

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias



“Interacción del Virus de la fiebre aftosa con las células dendríticas: génesis de la respuesta inmune adaptativa”

Trabajo de tesis presentado para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Inmunología

Lic. Cecilia Ana Langellotti

Directores:

Dra. Mónica Vermeulen

Dra. Patricia Inés Zamorano

Laboratorio de Inmunología e Inmunomoduladores
Instituto de Virología
CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2011

A Lulí y César:

Por el amor incondicional, el acompañamiento y la paciencia que me tienen,

Por la hermosa familia que formamos,

Gracias por estar siempre!!! Los amo...

AGRADECIMIENTOS

A Patricia, por abrirme las puertas del laboratorio cuando todavía era una estudiante de grado, por formarme y acompañarme todos estos años,

A Mónica, por aceptar dirigirme en esta tesis, por su compromiso incondicional, por su gran apoyo, por estar siempre dispuesta a ayudarme (incluso en días feriados!!), por su paciencia conmigo,

Al director del Instituto, Dr. Fernando Fernández que me otorgó el apoyo institucional para desarrollar este trabajo,

A las chicas del lab, Vale Q, Vicky, Ivi y Eri, por aguantarme todos los días, por los momentos que compartimos fuera del lab, por hacerme reír mucho, por hacer ameno todo el tiempo que compartimos en el laboratorio,

A los chicos del “viejo lab D”, Vale O, Digi y Seba P, por los buenos tiempos que pasamos juntos, por la compañía, el aguante y las horas de charla,

A los chicos de la Academia, por darme un lugar en la mesada para trabajar, por hacerme sentir bienvenida en su laboratorio, por la buena onda,

A Mariela y María José, por su ayuda y paciencia con mis experimentos, por hacer fuerza mental conmigo para que alcancen las células, por su compañía,

Al director del laboratorio de Cultivos Celulares, Osvaldo Zabal y a los integrantes de su grupo, Daniel Fariñón, Estela Fernández, Teresa Morán, por proveerme siempre de células aunque las pida a último momento,

A los chicos del P3, Juan y Gastón, por estar siempre dispuestos a ayudarme, por el aguante cuando no me alcanza el tiempo en el lab y me tienen que esperar, por los mates compartidos en su oficina,

A mis compañeros de otros grupos y sectores del INTA, Miriam, Danilo, Guille, Juancito, Marimonia, Anita, Diego (x2), Dario, Gustavo, Demian, Lucas, Agus, Sol, Ana Clara, Marina (x3), Gaby (x2), Ale, Bessie, Ariel, Mariano, Oscar, Mirko, Mariana, Aye, Fonde, Silvi, Vanesa, Samu, Gero y a todos los que sé que me estoy olvidando de nombrar... GRACIAS por hacer de nuestro lugar de trabajo un ambiente amigable y divertido,

A todo el personal de apoyo del instituto. A Marta y Pame, por su ayuda en el trabajo cotidiano, sin uds nuestro trabajo sería mucho más complicado. A Fátima, Sandra y Silvio, por ayudarme con el cuidado de los ratones. A los choferes,

Marcelo y Ramón, por ir, entre otros lugares, hasta La Plata a buscar a mis animalitos, gracias!! A las secretarias, Betty, Claudia, Debora, Soledad y a Ezequiel, por ocuparse de todo el tramiterio y por aguantarme siempre haciendo las mismas preguntas,

A Claudia Mongini, por las charlas en la oficina y por sus consejos,

A Eliana Smitsaart, por donarme tan gentilmente el virus inactivado que se usó para los experimentos de este trabajo,

A Vivi, mi cuñadita, por acompañarme y ayudarme en los últimos días de escritura,

A mi familia, por su amor, comprensión y paciencia,

Al CONICET, por otorgarme las Becas de Postgrado, apoyando el desarrollo de esta Tesis doctoral,

A INTA, por darme el lugar físico para poder desarrollar mi trabajo de investigación,

A la Universidad de Morón y a la Universidad de Buenos Aires, por la formación de todos estos años.

Índice

INDICE

	<i>Página</i>
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCION.....	9
1- El virus de la fiebre aftosa.....	10
1.1- Generalidades de la enfermedad y patogenia.....	10
1.2- Clasificación, organización genómica y proteínas del virus de la fiebre aftosa.....	12
1.3- Ciclo infectivo.....	16
1.4- Distribución geográfica de la enfermedad e importancia económica ..	18
2- Respuesta inmune contra infecciones virales.....	23
2.1- Activación de la respuesta inmune anti-viral.....	27
2.1.1- Reconocimiento de la infección por la inmunidad innata	27
2.1.2- Interferón de tipo 1	29
2.1.3- Células NK	30
2.1.4- Linfocitos B de tipo innato.....	31
3- Células dendríticas y su función en la inducción de respuestas anti-virales.....	33
3.1- Subpoblaciones de células dendríticas	34
3.2- Captación del antígeno y maduración de las células dendríticas.....	35
3.3- Procesamiento y presentación antigénica.....	37
3.4- Modulación de la respuesta inmune adaptativa por células dendríticas.....	38
3.5- Inducción de tolerancia y de linfocitos T reguladores por células dendríticas	40

4- Interacción entre células dendríticas y virus	42
4.1- Reconocimiento de la infección y respuesta innata mediada por CDs	42
4.2- Respuesta inmune adaptativa contra virus. Inicio y modulación de la funcionalidad de las CDs por infecciones virales	45
4.3- Estimulación de linfocitos B y de la secreción de anticuerpos anti- virales por CDs	47
5- Respuesta inmune contra VFA	48
5.1- Respuesta inmune en los hospedadores naturales	48
5.2- Respuesta inmune en el modelo murino contra VFA.....	50
5.3- Interacción entre las células dendríticas y el Virus de la Fiebre Aftosa.....	55
 HIPOTESIS Y OBJETIVO	 59
 MATERIALES Y METODOS	 60
1- Ratones.....	61
2- Medidas de bioseguridad	61
3- Líneas celulares	61
4- Virus	61
5- Infección e inmunización de los ratones.....	62
6- Desafío viral	62
7- ELISA para detección de inmunoglobulinas totales específicas contra VFA en sueros.....	63
8- Obtención de los bazos para la posterior purificación de las poblaciones celulares	64
9- Enriquecimiento de células CD11c y mPDCA-1 a partir de esplenocitos en suspensión mediante la utilización de perlas magnéticas	64
10- Análisis de la producción de citoquinas intracelulares en células dendríticas por citometría de flujo.....	65
11- Análisis de la expresión de moléculas de superficie mediante	

citometría de flujo	65
12- Análisis de muerte celular	66
13- Obtención de plasma	66
14- Análisis de la secreción de citoquinas en cultivos de células dendríticas o cocultivos de células dendríticas y esplenocitos	67
15- ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares o en plasma	67
16- Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas.....	68
17- Análisis estadístico de los datos	69
 RESULTADOS.....	 70
1- Análisis de los niveles de anticuerpos totales en el suero.....	71
2- Estudio de las distintas subpoblaciones de células dendríticas esplénicas en bazo.....	72
3- Análisis de los subtipos de células dendríticas purificadas de bazo.....	75
3.1- Células dendríticas convencionales	75
3.2- Células dendríticas plasmacitoides	77
3.2.1- Estudio de las células dendríticas en sangre periférica	78
3.3- Análisis fenotípico de las células dendríticas esplénicas: estado de activación	79
3.4- El virus de la fiebre aftosa induce la muerte temprana de las células dendríticas.....	80
3.5- Análisis del perfil de citoquinas inducido en las CDs esplénicas por el virus infeccioso o inactivo	82
4- Estudio de las distintas poblaciones de linfocitos en bazo	85
4.1- El VFA induce alteraciones de las poblaciones de linfocitos T esplénicas	85
4.2- Estudio de la población de linfocitos B maduros.....	87
4.3- Inducción de linfocitos T regulatorios en el bazo de ratones inoculados con VFAi	88

5- Evaluación de la capacidad estimuladora de los linfocitos T por las CD8 infectadas con VFA.....	90
DISCUSION	94
CONCLUSIONES.....	104
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	107

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Acs: anticuerpos
ADN: ácido desoxiribonucleico
AN: ácidos nucleicos
APC: alofocianina
ARN: ácido ribonucleico
ARNdc: ARN de doble cadena
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNsc: ARN de simple cadena BEI: Bromoetilamina
BCR: receptor del linfocito B
BHK: baby hámster kidney
Btk: Bruton's tyrosine kinasa
CCDA: citotoxicidad celular dependiente de Anticuerpos
CDs: células dendríticas
CDsc: células dendríticas convencionales
CDsl: células dendríticas linfoides
CDsm: células dendríticas mieloides
CDsp: células dendríticas plasmacitoides
CFSE: del inglés, *carboxylfluorescein succinimidyl ester*
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
CML: cultivo mixto de linfocitos
CPA: célula presentadora de antígenos
CT: control
CTLs: linfocitos T citotóxicos
DICT₅₀: dosis infectiva en cultivo de tejidos
dpi: días post-inoculación
DLRL₅₀: dosis letal 50 % en ratones lactantes
DO: densidad óptica
FA: Fiebre Aftosa
FITC: isocianato de fluoresceína

FR: forma replicativa
h: hora
HCV: virus de la hepatitis C
IFM: intensidad de fluorescencia media
IFN: interferón
Ig: inmunoglobulina
IL: interleuquina
IFM: intensidad de fluorescencia media
i.p.: intra-peritoneal
LB: linfocito B
LPS: Lipopolisacárido
LT: linfocito T
LT reg: linfocito T regulatorio
MEM-D: Dulbecco's modified Eagles's minimal essential
min: minutos
ml: mililitro
mPDCA-1: mouse plasmacytoid dendritic cell antigen-1
MSF: Medidas Sanitarias y Fitosanitarias
NALT: tejido linfoide asociado a la narinas
NK: célula "natural killer"
nm: nanómetros
OIE: Organización Internacional de Epizootias
OMC: Organización Mundial del Comercio
ORF: marco de lectura abierto
O1C: cepa O1 Campos
PE: ficoeritrina
PBS: buffer fosfato salino
PBST: buffer fosfato salino adicionado con 0,05% de tween 20
pg: picogramo
PMAPs: patrones moleculares asociados a patógenos
RFcy: receptores para la porción Fc de anticuerpos

rpm: revoluciones por minuto
RRPs: receptores de reconocimiento de patrones
SAT: Southern African Territories
SEM: error estándar medio
SFB: suero fetal bovino
T.A.: temperatura ambiente
TCR: receptor T del linfocito T
TD: timo-dependiente
Th1: linfocitos T colaboradores tipo 1
Th2: linfocitos T colaboradores tipo 2
Th17: linfocitos T colaboradores tipo 17
TI: timo-independiente
TLR: receptor tipo toll
TMB: 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
TNF: factor de necrosis tumoral
Tr1: linfocitos T regulatorios 1
Tregi: células T regulatorias inducibles
µg: microgramos
µl: microlitro
VDB: virus de la diarrea bovina
VFA: virus de la fiebre aftosa
VFAi: virus de la fiebre aftosa inactivado
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
VLCM: virus de la linfocoriomeningitis murina
VSV: Virus de la Estomatitis Vesicular
ZM: zona marginal
°C: grados centígrados
7-AAD: 7-amino-actinomicina D

RESUMEN

La Fiebre Aftosa es una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa, causada por el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). La enfermedad afecta a bovinos, ovinos, cerdos y varias especies silvestres, se caracteriza por la aparición de fiebre y lesiones vesiculares localizadas en la cavidad bucal, lengua y alrededor de las pezuñas. Desde un punto de vista económico, es la enfermedad más importante del ganado a nivel mundial. Las consecuencias económicas de la infección se deben al deterioro físico y productivo más que a pérdidas por mortalidad, pero para los países exportadores de animales y de productos animales, como Argentina, las pérdidas de mayor importancia se deben a las fuertes restricciones en el comercio internacional.

El VFA interacciona con las células dendríticas, tanto de sus huéspedes naturales como de los ratones, pero el impacto de esta interacción sobre la respuesta inmune adaptativa es controversial. Las vacunas utilizadas actualmente contra la fiebre aftosa contienen la forma inactivada del virus. Poco se conoce sobre las diferencias entre el virus infeccioso y el inactivado, en términos de subpoblaciones de células dendríticas involucradas en la activación de la respuesta inmune.

En el presente trabajo de tesis, llevado a cabo en el modelo murino, mostramos como la infección con el VFA induce inmunosupresión temprana, a nivel de reducción en el número de células dendríticas esplénicas de las diferentes subpoblaciones y la inhibición de la activación y maduración de las mismas. Además, la infección induce la secreción de bajos niveles de IFN- α en sangre periférica. La linfoproliferación se encuentra inhibida en estadios tempranos de la infección, pero la respuesta celular se reestablece luego de cinco días post-infección. Por el contrario, el virus inactivado provoca un aumento del porcentaje de células dendríticas plasmacitoides en bazo y la producción de IL-10, que

desencadena la activación de una respuesta de células T regulatorias en los ratones.

Palabras clave: Virus de la fiebre aftosa, células dendríticas, virus inactivado, CD4+CD25+Foxp3+, activación de linfocitos T, interferón tipo 1.

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease is a highly contagious and acute viral disease of cloven-hoofed animals, caused by Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV). It is characterized by fever and vesicular injuries located in oral cavity, tongue and all around the hooves. From an economical point of view, it is the most important disease of livestock worldwide. The economic consequences of the infection are more generated by physical and productive deterioration, than by mortality, but for countries who export animals and its products, as Argentina, the main losses are due to strong restrictions imposed to the international trade.

The FMDV interacts with dendritic cells, both in the natural host and in mice, but the impact of this interaction on the adaptive immune response is controversial. Currently available vaccines are based on inactivated forms of the FMDV. Little is known about the differences between infectious and inactivated virus, in terms of dendritic cell subsets involved in immune response activation. The present work, which was carried out in the mice model, shows that live virus infection induces a reduction in splenic dendritic cell subsets. In addition, lymphocyte proliferation is inhibited in the early stages of infection, but restored to normal values 5 days post-infection. By contrast, the inactivated virus increases the percentage of plasmacytoid dendritic cells in the spleen and the production of IL-10, which triggers the activation of a T regulatory response.

The present work, which was carried out in the mice model, shows that live virus infection induces early immunosuppression at level of reduction in the number of splenic dendritic cell subsets, and the inhibition of activation and maturation of them. In addition, infection induces the secretion of low levels of IFN- α in peripheral blood. Lymphocyte proliferation is inhibited in the early stages of infection, but it is restored at 5 days post-infection. By contrast, the inactivated

virus increases the percentage of plasmacytoid dendritic cells in the spleen and the production of IL-10, which triggers the activation of a T regulatory response.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, dendritic cells, inactivated viral particles, CD4+CD25+Foxp3+, T lymphocytes activation, interferon type 1.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1- El virus de la fiebre aftosa

1.1- Generalidades de la enfermedad y patogenia

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad infectocontagiosa aguda, cuyo agente etiológico es el virus de la Fiebre Aftosa (VFA), el cual pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae* (Racaniello, 2001). La enfermedad se caracteriza por la aparición de fiebre y lesiones vesiculares localizadas fundamentalmente en la cavidad bucal, lengua y alrededor de las pezuñas, y en algunos casos también lesiones en el epitelio del hocico, ollares, patas, pezones, ubres y pilares del rumen. Fue observada por primera vez en 1514 y descrita en 1546 en Venecia por Hieronymus Fracastorius de Verona, en su publicación “De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione”. Debido a las importantes pérdidas causadas en la producción animal, así como a las restricciones en el comercio internacional de productos pecuarios que se establecen con los países que presentan la enfermedad, la importancia económica de la misma es sumamente considerable (Alexandersen y col., 2003; Grubman y Baxt, 2004).

El virus afecta a los artiodáctilos, incluyendo los rumiantes domésticos, como los bovinos, ovinos, caprinos y cerdos, así como a más de 70 especies silvestres (Callis, 1979; House y Mebus, 1998; Alexandersen y col., 2003). Fue posible desarrollar la infección experimental en perros, gatos, conejos y chinchillas (Callis, 1979), asimismo se detectó viremia post-inoculación en gatos, monos, ratas y ranas (Cottral y Bachrach, 1968). Los equinos no son susceptibles a la enfermedad.

Los animales susceptibles pueden contagiarse por contacto directo con animales infectados, ya sea a través de aerosoles que vehiculizan el virus hasta el tracto respiratorio, o por transferencia mecánica del virus a través de cortes o abrasiones de la piel o de las superficies mucosas o por medio de la inseminación artificial. Otra forma de contagio está dada por el contacto indirecto, en el que el

virus es transportado a través de maquinarias, vehículos o personas. También es importante el contagio por ingestión de alimentos contaminados con el virus, siendo esta última forma de contagio la que originó los brotes de FA que ocurrieron en Japón y Sudáfrica en el año 2000 y en el Reino Unido en 2001 (Knowles y col., 2001).

Muchos trabajos indican que el área de la faringe es el sitio habitual de infección primaria, a menos que el virus haya entrado por lesiones de la piel o las mucosas. Luego de la transmisión aerógena, el VFA replica durante un período que se extiende de uno a tres días en el epitelio del techo de la faringe y en la superficie dorsal del paladar blando, tanto en bovinos como en cerdos (Oleksiewicz y col., 2001; Mc Vicar y Suttmoller, 1976; Alexandersen y col., 2001; Burrows y col., 1981), mientras que en los ovinos serían las tonsilas las que juegan un rol de importancia en la infección inicial (Burrows 1968). El epitelio de la faringe sería responsable también, de mantener la persistencia de la infección en los animales portadores. El VFA puede detectarse en la faringe 1 a 3 días antes de que se detecte la viremia, la cual dura en los bovinos entre 3 y 5 días y es la vía por la cual el virus se distribuye sistémicamente, llegando a los sitios de replicación secundaria. La principal amplificación del virus en este momento ocurre en el epitelio escamoso estratificado cornificado de la piel, especialmente alrededor de las pezuñas, en la glándula mamaria y en la boca, incluida la lengua. En los animales jóvenes, también replica en el miocardio. Los nódulos linfáticos así como los linfocitos y macrófagos, no toman parte del ciclo replicativo, y se demostró que el virus que puede encontrarse en los órganos linfoides se origina en otros tejidos. La eliminación del virus de la circulación y la reducción significativa de la carga viral en la mayoría de los órganos, secreciones y excreciones, tanto en rumiantes como en cerdos, coincide temporalmente con el comienzo de la detección de Iso anticuerpos (Acs) neutralizantes en el suero (Alexandersen y col., 2003). Una excepción la constituye la región faríngea de los rumiantes, en donde el virus puede establecer una infección persistente, aún en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en suero (Mc Vicar y Suttmoller, 1976).

Las tres especies principales involucradas en un brote de FA son el ovino como huésped de mantenimiento principalmente, el porcino como amplificador y el bovino como indicador, y esta última es la especie más importante en la diseminación y mantenimiento de la cadena epidemiológica de la transmisión (House y Mebus, 1998). El porcino juega un papel importante en la cadena epidemiológica de la FA particularmente por ser, después de infectado, un gran replicador del virus. (Donaldson y Ferris, 1980; Donaldson y col., 1987; Sellers y Parker, 1969).

El contagio está determinado por tres aspectos esenciales: la cantidad de virus eliminada por el animal infectado, la supervivencia del virus afuera del animal y la cantidad de virus requerida para comenzar la enfermedad en el animal susceptible. (Sellers y col., 1971).

1.2- Clasificación, organización genómica y proteínas del virus de la fiebre aftosa

El VFA tiene un diámetro de entre 28-30 nm y una densidad de 140S. Está compuesto por una única molécula de ARN de cadena simple y sentido positivo. El genoma viral de aproximadamente 8500 bases de largo, se encuentra recubierta por una cápside proteica de forma icosaédrica que está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales: 1A, 1B, 1C y 1D, según la nomenclatura definida por Rueckert y Wimmer (1984). Las proteínas estructurales también se conocen como VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente (Grubman y Baxt, 2004). La estructura tridimensional de éstas es la que provee los sitios antigénicos que dan la respuesta a la vacunación o infección, y a su vez son las mediadoras de la unión a los receptores celulares que median su internalización. Debido a su polaridad y a la presencia de poli(A) en el extremo terminal 3', el ácido ribonucleico (ARN) del VFA puede ser traducido sin transcripción previa de una cadena complementaria, por lo que, su ARN desnudo es infeccioso al ingresar al

interior celular o cuando es inoculado utilizando la vía intradermolingual o intramuscular en bovinos y otros animales (Cottral y Bachrach, 1968). Este virus posee una cápside proteica pero carece de cubierta lipídica y por lo tanto no es sensible a los solventes de lípidos como el fenol y el cloroformo. El VFA es muy sensible a cambios de pH y se inactiva a pHs por debajo de 6,0 y por encima de 9,0 (van Vlijmen y col., 1998). El virus puede sobrevivir en leche, suero y otros materiales orgánicos, especialmente en presencia de materia orgánica, como así también por largos períodos en la carne congelada, dentro de la médula ósea o los linfonódulos (House y Mebus, 1998).

El genoma del virus (Figura 1) está unido covalentemente en su región terminal 5' a un residuo de 23-24 aminoácidos, la proteína 3B (también conocida como VPg), es encapsidado durante la maduración en la cápside proteica icosaédrica (Jackson y col., 2003) y contiene un único marco de lectura abierto, con dos sitios alternativos de iniciación. La poliproteína codificada puede procesarse en más de una docena de polipéptidos maduros así como intermediarios parciales de clivaje (Grubman y col., 1984; Robertson y col., 1985; Rueckert, 1996). El VFA es el único de los picornavirus que codifica copias redundantes de 3B, y no se han aislado virus con menos copias hasta hoy, sugiriendo que hay una fuerte presión selectiva manteniendo esta redundancia. Falk y col. (1992) demostraron que un VFA quimera con una sola 3B funcional produjo 25-50 veces menos partículas virales infecciosas que el virus original con tres 3B funcionales.

La proteína L^{pro} posee dos codones de iniciación AUG (Sangar y col., 1987) que codifican para dos variantes de la proteína denominadas Lab y Lb, siendo esta última la que cumple un rol más importante (Cao y col., 1995). Esta proteína se autocliva del resto de la poliproteína (Strebel y Beck, 1986) y se le atribuyen funciones de bloqueo en la traducción cap-dependiente de proteínas, de esta manera la síntesis proteica dentro de la célula se deriva solo a proteínas virales. L^{pro} es también un determinante importante de la virulencia, esencial para producir transmisión viral entre huéspedes. Sin ella el virus no puede superar la respuesta inicial de IFN tipo I del huésped (Mason y col., 2003).

Las proteínas no estructurales participan en la replicación del ARN y en el plegamiento de las proteínas estructurales. La porción 2 es procesada en 3 polipéptidos maduros, 2A^{pro}, 2B y 2C (Rueckert y Wimmer, 1984). La función de 2C parecería ser la de una helicasa, involucrada en la separación de las cadenas del ARN viral durante la replicación. Se cree que 2C cumple funciones en la iniciación de la síntesis de la hebra de ARN negativa, tiene actividad GTPasa y ATPasa. Las proteínas 3A y 3AB serían críticas en la replicación de ARN asociada a membranas celulares (Mason y col., 2003). 3C^{pro} fue identificada como una proteasa (Klump y col., 1984) y es responsable de la mayoría de los clivajes que se producen en la poliproteína viral y también es responsable del clivaje de algunas proteínas celulares para inhibir su transcripción.

