez-Cordón, A. Núñez, M. Fernández de Marco, and J.C. Gómez-Villamandos, 2005: Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J. Comp. Pathol.* 132, 289-302.

Salio, M., M. Cella, M. Suter, and A. Lanzavecchia, 1999: Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 29, 3245-3253.

Sallusto, F., A. Langenkamp, J. Geginat, and A. Lanzavecchia, 2000: Functional subsets of memory T cells indentified by CCR7 expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251, 167-171.

Sang, Y., C.R. Ross, R.R. Rowland, and F. Blecha, 2008: Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection. *Viral Immunol.* 21, 303-313.

Schurrer, J.A., S.A. Dee, R.D. Moon, M.P. Murtaugh, C.P. Finnegan, J. Deen, S.B. Kleiboeker, and C.B. Pijoan, 2005: Retention of ingested porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1517-1525.

Schurrer, J.A., S.A. Dee, R.D. Moon, J. Deen, and C. Pijoan, 2006: An evaluation of three intervention strategies for the control of insects on a commercial swine farm. *Swine Health Prod.* 14, 76-81.

Segalés, J., L. Martínez-Guinó, M. Cortey, N. Navarro, E. Huerta, M. Sibila, J. Pujols, and T. Kekarainen, 2009: Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet. Microbiol.* 134, 199-207.

Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homman, H. Yamada, K.P. Campbell, J.C. de La Torre, and M.B. Oldstone, 2000:

Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192, 1249-1260.

Shen, G., N. Jin, M. Ma, K. Jin, M. Zheng, T. Zhuang, H. Lu, G. Zhu, H. Jin, M. Jin, X. Huo, X. Qin, R. Yin, C. Li, H. Li, Y. Li, Z. Han, and Y. Chen, 2007: Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* 25, 4193-4202.

Shevach, E.M., 2006: From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.

Shevach, E.M., 2009: Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636-645.

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

Silva-Campa, E., L. Cordoba, L. Fraile, L. Flores-Mendoza, M. Montoya, and J. Hernández, 2010: European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology* 396, 264-271.

Silva-Campa, E., V. Mata-Haro, E. Mateu, and J. Hernández, 2012: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4⁺CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs). *Virology* 430, 73-80.

Sirinarumit, T., Y. Zhang, J.P. Kluge, P.G. Halbur, and P.S. Paul, 1998: A pneumo-virulent United States isolate of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 79, 2989-2995.

Snijder, E.J., and J.J. Meulenberg, 1998: The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 961-979.

Snijder, E.J., J.C. Dobbe, and W.J. Spaan, 2003: Heterodimerization of the two major proteins is essential for arterivirus infectivity. *J. Virol.* 77, 97-104.

Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, 2008: Mechanisms of regulatory T-cell suppression-a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.

Soyka, M.B., D. Holzmann, and C.A. Akdis, 2012: Regulatory cells in allergen-specific immunotherapy. *Immunotherapy* 4, 389-396.

Stadejek, T., M.B. Oleksiewicz, D. Potapchuk, and K. Podgórska, 2006: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of a new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835-1841.

Stadejek, T., M.B. Oleksiewicz, A.V. Scherbakov, A.M. Timina, J.S. Krabbe, K. Chabros, and D. Potapchuk, 2008: Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153, 1479-1488.

Steinman, R., 1991: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.

Steinman, R., 2012: Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 1-22.

Stockhoff-Zurweiden, N., J.A. Navarro Camarro, E. Grosse-Beilage, J. Chavez, and J. Pohlenz, 1993: Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *J. Vet. Med. B* 40, 261-271.

Storgaard, T., M. Oleksiewicz, and A. Botner, 1999: Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Arch. Virol.* 144, 2389-2401.

Suárez, P., M. Díaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J.M. Castro, A. Nieto, and J. Ortín, 1996: Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 70, 2876-2882.

Subramanian, S., B. Kwon, L.K. Beura, A.K. Pattnaik, and F. Osorio, 2009: Elucidation of mechanism of TNF α suppression by PRRSV. In: *Proceedings of the 90th Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Chicago, Il (Abstract 176)*.

Summerfield, A., and K.C. McCullough, 2009: The porcine dendritic cell family. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 299-309.

Sun, Z., C. Liu, F. Tan, F. Gao, P. Liu, A. Qin, and S. Yuan, 2010: Identification of dispensable nucleotide sequence in 3'untranslated region of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 38-47.

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

Sur, J.H., A.R. Doster, and F.A. Osorio, 1998: Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 35, 506-514.

Suradhat, S., and R. Thanawongnuwech, 2003a: Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.

Suradhat, S., R. Thanawongnuwech, and Y. Poovorawan, 2003b: Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 453-459.

Swenson, S.L., H.T. Hill, J.J. Zimmerman, L.E. Evans, J.G. Landgraf, R.W. Wills, T.P. Sanderson, M.J. McGinley, A.K. Brevik, D.K. Ciszewski, and M.L. Frey, 1994: Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1943-1948.

Tait, J.F., and D. Gibson, 1992: Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium membrane phosphatidylserine content. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 187-191.