Al igual que todos los virus que tienen ARN como material genético, el VFA tiene una gran capacidad de cambio. Para adaptarse a nuevos ecosistemas y para evadir la respuesta inmune del huésped este virus ha evolucionado produciendo muchas variantes antigénicas, denominadas serotipos. Han sido identificados 7 serotipos: A, O, C, Asia 1 y Southern African Territories (SAT) 1, SAT2 y SAT3. Cada serotipo incluye numerosos subtipos. Esta diversidad y heterogeneidad antigénica tiene enorme importancia en el control de la enfermedad, exigiendo una vigilancia epidemiológica constante y la elaboración de vacunas con componentes inmunogénicos perfectamente identificados con las cepas de virus actuantes en el campo (Brown y Mowat, 2003).

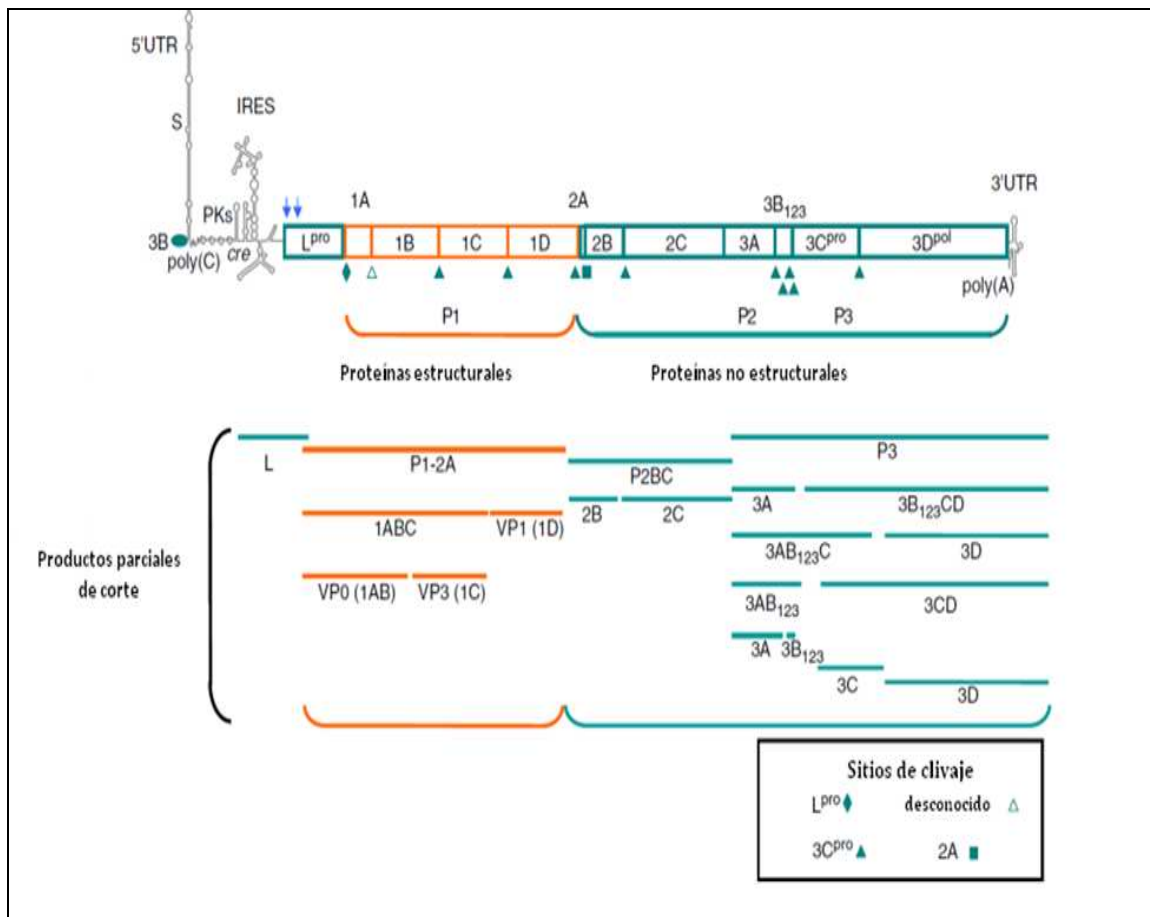


Figura 1: Diagrama esquemático del genoma del VFA y del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral. El marco abierto de lectura se indica como el área rectangular central y las proteínas virales se nombran según la nomenclatura de Rueckert y Wimmer (1984). Los nombres de las proteínas codificadas en cada sector del segmento codificante están indicados. También se muestran los elementos funcionales del genoma, tales como el IRES en el extremo 5' no traducido y la región 3' no traducida. La traducción de la poliproteína puede ocurrir en dos codones ATG (indicado por las flechas azules) en el extremo amino-terminal de L^{pro}. Procesamiento proteolítico de la poliproteína de VFA se inicia por las proteinasas virales L^{pro}, 2A y 3C^{pro}, mientras que la división del precursor de la proteína estructural VP0 se produce por un mecanismo desconocido. Los sitios de escisión de las diferentes proteasas se indican en el cuadro. (Adaptado de Grubman y col., 2008).

1.3- Ciclo infeccioso

Las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_v\beta_6$ son los principales receptores celulares para el VFA (Berinstein y col., 1995; Jackson y col., 2000; Jackson y col., 2002). Estas glicoproteínas, compuestas de dos subunidades (α y β) interactúan con el motivo tripéptido Arginina-Glicina-Aspártico (RGD) presente en una región altamente expuesta del rulo G-H de la proteína VP1. En condiciones apropiadas, la infección por cepas del virus de la fiebre aftosa dependería de los residuos de heparan sulfato. La estructura cristalizada del VFA ligado a heparina revela 3 residuos de azúcares unidos estrecha y específicamente en el surco de la superficie de la cápside. En pasajes en cultivo celular el VFA tipo O adquiere rápidamente afinidad por el heparan sulfato, hecho que dificulta el entendimiento del papel de los receptores en los animales infectados. La estructura de los receptores revela un contacto con el aminoácido arg-63 de 1C importante para estabilizar la unión (Jackson y col., 2003). Asimismo, el VFA puede utilizar otros receptores celulares alternativos. Por ejemplo, puede ingresar a las células formando complejos inmunes con anticuerpos y inducir su fagocitosis mediada por los receptores Fc (Mason y col., 1994).

La replicación de los picornavirus se da enteramente en el citoplasma celular. Luego de la adhesión al receptor celular, y a diferencia de lo que ocurre con otros Picornavirus, el VFA ingresa a la célula y se localiza en el interior de los endosomas. En estos, el virión de 140S se desensambla en subunidades pentaméricas de 12S, liberando así el ARN. Este fenómeno ocurre como consecuencia del ambiente ácido típico del interior de los endosomas (Curry y col., 1995; Ellard y col., 1999). Una vez que el ARN de polaridad positiva entra en el citoplasma, por un mecanismo aún desconocido, es traducido para producir las proteínas virales esenciales para la replicación y la producción de nuevas partículas virales. El ORF viral se traduce en un único polipéptido, el cual, como se mencionó anteriormente, es escindido proteolíticamente a medida que se va formando, obteniéndose como productos finales las proteínas estructurales y no estructurales del VFA. Estas reacciones de escisión son llevadas a cabo por las

tres proteasas virales: L^{pro}, 2A y 3C^{pro} (Clarke y Sangar, 1988; Vakharia y col. 1987; Ryan y col. 1991; Bablanian y Grubman, 1993) Entre las proteínas que se sintetizan está la polimerasa de ARN dependiente de ARN (3Dpol) y otras accesorias necesarias para la replicación del genoma y la síntesis del ARNm. El primer paso en la replicación del genoma es el copiado del ARN de hebra positiva recién ingresado para formar el intermediario ARN de hebra negativa. Como resultado, se forma una molécula de doble cadena, denominada forma replicativa (FR) Una vez producida la FR, la síntesis de nuevas cadenas de sentido positivo puede comenzar. La síntesis del ARN tiene lugar en el citoplasma, en asociación con un complejo replicativo formado por membranas derivadas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Grubman y col., 2004). Resultados recientes demostraron que el VFA induce la formación de autofagosomas en las células que infecta, proporcionando una superficie adecuada para el ensamblado de las proteínas virales requeridas para la replicación (O'Donnell, 2011)

La síntesis de ARN positivo es iniciada tan rápidamente (20 a 50 veces más rápido que las hebras negativas) que se genera un intermediario replicativo consistente de una hebra negativa y muchas copias de hebras positivas. Estos eventos ocurren en los denominados complejos de replicación, pequeñas vesículas derivadas de membranas que son inducidas por varias proteínas virales. A medida que se van produciendo las proteínas estructurales 3C^{pro} las cliva. El último paso en el ciclo de replicación consiste en la encapsidación del ARN de cadena positiva. La formación de la cápside se inicia por la interacción de las proteínas VP0, VP1 y VP3, las cuales se asocian formando un protómero. Cinco protómeros forman un pentámero y doce pentámeros se ensamblan en una partícula denominada provirión que contiene al ARN viral unido de forma covalente a la proteína viral VPg. El último paso hacia la formación de un virión maduro es la escisión de VP0 en VP2 y VP4, la cual ocurre autocatalíticamente (Curry y col., 1997; Hindiyeh y col., 1999) por un mecanismo dependiente de la presencia del ARN viral (Jacobson y Baltimore, 1968).

El tiempo completo requerido para un ciclo simple de replicación viral puede durar de 5 a 10 horas, dependiendo de muchas variables, entre ellas, la cepa viral,

la temperatura, el pH, la célula huésped y la multiplicidad de infección. Las partículas de virus completas a menudo forman cristales en las células infectadas y posteriormente son liberadas por desintegración de la célula huésped. La mayoría de los picornavirus son liberados cuando la célula pierde su integridad y se rompe (Racaniello, 2001).

1.4- Distribución geográfica de la enfermedad e importancia económica

La fiebre aftosa es endémica en varias partes de Asia y en gran parte de África y Oriente Medio. En Sudamérica, la mayoría de los países han aplicado la zonificación y son reconocidos libres de fiebre aftosa con o sin vacunación, y la enfermedad sigue siendo endémica solamente en unos pocos países. Australia, Nueva Zelanda e Indonesia, Centroamérica y Norteamérica y Europa Occidental están actualmente libres de fiebre aftosa. Sin embargo, la enfermedad puede ocurrir esporádicamente en áreas típicamente libres (Figura 2).

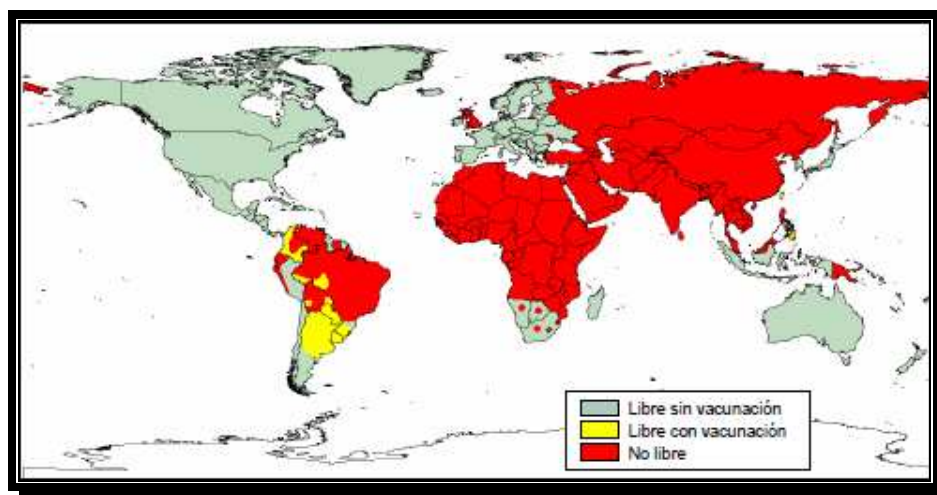


Figura 2: Estatus sanitario mundial con respecto a la Fiebre Aftosa (fuente: OIE, noviembre 2007).

La fiebre aftosa es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2009 de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (capítulo 1.2 artículo 1.2.3) y debe ser declarada a la OIE (capítulo 1.1 – Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos). Es la primera enfermedad para la cual la OIE ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación.

Entre los Países y Territorios Miembros de la OIE, 65 son reconocidos libres de fiebre aftosa sin vacunación y 1 es reconocido libre con aplicación de la vacunación. En varios otros países, se reconocen zonas libres con o sin aplicación de la vacunación, como es el caso de Argentina, la cual es libre con vacunación para la zona por encima del paralelo 42º, mientras que la Región Patagónica (por debajo del paralelo 42º) es considerada “zona libre sin vacunación” (Figura 3). Actualmente hay más de 100 países que no son considerados como libres.

Esta enfermedad ha sido reconocida como el obstáculo más importante para el comercio internacional de animales y productos animales por la OIE (Leforban, 1999). Como resultado, los países libres de FA prohíben la importación de animales susceptibles o sus productos de países que presentan la infección.

Los métodos actuales de control de la enfermedad incluyen el sacrificio de los animales infectados y de los que han estado en contacto con estos e inhibición en el movimiento de animales para evitar la dispersión y la vacunación.

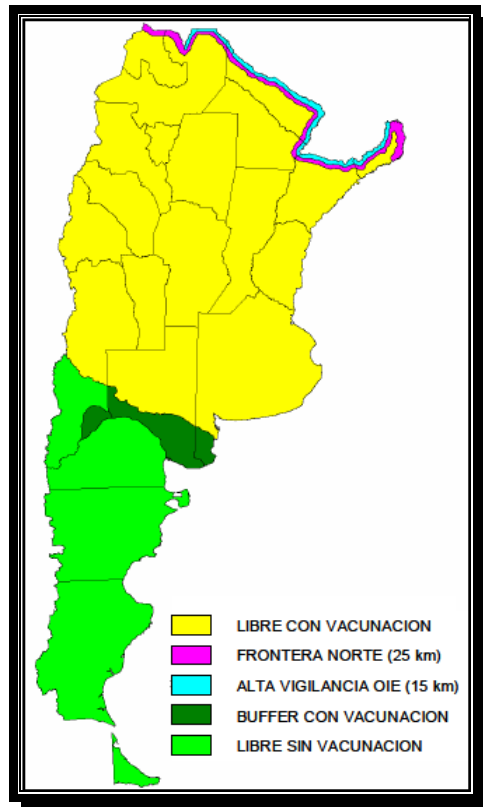


Figura 3: Estatus sanitario argentino con respecto a la Fiebre Aftosa
(fuente: OIE, marzo 2007).

La OIE ha identificado como patrones de enfermedad de mayor importancia a tener en cuenta frente a diferentes patógenos:

- La alta transmisibilidad
- La rápida difusión
- Las consecuencias graves para la economía o para la salud pública
- La importancia en el comercio internacional de animales y productos animales.

Entre las enfermedades animales que reúnen las características mencionadas, excepto la de ser de riesgo para la salud pública, se encuentra la

FA. El VFA ha causado los mayores perjuicios económicos relacionados con el ganado en el mundo y en nuestro país.

Las consecuencias económicas de la infección con VFA, generalmente en bovinos y porcinos, son debidas al deterioro físico y productivo más que a pérdidas por mortalidad, ya que en los bovinos adultos esta es generalmente menor al 5 %. La infección puede provocar un 50 % de mortalidad sólo si afecta al músculo cardíaco, particularmente en animales jóvenes (Donaldson y col., 1987; Geering y col., 1995). El alto grado de morbilidad, las pérdidas de productividad y las lesiones asociadas a las infecciones secundarias, constituyen un problema importante para los productores ganaderos e industrias relacionadas (Morgan y col., 1980). Sin embargo para los países exportadores de animales y productos animales, como Argentina, las pérdidas económicas de mayor importancia se deben a las restricciones en el comercio internacional.

El comercio internacional está regulado por la Organización Mundial del Comercio (OMC). A su vez el marco legal para el comercio de animales y productos de origen animal, está contenido en el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo MSF). El objetivo del MSF es facilitar el comercio de estos elementos entre países sin poner en riesgo la vida o salud de las personas, animales o plantas. Este acuerdo estableció que actualmente las barreras sanitarias sean las únicas legítimas para el comercio de animales y productos animales, basándose para ello en las directrices y recomendaciones establecidas por la OIE.

En los últimos años, tanto países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo, libres de la enfermedad, han sufrido la re-introducción del virus, perdiendo y recuperando alternativamente el reconocimiento de país libre de FA, con las consecuencias económicas que esto implica.

Hechos recientes han demostrado las dificultades existentes en la Argentina para el mantenimiento de la condición de "país libre de FA". A principios de los años '90 se consideró que el problema de la FA estaba controlado. Por esa razón se desmantelaron proyectos y una importante cantidad de recursos humanos fue

derivada a otras problemáticas. En 1999 Argentina dejó de vacunar. En mayo de 2000 el país fue reconocido como “libre de FA sin vacunación”. En agosto de ese año, se inició una epidemia que se extendió hasta enero de 2002 registrándose 2563 focos en 15 provincias. Como consecuencia, en marzo de 2001 se re-estableció la vacunación sistemática de los bovinos ubicados al norte del río Colorado. En julio de 2003 se obtuvo el reconocimiento de “país libre de FA con vacunación”, reconocimiento que se perdió dos meses después a causa de un foco detectado en Salta. Nuevamente se ajustaron las acciones de control y vigilancia epidemiológica, logrando el reconocimiento de “país libre de FA con vacunación” en enero de 2005. Un nuevo episodio de la enfermedad, esta vez en Corrientes en febrero de 2006, ocasionó modificaciones en el Status Sanitario.

Estos episodios ocasionaron graves pérdidas económicas, principalmente a los productores ganaderos, a importantes sectores de la industria frigorífica y a varios sectores de la cadena de carnes y ganados. Las pérdidas por restricciones en el mercado externo (disminución en los precios, cierre de mercados) asociadas con la epidemia del 2001, fueron de entre 700 y 1.700 millones de dólares. También fueron significativas las pérdidas asociadas con el sacrificio sanitario, la inmovilización de animales, las tareas para el control y las complicaciones de manejo ocasionadas por estas causas.

La re-introducción de la FA al país tendría gravísimas consecuencias económicas, principalmente pero no únicamente, sobre el mercado externo de carne y otros productos de origen de animales susceptibles al virus. Dependiendo de la extensión y duración de los brotes, también podría haber graves efectos sobre las economías regionales, la productividad de los establecimientos de las áreas afectadas, y en la mayoría de los sectores de la cadena de ganados y carnes.

2- Respuesta inmune contra infecciones virales

Los virus son patógenos intracelulares obligatorios que dependen para su supervivencia de huéspedes susceptibles donde replicar. La co-evolución de los virus y sus huéspedes ha conducido a un balance entre la virulencia y la respuesta inmune inducida (Hilleman, 2004; Hangartner y col., 2006). Por lo tanto, si bien los virus a lo largo de su evolución han adquirido mecanismos que les permiten una replicación eficiente en sus huéspedes, raramente presentan una virulencia tal que provoque la muerte de los mismos. Paralelamente, el sistema inmune del huésped ha evolucionado adquiriendo mecanismos que le permiten responder eficientemente contra las infecciones virales, y de esta manera controlar la patogenia. Sin embargo, la magnitud de la respuesta montada también presenta un límite en su desarrollo, el cual está determinado por la producción de daño inmunopatológico que toda respuesta inmune conlleva (Hangartner y col., 2006; Bachmann y Kopf, 2002).

Las infecciones virales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a las características citopatogénicas de los virus involucrados: infecciones citopáticas y no citopáticas.

Diferentes grupos de virus citopáticos provocan infecciones agudas, causando rápida necrosis en las células infectadas. Ejemplos de este tipo de infecciones los constituyen el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), poliovirus, rinovirus (virus del resfrío), el virus de la rabia y el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). La estrategia de supervivencia de estos virus es infectar al huésped, replicar rápidamente causando extenso daño celular, lo que induce una rápida respuesta de anticuerpos neutralizantes. Esto hace que antes de ser controlado por el sistema inmune, el virus deba transmitirse a un nuevo huésped susceptible (Hilleman, 2004). Por este motivo, los virus citopáticos son altamente y rápidamente contagiosos. Sin embargo, esta estrategia viral presenta el inconveniente de que, con cada transmisión, el número de huéspedes susceptibles (no inmunes) en una población disminuye. Consecuentemente, la posibilidad de replicación viral en la población se reduce rápidamente. Por lo tanto, la mayoría de los virus citopáticos

escapan a este estado de inmunidad poblacional mediante mutaciones que genera variantes virales (serotipos) que si bien presentan reacción cruzada con la variante viral original en varios epitopes reconocidos por anticuerpos, no reaccionan cruzadamente en aquellos epitopes involucrados en la neutralización o protección. Como resultado, individuos que presentan inmunidad contra un serotipo viral, no poseerán inmunidad protectora contra virus pertenecientes a serotipos distintos (o distintas variantes del mismo serotipo), y por lo tanto, serán susceptibles a la infección con estos últimos (Nagendrakumar y col., 2011; Goris y col., 2008).

Los virus no-citopáticos, no inducen daño celular directo, sino que es la propia respuesta del huésped la responsable de las lesiones en los tejidos infectados. Por lo que las lesiones generadas en los tejidos infectados con éstos virus se denominan lesiones inmunopatológicas. Dentro de este grupo se encuentran el virus de la hepatitis B y C, el virus de la linfocoriomeningitis murina (VLCM), virus de la diarrea bovina (VDB) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La estrategia de supervivencia de estos virus se caracteriza por su persistencia prolongada en el huésped, la cual es posible gracias a la baja inmunogenicidad y baja patogenicidad de los mismos, así como a los mecanismos gatillados contra la respuesta inmune del huésped. Por lo cual, los virus no-citopáticos rara vez son eliminados del hospedador, y por lo tanto no requieren de una alta tasa de contagio para sobrevivir en la población (Hilleman, 2004).

Las infecciones con virus citopáticos y no-citopáticos suelen activar mecanismos similares durante la respuesta innata, entre los que se destacan la producción de interferones de tipo 1, células NK y células dendríticas plasmacitoides. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa presenta características diferenciales notorias. A lo largo de esta Introducción, nos centraremos particularmente en el análisis de la respuesta inmune contra los virus citopáticos atendiendo a que el VFA pertenece a este grupo.

Un rasgo característico de las respuestas contra los virus citopáticos es la rápida inducción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes (2-4 días post-infección), los que en general se produce en forma timo-independiente. Estos anticuerpos son los principales encargados de controlar la infección, ya que evitan la diseminación del virus sistémicamente.

Los linfocitos B timo-independientes (TI) pueden diferenciarse y producir anticuerpos sin recibir señales coestimuladoras de los linfocitos T foliculares. Los antígenos que desencadenan este tipo de respuestas se denominan antígenos timo-independientes y pueden clasificarse en tipo 1 o tipo 2, de acuerdo a la capacidad de inducir anticuerpos en ratones CBA/N, los cuales presentan una mutación en el gen *btk* (Bruton's tyrosine kinase), quinasa necesaria para la señalización a través del receptor de reconocimiento del linfocito B (BCR).

- Antígenos TI de tipo 1. Este grupo lo constituyen las moléculas que actúan como activadores policlonales de los linfocitos B y que inducen una respuesta eficiente en ratones CBA/N. El ejemplo típico de este grupo de antígenos es el lipopolisacárido (LPS) bacteriano.
- Antígenos TI de tipo 2. Este grupo está formado por moléculas incapaces de inducir una respuesta eficiente en los ratones CBA/N. Estos antígenos se caracterizan por la presencia de epitopes ordenadamente repetidos.

Los antígenos TI de tipo 2 clásicos son los polisacáridos capsulares bacterianos y los polímeros sintéticos. Asimismo, muchos virus citopáticos se comportan como antígenos timo-independientes de tipo 2. Entre ellos se pueden mencionar los siguientes virus: VFA (Borca y col., 1986), coxsackie (Burns y col., 1975), cardiovirus, Sindbis (Burns y col., 1975), poliomavirus (Szomolanyi-Tsuda y Welsh, 1996), influenza (Lee y col., 2005), rhabdovirus (Battegay, 1996) y rotavirus (Franco y Greenberg, 1997). La capacidad de estos virus de inducir

respuestas de Acs TI ha sido asociada, al menos en parte, con la alta organización de los antígenos presentes en la superficie de los mismos (Bachmann y col., 1997). En efecto, el umbral de activación de las células B es menor para antígenos repetitivos y organizados (separados por una distancia de 5-10 nm) que para antígenos monoméricos no estructurados (Bachmann y col., 1997; Dintzis y col., 1976). Estos requerimientos en la organización antigénica están relacionados con la geometría espacial en la distribución de los BCRs de la superficie de los linfocitos B. Por lo tanto, la estimulación de los linfocitos B específicos con este tipo de antígenos induce el entrecruzamiento multivalente de los BCRs, produciéndose así la primer señal para las respuestas TI tipo 2 (Vos y col., 2000). A pesar de la timo-independencia de este tipo de respuestas, habría segundas señales que serían necesarias para la activación de los linfocitos involucrados. Sin embargo, a diferencia de las respuestas TD, en el caso de las respuestas contra antígenos TI, las segundas señales provendrían directamente del patógeno. Por ejemplo, ha sido demostrado que la señalización a través de TLR-9 presente en los linfocitos B, actúa en forma sinérgica con la señalización mediada a través del BCR, estimulando la proliferación B y la secreción de anticuerpos (Goeckeritz y col., 1999).

Por el contrario, cuando el virus es no-citopático, el control de la infección suele estar a cargo de la respuesta celular, particularmente los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, estos linfocitos también son los principales responsables del daño inmunopatológico que se observa en el transcurso de estas infecciones. Mientras que, los anticuerpos neutralizantes aparecen en bajos títulos y tardíamente (entre semanas a meses post-infección), lo cual constituye una diferencia notoria con las respuestas a virus citopáticos (Hangartner y col., 2006).

Es decir que, la respuesta inmune inducida luego de las infecciones virales difiere notablemente dependiendo del virus considerado, tanto en relación a los mecanismos efectores involucrados como a la cinética de la respuesta.

2.1- Activación de la respuesta inmune anti-viral

La respuesta inmune contra los virus, en particular contra los virus citopáticos como el VFA, presentan diferencias notorias respecto a las respuestas inducidas contra antígenos TD clásicos. El daño tisular causado por la replicación viral con la consecuente inflamación, la presencia de diferentes moléculas plausibles de ser reconocidas por el sistema inmune innato, la estructura del antígeno y su cinética de distribución así como los mecanismos de evasión desplegados por los virus contra la respuesta inmune montada por el huésped, son algunos de los factores determinantes del éxito en la resolución de la patogenia. Algunos de estos aspectos serán tratados en la presente sección.

2.1.1. Reconocimiento de la infección por la inmunidad innata

La mayoría de los virus infectan a sus huéspedes ingresando por las superficies epiteliales de la piel o mucosas de las vías aéreas, conjuntiva, tracto gastrointestinal o el tracto urogenital. El primer obstáculo encontrado por los virus para ingresar al organismo susceptible lo constituyen las superficies epiteliales, las cuales poseen mecanismos físicos y químicos de protección. Una vez traspasada esta primera barrera de defensa será capaz de replicar en los tejidos desencadenando así la respuesta inmune del huésped.

Los mecanismos de defensa contra los patógenos están regulados por la activación concertada de la inmunidad innata y la adaptativa. Sin embargo, el sistema innato es esencial en iniciar la cascada de activación tanto en los tejidos periféricos como linfoides. Antes que la respuesta innata se inicie, el patógeno debe ser reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), moléculas altamente conservadas de un patógeno a otro (Janeway, 2001). Cada RRP activa cascadas trasduccionales específicas que inducen la expresión de un conjunto de genes como las citoquinas pro-inflamatorias y los interferones de tipo 1. Estos

últimos desempeñan un rol crítico anti-viral durante la inmunidad innata que tiene por objeto erradicar los virus replicantes. Las bacterias y los hongos presentan componentes únicos en sus paredes celulares como las glicoproteínas o lipoglicanos, no presentes en las células del huésped, por lo que la detección de éstos PMAPs por los RRP es relativamente fácil. Por el contrario, los PMAPs más importantes virales son los ácidos nucleicos (AN), que tienen similitud estructural con los AN del huésped. Por lo que, el proceso por el que los RRP discriminan lo propio de lo no propio debe ser estrictamente regulado. Tres familias de RRP que sensan AN se describieron; los receptores toll (TLRs) endosomales, los genes inducibles por ácido retinoico (RIG-1)-like (RLRs) citoplasmáticos y moléculas no caracterizadas que sensan ácido dextrirribonucleico (ADN). Estos receptores comúnmente activan IFNs de tipo I además de citoquinas pro-inflamatorias. Los TLRs son una familia de proteínas de transmembrana expresadas preponderantemente en las células inmunes como los macrófagos y las células dendríticas (Kawai y Akira, 2007). De los doce miembros de esta familia descritos hasta la fecha (Medzhitov y col., 1997) sólo el TLR3, 7,8 y 9 reconocen AN virales. Dependiendo del virus o del estadio replicativo el ARN de doble cadena (ARNdc) es reconocido por el TLR-3 (Alexopoulou y col., 2001), ADN rico en motivos CpG puede ser reconocido a través de TLR-9 (Krug y col., 2004; Lund y col., 2003), ARN de simple cadena (ARNsc) que puede ser reconocido en el interior de endosomas a través de TLR7 y glicoproteínas de envoltura viral (Lund y col., 2004; Diebold y col., 2004; Heil y col., 2004). Como principal consecuencia funcional de la estimulación de estos receptores se produce una importante secreción de IFNs de tipo 1 (Yoneyama y Fujita, 2010).

Hace unos años se demostró en bovinos (Zhang y col., 2006) infectados con el VFA durante la fase aguda un aumento notable del ARN mensajero para el IFN- α , en el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT), llamativamente se observaba en este tejido un incremento del TLR4, RRP que se caracteriza por reconocer LPS de las paredes bacterianas y cuya expresión está asociada a la membrana celular. En forma reciente, Hüsser y col. (2011) demostraron utilizando la línea de células epiteliales porcinas PK-15, que el VFA es sólo detectado a

través de un miembro de la familia de RLRs el MDA-5 que activa la producción de IFN- β .

2.1.2. Interferón de tipo 1

Los interferones (IFNs) son una familia multigénica de citoquinas inducibles que poseen actividad antiviral, se la clasifica en dos grupos: IFNs de tipo 1 (interferones virales), e IFN tipo 2 (IFN- γ o inmune). Los genes para los IFNs virales se encuentran en todos los vertebrados superiores, y hasta el presente se describieron más de 10 miembros de la familia del IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω e IFN- τ en mamíferos (Roberts y col., 1998). Dentro de estos, el IFN- α y el IFN- β ejercen un rol central en la inmunidad innata antiviral. Luego de la ocurrida la infección viral la transcripción del IFN- α y el β es inducida rápidamente, secretándose los IFNs los que son reconocidos por un complejo receptor formado por 2 subunidades (IFNAR1, IFNAR2) que reconocen ambos IFNs α y β , respectivamente (Uze y col., 2007). Una vez activada la cascada de síntesis de los IFNs por todos los tipos celulares, por acción autócrina o paracrina, estos regulan la activación de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo la maduración de las CD8, la activación de las células NK y la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ (Tough, 2004; Stetson y Medzhitov, 2006). Es decir, que desarrollan un papel central en modular la activación de la respuesta inmune antiviral.

Un hecho ha destacar, es que si bien todas las células son capaces de producir IFNs de tipo 1 post-infección, sólo las CD8 plasmacitoides, también llamadas células productoras de IFN, pueden secretar hasta mil veces más IFN α/β que el resto de las células del organismo (Asselin-Paturel y col., 2001; Siegal y col., 1999).

2.1.3. Células NK

Las células NK son linfocitos grandes y granulares del sistema inmune innato ampliamente distribuidos en el organismo, y que están capacitadas para desplegar funciones tanto microbianas como inmunoregulatorias (Biron, 1999; Lee y Biron, 2010). Estas funciones están moduladas a través de su capacidad citotóxica y de su habilidad para producir citoquinas. Durante las infecciones virales, los IFNs de tipo 1 ($\text{IFN}\alpha/\beta$) estimulan tanto la resistencia celular a los virus como la actividad citolítica de las células NK (Nguyen y col., 2002). Sin embargo no se demostró una asociación entre la producción de $\text{IFN-}\gamma$ por las NK y los IFNs de tipo 1. Un hecho importante es que las NK se encuentran en mayor frecuencia que los linfocitos TCD8+. La activación de las células NK ocurre por entrecruzamiento de sus receptores activadores; las moléculas Ly49 en ratones, KIR en el hombre y las NKG2 expresadas en ambas especies (Lanier, 1998), con ligandos virales. En este sentido se demostró que no es sólo la alta frecuencia de éstas células (2-10 %) en sangre periférica sino también la alta expresión de los receptores activadores lo que determina su mayor potencial en responder contra los virus en relación a los linfocitos TCD8+ específicos que necesitan aumentar su frecuencia a través de la expansión clonal.

Además de su efecto anti-viral directo, las células NK son capaces de modular diversos mecanismos que permiten la regulación entre otros de la respuesta T. Producen $\text{IFN-}\gamma$ que promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ vírgenes en un perfil Th1 (Scharton y Scott, 1993), regulan la replicación viral por lo que se reducen los niveles de IFNs de tipo 1 con lo que se revierte el efecto de inhibición inducido sobre la activación de las células dendríticas y se restituye su capacidad de activar la respuesta T (Robbins y col., 2007), asimismo al mediar la muerte de las células infectadas promueven la presentación antigénica (Krebs y col., 2009)

Las NK presentan receptores para el fragmento Fc de la IgG ($\text{RFc}\gamma$) de manera que pueden activarse de forma independiente de los receptores activadores, a través del reconocimiento de células recubiertas por anticuerpos y

destrucción de las mismas. Este mecanismo se denomina citotoxicidad celular dependiente de Acs (CCDA). El FcR presente en este tipo celular es el Fc γ RIII, que se fija a las moléculas de IgG agrupadas sobre la superficie celular pero no a la IgG monomérica circulante. De esta forma la CCDA solo ocurre cuando la célula blanco está recubierta de anticuerpos. El entrecruzamiento del receptor con su ligando, desencadena la activación de estas células y como consecuencia las NK sintetizan citoquinas, como IFN- γ , y liberan el contenido de sus gránulos que median las funciones citotóxicas (Abbas y Lichtman, 2004).

Existe asociación entre la expansión de ciertos receptores de activación y determinadas infecciones virales, así se demostró para infecciones por citomegalovirus humano y el NKG2C/CD94; para el CMV murino y el Ly49H y el NKp30 para infecciones agudas con el virus de la hepatitis C (HCV) (Biron, 2010)

Recientemente se demostró, que en algunos casos las células NK son capaces de producir IL-10, y así controlar negativamente la respuesta T. Se demostró que durante infecciones crónicas con HCV y por infecciones con CMV murino donde el Ly49H está involucrado. En estos casos, se cree que la IL-10 limitaría la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD8+ y protegería contra el daño producido por la activación T (De Maria y col., 2007; Lee y col., 2009).

2.1.4. Linfocitos B de tipo innato

Así como las células NK presentan la habilidad de ejercer respuestas citotóxicas en forma rápida, conteniendo la infección mientras los linfocitos T citotóxicos son activados en un proceso más lento, también existe un conjunto de linfocitos B (LB) capaces de secretar anticuerpos inmediatamente luego de una infección. A estos LB se los denomina linfocitos B de tipo innato.

El conjunto de LB maduros es heterogéneo, estando constituido por tres subpoblaciones principales: linfocitos B2 (foliculares), linfocitos B1 y LB de la zona

marginal (ZM). Estas poblaciones celulares difieren en su localización anatómica, en la expresión de marcadores de superficie y en su funcionalidad.

Los linfocitos B2 foliculares constituyen la mayoría de los LB maduros. Funcionalmente, los linfocitos B2 son los “clásicos LB”, responsables de las respuestas contra antígenos proteicos TD clásicos. La estimulación para la secreción de anticuerpos por este grupo de LB requiere no solo del reconocimiento del antígeno a través del BCR, sino también de una segunda señal necesaria para la activación de los LB, provista por los LT colaboradores. El tiempo requerido para que un linfocito B2 madure y se transforme en una célula secretora de anticuerpos de alta afinidad por el antígeno, es de al menos cinco días.

En cambio, tanto los linfocitos B1 como los LB de la ZM del bazo constituyen un grupo funcional que se denomina LB de tipo innato (Kearney, 2005). Ambas poblaciones cumplen funciones similares y están involucradas en la generación de anticuerpos de forma TI (Martin y Kearney, 2001; Wortis y Berland, 2001). Estas células presentan un fenotipo activado o efector que les permite la rápida producción de anticuerpos ante el desafío antigénico. Una vez activadas, estas células son capaces de responder a antígenos en ausencia de colaboración T y diferenciarse rápidamente, dentro de los tres días, en células secretoras de anticuerpos (Martin y col. 2000; Oliver y col. 1999). Es por esto que los LB de tipo innato representan una interfase entre la inmunidad innata y adaptativa, ya que si bien poseen la especificidad de la inmunidad adaptativa, presentan la cinética y los requerimientos de activación típicos del sistema innato.

Los LB de tipo innato se caracterizan por la utilización de BCRs con limitada diversidad. Los BCRs de estos linfocitos generalmente son sometidos a selección positiva mediada por antígenos, usualmente propios, que en muchos casos presentan reacción cruzada con antígenos presentes en patógenos microbianos. Asimismo, la rapidez en generar una respuesta de anticuerpos que poseen estos linfocitos se debe a que los mismos reaccionan habitualmente contra antígenos TI, y por lo tanto, no requieren de colaboración de LT para ser activados (Kearney y col., 2005).

3- Células dendríticas y su función en la inducción de respuestas anti-virales

Los antígenos TI clásicos, tales como los carbohidratos bacterianos purificados o los polímeros sintéticos, carecen de epitopes capaces de ser reconocidos por los linfocitos T. Por el contrario, muchos virus citopáticos presentan la interesante particularidad de que, a pesar de comportarse como antígenos TI, son antígenos de naturaleza proteica. Por lo tanto, la respuesta inmune contra los virus presenta un componente TD, el cual, podría interactuar y modular al componente TI. Las células dendríticas cumplen un importante papel en esta interacción, el cual reside en su capacidad de activar y modular tanto las respuestas de linfocitos T, así como la de los linfocitos B (Steinman, 2003; Jego y col., 2005).

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) que expresan una cualidad única: activar linfocitos T vírgenes, poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa (Reis e Sousa, 2006). En respuesta a señales indicativas de inflamación y/o infección, las CDs inmaduras migran hacia los ganglios linfáticos drenantes, transformándose en CDs maduras, las cuales presentan baja capacidad de endocitar y procesar antígenos, pero alta capacidad presentadora (Domínguez y Ardavín, 2010). Este particular comportamiento de las CDs permite a las mismas captar el antígeno en periferia y presentarlo a los linfocitos T a nivel de los órganos linfáticos secundarios, dando inicio a la respuesta inmune adaptativa. La relevancia de las CDs en la respuesta inmune no guarda sólo relación con su capacidad de activar a los linfocitos T naïve. Son ellas las que deciden el perfil particular en el que se diferenciarán las células T CD4+ al activarse: Th1, Th2, Th17 o T regulatorio. Esta decisión depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CDs (Mittelbrunn y col., 2009; López-Bravo y Ardavín, 2008).

3.1- Subpoblaciones de células dendríticas

Las CDs han sido descritas como los efectores más importantes en la respuesta inmune del huésped, tanto en humanos como en ratones, ya que han demostrado su rol al vincular las respuestas inmune innata y adaptativa (Banchereau y Steinman, 1998).

Las CDs se diferencian a partir de precursores presentes en médula ósea, alcanzando luego tejidos periféricos, donde residen como CDs inmaduras. Ellas expresan una alta capacidad de endocitar y procesar antígenos. Las células dendríticas (CDs) componen un grupo heterogéneo de tipos celulares, que difieren en su fenotipo y funcionalidad. Las CDs constituyen un grupo heterogéneo de células que se clasifican en CDs convencionales (CDsc) y CDs plasmacitoides (CDsp) (Ardavin, 2003). En los ratones, ambos grupos de células expresan en la superficie celular a la molécula CD11c, la cual es utilizada como marcador de estas células.

Las CDs convencionales actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, y por lo tanto, son las únicas con capacidad para iniciar la respuesta adaptativa en los órganos linfáticos secundarios, además tienen la capacidad de activar y modular tanto las respuestas de los LT, así como la de los LB (Steinman, 2003).

Las CDsc se subdividen en estado de reposo en dos subsets que se distinguen por su expresión de las moléculas CD4 y CD8; el de CD4⁺CD8⁻ y el de CD4⁻CD8⁺ (CD11c⁺CD8^{α+}) y el de DCs mieloides (CD11c⁺CD8^{α-}) que es el que se presenta en mayor proporción y que está integrado por CD4⁻CD8^{α-} y CD4⁺CD8^{α-} (Villadangos y Schnorrer, 2007; Steinman y Banchereau, 2007; Liu y Nussenzweig, 2010). En ratón, estos dos subsets se ubican en distintos lugares del bazo, mientras que las CD4⁺CD8^{α+} se ubican en el área paracortical T, las CD4⁻CD8^{α-} se localizan principalmente en la zona marginal; con lo cual estas poblaciones se encuentran expuestas a diferentes microambientes con distintas células y citoquinas. Estas células tienen diferentes funciones inmunes. Las CD4⁺ no producen citoquinas, pero presentan antígenos eficientemente

a los LT CD4+ (Liu y Nussenzweig, 2010). Las CD CD8 α + realizan presentación cruzada a LT CD8+ y son las mayores productoras de IL-12 y estimular a los LT CD8+ citotóxicas antivirales, mientras que las CDc CD8 α -CD4- producen IFN- γ (Belz y col., 2002; León y col., 2004; Fujimoto y col., 2003; O'Connell y col., 2003; Dalod y col., 2002).

Por el contrario, las CDs plasmacitoides se caracterizan por presentar en superficie las moléculas CD11c y B220; y tienen una importante función en el desarrollo de la respuesta inmune innata. Se encuentran en todos los órganos linfoides y se caracterizan por su potencial para producir grandes cantidades de interferones (IFNs) de tipo 1 al reconocer antígenos virales a través de los receptores TLR3 (Asselin-Paturel y col., 2001). Además, se ha propuesto que estas células estarían involucradas en el mantenimiento de la tolerancia T mediante la inducción de la diferenciación de células T regulatorias (Martin y col., 2002), las cuales inhiben la activación de las células B y T vírgenes y también la propia actividad de las CDs convencionales, a través de un mecanismo dependiente de IL-10 (Bilsborough y col., 2003).

Por otra parte, la producción de IFN tipo I por las CDsp puede ser importante para promover la maduración de las CDs mieloides (Barchet y col., 2005; Kadowaki y col., 2000).

3.2- Captación del antígeno y maduración de las células dendríticas

Las células dendríticas (CDs), en su estado inmaduro, se encuentran distribuidas en la mayoría de los tejidos periféricos, principalmente en la piel y en las mucosas, donde constantemente sensan la presencia de antígenos a través de la emisión de sus dendritas. Estas células se caracterizan por su alta capacidad endocítica, la que les permite internalizar antígenos presentes en el medio. Los mecanismos de reconocimiento e internalización de antígenos utilizados por las CDs comprenden la fagocitosis, la macropinocitosis y la endocitosis mediada por receptores. En este último mecanismo, intervienen: los receptores para el Fc de

los anticuerpos, los receptores del complemento, receptores para proteínas de choque térmico, receptores scavenger y receptores de la familia de lectinas tipo C. A pesar de la alta capacidad endocítica de las CDs inmaduras, su capacidad de procesar y presentar antígenos es pequeña. Fenotípicamente, estas células se caracterizan por la baja expresión en la superficie celular de las moléculas CD80, CD86, CD40 y CMH de clase II (Sallustro y col., 1995). Sin embargo, poseen altos niveles de moléculas del CMH de clase II en localización intracelular (Mellman y Steinman, 2001).

Muchos estímulos, al interactuar con las CDs inmaduras, inducen en ellas una serie de cambios fisiológicos, que en conjunto, se denominan maduración. Los estímulos que inducen la maduración de las CDs son de diferente naturaleza.

- Compuestos microbianos: Muchos componentes de los microorganismos actúan sobre diferentes TLRs para inducir maduración. Por ejemplo ARN viral doble cadena reconocido por TLR3, ADN viral o bacteriano con motivos CpG reconocidos por TLR9, así como ARN viral de simple cadena reconocido por TLR7, son estímulos para la maduración.
- Algunas citoquinas como TNF- α , IL-1 e interferones de tipo I también inducen maduración.
- La señalización por CD40, luego de la interacción con CD40L presente en linfocitos T activados (Caux y col., 1994; Cellay col., 1997) induce maduración a la vez que los linfocitos T reconocen su antígeno específico en la superficie de las CDs
- Señales liberadas por células en condiciones de estrés, que serían reconocidas por las CDs a través de TLRs (Vabulas y col., 2002) o de CD40 (Becker y col., 2002) también inducen maduración de las CDs.

Como resultado del proceso de maduración, las CDs aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 y las moléculas CMH de clase I y II, hecho que las vuelve excelentes presentadoras del antígeno específico a los linfocitos T vírgenes. Asimismo, coordinadamente se produce una serie de cambios en el citoesqueleto, en la expresión de integrinas y en la expresión de

receptores de quimioquinas, que inducen la migración de las células hacia los órganos linfáticos secundarios (Randolph y col., 2005).

En los órganos linfáticos secundarios es donde se produce la presentación de antígenos, comenzando de esta forma el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, una de las funciones centrales de las CD es la de actuar como nexo entre los tejidos periféricos y los órganos linfáticos secundarios, mediante el transporte de antígeno. Sin embargo, otro componente importante de dicha conexión consiste en la capacidad de las CD de recibir y transmitir información sobre la naturaleza del patógeno y del estado en que se encuentran los tejidos infectados (Paul, 2003). Estas características, les permiten a las CD, no sólo iniciar una respuesta inmune adaptativa, sino que además posibilitan que estas células modulen el tipo de respuesta inducida (Guermonprez y col., 2002).

3.3- Procesamiento y presentación antigénica

Los antígenos que fueron captados por las CD o aquellos que se liberarán al citoplasma, deben ser convertidos en péptidos pequeños y luego ser presentados en la superficie celular en el contexto de las CMH. Estos péptidos servirán como ligandos del receptor de reconocimiento antigénico del linfocito T (TCR), los cuales serán activados con la ayuda de las moléculas co-estimuladoras (CD86 o CD40). Las moléculas del CMH de clase I interactúan mayormente con péptidos propios del citosol o con péptidos virales generados por la vía citoplasmática, mientras que las del CMH de clase II se asocian principalmente con péptidos originados por la vía endocítica, derivados de antígenos exógenos (Mellman y Steinman, 2001). Las moléculas del CMH de clase I se expresan en todas las células del organismo, mientras que las del CMH de clase II se encuentran restringidas a las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, incluyendo a los linfocitos B, las CD y los macrófagos (Hiltbold y Roche, 2002).