Takikawa, N., S. Kobayashi, S. Ide, Y. Yamane, Y. Tanaka, and H. Yamagishi, 1996: Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 355-357.

Tang, H.L., and J.G. Cyster, 1999: Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284, 819-822.

Tanimoto, T., and Y. Ohtsuki, 1996: Evaluation of antibodies reactive with porcine lymphocytes and lymphoma cells in formalin-fixed, paraffin-embedded, antigen-retrieved tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 57, 853-859.

Teodoro, J.G., and P.E. Branton, 1997: Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71, 1739-1746.

Terpstra, C., G. Wensvoort, and J.M.A. Pol, 1991: Experimental reproduction of porcine reproductive and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* 13, 131-136.

Tew, J.G., J. Wu, D. Qin, S. Helm, G.F. Burton, and A.K. Szakal, 1997: Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol. Rev.* 156, 39-52.

Thacker, E.L., P.G. Halbur, R.F. Ross, R. Thanawongnuwech, and B.J. Thacker, 1999: Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37, 620-627.

Thacker, E.L., 2001: Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 17, 551-565.

Thanawongnuwech, R., E.L. Thacker, and P.G. Halbur, 1997: Effect of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): In vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 323-335.

Thanawongnuwech, R., G.B. Brown, P.G. Halbur, J.A. Roth, R.L. Royer, and B.J. Thacker, 2000: Pathogenesis of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet. Pathol.* 37, 143-152.

Thanawongnuwech, R., T.F. Young, B.J. Thacker, and E.L. Thacker, 2001: Differential production of Proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 115-127.

Thomson, B.J., 2001: Viruses and apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 65-76.

Tian, K., X. Yu, T. Zhao, Y. Feng, Z. Cao, C. Wang, Y. Hu, X. Chen, D. Hu, X. Tian, D. Liu, S. Zhang, X. Deng, Y. Ding, L. Yang, Y. Zhang, H. Xiao, M. Qiao, B. Wang, L. Hou, X. Wang, X. Yang, L. Kang, M. Sun, P. Jin, S. Wang, Y. Kitamura, J. Yan, and G.F. Gao, 2007: Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PloS One* 2, e526.

Tingstedt, J.E., D. Torrehave, P. Lind, and J. Nielsen, 2003: Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 123-132.

Tizard, I.R., 2009: Dendritic cells and antigen processing. In: Tizard, I.R. (eds), *Veterinary Immunology*, 7th edn. pp. 56-66; Saunders editorial.

Toka, F.N., S. Suvas, and B.T. Rouse, 2004: CD4+CD25+ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8+ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 78, 13082-13089.

Tong, G.Z., Y.J. Zhou, X.F. Hao, Z.J. Tian, T.Q. An, and H.J. Qiu, 2007: Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1434-1436.

Trincado, C., S.A. Dee, K.D. Rossow, D. Halvorson, and C. Pijoan, 2004: Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 154, 233-237.

Trinchieri, G., 2007: Pillars of immunology: The birth of a cell type. *J. Immunol.* 178, 3-4.

Truyen, U., S. Wilhelm, M. Genzow, and G. Schagemann, 2006: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): a ring test performed in Germany to assess RT-PCR detection methods. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 68-74.

Van Breedam, W., P.L. Delputte, H. Van Gorp, G. Misinzo, N. Vanderheijden, X. Duan, and H.J. Nauwynck, 2010: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J. Gen. Virol.* 91, 1659-1667.

Vanderheijden, N., P. Delputte, H. Nauwynck, and M. Pensaert, 2001: Effects of heparin on the entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into alveolar macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 683-689.

Vanderheijden, N., P.L. Delputte, H.W. Favoreel, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, P.A. Van Woensel, and H.J. Nauwynck, 2003: Involvement of sialoadhesina in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207-8215.

Van Gorp, H., W. Van Breedam, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2008: Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2943-2953.

Van Gorp, H., W. Van Breedam, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2009: The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch. Virol.* 154, 1939-1943.

Van Gorp, H., W. Van Breedam, J. Van Doorselaere, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, 2010: Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 84, 3101-3105.

Vanhee, M., S. Costers, W. Van Breedam, M. Geldhof, J. Van Doorselaere, and H.J. Nauwynck, 2010: A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains. *Viral Immunol.* 23, 403-413.

Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., and M. Pensaert, 1996: Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* 48, 325-335.

Van Reeth, K., G. Labarque, H.J. Nauwynck, and M. Pensaert, 1999: Differential production of Proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.

Vashisht, K., T.L. Goldberg, R.J. Husmann, W. Schnitzlein, and F.A. Zuckermann, 2008: Identification of immunodominant T-

cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 26, 4747-4753.

Villamide-Herrera, L., R. Ignatius, M.A. Eller, K. Wilkinson, C. Griffin, E. Mehlhop, J. Jones, S.Y. Han, M.G. Lewis, S. Parrish, T.C. Vancott, J.D. Lifson, S. Schlesinger, J.R. Mascola, and M. Pope, 2004. Macaque dendritic cells infected with SIV-recombinant canarypox *ex vivo* induce SIV-specific immune responses *in vivo*. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 20, 871-884.