3.4- Modulación de la respuesta inmune adaptativa por células dendríticas

La activación de los linfocitos T vírgenes y su posterior diferenciación en células T efectoras y T de memoria, dependen de 2 señales. La 1° involucra la interacción entre el receptor T del linfocito T (TCR) con el péptido antigénico asociado al CMH de la CDs. La 2° señal está dada por la interacción de las moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de ambas células; CD28 en las células T y CD80/CD86 en las CDs (Keir y Sharpe, 2005). La presencia de ambas señales conduce a la activación de la respuesta inmune adaptativa, lo que se refleja en la inducción de la expansión clonal de los linfocitos T vírgenes y en consecuente diferenciación en células efectoras y de memoria (Kearney y col., 1994). La presencia de una 3° señal fue recientemente propuesta, que se refiere a aquellos “ligandos” liberados por las CDs que determinan la orientación del perfil de la respuesta inmune adaptativa. Habiéndose demostrado que es el patrón de citoquinas producido básicamente por las CDs quien determina el perfil de diferenciación de las células T CD4+ y por lo tanto, el perfil de la inmunidad adaptativa, surge un segundo interrogante crucial. ¿Qué es lo que determina el particular perfil de citoquinas producido por las CDs? Hoy sabemos que las CDs son las responsables de decodificar las propiedades del proceso infeccioso e instruir, en consecuencia, la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil apto para combatirlo. Esta decodificación involucra la participación decisiva de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) presentes en las CDs, los que involucran distintas familias de receptores: los receptores Toll (TLR), los receptores lectina-tipo C (CLR), los receptores RIG-1 (RIG-1 y MDA-5) y los receptores tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization domain, Nod-like receptor, NLR). Los RRP se activan al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o señales de estrés o daño celular (DAMPs) y será el particular set de RRP que se activa en las CDs inmaduras en respuesta al proceso infeccioso, el que determinará, prioritariamente, su perfil de producción de citoquinas y por ende, el curso de la inmunidad adaptativa (Kumar y col., 2011;

Kersse y col., 2011; Kawai y Akira, 2010). No obstante, otros estímulos sentidos por las CDs inmaduras en la periferia, diferentes a los PMAPs y DAMPs podrían también ejercer un papel modulador sobre el perfil de citoquinas producido por las CDs.

Mientras que, la activación de linfocitos T CD8⁺ conduce a su diferenciación en células citotóxicas la activación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes conduce a su diferenciación en 4 perfiles distintos: T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17) o células T regulatorias (Treg) inducibles (Kalinski y col., 1999; Curtsinger y col., 2003; Agrawal y col., 2010). Así, la IL-12 es un mediador que se libera como señal 3 y que promueve el desarrollo de respuestas efectoras Th1 o CTLs (Trinchieri, 2003), mientras que los ligandos Notch lo serían para las células Th2 (Tu y col., 2005). Las citoquinas pro inflamatorias IL-6, TGF- β parecen determinar la diferenciación de efectores Th17 al menos en ratones, mientras que el TGF- β y la IL-2 inducen células T regulatorias inducibles (Tregi) (Naldi y col., 2010)

En los ratones se propusieron varios mecanismos para explicar la habilidad de las CDs para activar la respuesta adaptativa. En primer lugar, diferentes tipos de CDs pueden inducir respuestas diferenciales. En este sentido, se demostró que las CDs linfoides por la (CD8 α +), al ser inoculadas por vía subcutánea, inducen la polarización de los linfocitos T hacia un perfil Th1. Por el contrario, las CDs mieloides que no expresan la molécula CD8 α -, inducen una respuesta con un perfil Th2 (Maldonado-Lopez et al 1999). La polarización de la respuesta inducida por distintos grupos de CDs estaría relacionada con el perfil de citoquinas secretadas predominantemente por las mismas. La inducción de respuestas Th1 por CDs CD8 α + se debe a la habilidad de este grupo de secretar IL-12, mientras que la menor producción de IL-12 por el grupo CD8 α - explicaría el desarrollo de respuestas Th2 por estas (Maldonado-Lopez y col., 1999; Liu y col., 2001). Sin embargo, la polarización de la respuesta inducida por cada uno de estos subgrupos de CDs es, a su vez, influenciada y modificada por señales

provenientes de otras células, así como por señales provenientes del antígeno (Liu y col., 2001). A modo de ejemplo, el estado de levadura de *Candida albicans*, cuando es incubado con CDs, induce la secreción de IL-12 y el desarrollo de respuestas Th1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, en el estado de hifa, induce la secreción de IL-4 por linfocitos T (d'Ostiani y col., 2000). Por último, señales específicas de los tejidos donde residen las CDs también podrían participar en la diferenciación fenotípica de las mismas y por lo tanto, en el tipo de respuesta que inducen. Mientras que CDs CD11c aisladas de placas de Peyer o de pulmón producen IL-4 e IL-10, y por lo tanto, inducen preferentemente una respuesta Th2, CDs CD11c+ aisladas de bazo induce preferentemente una respuesta Th1 (Iwasaki y Kelsall, 1999; Stumbles, 1999). Las diferencias funcionales entre los diferentes tejidos podrían resultar de diferencias en el ambiente de citoquinas así como del linaje de las CDs de cada tejido (Liu y col., 2001).

3.5- Inducción de tolerancia y de linfocitos T reguladores por células dendríticas

Como ha sido mencionado anteriormente, la activación de las CDs induce su migración por vasos linfáticos desde los tejidos hacia los órganos linfáticos secundarios. Sin embargo, las CDs también pueden migrar en un estado inmaduro. La ausencia de señales co-estimuladoras en estos casos induce tolerancia periférica al provocar un estado de falta de respuesta en los linfocitos estimulados (Hawiger y col., 2001; Bonifaz y col., 2002). Por ejemplo, ha sido demostrado que la internalización de cuerpos apoptóticos no induce maduración de las CDs. Sin embargo, aumentan la expresión de CCR7 (receptor de quimioquinas que induce la migración a las zonas T de los órganos linfáticos secundarios). Por lo tanto, este mecanismo permitiría la inducción de tolerancia contra antígenos propios provenientes de células que mueren por muerte programada (Bonifaz y col., 2002; Verbovetski y col., 2002). Otro mecanismo por

el que las CD_s inmaduras contribuyen al estado de tolerancia es mediante la inducción de linfocitos T regulatorios. La estimulación de linfocitos T CD₄⁺ con CD_s alogeneicas inmaduras induce producción de IL-10 y disminución de la proliferación de los linfocitos (Jonuleit y col., 2000). Por lo tanto, ha sido propuesto que en condiciones fisiológicas, las CD_s inmaduras constantemente inducirían tolerancia contra antígenos propios. Por el contrario, luego de una infección que induce maduración, si bien las CD_s presentarán a los linfocitos T antígenos microbianos, así como antígenos propios, el sistema inmune solo responderá contra los antígenos del microbio ya que los clones que reconocen proteínas propias han sido previamente silenciados o eliminados (Steinman, 2003).

Además de inducir un estado de tolerancia contra antígenos propios, las CD_s inmaduras cumplen un importante papel en la inducción de linfocitos T regulatorios 1 (Tr1) que pueden ser generados y expandidos en la periferia a partir de precursores CD₄⁺ CD₂₅⁻ Foxp₃⁻ convirtiéndose en células CD₄⁺ CD₂₅⁺ Foxp₃⁺. Las funciones de estas células es inhibir la diferenciación y/o la función de las células T efectoras productoras de IL-10, contra antígenos microbianos. La inducción de linfocitos Tr1 ha sido descrita luego de infecciones bacterianas, virales y parasitarias, tales como las causadas por *Bordetella pertussis*, HCV y *Onchocerca volvulus* (McGuirk y col., 2002; MacDonald y col., 2002; Satoguina y col., 2002). La regulación ejercida por linfocitos Tr1 está mediada por la secreción de IL-10, y en algunos casos también de TGF- β . Estas citoquinas, al actuar sobre las CD_s, disminuyen la expresión de las moléculas del CMH así como la de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. Asimismo, IL-10 disminuye la secreción de IL-12 y de TNF- α (Moore y col., 2001). Por lo tanto, durante el desarrollo de las respuestas contra estos patógenos, la inducción de la respuesta efectora T se encuentra inhibida. La función ejercida por los linfocitos Tr1 sería importante porque controlan el daño inmunopatológico al que se ven sometidos los tejidos del huésped durante el desarrollo de la respuesta inmune contra antígenos microbianos (Mills, 2004).

Asimismo, ha sido demostrado que en diversas infecciones virales, la inducción temprana de una respuesta inmunosupresora que se correlaciona con un marcado aumento en la frecuencia de las células T regulatorias (Treg) (CD4+CD25+Foxp3+) y las células T productoras de las citoquinas anti-inflamatorias; TGF- β e IL-10 (Estes y col., 2006), lo que indica que las células Treg conjuntamente con las citoquinas anti-inflamatorias, posiblemente, pueden contribuir a la persistencia viral al limitar tempranamente la respuesta inmune antiviral. Además, se demostró un rol de las células CD25+Foxp3+ sobre la anergia de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ frente a la estimulación con péptidos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) *in vitro* (Aandahl y col., 2004; Eggena y col., 2005; Wherry y col., 2006). El virus de la miocarditis aguda, muestra una incrementada expresión de las células Treg Foxp3+ esplénicas relacionado al aumento de las citoquinas (TGF- β , IL-6, IL-10). Además, los linfocitos T CD4+, CD8+ así como la relación CD4/CD8 estaban completamente disminuidos en los ratones infectados. Esta activación temprana y sostenida de células T regulatorias capaces de inhibir la respuesta anti viral CD4 y CD8, permitiría el establecimiento de la infección a largo plazo, que estas células pueden contribuir con la persistencia del virus en forma prematura al limitar la respuesta inmune antiviral.

4- Interacción entre células dendríticas y virus

4.1- Reconocimiento de la infección y respuesta innata mediada por CDs

Virus pertenecientes a distintas familias pueden infectar CDs, induciendo importantes modificaciones en su funcionalidad, y por lo tanto, modulando el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Asimismo, debido a la constante evaluación del medioambiente tisular en que residen, y gracias a su dotación de RRP, las CDs pueden iniciar el desarrollo de respuestas contra virus que no las infectan directamente, sino que infectan otras células del tejido donde ellas residen.

En los casos de infección directa de las CDs, el ingreso de los virus en las mismas se produce habitualmente luego de la interacción con receptores específicos ubicados en la superficie de las células. Los receptores utilizados con este fin por varios virus, han sido identificados en las CDs. Por ejemplo, en CDs localizadas en la piel, el VIH interactúa con el receptor de lectinas de tipo C (Turville y col., 2002). En cambio, en otras poblaciones de CDs, este virus interactúa con la molécula DC-SIGN (Geijtenbeek y van Kooyk, 2003). Esta misma molécula actúa también como receptor en CDs de los virus del dengue (Tassaneetrithep y col., 2003) y del sarampión (de Witte y col., 2006). Por último, coronavirus murino infecta CDs mediante la interacción con el receptor murino para coronavirus, CEACAM1 (Turner y col., 2004).

Una vez producido el ingreso del virus a la CD, la infección puede proseguir a través de un curso productivo o abortivo. En el primer caso, nuevos viriones infecciosos son producidos, indicando que el ciclo de replicación viral se ha desarrollado en forma completa. Por el contrario, en la infección abortiva, el ciclo viral se interrumpe en algún paso previo al de la liberación de viriones por lo que no hay infección de otras células. Infecciones productivas de CDs han sido reportadas para diversos virus, entre ellos el virus de la inmunodeficiencia humana (Pope y col., 1994; Granelli-Piperno y col., 1998), Sarampión (Server Delprat y col., 2000), Varicella (Morrow y col., 2003), el virus herpes simplex (Mikloska y col., 2001), influenza (Bender y col., 1998), parainfluenza (Plotnicky-Gilquin y col., 2001) y el virus vaccinia en CDs inmaduras (Engelmayer y col., 1999). Sin embargo, en muchos de estos casos, la replicación viral ocurre a una tasa controlada, menor a la observada en otras células susceptibles. Este hecho ha sido vinculado al efecto de los interferones de tipo 1 secretados por la misma CD (Ludewig y col., 2000; Ghanekar y col., 1996; Cella y col., 1999). Las infecciones no productivas han sido descritas para el virus papiloma humano (Matthews y col., 2003), herpesvirus humano tipo-8 (Larcher y col., 2005), circovirus porcino (Vincent y col., 2003) y el virus vaccinia en CDs maduras (Engelmayer y col., 1999). Durante el desarrollo de las infecciones, tanto los ácidos nucleicos virales y las glicoproteínas presentes en algunos virus, así como las señales liberadas por

las células infectadas, pueden ser reconocidos por los RRP's expresados por las CD's. Es interesante remarcar que las CD's mieloides y las CD's plasmacitoides expresan diferentes grupos de TLR's, lo cual determina que estas células responden diferencialmente a distintas moléculas generadas durante el proceso infeccioso.

La señalización por los TLR's produce como resultado la secreción de interferones de tipo 1, así como el comienzo de la maduración de las CD's (Doyle y col., 2002; Yamamoto y col., 2002). Sin embargo, existen mecanismos virales capaces de interferir con la señalización a través de los mismos (Diebold y col., 2003). Por lo tanto, mientras que algunos compuestos virales purificados pueden inducir activación y maduración de las CD's por la señalización a través de un TLR determinado, el resultado de la infección con el virus puede ser diferente al de sus componentes aislados. A modo de ejemplo, mientras que ARN doble cadena viral purificado puede estimular la producción de IFN- α en CD's no plasmacitoides, luego de la infección con influenza estas células secretan muy bajos niveles de interferón, a pesar de que la replicación viral procede normalmente. Ha sido demostrado, que la proteína NS1 del virus secuestra al ARN en el citoplasma, y por lo tanto evita el reconocimiento de éste por los RRP's presentes en las células. Por el contrario, la infección con un virus influenza al que genéticamente se le eliminó la proteína NS1 del genoma, induce altos niveles de interferón (Diebold y col., 2003).

La producción de interferones de tipo 1 por las células plasmacitoides supera considerablemente a la de las células mieloides. En efecto, las CD's plasmacitoides son las principales responsables de las respuestas de interferón sistémicas luego de las infecciones virales (Colonna y col., 2002). Además de secretar altas cantidades de IFNs de tipo 1, el espectro de los genes de interferón expresados en éstas células es más amplio que en las CD's convencionales (Izaguirre y col., 2003).

Otra función de las CD's consiste en el reclutamiento de otras células efectoras de la inmunidad innata a los tejidos infectados. Las CD's inmaduras, cuando son expuestas a un estímulo maduratorio, secretan quimioquinas

proinflamatorias, como resultado de los cual se produciría el reclutamiento de macrófagos, granulocitos y linfocitos T (Sallusto y Lanzavecchia, 1999). Asimismo, a través del reclutamiento mediado por quimioquinas, la activación mediada por citoquinas y la activación dependiente del contacto célula-célula, las CD8 infectadas cumplen un importante papel en la rápida activación de células NK (Gerosa y col., 2002; Ferlazzo y col., 2002).

4.2- Respuesta inmune adaptativa contra virus. Inicio y modulación de la funcionalidad de las CD8 por infecciones virales.

La inducción de una respuesta inmune adaptativa contra los virus es otra de las funciones centrales de las CD8. Evolutivamente, los virus han desarrollado gran cantidad de mecanismos para modular la funcionalidad de las CD8, y de esta forma interferir en el tipo de respuesta a desarrollarse.

La infección viral de CD8 resulta, en algunas situaciones, en un aumento de su capacidad para estimular la diferenciación de linfocitos T efectoras. Por ejemplo, luego de la infección con hantavirus, se observa un aumento en la expresión de las moléculas del CMH, así como un aumento en la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. La infección de CD8 con influenza también puede, en algunas condiciones, producir maduración de las CD8. En este sentido, la infección de CD8 con bajas dosis de influenza aumenta la capacidad estimuladora de las mismas, e induce una respuesta de perfil Th1 por los linfocitos estimulados. Sin embargo, la infección con altas dosis produce resultados opuestos. En este último caso, la capacidad de las CD8 infectadas de estimular respuestas alorreactivas disminuye. Asimismo, el perfil de respuesta inducido también se modifica, polarizándose en este caso hacia un perfil Th2 con secreción de IL-4 e IL-10.

A excepción de los dos ejemplos citados en el párrafo precedente (hantavirus e influenza), el resto de las infecciones virales estudiadas conduce a una

disminución en la capacidad de las CD8 para activar linfocitos T (Pollara y col., 2005). Los mecanismos involucrados en producir dicho efecto son variados:

- En primer lugar, se puede citar la **disminución de la expresión de moléculas presentadoras y co-estimuladoras en la superficie de las CD8 infectadas**, así como de la secreción de citoquinas con actividad pro-inflamatoria. Estos efectos han sido descritos en las infecciones con herpes simplex tipo 1 (Salio y col., 1999), citomegalovirus humano (Moutaftsi y col., 2002), ebola (Mahanty y col., 2003), virus de la fiebre de lassa (Mahanty et al., 2003), hepatitis C (Kanto y col., 1999) y vaccinia (Engelmayer y col., 1999). Asimismo, CD8 de pacientes en etapa aguda de la infección con HIV también tienen disminuida la expresión de CD80 y CD86 (Lore y col., 2002).

- Otro mecanismo que ha sido involucrado en la interferencia con la capacidad de CD8 infectadas para estimular linfocitos T efectores, consiste en la **expresión en la superficie de las CD8 de proteínas virales que impiden su interacción con linfocitos T**. Por ejemplo, durante la infección con el virus del sarampión, la expresión de las glicoproteínas H y F en la superficie de las CD8 inhibe la activación de los linfocitos T, a través de un mecanismo que requiere contacto célula-célula (Dubois y col., 2001).

- Otros virus, luego de infectar CD8, **modulan el perfil de la respuesta inducida por las CD8**. En muchos casos, los virus interfieren con la producción temprana de IL-12 por parte de CD8, y por lo tanto, con la capacidad de inducir una respuesta Th1 protectora. Por ejemplo, HSV-1 o HCMV inhiben específicamente la secreción de IL-12, mientras que la secreción de otras citoquinas, tales como IFN- α o TNF- α permanece inalterada (Salio y col., 1999; Moutaftsi y col., 2002). La infección de CD8 con RSV también impide el desarrollo de linfocitos Th1 productores de IFN- γ en cocultivos. Sin embargo, en este caso el efecto no es exclusivo sobre IL-12, sino que además está acompañado de la inhibición de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Bartz y col., 2003). Por otro lado, infecciones virales pueden alterar el perfil de citoquinas y el tipo de respuesta mediante la inducción de citoquinas supresoras o anti inflamatorias. A modo de ejemplo, la infección de CD8 con HIV o HCV induce linfocitos T

reguladores, los cuales interfieren con la generación de una respuesta T contra el virus (Granelli-Piperno y col., 2004; MacDonald, 2002).

- La **inducción de apoptosis en las CDs infectadas**, es otra forma de impedir la activación de linfocitos T. Los virus vaccinia, herpes simplex tipo 1, RSV y el virus de influenza inducen apoptosis de CDs infectadas (Engelmayer y col., 1999; Pollara y col., 2003; Bartz y col., 2003; Cella y col., 1999).

- Por último, otros virus, a pesar de no alterar la expresión de las moléculas presentadoras o co-estimuladoras, ni de inducir citoquinas anti-inflamatorias, **inducen depresión de la funcionalidad de las CDs por mecanismos aun no dilucidados**. Tal es el caso de la infección de CDs con el virus de parainfluenza (Plotnicky-Gilquin y col., 2001)

4.3- Estimulación de linfocitos B y de la secreción de anticuerpos anti-virales por CDs

La estimulación de linfocitos B y la inducción de anticuerpos antivirales específicos es otra función de las CDs que reviste gran importancia en el control de las infecciones. En este sentido, ha sido demostrado que las CDs, luego de su interacción en forma directa con los linfocitos B, pueden inducir el cambio de isotipo, diferenciación a células plasmáticas y secreción de anticuerpos (Fayette y col., 1998). La estimulación de linfocitos B por CDs da como resultado la producción de anticuerpos, tanto contra antígenos timo-dependientes, como contra antígenos timo-independientes (Wykes y col., 1998; Dubois y col., 1999; Colino y col., 2002; Balazs y col., 2002). Asimismo, las CDs han sido involucradas en la rápida inducción de anticuerpos neutralizantes contra virus citopáticos. Por ejemplo, luego de la infección con VSV, las CDs transportan y liberan virus en los órganos linfáticos secundarios, permitiendo la inducción de linfocitos B y la producción de IgM en forma timo-independiente (Ludewig y col., 2000). Asimismo, luego de la infección de las CDs plasmacitoides con el virus de la influenza, estas células promueven la diferenciación de los linfocitos B activados por CD40, hacia

células plasmáticas productoras de anticuerpos. La estimulación depende de la secreción por parte de las CDsp de IFN- α e IL-6, las cuales actúan secuencialmente. El IFN- α induce la diferenciación a plasmablastos no secretores. Subsecuentemente, la IL-6 induce la diferenciación a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, facilitando de esta manera la producción de anticuerpos antivirales (Jego y col., 2003).

5- Respuesta inmune contra VFA

5.1- Respuesta inmune en los hospedadores naturales

El conocimiento que se tiene de la respuesta inmune contra VFA en los hospedadores naturales es limitado, debido a la imposibilidad de trabajar con animales endocriados, la falta de reactivos específicos para realizar mediciones *in vitro* y el elevado costo de trabajar con animales de mediano o gran porte, como lo son los cerdos y los bovinos.

Sin embargo, ha podido determinarse que a partir del tercer día post infección de rumiantes o cerdos, comienzan a detectarse en el suero anticuerpos seroneutralizantes. Estos eliminan el virus de la circulación y además otorgan protección contra la re-infección con virus del mismo serotipo (Bautista y col., 2003). En bovinos, luego de la producción inicial de IgM, se produce el cambio a IgG, observándose generalmente que la concentración de IgG1 es mayor que la de IgG2 (Saiz y col., 2002, Mulcahy y col., 1990). La rápida cinética de producción de anticuerpos seroneutralizantes al comienzo de la infección transcurriría en un contexto de falta de colaboración T, ya que la proliferación restringida por moléculas del CMH de clase II recién es detectable a los 14 dpi (Childerstone y col., 1999).

Al igual que los LT colaboradores, los linfocitos T CD8+ también son inducidos a partir del día 14 post infección de bovinos con VFA (Childerstone y col., 1999). Por lo tanto, si bien durante el desarrollo de la respuesta inmune

contra VFA se inducen LT citotóxicos, los mismos no participan en el control inicial de la infección. Más aún, la expresión de moléculas del CMH de clase I en la superficie de células susceptibles disminuye rápidamente luego de la infección (Garcia-Valcarcel y col., 1996). Esta disminución en la expresión de moléculas del CMH de clase I podría estar mediada por la interferencia del virus en el proceso de ensamblaje del péptido con las moléculas del CMH (Garcia-Valcarcel y col. 1996). Asimismo, la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas celulares que se produce como consecuencia de la infección con el virus, también podría explicar la menor expresión de esta molécula presentadora en la superficie celular. Independientemente del mecanismo utilizado, tanto la inducción como la actividad efectora de los LT citotóxicos estarían impedidas durante la etapa temprana de la infección con VFA (Sanz-Parra y col., 1998), reforzando la observación de que el control inicial de la infección es llevado a cabo principalmente por anticuerpos seroneutralizantes. Recientemente ha sido publicado un trabajo con bovinos a los cuales se les realizó una depleción parcial de las células T CD8+, lo cual no afectó la resolución de la infección aguda por VFA (Juleff y col., 2009).

En porcinos, durante los primeros 4 dpi, se produce una marcada pero transiente linfopenia, donde los distintos subtipos de células T como de células B son afectados, una importante inhibición de la funcionalidad de los LT, medida por estimulación con Concanavalina-A. Sin embargo, al igual que en los bovinos, la viremia en estos animales tiene una duración de 2-3 días. Por lo tanto, tampoco en este caso la colaboración T sería necesaria para inducir una respuesta protectora contra VFA. Más aún, esta depresión de la funcionalidad T es simultánea con la inducción de anticuerpos seroneutralizantes específicos (Chinsangaram y col., 2003; Eble y col., 2004; Bautista y col., 2003; Diaz-San Segundo y col., 2006).

Esta ampliamente reportado que los IFNs estimulan un estado antiviral en las células blanco de numerosos virus. En estas células la replicación viral se bloquea o impide debido a la síntesis de enzimas que interfieren con procesos tanto celulares como virales. En el caso de la FA la producción de IFNs de tipo I (IFN α y β) constituye un mecanismo de suma importancia para el rápido control del virus en los primeros momentos luego de la infección. A través de

experimentos realizados *in vitro*, se demostró que la infección con VFA de células susceptibles puede ser inhibida si éstas son preincubadas con interferón recombinante porcino o bovino (Chinsangaram y col., 2001). La importancia del interferón en el control inicial del VFA ha sido también demostrada *in vivo*. La inoculación de cerdos con un adenovirus recombinante que expresa IFN- α porcino indujo protección contra la infección con VFA en menos de 24 hs luego de la inoculación (Chinsangaram y col., 2003).

La producción de IFNs de tipo 1, también ha sido estudiada en CDs de cerdo aisladas de la piel. La expresión constitutiva de IFN- α en estas células es responsable de la resistencia de las mismas a la infección con el virus. Además, luego de la infección *in vitro* de las CDs, se estimula la secreción de IFN- β . Por el contrario, células pulsadas con virus inactivado no aumentan la producción de estas citoquinas, indicando que la forma replicativa del ARN de doble cadena es necesaria para inducir la secreción de IFN (Bautista y col., 2005).

Recientemente se ha demostrado en CDs plasmacitoides de cerdo, que la secreción de IFN- α no solo depende de que el VFA se encuentre activo sino que además debe estar opsonizado por anticuerpos IgG. Los anticuerpos posibilitan la entrada del VFA opsonizado a las CDs plasmacitoides a través del receptor Fc γ RII (CD32), allí se produce un ciclo de replicación abortivo del virus que se asocia con una alta producción de IFN- α . De esta forma se podría explicar porque animales con niveles de anticuerpos específicos muy bajos, pueden resultar protegidos a corto plazo luego de la vacunación. La función de las CDs plasmacitoides sería retardar la infección viral hasta que los niveles de anticuerpos sean más efectivos y puedan promover respuestas inmunes protectoras (Guzylack-Piriou y col., 2006).

5.2- Respuesta inmune en el modelo murino contra VFA

A pesar que el ratón adulto no es susceptible a la infección natural con el VFA, ha sido y continúa siendo utilizado como modelo para este virus en numerosos trabajos.

Si bien las diferencias que existen entre los ratones y los hospedadores naturales, en cuanto a forma de infección y curso de la enfermedad, son numerosas, se han podido establecer paralelismos entre el modelo murino y los bovinos (Borca y col., 1986 y 1993; Fernandez y col., 1986; Garmendia y col., 1989; Lopez y col., 1990; Dus Santos y col., 2000; Quattrocchi, 2008; Juleff y col., 2009) como así también entre murinos y cerdos (Chinsangaram y col., 2003; Eble y col., 2004; Song y col., 2005).

La infección es posible en cepas CH3, Swiss, BALB/c y nude si el virus se inocula por vía i.p. (Fernández y col., 1986; Collen y col., 1989) y está muy bien caracterizada. Esta comprende una importante replicación viral en el páncreas mientras que la enfermedad cursa de forma subclínica. Durante las primeras 48-72 hs de la infección, se produce una viremia de alto título ($\sim 10^5$ - 10^6 DLRL₅₀/ml), la cual es rápidamente controlada por anticuerpos neutralizantes (Fernandez y col., 1986). Ante la imposibilidad de producir anticuerpos neutralizantes, como sucede luego del tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida, los ratones infectados con VFA presentan una viremia persistente, indicando el papel central desempeñado por el sistema inmune adaptativo en el control de esta infección (Borca y col., 1986). Una vez superada la fase aguda de la infección, los títulos séricos de anticuerpos seroneutralizantes se mantienen elevados por largos períodos de tiempo (López y col., 1990).

Hay trabajos que indican que la importancia de los anticuerpos podría residir más en su capacidad opsonizante que en la neutralizante. Experimentos realizados *in vivo* en el modelo de ratón lactante demostraron que era posible obtener protección inoculando anticuerpos monoclonales de moderado título neutralizante previamente al desafío viral y que era la opsonización de los viriones lo que correlacionaba con la protección más que la neutralización de la infectividad (Mc Cullogh y col., 1986). La seroprotección resultaba efectiva solo si se mantenían intactas tanto las porciones Fc de los anticuerpos como las funciones de fagocitosis de los ratones inoculados. En este sentido los autores discuten que es probable que la protección observada en este modelo, requiera que los

anticuerpos opsonicen los viriones para que luego los complejos virus-anticuerpo sean fagocitados.

Más tarde este mismo grupo de trabajo (Mc Culloch y col., 1988), corroboró, utilizando células peritoneales murinas, que la fagocitosis del VFA opsonizado por parte de células con FcR, como son los monocitos y macrófagos, constituye la defensa inmune efectora más importante en el modelo utilizado. Esto también fue observado por nuestro grupo (Quattrocchi y col., 2011) al evaluar una vacuna de emergencia.

Contrariamente a lo que sucede cuando los ratones se infectan con el VFA infeccioso, la duración de la inmunidad luego de la vacunación con VFA inactivado depende de la dosis de antígeno utilizada y de la formulación de la vacuna. La inmunización con 0.1 µg de VFA en PBS induce una respuesta neutralizante protectora pero de corta duración, en la que los títulos de anticuerpos seroneutralizantes comienzan a disminuir a partir de los 60 dpv. En efecto, luego de transcurridos tres meses desde el momento de la vacunación, el nivel de anticuerpos en el suero de estos animales ya no es suficiente para controlar la viremia, y los ratones vuelven a ser susceptibles a la infección. Sin embargo, si la inmunización se realiza con 10 µg de VFA en PBS o con 0.1 µg de VFA en una emulsión agua en aceite, se induce una respuesta de duración prolongada (López y col., 1990; Piatti y col., 1991). Las respuestas contra VFA infeccioso o inactivado no solo presentan diferencias en la duración de la inmunidad generada, sino que además difieren en la dependencia de colaboración de LT para inducir la producción de anticuerpos. Mientras que el virus infeccioso se comporta como un antígeno TI, el virus inactivado inoculado a bajas dosis se comporta como un típico antígeno TD, requiriendo de colaboración T para inducir anticuerpos (Piatti y col., 1991). En experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos a ratones receptores vírgenes irradiados y luego infectados, se observó que la transferencia de LB provenientes de dadores infectados 8 días antes, rápidamente generaba una respuesta neutralizante. Por el contrario, la transferencia de LB provenientes de dadores vacunados con 0.1 µg de VFA era incapaz de generar una respuesta de anticuerpos seroneutralizantes. En cambio, si conjuntamente con los LB

provenientes de animales inmunizados se transferían LT, la respuesta era inducida. De modo que el mecanismo de eliminación del virus continuaba siendo mediado por LB, ya que la transferencia exclusiva de LT no transfería inmunidad. Por lo tanto, cuando se realiza la inmunización con virus inactivado, la inducción de una respuesta de anticuerpos seroneutralizantes requiere colaboración T. Por el contrario, la respuesta generada luego de la infección, no precisa de LT para ser inducida (Piatti y col., 1991).

Las diferencias cualitativas en el tipo de respuesta inducida por el virus infeccioso e inactivado también pueden ser evidenciadas por el perfil de isotipos que se produce en cada caso. En ratones infectados, a partir de los 7 dpi es posible detectar en suero, además de la IgM neutralizante producida ya desde el tercer dpi, a los isotipos IgG1 e IgG3. Desde el día 14, IgG2a e IgG2b también comienzan a ser producidos, siendo IgG1 e IgG2b los isotipos predominantes a partir de los 14 dpi. Por el contrario, en ratones vacunados con vacunas convencionales (hidróxido de aluminio o emulsión de agua en aceite) IgG1 e IgG2a son los sub-isotipos que predominan, acompañados de bajos niveles de IgG2b.

A pesar de que, como se indicó anteriormente, la producción temprana de anticuerpos anti-VFA puede ser inducida en ausencia de colaboración T, la misma resulta imprescindible para mantener altos títulos de anticuerpos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, si bien la respuesta inmune temprana en ratones atímicos es de magnitud similar a la de los controles eutímicos, a partir del décimo día post infección los títulos séricos de anticuerpos comienzan a descender en los ratones atímicos. Estas observaciones indican la imposibilidad de establecer memoria en ausencia de colaboración T. Asimismo, la duración de la persistencia de anticuerpos seroneutralizantes se asocia con la presencia de CPA capaces de presentar péptidos en moléculas del CMH de clase II (Wigdorovitz y col., 1997), confirmando la necesidad de colaboración T para mantener altos títulos de anticuerpos seroneutralizantes.

Recientemente ha sido demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las CDs juegan un rol fundamental en la respuesta inmune de los murinos hacia el VFA.

Ostrowski y colaboradores (2005) demostraron que estas células se infectan de forma abortiva con el VFA, lo que induce una diferenciación hacia un fenotipo macrofágico que resulta en una falla en el desarrollo de la respuesta TD durante la infección aguda. También se demostró que esta falla de las CDs en la estimulación de la respuesta T está asociada con la producción de IL-10. La inhibición de la respuesta T por IL-10 está caracterizada (de Waal Malefyt, 1998) y ha sido reportada en otras infecciones virales (Granelli-Piperno y col., 2004). Los autores discuten que la respuesta de anticuerpos contra el VFA infeccioso parece proceder en dos fases. En la fase temprana, durante la primer semana de infección, se desarrolla una producción rápida, TI, de anticuerpos seroneutralizantes los cuales son suficientes para eliminar el virus en aproximadamente 3 días. Seis días luego de la infección, se produce la segunda fase de la respuesta inmune que depende de colaboración T. Como resultado de esta segunda fase se produce la secreción de anticuerpos por largos periodos de tiempo, el cambio del isotipo de los anticuerpos y se establece la memoria inmunológica.

Por el contrario el VFA inactivado estimula a las CDs para producir una respuesta de anticuerpos de tipo TD.

En 2007, Ostrowsky y col., demostraron que la modulación de las CDs mediada por el VFA infeccioso, es clave para el desarrollo de la respuesta inmune temprana contra el virus, dado que son estas CDs infectadas las que estimulan a los LB de la ZM del bazo, para producir los anticuerpos de forma TI. También reportaron que el principal órgano donde tiene lugar esta producción de anticuerpos, es el bazo mientras que los nódulos linfáticos no participan de forma alguna.

El desarrollo de una enfermedad aguda y una infección clínicamente manifiesta producida por VFA en ratones, ha sido descrita en las cepas Swiss, BALB/c y C57/BL6 infectados experimentalmente con VFA de los serotipos C-S8c1 o SAT-1. La enfermedad se caracteriza clínicamente por apatía, pelo erizado, lomo encorvado y moderada pérdida de peso a las 24 hs post infección. Subsiguientemente se observa sintomatología neurológica, manifestada

principalmente por el desarrollo de ataxia del tren posterior. La muerte ocurre 48-72 hs más tarde (Salguero y col., 2005). Microscópicamente, se detectan importantes alteraciones en el estrato espinoso en la piel de la almohadilla plantar. En un primer momento se observa degeneración de este estrato de la epidermis, seguido luego de edema intercelular y formación de microvesículas, localizadas fundamentalmente cerca de la membrana basal. Estas lesiones, son características de la enfermedad causada por VFA en los hospedadores naturales.

Durante la fase aguda de la infección con este serotipo, se observa una importante linfopenia, así como eliminación de linfocitos en órganos linfoides. Tanto los LB como los TCD4+ y CD8+ están afectados, hecho que podría asociarse a un estado de inmunodepresión, tal como el que ha sido descrito en la etapa aguda de la infección con VFA en porcinos (Bautista y col., 2003). Los LB y T CD8+ provenientes de ratones infectados expresan proteínas no estructurales de VFA, lo cual indicaría replicación viral. Sin embargo, la expresión de estas proteínas no fue detectada en los LT CD4+, indicando que otro mecanismo no identificado estaría involucrado en la disminución de la cantidad de estos linfocitos en sangre y órganos linfoides de ratones infectados.

5.3- Interacción entre las células dendríticas y el Virus de la Fiebre Aftosa

La infección de CDs por el VFA y su posterior viabilidad son temas controversiales, ya que al parecer se vería afectado por el origen de las CDs utilizado. Por ejemplo, mientras Gregg y colaboradores (1995) detectaron un 10% de infección de CDs porcinas de piel *in vitro* y muerte celular; por otro lado Ridgen y col. (2002) reportaron infección detectada a través de la presencia de proteínas no estructurales del virus, pero no observaron muerte celular. Sin embargo, otro grupo no detecta infección viral en CDs de piel de porcinos (Bautista y col., 2005). En el caso de otro grupo de investigación (Nfon y col., 2008) no observaron infección ni *in vivo* ni *in vitro* utilizando CDs porcinas derivadas de monocitos, pero

si existe infección de sus células progenitoras CD172+ (Díaz-San Segundo y col., 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, la replicación del VFA en cultivo celular es inhibida por el IFN- α y la inoculación de esta citoquina en cerdos los protege de una posterior infección por VFA (Chinsangaram y col., 2003; Moraes y col., 2003). Sin embargo, la infección por VFA de animales susceptibles resulta en viremia entre 1 y 3 dpi, y una rápida aparición de los signos clínicos de la enfermedad sugirieron que el virus es capaz de bloquear o sobreponerse a la respuesta inicial de IFN- α producido posiblemente por las CDsp y/o quizás por otras células.

Bautista y colaboradores (2005) observaron *in vitro* que el VFA inducía en CDs porcinas una producción substancial de IFN tipo 1 cuando el virus era infectivo pero esto no ocurría al utilizar virus inactivado. Después de esta producción de IFN, las células no modificaron su capacidad de captar antígenos ni la expresión de moléculas de superficie, indicando que mantenían intactas sus funciones luego de la exposición al virus. En el caso de CDs porcinas de piel aisladas de animales infectados con VFA, estas células no secretan IFN tipo I hasta 42-50 dpi, a pesar de no estar infectadas ellas mismas, incrementando poco las moléculas de superficie CMH clase II y CD80/86 y la función de procesamiento antigénico (Nfon y col., 2008). En el caso de las CDs porcinas derivadas de monocitos se detecta producción de IFN- α al ser expuestas a distintas cepas de VFA (Nfon y col., 2008).

Estudios *in vitro* realizados por Guzylack-Piriou y colaboradores (2006) demostraron que las CDsp de cerdos no son susceptibles al VFA y no producen IFN- α luego de la exposición al VFA, indicando que el virus podría estar encontrando una oportunidad en la cual replicar y diseminarse. En paralelo, los autores muestran que al formarse complejos inmunes entre el VFA y sueros inmunes, el virus puede de esta manera infectar CDsp e iniciar una replicación abortiva la cual resulta en la producción de altos niveles de IFN- α . Guzylack-Piriou y colaboradores (2006) propusieron que en los estadios tempranos de la

respuesta adaptativa cuando los niveles de anticuerpos específicos-VFA son bajos para inducir protección, estos son suficientes para mediar la infección de CDsp con la subsecuente inducción y liberación de IFN- α requerida para la eliminación del virus.

Bautista y colaboradores (2005) estudiaron *in vitro* el efecto de la infección por VFA en CDs derivadas de piel de cerdos. Aunque el VFA fue capaz de unirse e internalizarse en las CDs de piel, no pudieron detectar replicación del ARN viral o de producción de proteínas virales o progenie viral. Más aún, la infección por VFA no tuvo efecto sobre la actividad fagocítica o la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de estas células. Pero aún así, la infección indujo a las CDs de piel a producir ARNm de IFN- β y secreción de IFN- β , y además las células secretaron IFN- α que se expresó constitutivamente. Aunque no se pudo detectar la infección productiva del VFA en estas CDs, los niveles mínimos de intermediarios de replicación del virus dentro de estas células podrían desencadenar una respuesta innata con la liberación de IFNs.

Sin embargo, la rápida progresión de la fiebre aftosa en el ganado porcino sugiere que o bien los niveles de IFN secretado por CDs de piel no son suficientes para desencadenar una respuesta antiviral en células vecinas sensibles del epitelio y/o títulos suficientemente altos de virus ya se han producido por la infección de las células epiteliales antes de la secreción de IFN- α/β por las CDs de piel.

El mismo grupo ha demostrado que el comportamiento de dos poblaciones de CDs es algo diferente cuando están aislados de los animales que han sido infectadas con VFA previamente (Nfon y col., 2008). CDs derivadas de piel y CDs derivadas de monocitos, aislados de cerdos infectados con VFA a 3 dpi, mostraron una reducción en la producción de IFN- α luego de la estimulación *ex vivo* con virus depletado de la porción que codifica para L^{pro} y/o poly(IC) sintético, aunque la infección por VFA no se detectó. Sin embargo, la capacidad de estas células para procesar antígenos no fue afectada, indicando que aunque la inmunidad innata no es capaz de detener la replicación viral, la inmunidad adaptativa puede ser estimulada y potencialmente eliminar el virus del organismo.

Por otro lado, al estudiar los niveles de IFN tipo I en sangre de cerdos infectados se detectaron altos niveles de esta citoquina. Mientras que las CDsp de sangre de estos cerdos infectados en forma aguda están depletados y las CDsp que quedan no producen IFN- α en respuesta a TLR o a VFA pero recuperan su habilidad a los 7 a 9 dpi (Nfon y col., 2010).

El único estudio realizado en bovinos, es en CDs derivadas de monocitos que muestra que son susceptibles en baja frecuencia al VFA pero se hacen significativamente susceptibles a la infección y son productivamente infectadas en presencia de VFA unido a anticuerpos neutralizantes. También muestran que la infección de CDs derivadas de monocitos por inmunocomplejos con VFA tienen consecuencias funcionales que pueden afectar adversamente el desarrollo de la respuesta inmune *in vivo* (Robinson y col., 2011).

Como mencionamos anteriormente, Ostrowski y col. (2005) demostraron que las CDs diferenciadas de médula ósea de ratón se infectan de forma abortiva con el VFA, lo que induce una diferenciación hacia un fenotipo macrófágico que resulta en una falla en el desarrollo de la respuesta TD durante la infección aguda. También se demostró que esta falla de las CDs en la estimulación de la respuesta T está asociada con una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras y con la producción de IL-10. Díaz-San Segundo (2009) también observó que monocitos porcinos (progenitores de CDs) infectados *in vitro* se diferenciaban a CDs que secretan mayores niveles de IL-10 en co-cultivos con LT, relacionando este fenómeno al aumento de IL-10 detectado en suero de cerdos infectados en comparación a animales naïve. Este resultado se encuentra en concordancia con lo observado en ratones por Ostrowski anteriormente.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La principal hipótesis de este trabajo de Tesis es:

La modulación de los subtipos de células dendríticas esplénicas difieren notoriamente en respuesta a la infección con el VFA o frente a la inoculación con la partícula inactivada.

Lo que podría explicar las bases inmunológicas que determinan que la respuesta inducida luego de la infección con el VFA presente una mayor rapidez, eficiencia y duración que la respuesta generada luego de la vacunación con el virus inactivado. Estos hallazgos permitirían contar con información que podría utilizarse en el diseño racional de vacunas anti-aftosa.

Con el objetivo de definir de qué manera el VFA afecta la cantidad y funcionalidad de los distintos subtipos de CDs localizadas en el bazo, así como los mecanismos involucrados en el desarrollo y posterior modulación de la respuesta inmune adaptativa, se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

- ◇ **Objetivo particular 1:** *La infección con el VFA determina alteraciones en la distribución tisular y fisiología de las CDs.*
- ◇ **Objetivo particular 2:** *Funcionalidad de las CDs inducidas como consecuencia de la vacunación o la infección con el VFA. Inducción de citoquinas. Capacidad de las CDs de activar la respuesta T.*
- ◇ **Objetivo particular 3:** *La infección con el VFA modula la producción de interferones del tipo I ($IFN\alpha/\beta$).*
- ◇ **Objetivo particular 4:** *La infección con el VFA modula diferencialmente las distintas poblaciones de linfocitos T*

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Ratones

Todos los experimentos fueron llevados a cabo utilizando ratones endocriados machos de la cepa BALB/c de la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) de 8-12 semanas. Los animales fueron mantenidos a $20 \pm 2^{\circ}$ C bajo un esquema automático de luz-oscuridad de 12 hs. El cuidado de los animales fue en concordancia a las reglas institucionales.

2- Medidas de bioseguridad

La manipulación de virus infeccioso para la realización de pruebas con ratones y de cualquier procedimiento que requiera la manipulación de muestras infecciosas fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el bioterio y en el laboratorio de Bioseguridad NSB 3A del SENASA o de INTA Castelar.

3- Líneas celulares

Para la amplificación del VFA y para los ensayos de titulación viral se utilizó la línea susceptible BHK-21 (fibroblastos provenientes de riñón de hámster neonato).

4- Virus

El VFA serotipo O1 Campos (O1C), gentilmente provisto por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agropecuaria (SENASA), fue utilizado en

los experimentos de esta tesis. Este virus proviene de vesículas de bovinos infectados con VFA y ha sido amplificado dos veces sobre la línea celular susceptible BHK-21.

El virus no infeccioso, inactivado con Bromo-etilamina (BEI), fue gentilmente cedido por la empresa Biogénesis-Bagó. Posteriormente, se clarificó por centrifugación a 10000 rpm durante 1 h a 4° C para utilizarlo como inmunógeno vacunal.

5- Infección e inmunización de los ratones

Los ratones fueron inoculados con 10^5 dosis infecciosas en cultivo celular 50% (DICT₅₀) de virus infeccioso (VFA) en buffer fosfato salino (PBS) o 3.5 µg de virus inactivado con BEI (correspondiente a 10^7 DICT₅₀) del virus inactivado (VFAi) en PBS, ambos de serotipo O1 Campos, por vía intraperitoneal (i.p.). El grupo de ratones control fueron inoculados con el sobrenadante de cultivo de las células BHK-21 sin infectar.

6- Desafío viral

Los ratones fueron desafiados con 0,5 ml de 10^5 DICT₅₀ de VFA por vía i.p. En este modelo la protección está definida por la presencia o ausencia de viremia (López y col., 1990; Piatti y col., 1991; Carrillo y col., 1998), considerándose protegidos a aquellos animales que 24 hs post-infección no presentan viremia. Para determinar la presencia del virus en los ratones, luego de 24 hs de infectados, los mismos fueron anestesiados y sangrados a blanco por vía retro-orbital. La sangre completa heparinizada de cada animal fue diluida en una proporción de 1:1 en medio esencial mínimo Dulbecco modificado (MEM-D) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB). Luego, la dilución fue sembrada por duplicado sobre monocapas de células BHK-21 crecidas en placas

de 96 pocillos. Al cabo de 40 min en estufa de 37° C y 5 % CO₂, las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS y se adicionó MEM-D con 2 % SFB. Las células se mantuvieron en estufa de 37° C y 5 % CO₂ por 48 hs. Al finalizar el tiempo de incubación, se procedió a la lectura del efecto citopático. Se consideró al animal no protegido si al menos uno de los duplicados poseía efecto citopático. Se consideró al animal protegido, si luego de un pasaje ciego la muestra no presentaba efecto citopático.