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

Wagstrom, E.A., C.C. Chang, K.J. Yoon, and J.J. Zimmerman, 2001: Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1876-1880.

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

Ward, S.M., B.C. Fox, P.j. Brown, J. Worthington, S.B. Fox, R.W. Chapman, K.A. Fleming, A.H. Banham, and P. Klenerman, 2007: Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J. Hepatol.* 47, 316-324.

Weiland, E., M. Wieczorek-Krohmer, D. Kohl, K.K. Conzelmann, and F. Weiland, 1999: Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet. Microbiol.* 66, 171-186.

Weiss, L., V. Donkova-Petrini, L. Caccavelli, M. Balbo, C. Carbonneil, and Y. Levy, 2004: Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood*, 104, 3249-3256.

Wensvoort, G., C. Terpstra, J.M. Pol, E.A. ter Laak, M. Bloemraad, E.P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, and et al., 1991: Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121-130.

Werling, D., M. Koss, C.J. Howard, G. Taylor, W. Langhans, and J.C. Hope, 2002: Role of bovine chemokines produced by dendritic cells in respiratory syncytial virus-induced T cell proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 225-233.

White, M.E.C., 1991: Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* 128, 574.

Wills, R.W., J.J. Zimmerman, K.J. Yoon, S.L. Sweson, L.J. Hoffman, M.J. McGinley, H.T. Hill, and K.B. Platt, 1997: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57, 69-81.

Wills, R., F.A. Osorio, and A. Doster, 2000: Susceptibility of selected non swine species to infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: *Proceedings of the 31st Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* Pp. 411-413.

Wills, R.W., A.R. Doster, J.A. Galeota, J.H. Sur, and F.A. Osorio, 2003: Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 58-62.

Wissink, E.H., M.V. Kroese, H.A. Van Wijk, F.A. Rijsewijk, J.J. Meulenberg, and P.J. Rottier, 2005: Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79, 12495-12506.

Wongyanin, P., S. Buranapraditkun, K. Chokeshai-Usaha, R. Thanawonguwech, and S. Suradhat, 2010: Induction of inducible CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 1236-1246.

Wongyanin, P., S. Buranapraditkun, D. Yoo, R. Thanawonguwech, J.A. Roth, and S. Suradhat, 2012: Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (T_{reg}). *J. Gen. Virol.* 93, 170-182.

Worliczek, H.L., M. Buggelsheim, R. Alexandrowicz, K. Witter, P. Schmidt, W. Gerner, A. Saalmüller, and A. Joachim, 2010: Changes in lymphocyte populations in suckling piglets during primary infections with *Isospora suis*. *Parasite Immunol.* 32, 232-244.

Wu, W.H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R.R. Rowland, J. Christopher-Hennings, and E.A. Nelson, 2001: A 10-KDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.

Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, 1980: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.

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

Xu, M., W. Shujie, L. Li, L. Lei, Y. Liu, W. Shi, J. Wu, L. Li, F. Rong, M. Xu, G. Sun, H. Xiang, and X. Cai, 2010: Secondary infection with *Streptococcus suis* serotype 7 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Virol. J.* 7:184.

Yaeger, M.J., T. Prieve, J.E. Collins, J. Christopher-Hennings, E. Nelson, and D. Benfield, 1993: Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.* 1, 7-9.

Yang, H., C.A. Oura, P.A. Kirkham, and R.M. Parkhouse, 1996: Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes. *Immunology* 88, 577-585.

Yang, L., M.L. Frey, K.J. Yoon, J.J. Zimmerman, and K.B. Platt, 2000: Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch. Virol.* 145, 1599-1619.

Yoo, D., C. Song, Y. Sun, Y. Du, O. Kim, and H.C. Liu, 2010: Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 48-60.

Yoon, I.J., H.S. Joo, W.T. Christianson, H.S. Kim, J.E. Collins, R.B. Morrison, and G.D. Dial, 1992: An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 144-147.

Yoon, I.J., H.S. Joo, W.T. Christianson, R.B. Morrison, and G.D. Dial, 1993: Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod.* 4, 5-8.

Yoon, I.J., H.S. Joo, S.M. Goyal, and T.W. Molitor, 1994: A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 289-292.

Yoon, K.J., J.J. Zimmerman, M.J. McGinley, J. Landgraf, M.L. Frey, H.T. Hill, and K.B. Platt, 1995: Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may lead to mis-diagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 386-387.

Zeman, D., R. Neiger, M. Yaeger, E. Nelson, D. Benfield, P. Leslie-Steen, J. Thomson, D. Miskimins, R. Daly, and M. Minehart, 1993: Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 522-528.

Zhou L., and H. Yang, 2010: Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res.* 154, 31-37.

Zimmerman, J.J., K.J. Yoon, E.C. Pirtle, R.W. Wills, T.J. Sanderson, and M.J. McGinley, 1997: Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet. Microbiol.* 55, 329-336.

Zimmerman, J.J., D.A. Benfield, M.P. Murtaugh, F. Osorio, G.W. Stevenson, and M. Torremorell, 2006: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Straw, B.J., et al. (Eds.), *Diseases of Swine*, 9th edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 387-418.