7- ELISA para detección de inmunoglobulinas totales específicas contra VFA en sueros

La determinación de las inmunoglobulinas murinas (Igs) totales contra el VFA se determinó por la técnica de ELISA. Para lo cual, las placas se pegaron con suero anti-VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante 18 hs a 4°C. Luego se lavaron con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% (PBST) y se bloquearon con 1% de OVA (buffer de bloqueo) por 30 min a temperatura ambiente (TA). Las muestras de sueros de los ratones fueron diluidas seriadamente en buffer de bloqueo y luego se adicionó una cantidad fija de VFA inactivado. Luego de la incubación por 1 h a 37°C en agitación, las mezclas de virus-suero se transfirieron a las placas bloqueadas e incubadas por 1 h a TA. Al cabo de este tiempo, se lavaron las placas y se adicionó el anticuerpo anti-Ig totales y anti-IgM de ratón conjugados con biotina (e-bioscience) en la dilución apropiada en el buffer de bloqueo. Luego de incubar 1 hs a T.A., se lavaron las placas y se adicionó peroxidasa conjugada con estreptoavidina en PBST-OVA. Se incubó 1 h a T.A., luego se lavaron las placas y se reveló utilizando o-fenilenediamina-H₂O₂ como sustrato de la peroxidasa. La absorbancia se determinó a 492 nm de densidad óptica (DO). Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron la DO del punto de corte establecido como la media de las DO alcanzadas por los sueros negativos más dos desvíos estándar.

Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa.

8- Obtención de los bazos para la posterior purificación de las poblaciones celulares

A 1 o 3 días post-inoculación (dpi) se obtuvieron los bazos de los ratones infectados con VFA, inoculados con VFAi o control (4 por grupo por experimento), los que se escindieron en pequeños trozos, y se incubaron en presencia de colagenasa tipo I (250 U/ml) (Roche) por 40 min a 37° C. Al finalizar el tiempo de incubación, la reacción se frenó por la adición de PBS suplementado con 5 % de SFB (Gibco). Luego, los fragmentos fueron incubados con DNAsa I (50 U / ml) (Invitrogen) por 40 min a 37° C. Finalmente, la suspensión celular fue filtrada a través de una gasa, lavada con PBS frío y centrifugada a 1500 rpm por 10 min a 4° C.

9- Enriquecimiento de células CD11c y mPDCA-1 a partir de esplenocitos en suspensión mediante la utilización de perlas magnéticas

Las células de bazo provenientes de ratones vacunados, infectados o control fueron purificadas de acuerdo a la expresión de las moléculas de superficie CD11c y mPDCA-1 (Miltenyi Biotec). Para ello, esplenocitos en suspensión (como se detalla en el punto 9 de Materiales y Métodos) fueron incubados con la mezcla de los anticuerpos monoclonales anti-CD11c y anti-mPDCA-1 murino acoplados a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec) durante 30 minutos a 4° C (10^9 células en PBS). Luego de lavar las células con PBS frío, la separación fue realizada utilizando una columna MS con un separador MACS en concordancia con el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec).

Una vez finalizados los lavados, las células fueron resuspendidas en medio completo (MC); medio RPMI suplementado con 5×10^{-2} mM 2-mercaptoethanol, 1 % ampicilina-streptomicina (Sigma Chemical Co.) y 10 % SFB.

10- Análisis de la producción de citoquinas intracelulares en células dendríticas por citometría de flujo

Las células dendríticas purificadas de bazo fueron cultivadas (2.5×10^5 células/pocillo) por 18 hs en presencia de brefeldina A (5 μ g/ml). Las células fueron marcadas con marcadores de superficie con APC-conjugado a anticuerpos anti-CD11c (BD Pharmingen). Luego de lavarlos, las células fueron fijadas con 0,5 % de paraformaldehído y permeabilizadas con saponina (0,1 % en PBS). Las células permeabilizadas fueron incubadas con anticuerpos conjugados a PE dirigidos a IL-6, IL-10, TNF- α (BD Pharmingen) o anticuerpos control de isotipos por 30 min. La marcación celular fue lavada dos veces con la solución de saponina, resuspendida en FACSflow, y analizada por citometría de flujo.

11- Análisis de la expresión de moléculas de superficie mediante citometría de flujo

A fin de evaluar la expresión de moléculas en la superficie de las CDs, los siguientes anticuerpos monoclonales fueron utilizados: anti-CD11c, anti-CD8 α , anti-B220, anti-CD86 y anti-CMH II. Las distintas poblaciones de linfocitos T fueron analizadas según la expresión de las moléculas CD8, CD4, CD25 y Foxp3. En el caso de Foxp3 se realizó una marcación intracitoplasmática como se indica en el **punto 9** de Materiales y Métodos. Los anticuerpos utilizados se hallaban conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofocianina (APC) (BD Pharmingen, San Diego, CA).

Las suspensiones celulares (5×10^5 células) fueron incubadas con 1 μg de los anticuerpos indicados, diluidos en PBS con 5 % de SFB a 4° C durante 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS y finalmente fijadas con paraformaldehído 0,4 % y resuspendidas en 400 μl de buffer Isoflow (Beckman). Los controles de isotipo se utilizaron como controles negativos de marcación inespecífica.

El análisis se realizó utilizando un citómetro FACSCalibur acoplado con el software CellQuest (Becton Dickinson Biosciences). Los resultados se expresaron como la media de la intensidad de fluorescencia o de los porcentajes de células positivas, según se indique.

12- Análisis de muerte celular

La apoptosis tardía o necrosis de las CDs fue determinada a las 5 y 24 hs post-inoculación usando el colorante 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD, Pharmingen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células de los distintos tratamientos fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 μl de PBS en presencia de 5 μl de 7-AAD ($0.25 \mu\text{g}/10^6$ células). Luego de 20 min de incubación a 4° C en oscuridad, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS 1x frío. Luego, se les adicionó una solución de formaldehído al 1% conteniendo 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de Actinomicina D (que detiene la división celular). Las muestras celulares fueron analizadas por citometría de flujo.

13- Obtención de plasma

Al cabo de 1 o 3 dpi, se recolectaron muestras de sangre en tubos con heparina. Se separó el plasma por centrifugación a 1500 x g por 10 min y se conservaron a -80°C para la determinación de distintas citoquinas.

14- Análisis de la secreción de citoquinas en cultivos de células dendríticas o cocultivos de células dendríticas y esplenocitos

Los cultivos de CDs (1×10^6 células/pocillo) o los cocultivos de CDs y esplenocitos (1×10^6 células/pocillo), en una proporción de 1:5, fueron realizados en medio completo. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados a las 24 hs (en el caso de los cultivos de CDs) y de 48 hs (en el caso de los cocultivos), para evaluar la secreción de citoquinas por la técnica de ELISA.

15- ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares o en plasma

La cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares se realizó por la técnica de ELISA sandwich. Los ensayos para dosar IFN- γ e IL-10 (ebiosciences), e IFN- α (PBL Biomedical Laboratories) fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, placas de ELISA (Maxisorp) fueron recubiertas con anticuerpos anti IL-10 o IFN- γ (eBioscience) diluidos en buffer carbonato-bicarbonato (0.05 M, pH 9.6) e incubadas durante una noche a 4°C. Las placas fueron luego lavadas tres veces con PBS adicionado con 0.05% Tween 20 (PBST) y bloqueadas con PBS suplementado con 10% suero fetal bovino durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de cultivo y los estándares de cada citoquina fueron agregados a las placas en duplicados e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces como se indicó anteriormente, el correspondiente anticuerpo anti-citoquina conjugado con biotina fue agregado e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron luego lavadas e incubadas con streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar, el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) fue agregado. La absorbancia a 450 nm fue medida

en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas en base a las densidades ópticas obtenidas con los estándares.

En el caso del ELISA anti-IFN- α , las placas vienen previamente sensibilizadas con el anticuerpo anti-IFN α y bloqueadas. Se agregan a la placa 100ul/pocillo de los sobrenadantes de cultivo celular o plasma y los estándares de citoquina, luego se agrega 50ul/pocillo del anticuerpo anti-IFN α biotinilado y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación (450 rpm). Luego se lo continúa incubando por 24hs a 4° C sin agitación. Finalizada la incubación, se lavaron las placas 4 veces con Wash Solution. Se agregaron 100 μ l/pocillo de HRP solution y se incubaron por 2 hs en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron 4 veces y se adicionó 100 μ l /pocillo de TMB. Se incubó por 15 min en oscuridad y se frenó la reacción con Stop Solution. La absorbancia a 450 nm fue medida en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas en base a las densidades ópticas obtenidas con los estándares.

Los límites de detección fueron de 4 pg/ml para IL-10, 10 pg/ml para IFN- γ y de 12,5 pg/ml para IFN- α .

16- Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas

La capacidad de las CDs purificadas de ratones BALB/c infectados con VFA o inmunizados con VFA inactivado a 3 dpi de estimular la proliferación de linfocitos T fue evaluada *in vitro* mediante un cultivo mixto de linfocitos (CML).

Para la realización del CML, los esplenocitos depletados de células dendríticas, fueron marcados con 5nM de CFSE (del inglés, *carboxylfluorescein succinimidyl ester*) por 40 min a 37°C. Luego, las células fueron lavadas 4 veces y re-suspendidas en medio completo. Las CDs purificadas fueron incubadas con los esplenocitos en una relación de 1:5 en microplacas de 96 pocillos por 4 días en medio RPMI completo. A 24, 48, 72 y 96 hs post-inoculación, las células co-

cultivadas fueron lavadas con PBS frío, fijadas con paraformaldehído 0,2% y resuspendidas en Facsflow (Becton Dickinson). Y analizadas por citometría de flujo.

17- Análisis estadístico de los datos

Las diferencias entre medias fueron analizadas usando el test t de Student, y los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Para realizar estos análisis se emplearon los programas GraphPad Prism e InfoStat.

Resultados

RESULTADOS

1- Análisis de los niveles de anticuerpos totales en el suero.

Es sabido que la respuesta de anticuerpos inducida por el virus inactivado es de corta duración, mientras que los producidos por la infección son de larga vida (Ostrowski y col., 2005). Decidimos evaluar previamente este punto. Para lo cual, se inocularon grupos de 5 ratones Balb/c con 3,5 µg (en un inóculo de 500 µl) de VFAi en PBS y a otro grupo se lo infectó con 0,5 ml de 1×10^5 DICT₅₀ de VFA serotipo O1 Campos.

A distintos días post-inoculación (4, 7, 17, 25 y 38 dpi) se colectaron muestras de suero y se evaluaron los niveles de anticuerpos totales. Como se puede observar en la **Figura 1**, los ratones inoculados con el VFAi presentan niveles de anticuerpos más bajos que los inducidos por la infección. Asimismo, la génesis de respuesta de anticuerpos tras la infección es notablemente más rápida que la producida por el VFAi, además de mantenerse elevada por más de 40 días.

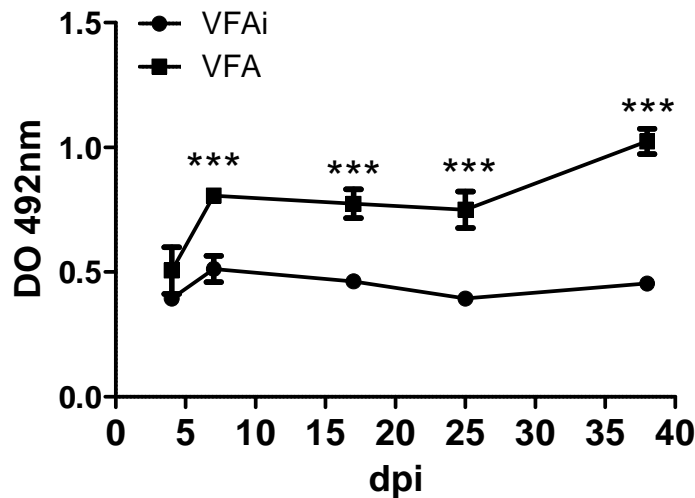


Figura 1: Cinética de anticuerpos inducidos por el VFA y el VFAi. Se inocularon ratones BALB/c con VFA o VFAi, y a distintos dpi se tomaron muestras de sangre y se midieron por ELISA los anticuerpos anti-VFA totales (IgM+IgG). Cada punto corresponde al promedio de las densidades ópticas (DO) alcanzada por los sueros (dilución 1/100) de los animales que integran los distintos grupos y representan la media \pm SEM de 6 ratones por tratamiento. Los asteriscos indican la significancia estadística (***) ($p < 0.001$).

Posteriormente, cuando los niveles de anticuerpos en el grupo VFAi disminuyeron, todos los animales de ambos grupos fueron desafiados con 0,5 ml de 1×10^5 DICT₅₀ de VFA, y mientras el 100 % de los animales del grupo VFA infeccioso estuvieron protegidos al desafío, los animales del grupo VFAi no lograron protegerse. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo descrito previamente en el modelo murino.

2- Estudio de las distintas subpoblaciones de células dendríticas esplénicas en bazo

Ha sido demostrado que el VFA es capaz de infectar a las CDs (Summerfield y col., 2009) e inducir su activación (Ostrowski y col., 2005; Summerfield y col., 2003; Guzylack-Piriou y col., 2006; Harwood y col., 2008).

Teniendo en cuenta que la vacunación actual contra la fiebre aftosa utiliza el virus de la Fiebre Aftosa inactivado (VFAi), se decidió evaluar si las CDs son reclutadas diferencialmente por la infección o por el VFAi. Para ello, ratones de la cepa BALB/c se infectaron con VFA (1×10^5 DICT₅₀), se inyectaron con VFAi (3,5 µg) o se inocularon con el sobrenadante de cultivo de células BHK-21 sin infectar como control, por vía intra-peritoneal.

Al cabo de uno o tres días, se obtuvieron los esplenocitos de los bazo de los ratones inoculados y se analizó por citometría de flujo las CDs presentes en bazo y los distintos subtipos de CDs.

En la **Figura 2** se observa el porcentaje total de células CD11c+ (CDs) tanto a 1 día como a 3 días post-inoculación (dpi), pudiendo observarse disminución del total de CDs en ambos tratamientos.

Al estudiar los porcentajes de los distintos subtipos de CDs a los 3 dpi (**Figura 3**) la población de CDs mieloides (CDsm) (CD11c+ CD8α-) disminuye en ambos tratamientos, mientras que los porcentajes de CDs linfoides (CDsl) (CD11c+ CD8α+) como los de las CDs plasmacitoides (CDsp) (CD11c+ B220+) son menores versus el control sólo en los bazo de los ratones infectados. Por el contrario, en los animales inoculados con el VFAi estas dos subpoblaciones presentan valores normales.

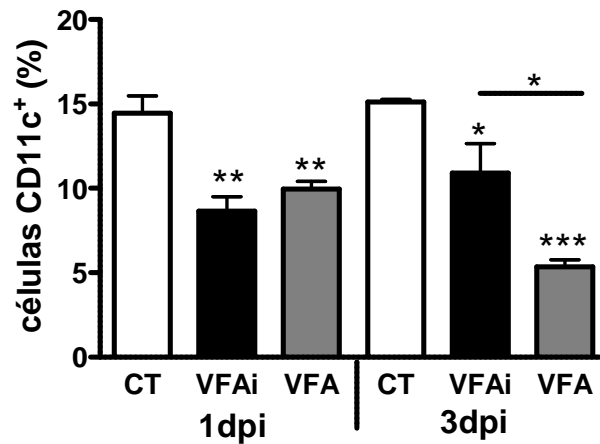


Figura 2: el VFA infeccioso como el inactivo inhiben los porcentajes totales de CDs esplénicas. Los porcentajes de las CDs totales en los bazo de ratones inoculados con VFA, VFAi o control a 1 y 3 dpi fueron analizados por citometría de flujo. Los resultados están expresados como los porcentajes de células CD11c+ y representan la media \pm SEM. n=6. Los asteriscos indican la significancia estadística (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

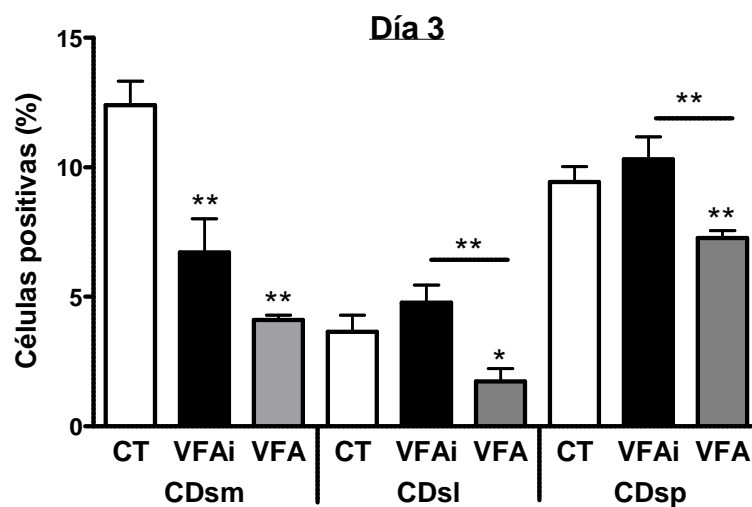


Figura 3: El VFA inhibe los porcentajes de CDs esplénicas. Los porcentajes de las distintas poblaciones de CDs (CDsm, CDsl y CDsp) en los bazo de ratones inoculados con VFA, VFAi o control fueron analizados por citometría de flujo a 3dpi. Los resultados están expresados como los porcentajes de células positivas y representan la media \pm SEM de 6 ratones por tratamiento. Los asteriscos indican la significancia estadística (*p<0.05, **p<0.01).

3- Análisis de los subtipos de células dendríticas purificadas de bazo

Los resultados anteriores nos alentaron a “postular” una distribución diferencial de las CDs esplénicas inducida por la partícula viral infectiva y por la inactiva. Por este motivo, se decidió purificar las CDs del bazo de los ratones tratados con VFA, VFAi o control y evaluar las proporciones de los distintos subtipos de CDs al cabo de 3 días post-inoculación.

Para lo cual, luego de obtenidos los bazos, los mismos se disgregaron en presencia de colagenasa y finalmente se purificaron las CDs utilizando esferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD11c/anti-mPDCA-1, como se describió en Materiales y Métodos. Finalmente, se estudiaron los distintos subtipos de CDs por marcación con anticuerpos monoclonales específicos fluorescentes y análisis por citometría de flujo.

3.1- Células dendríticas convencionales

Se evaluó en primer lugar a las CDs mieloides (CD11c+/CD8 α -), encontrando que tanto el VFA como el VFAi, como muestra la **Figura 4 (A y B)**, disminuyeron su porcentaje significativamente en comparación con el control; sin embargo este efecto fue más evidente cuando las CDs purificadas provenían de bazos de ratones infectados. Al analizar las CDs linfoides (CD11c+/CD8 α +), responsables en ratón de la activación de clones de linfocitos T citotóxicos (Idoyaga y col., 2009), la infección indujo una gran inhibición de este subtipo, como se observa en la **Figura 4 (A y C)**.

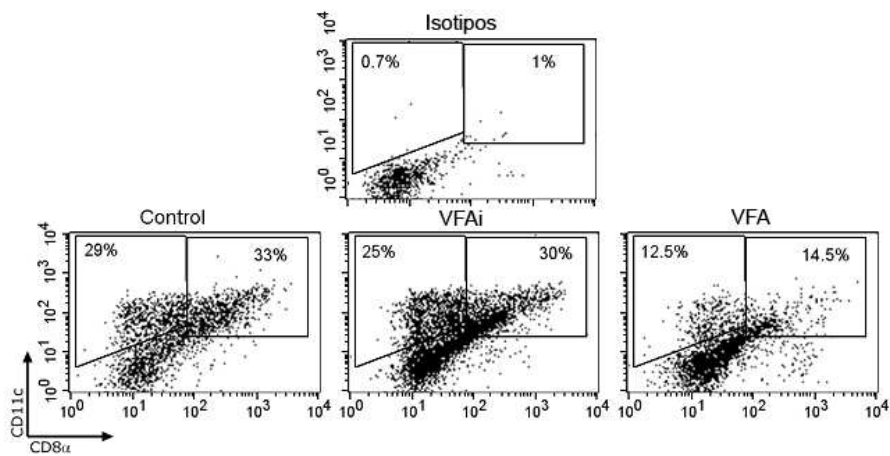
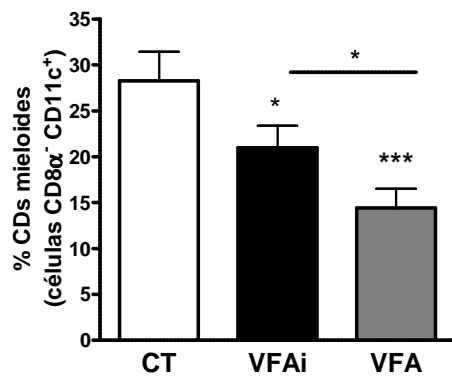
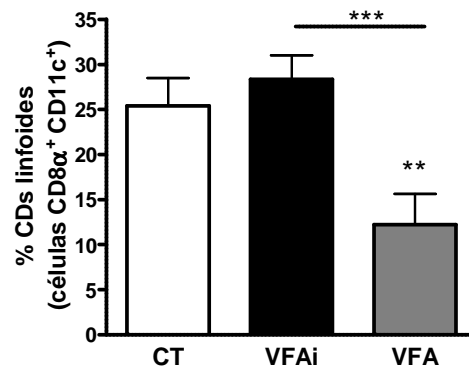
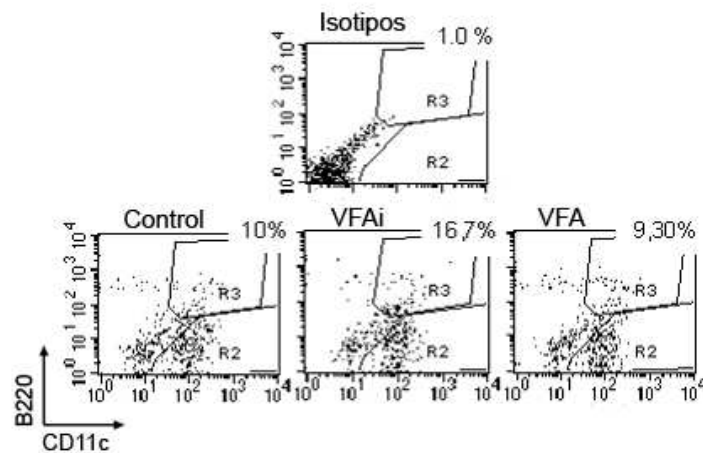
A**B****C**

Figura 4: El VFA inhibe a las CDs convencionales esplénicas. Las CDs de ratones inoculados con VFA, VFAi o control fueron purificadas del bazo a los 3 dpi. Los porcentajes de CDsm y CDsl fueron determinados por marcación con anticuerpos monoclonales anti-CD11c y anti-CD8 α . En **A**, se muestra un experimento representativo de 10, donde se observan las CDsm (CD11c⁺ CD8 α ⁻) y las CDsl (CD11c⁺ CD8 α ⁺). En **(B, C)** se muestran los histogramas correspondientes a los porcentajes positivos de CDsm y CDsl, respectivamente, y representan la media \pm SEM de 10 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

3.2- Células dendríticas plasmacitoides

Finalmente se evaluaron las CDsp esplénicas. Como se muestra en la **Figura 5 (A y B)** a los 3 dpi, el VFAi incrementa el número de CDsp (CD11c+/B220+), mientras que la infección causa una pequeña pero significativa disminución comparado con los valores obtenidos para el control; la inhibición fue más pronunciada cuando se lo compara con el virus inactivo.

A



B

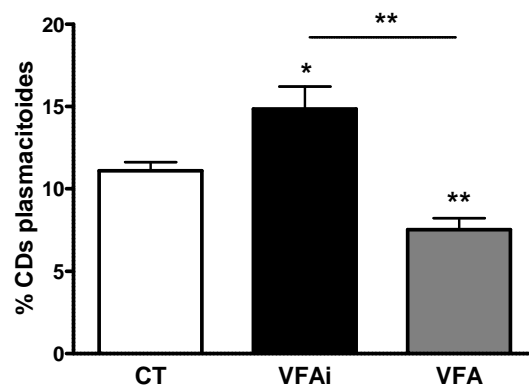


Figura 5: Alteración en los porcentajes de CDs plasmacitoides: virus infeccioso versus inactivo. Las CDs de ratones inyectados con VFA, VFAi o control fueron purificadas de bazo, utilizando esferas magnéticas, como se describió en Materiales y Métodos. Los porcentajes de CDsp fueron determinados por marcación con anti-CD11c-APC / anti-B220-FITC. En **(A)**, se muestra un experimento representativo de 6. En **(B)**, se muestran los histogramas correspondientes a los porcentajes de CDsp. Las barras representan la media \pm SEM de 6 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.2.1- Estudio de las células dendríticas en sangre periférica

Las diferencias observadas en el número de CD_s plasmacitoides entre el virus infeccioso y el inactivo nos llevan a preguntarnos, si estas diferencias respondían a variaciones en el reclutamiento de las mismas desde sangre periférica. Para analizar este punto, se obtuvieron las células mononucleares a partir de sangre periférica obtenida a 1 o 3 dpi. Como muestra la **Figura 6**, los porcentajes de CD_sp en la sangre de los ratones infectados a 1 dpi, son levemente mayores que los del VFAi. Sin embargo, a 3 dpi mientras el número de CD_sp se reduce por inoculación del VFAi; lo que correlaciona con el aumento observado en bazo en este tiempo, la infección muestra valores similares al control.

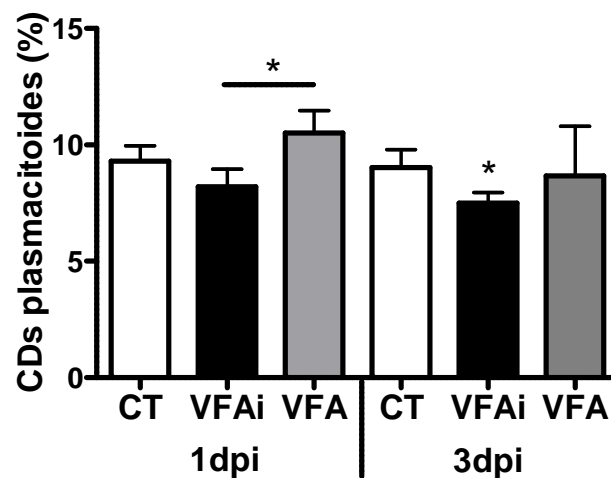


Figura 6: El VFAi inhibe las proporciones de CD_s plasmacitoides en sangre periférica 3 días post-inoculación. Las CD_s plasmacitoides fueron evaluadas en sangre periférica de ratones inyectados con VFA, VFAi o control a 1dpi y 3 dpi, y posteriormente analizados por citometría de flujo. Los histogramas muestran los porcentajes de células CD11c⁺ B220⁺ el día 1 y 3 post-inoculación y representan la media \pm SEM de 10 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (*p<0.05).

3.3- Análisis fenotípico de las células dendríticas esplénicas: estado de activación

La maduración de las CDs está acompañada por el aumento en la expresión de marcadores de superficie, incluyendo moléculas co-estimuladoras y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), moléculas centrales en la activación de los linfocitos T por las CDs (Steinman y Hemmi, 2006; Reis e Sousa, 2006; Villadangos y col., 2005). Para determinar si el VFA o el VFAi eran capaces de inducir la activación, es decir la modulación fenotípica de las CDs esplénicas, evaluamos la expresión de las moléculas CD86 y CMH de clase II 3 días post-tratamiento por citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 7**, ni la partícula inactiva ni la infectiva modificaron los niveles de expresión en superficie de la molécula CD86. Por el contrario, luego de 3 dpi, ambas partículas virales inhibieron la expresión de las moléculas del CMH de clase II en CDs esplénicas purificadas.

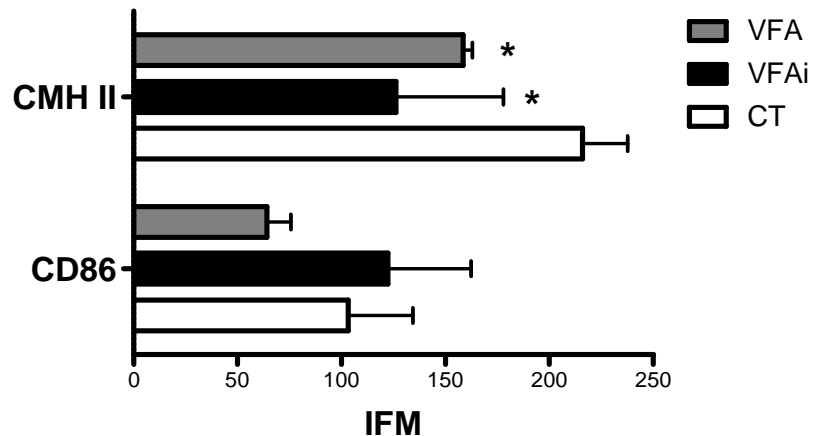


Figura 7: El virus infeccioso y el inactivo inhiben la expresión de la CMH de clase II. Las CDs de ratones inoculados con VFA, VFAi o control fueron purificadas de bazo a los 3dpi. Se analizó por citometría de flujo los niveles de expresión en superficie de las moléculas de CMH clase II y CD86 en estas células. Los resultados están expresados como valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) y representan la media \pm SEM de 11 experimentos independientes. Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$).

3.4- El virus de la fiebre aftosa induce la muerte temprana de las células dendríticas

Previamente en nuestro laboratorio hemos demostrado que el VFA es capaz de infectar CDs murinas, pero su replicación es abortiva (Ostrowski y col., 2005). Este fenómeno ha sido descrito durante la infección de CDs con distintos virus (Lay y col., 2010; Pejawar y col., 2005; Escarmís y col., 2008). Además, como el VFA produce una rápida y significativa disminución de las CDs esplénicas, y considerando también que es altamente citopático en muchas líneas celulares (Escarmís y col., 2008), decidimos evaluar la viabilidad de las CDs purificadas luego de la infección con el VFA utilizando el colorante 7-AAD, que marca las células necróticas. Como muestra la **Figura 8**, el VFA indujo la mortalidad de las CDs esplénicas (células CD11c+ totales), luego de 5 hs (**A**) y de 24 hs de infección (**A**). Un hecho interesante, fue encontrar que las CDs plasmacitoides fueron el subtipo más afectado en relación a su viabilidad por el VFA a las 24 hs (**B**). Por el contrario, en este mismo tiempo el VFA no indujo muerte en las CDsp en sangre periférica (**C**).

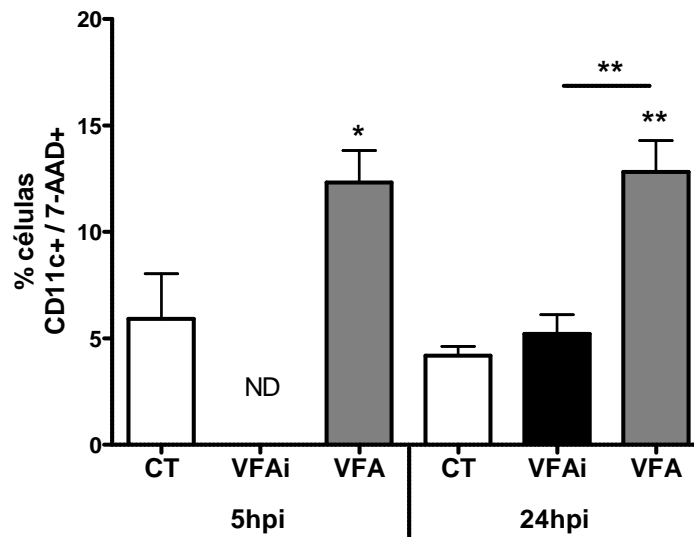
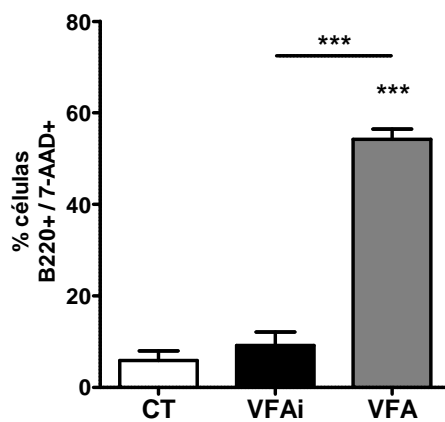
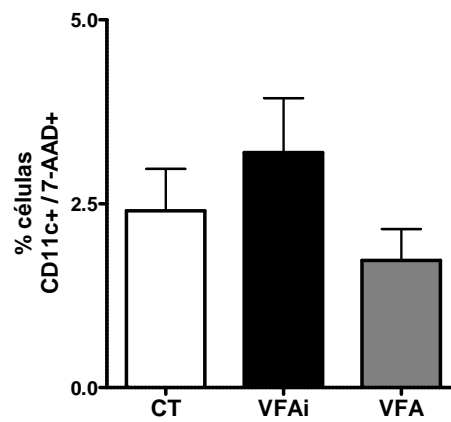
A**CDs esplénicas****B****24 hs CDsp esplénicas****C****24 hs CDs en sangre periférica**

Figura 8: La infección afecta la viabilidad de las CDs plasmacitoides. (A) la viabilidad fue medida en las CDs esplénicas totales (CD11c+) provenientes de ratones tratados con el VFA, VFAi y control. Luego de 5 y 24hs post-inoculación las CDs esplénicas fueron purificadas y se midió la muerte celular por citometría de flujo en presencia del colorante 7-AAD. En (B), se representan los porcentajes de células CD11c+ B220+ 7-AAD+ en el bazo de ratones tratados con VFAi, VFA o control a 24 hs post-inoculación. En (C), se muestra el porcentaje de CDs 7-AAD+ obtenidos en sangre periférica 24 hs post-tratamiento con el VFA, VFAi o control.

Los resultados están expresados como el porcentaje de las CDs+ 7-AAD+ y representan la media \pm SEM de 6 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

3.5- Análisis del perfil de citoquinas inducido en las CDs esplénicas por el virus infeccioso o inactivo.

Tomando en cuenta las diferencias encontradas en relación a los subtipos de CDs en los bazo de ratones inoculados con el virus infeccioso y el inactivo, y considerando el hecho de que las CDs plasmacitoides son la principal fuente de IFN- α (Guiducci y col., 2009; Szabo y Dolganiuc, 2008) mientras que las CDs convencionales son centrales en definir el perfil de polarización de los linfocitos T vírgenes (Liu y Nussenzweig, 2010; Belz y col., 2002), se decidió analizar el patrón de citoquinas inducido por el VFA o el VFAi en CDs esplénicas purificadas. Para lo cual, las CDs esplénicas fueron purificadas por selección positiva luego de 3 días post-inoculación. Luego del lavado, las células se resuspendieron en una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en medio completo y, en presencia de brefeldina A, se incubaron por 18 hs a 37° C. Finalmente, la producción de citoquinas se analizó por marcación intracitoplasmática. En la **Figura 9**, se observa que el VFAi indujo una gran producción de las citoquinas pro-inflamatorias; IL-6 y TNF- α por las CDs, mientras que las CDs purificadas de ratones infectados sólo indujeron pobres niveles de IL-6. A pesar del incremento de las citoquinas pro-inflamatorias por el virus inactivo, llamativamente también induce la secreción IL-10 por las CDs (**Figura 9**).

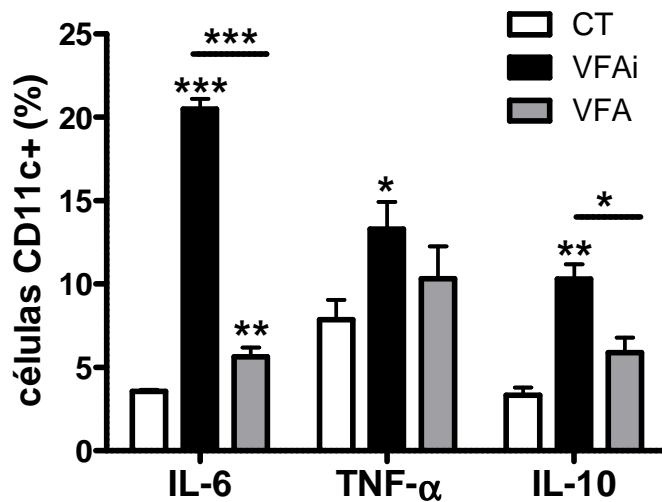
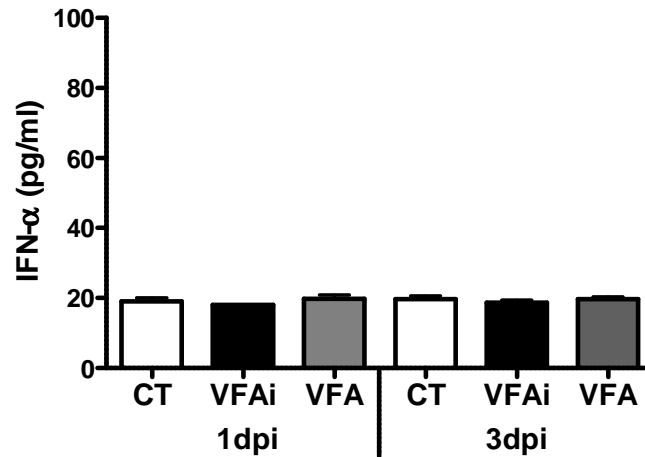


Figura 9: Las células dendríticas de animales inoculados con VFA inactivo inducen la secreción de IL-6, TNF- α e IL-10. A los 3 dpi, se purificaron las CDs esplénicas por selección positiva. Las células se resuspendieron en medio completo (2.5×10^5 células/pocillo), en presencia de brefeldina A ($5 \mu\text{g/ml}$) por 18 hs a 37°C . El porcentaje de IL-6, TNF- α e IL-10 en células CD11c+ se determinó por citometría de flujo. Los datos están expresados como el porcentaje de células CD11c+ positivas para la producción de cada citoquina analizada. $n = 7$. Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Finalmente, se decidió evaluar la producción de IFN- α en CDs esplénicas, la principal citoquina implicada en la inmunosupresión durante infecciones virales agudas. Como se muestra en la **Figura 10A**, los niveles de IFN- α no fueron afectados por la infección y fueron similares a los del control y a los del virus inactivo. Sin embargo, al contrario de lo observado en CDs esplénicas, se detectaron altos niveles de IFN- α en el plasma de los ratones 1 día post-infección (**Figura 10B**). Esta observación correlaciona con datos publicados por el grupo de Nfon y colaboradores (2010) quienes detectaron altos niveles de esta citoquina en suero de cerdos infectados con distintos serotipos del Virus de la Fiebre Aftosa. Estos resultados, nos permiten inferir que la partícula infectiva y la inactiva modulan diferencialmente la respuesta inmune, ya que mientras el VFAi induce una rápida respuesta inflamatoria mediada por las citoquinas TNF- α e IL-6, el VFA

parece inducir una inmunosupresión temprana mediada al menos en parte por el IFN- α .

A CDs esplénicas



B Plasma

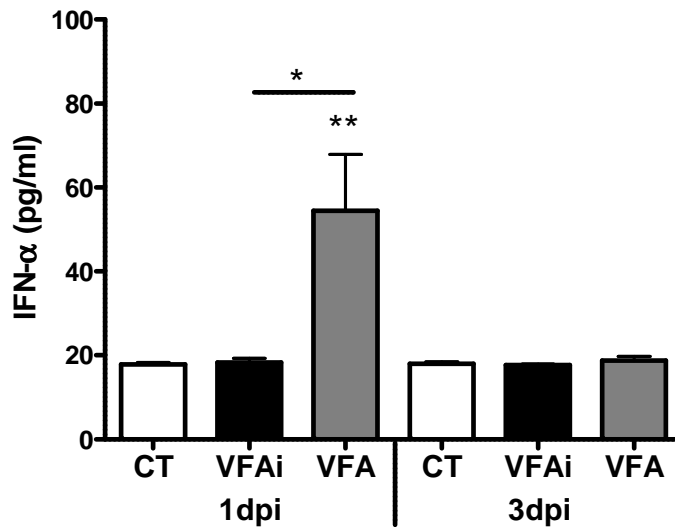


Figura 10: Diferencias en la inducción de IFN- α de ratones inoculados con VFA infectivo o inactivado. En (A), al cabo de 1 o 3 dpi, se purificaron las CDs esplénicas por selección positiva. Las CDs fueron resuspendidas en medio completo (1×10^6 células/pocillo) y cultivadas por 24 hs a 37° C. La producción de IFN- α se cuantificó en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA. Las barras corresponden a la concentración en pg/ml y representan la media \pm SEM de 4 experimentos. En (B), se muestran los valores observados en la cuantificación de IFN- α (pg/ml) obtenidos en el plasma de los ratones tratados. Las barras representan la media \pm SEM (n= 7). Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4- Estudio de las distintas poblaciones de linfocitos en bazo

En relación al VFA se ha descrito que en sangre periférica de cerdos durante la infección aguda se produce una linfopenia transiente que afecta principalmente a los linfocitos T (Bautista y col., 2003; Díaz-San Segundo y col., 2006), no asociada a la inducción de muerte celular, por lo que se postula que la producción de IFN- α por el huésped provoca el egreso de los linfocitos desde sangre periférica a los sitios afectados o tejidos linfoides (Díaz-San Segundo y col., 2006). Sin embargo, en los bovinos el número de linfocitos en sangre periférica tras el desafío con el VFA se mantiene normal (Windsor y col., 2011). Estas discrepancias en el efecto del virus sobre las poblaciones linfocitarias dependiendo del huésped considerado nos llevan a preguntarnos cómo son afectadas las poblaciones linfocitarias esplénicas por el virus infeccioso o inactivo.

4.1- El VFA induce alteraciones de las poblaciones de linfocitos T esplénicas

En primer término, se evaluó la población de linfocitos T (LT). Luego de 3 días post-tratamiento, se obtuvieron los bazos y las suspensiones celulares depletadas de CDs se marcaron con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD4. Como se puede observar en la **Figura 11 (A y C)** encontramos que mientras que en los ratones infectados los porcentajes de LT CD8+ están ligeramente disminuidos, la inoculación con el VFAi provoca un incremento del número de linfocitos T CD8+. Por el contrario, no se observaron alteraciones en los porcentajes de los linfocitos LT CD4+ (**Figura 11 B y C**), con ningún tratamiento.

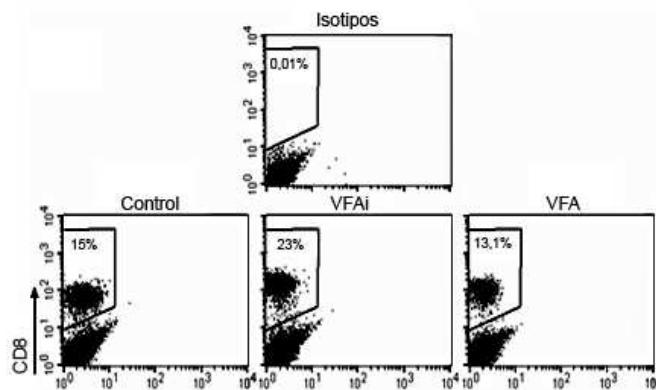
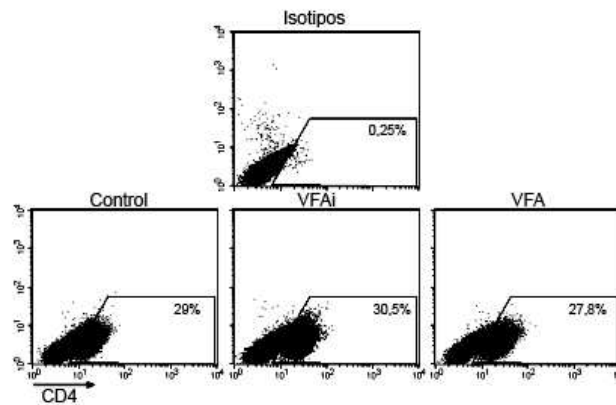
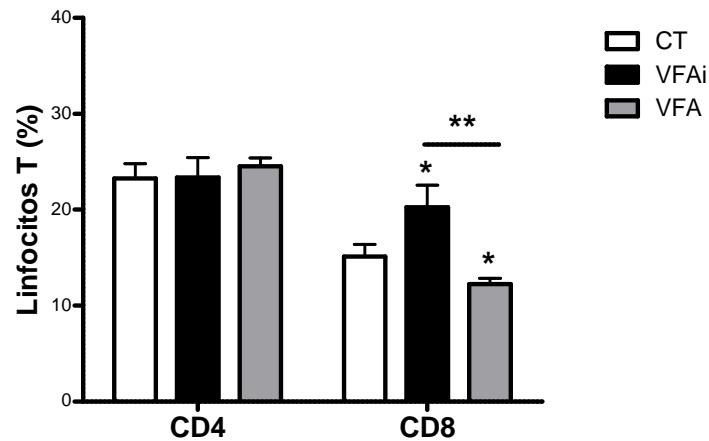
A**B****C**

Figura 11: Efecto diferencial del VFA infeccioso e inactivo sobre los LT CD8+. Los ratones fueron inoculados con VFAi, VFA o control. El día 3, se obtuvieron los bazos y luego de purificar las CDs con anti-CD11c/anti-PDCA-1, se analizaron los porcentajes de linfocitos T en la fracción negativa por citometría. En **A** y **B**, se muestran los dot plots representativos de 11 experimentos obtenidos para los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. En **C**, los histogramas representan el porcentaje de células positivas para cada marcador. Los resultados representan la media \pm SEM de 11 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2- Estudio de la población de linfocitos B maduros

Asimismo, estudiamos la población de linfocitos B maduros esplénicos (células B220+). En este caso, a 1 dpi se observa un pequeño aumento en esta población en el caso del virus inactivo, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos a 3 dpi, por lo que el virus en sus dos versiones no está afectando a la proporción de esta población en bazo (**Figura 12**).

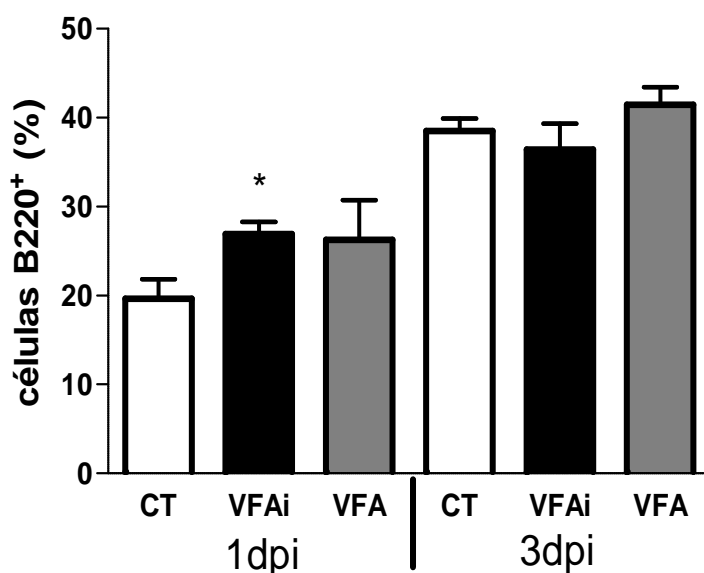


Figura 12: Los linfocitos B no son afectados por el virus infeccioso ni por el inactivo a 3 dpi. Los ratones fueron inoculados con VFAi, VFA o control. Uno y tres días después, obtuvimos los bazo de los ratones y luego de purificar las CDs con anti-CD11c/anti-PDCA-1; analizamos los porcentajes de linfocitos B maduros en la fracción negativa por citometría. Los resultados se muestran como el porcentaje de células B220+ y representan la media \pm SEM de 6 experimentos.

4.3- Inducción de linfocitos T regulatorios en el bazo de ratones inoculados con VFAi

Teniendo en cuenta que ha sido documentado que las CD_s inmaduras producen mayormente IL-10 y definen perfiles tolerogénicos (Mosser y Zhang, 2008; Fukaya y col., 2011), sumado al hecho que las CD_s obtenidas de bazos de ratones inoculados con el VFA inactivo mostraban altos niveles de IL-10, nos llevaron a analizar la población de linfocitos T regulatorios (Treg). Cuando los linfocitos Treg (CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺) se analizaron 1 día post-tratamiento no se observaron diferencias (**Figura 13 C**). Llamativamente, cuando se evaluó esta población a los 3 días, encontramos que en los ratones inoculados con la partícula inactiva, se indujo un incremento significativo en las proporciones de los linfocitos Treg esplénicos, en comparación al control, como se muestra en la **Figura 13 (A y B)**. Este resultado sugiere que la inducción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por las CD_s mediaría al menos parcialmente la génesis de una respuesta tolerogénica por el virus inactivo.

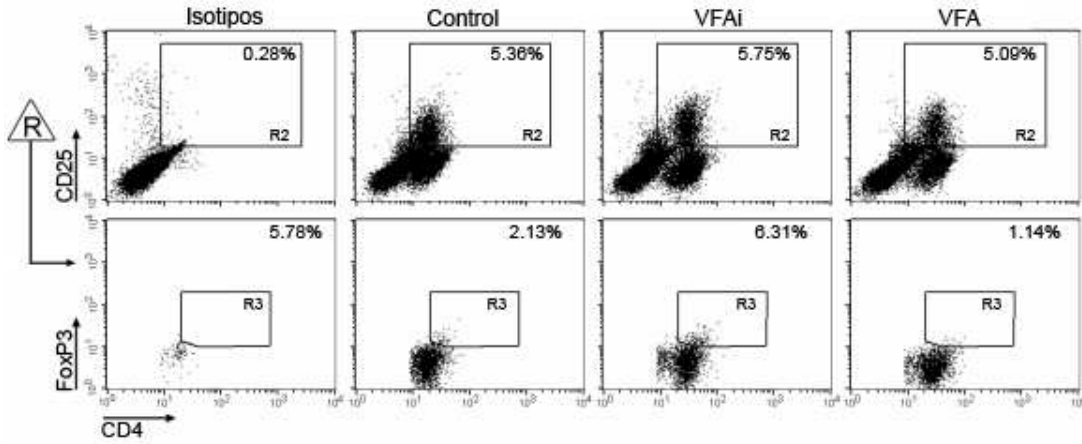
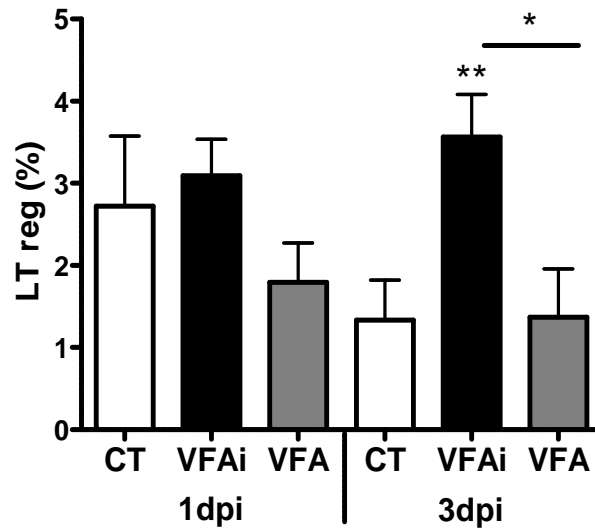
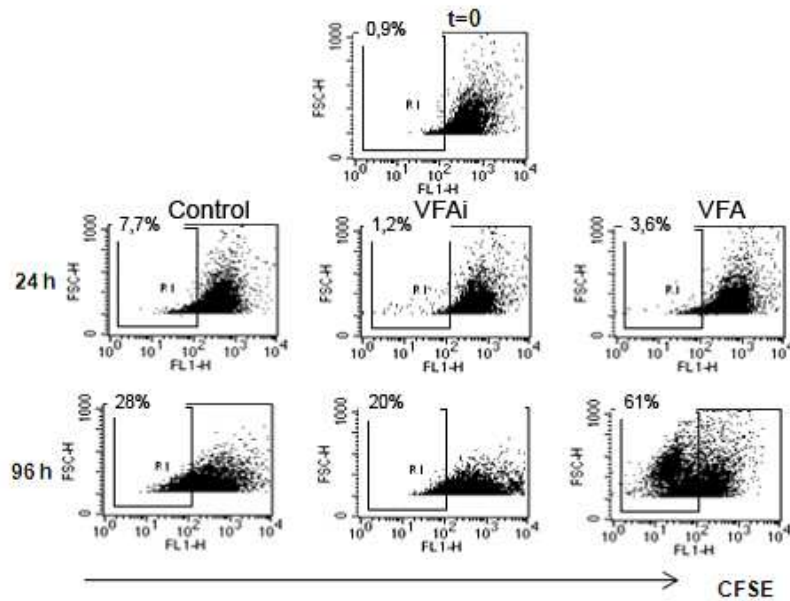
A**B**

Figura 13: El virus inactivo incrementa el número de linfocitos T regulatorios esplénicos. Las porcentajes de linfocitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+) fueron analizados en una suspensión celular obtenida del bazo de los ratones inoculados con el VFAi, VFA o control. Al cabo de 1 y 3 días se evaluaron por citometría los porcentajes. En **A**, se muestra un experimento representativo de 5. En **B** y **C**, los resultados de 1dpi y 3dpi, respectivamente, son expresados como el porcentaje de células CD4+ CD25+ FoxP3+ y representan la media \pm SEM de 5 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* p <0.05, ** p <0.01).

5- Evaluación de la capacidad estimuladora de los linfocitos T por las CDs infectadas con VFA

Una característica distintiva de los linfocitos T regulatorios es su capacidad de inhibir la activación de los linfocitos T vírgenes y/o la proliferación de linfocitos T efectores, mecanismo por el cual regulan la génesis de la respuesta inmune (Campbell y Koch, 2011), sumado al hecho que tanto el virus infeccioso como el inactivo provocan la inhibición de la expresión de las moléculas del CMH de clase II, decidimos estudiar si el VFA era capaz de primar la respuesta proliferativa T. Para analizar este punto, 3 días post-inoculación se obtuvieron las CDs a partir de los bazo de los ratones tratados con VFA, VFAi y control. Las células así obtenidas se co-cultivaron con esplenocitos autólogos en una relación de 1:5 (CDs: esplenocitos) marcados con el colorante CFSE (5 nM) y finalmente se incubaron a 37° C varios días como se describió en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 14 (A y B)**, las CDs de animales infectados fueron capaces de inducir la proliferación de los linfocitos autólogos a partir de las 72 hs horas de iniciado el co-cultivo, efecto no observado durante las primeras 48 hs de cultivo. Llamativamente, las CDs de los ratones inyectados con el virus inactivo inhibieron significativamente la proliferación de los esplenocitos. En este sentido concluimos, que si bien durante las primeras horas el VFA induce una rápida inmunosupresión, la respuesta proliferativa T se restituye más tarde, efecto no observado por acción para la partícula viral inactiva.

A



B

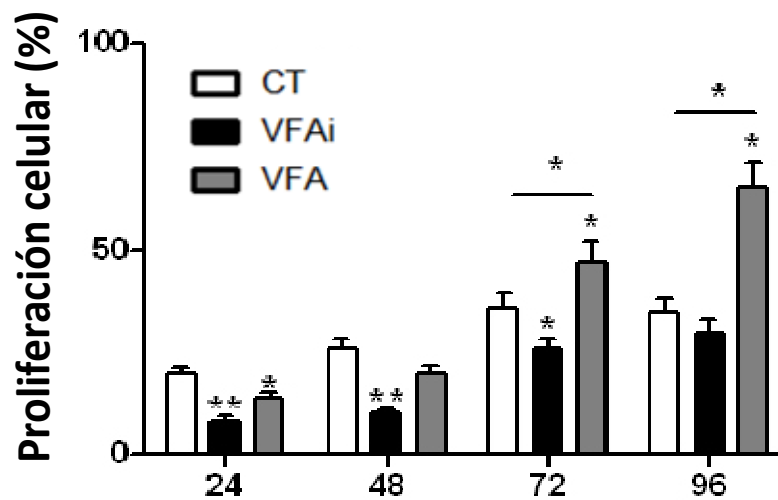


Figura 14: El virus infeccioso estimula la proliferación de los linfocitos, mientras que el virus inactivo la inhibe. Las CD4 purificadas de ratones a 3 dpi con: VFAi, VFA o control, fueron cultivadas con esplenocitos autólogos marcados con CFSE (5 nM) en una proporción de 1:5. (A) se muestra un dot blot representativo de 6 obtenidos a las 24 y 96 hs. En (B), el histograma representa el porcentaje de células proliferantes a distintos tiempos de iniciado el co-cultivo. Los resultados están expresados como la media \pm SEM, n=6. Los asteriscos indican significancia estadística (*p<0.05, **p<0.01).

Llamativamente, cuando evaluamos por citometría de flujo los porcentajes de linfocitos, observamos que el virus infectivo disminuyó las proporciones de linfocitos T CD4+ 1 dpi (**Figura 15**), mientras que como habíamos demostrado previamente (**Figura 10**) a los 3 dpi la proporción de LT CD4+ en este grupo se encontraba al mismo nivel que el grupo control.

Este resultado es coincidente con lo observado en la proliferación celular (**Figura 14**), donde en las primeras horas de cultivo se observa una disminución de los niveles linfoproliferativos con el virus infectivo. Por lo tanto, en concordancia con resultados previos (Bautista y col., 2003) el virus infectivo produce una disminución transiente de los LT CD4+ esplénicos a 1 dpi. Posteriormente, las proporciones se igualan al control.

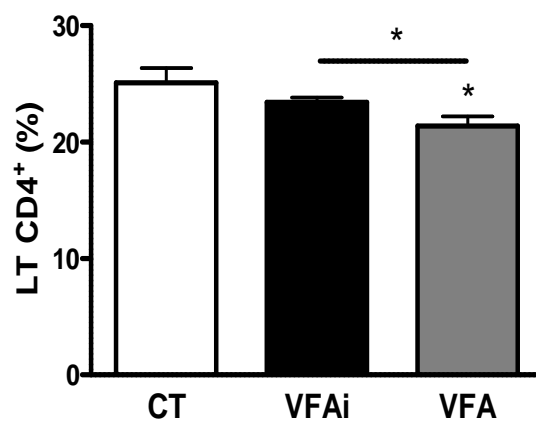


Figura 15: El virus infectivo disminuye tempranamente las proporciones de linfocitos T CD4+. Los ratones fueron inoculados con VFAi, VFA o control. El día 1 post-inoculación, se obtuvieron los bazo y luego de purificar las CDs con anti-CD11c/anti-PDCA-1, se analizaron los porcentajes de linfocitos T en la fracción negativa por citometría. El gráfico representan el porcentaje de células CD4+. Los resultados representan la media \pm SEM de 11 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* $p < 0.05$).

Por último, decidimos evaluar qué citoquinas se inducían en el sobrenadante de los co-cultivos, como forma de determinar si el efecto observado sobre la respuesta proliferativa T dependía de un particular perfil de citoquinas. Para lo cual, se tomaron los sobrenadante de obtenidos luego de 48 hs del co-cultivo entre las CDs y los esplenocitos provenientes de los diferentes tratamientos.

Como se muestra en la **Figura 16**, la infección provoca un incremento importante en la producción de IFN- γ y en menor medida modula la secreción de la IL-10, resultados similares a los obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo (Ostrowski y col., 2005). Por otra parte, una fuerte inducción de la IL-10 se detectó en el sobrenadante de los co-cultivos cuando las células provenían de ratones inoculados.

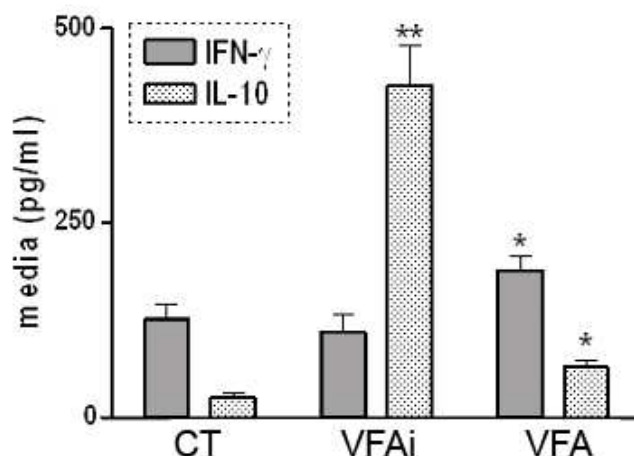


Figura 16: Perfil de citoquinas producidos en co-cultivos por el VFA y el VFAi. Los esplenocitos y las CDs purificadas obtenidas de los bazos de ratones inoculados con el VFAi, VFA o control fueron co-cultivadas por 48 hs a 37° C y la producción de IFN- γ e IL-10 se analizó en el sobrenadante por ELISA. El histograma muestra la concentración (pg/ml) y representan la media \pm SEM de 4 experimentos. Los asteriscos indican significancia estadística (* p <0.05, ** p <0.01).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Diferencias en la respuesta inmune contra VFA infeccioso e inactivado

La respuesta inmune inducida luego de la infección de ratones con el VFA prosigue un desarrollo que presenta importantes diferencias respecto a la respuesta inducida luego de la vacunación con virus inactivado. Ha sido descrito que las principales discrepancias se establecían en tres aspectos centrales: el grado de independencia de colaboración T para la producción de anticuerpos protectores, el perfil de isotipos inducido y la duración de la memoria inmunológica.

- Grado de independencia de colaboración T para la producción de anticuerpos protectores.

Mientras que la respuesta humoral inducida por la infección con el VFA comienza a desarrollarse en forma TI, permitiendo la producción de anticuerpos protectivos a los dos días post-infección, la respuesta contra el virus inactivado requiere la colaboración T desde el inicio, y por lo tanto, la aparición de anticuerpos capaces de controlar la infección demanda más tiempo (López y col., 1990; Piatti y col., 1991).

- Perfil de isotipos inducido

La infección se caracteriza por la inducción de IgG1 e IgG3 desde los 7 días post-infección y de altos niveles de IgG2b (y menores de IgG2a) a partir de los 14 días post-infección. Contrariamente, la vacunación induce principalmente IgG1 e IgG2a (Pérez-Filgueira y col., 1995).

- Duración de la memoria inmunológica

Mientras la infección induce inmunidad de larga duración, la cual se manifiesta por la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en suero, la vacunación sólo genera memoria de corto plazo (López y col., 1990; Wigdorovitz y col., 1997).

La existencia de estas diferencias sugiere que la activación del sistema inmune luego de la infección o la vacunación con la partícula inactivada está diferencialmente modulada. En consideración del importante papel que desempeñan las CD4 en el desarrollo de la respuesta adaptativa, uno de los objetivos principales de esta tesis consistió en determinar si *in vivo* el VFA dependiendo de su estado de activación era capaz de modular el número y funcionalidad de los subtipos de CD4 de bazo, y cómo estas alteraciones determinan la génesis de la respuesta inmune adaptativa.

En los resultados presentados en esta tesis, encontramos marcadas diferencias en la inducción de la respuesta inmune entre el virus infectivo y el inactivado en el modelo murino.

Modulación de las células dendríticas esplénicas por el VFA

Los datos obtenidos a lo largo de esta tesis indican que en el bazo de los ratones infectados se observa una marcada reducción en la población de CD4 totales, ya que tanto las CD4 plasmacitoides como las CD4 convencionales disminuyeron en comparación con el control 3 días post-infección. En este sentido, ha sido ampliamente demostrado que muchos virus como el virus de Influenza A, reovirus, el virus del dengue, de la hepatitis C, el virus de Ebola entre otros inducen la muerte celular en el huésped como un mecanismo de escape (como

por ejemplo: Influenza A, reovirus, dengue, hepatitis C, virus del Ebola (Clarke y Tyler, 2009; Galluzzi y col., 2010; Kaminski y Zhivotovski, 2010; Shrivastava y col., 2011; Tomlins y Storey, 2010). Esto nos llevó a pensar que el VFA podría inducir la muerte celular de las CDs. En este sentido, encontramos que la infección provocaba la muerte celular en un bajo pero significativo porcentaje de las células CD11c+ siendo las CDs plasmacitoides esplénicas el principal subtipo afectado. Sin embargo, este resultado no se correlacionó con lo observado luego de 1 día post-infección, en sangre periférica ya que los porcentajes de CDs no se vieron afectados, mientras que en este punto los valores de las CDs plasmacitoides eran similares a los observados en el bazo. En este sentido numerosos trabajos encontraron un efecto citopático del VFA sobre distintas células como en cultivos primarios de queratinocitos de cerdos (Ku y col., 2005), además de en el bazo, tejidos linfoides y corazón de los animales infectados (Díaz-San segundo y col., 2006; Gulbahar y col., 2007). Más recientemente, Nfon y col 2010 encontraron una disminución transiente de las CDs plasmacitoides en la sangre periférica de cerdos infectados con distintos serotipos del VFA, la que se asoció a una fuerte linfopenia consecuencia de la incapacidad de las CDs plasmacitoides de secretar IFN- α .

La inoculación del VFA serotipo O1 Campos inactivado causó un significativo incremento de las CDs plasmacitoides esplénicas sin modificar los porcentajes de las CDs linfoides y disminuyendo el porcentaje de las CDs mieloides. Un estudio previo (Jin y col., 2007) demostró que las CDs inmaduras obtenidas a partir de precursores de médula ósea eran susceptibles de morir por apoptosis cuando eran incubadas con la partícula inactivada vía la interacción de una integrina de las CDs con una secuencia de la proteína VP1, interacción que provocaría la inhibición de la respuesta inmune frente a la infección. Sin embargo, creemos poco probables estos resultados a tendiendo a que nosotros no observamos muerte celular en ningún caso con el VFAi.

En correlación con resultados previos obtenidos en el huésped natural (Díaz-San Segundo y col., 2009; Golde y col., 2008; Reid y col., 2011), no se detectó IFN- α en los sobrenadantes obtenidos de las CDs purificadas de los bazos de los ratones infectados. En este sentido, se ha descrito que la inducción de IFN- α por las CDs por el VFA requiere de la formación de complejos inmunes (CI) (Guzylack-Piriou y col., 2006; Summerfield y col., 2009) o la presencia al menos de partículas virales infecciosas (Bautista y col., 2005). Si bien, en el ratón el virus es eliminado rápidamente (Ostrowski y col., 2005), lo que evitaría tempranamente la formación de tales CI, consideramos sin embargo que la explicación más probable para la falta de producción de IFN- α por las CDs plasmacitoides murinas, sea consecuencia del tropismo mostrado por el VFA que induce la muerte selectiva de este subtipo particular de CDs, que son la principal fuente de IFNs de tipo I.

Sin embargo, cabe resaltar que, la detección de IFN- α en el plasma de los ratones infectados, es coincidente con lo observado por otros grupos en cerdos y bovinos infectados (Nfon y col., 2010; Windsor y col., 2011).

Activación de la respuesta adaptativa

Previamente Ostrowski, y col. (2005), demostraron que la infección *in vitro* de CDs con el VFA se asociaba a la incapacidad de primar una respuesta proliferativa. Por el contrario, al evaluar el efecto del VFA *in vivo* demostramos que la infección no afecta la capacidad de las CDs de activar la respuesta linfocitaria como lo evidencian los resultados del cultivo mixto linfocitario. Sin embargo, cabe resaltar que de la misma manera que Nfon y col. (2010), nosotros encontramos una inmunosupresión transiente de la proliferación de células T durante las primeras 48 horas de cultivo. Esta observación respalda el hecho de que la producción de IFN- α inducidos 1 día post infección en el plasma, por células distintas de las CDs plasmacitoides, podría ser responsable del efecto supresor observado en los estadios tempranos de la infección con el VFA. Más

aún, no podemos excluir que, luego del desafío viral del ratón con VFA, los esplenocitos secretaron niveles significativos de IFN- γ e IL-10, citoquinas con efecto inmunosupresor conocido, también asociado con la infección con VFA (Díaz-San Segundo y col., 2009; Ostrowski y col., 2007; 2005; Windsor y col., 2011). En nuestro modelo, asumimos que estas no participarían de la inmunosupresión hasta el pico de IFN- γ e IL-10 que aparece a las 48 hs de co-cultivo y coincide con la activación de la respuesta de células T.

Ha sido demostrado en ratones, que las CDs linfoides serían las responsables de primar a los linfocitos T CD8+ contra diferentes virus como también contra bacterias intracelulares (Belz y col., 2004; Neuenhahn y Busch, 2007). Por lo tanto, la depleción de las CDs CD8 α + esplénicas inducida por la infección de los ratones con el VFA pudo estar asociada a la reducción de linfocitos T CD8+. Futuros experimentos podrían determinar si el incremento en los niveles de IFN- γ que observamos en los co-cultivos entre CDs y esplenocitos, pueden explicar la activación tardía de este tipo particular de linfocitos. En este sentido, la activación tardía de linfocitos T CD8+ específicos efectores y de memoria luego de una infección con VFA ha sido demostrada en ganado (Guzman y col., 2008; Childerstone y col., 1999).

Como mencionáramos previamente, fue inesperado encontrar que el VFA no interfiere con la habilidad de las CDs convencionales de primar la respuesta adaptativa. Así, dos días luego del cultivo *in vitro* las CDs purificadas obtenidas de ratones infectados fueron capaces de presentar antígenos virales a esplenocitos autólogos activando la respuesta celular T, lo cual apoya firmemente el hecho que el virus de la fiebre aftosa es internalizado por la CDs (Díaz-San Segundo y col., 2009; Ostrowski y col., 2005; Summerfield y col., 2009). Considerando además que el VFA mostró un efecto citopático sobre las CDs plasmacitoides, no descartamos que las CDs convencionales perciban esta “señal de daño”, resultando en la incorporación del material celular junto a los antígenos virales de

manera de ingresar a la vía de presentación cruzada (Belz y col., 2004), necesaria para la activación de los linfocitos T CD8+ (Wakim y Bevan, 2011).

En ratones previamente se demostró que (Ostrowski y col., 2007) los linfocitos B de la zona marginal del bazo serían los responsables de la producción de los anticuerpos neutralizantes contra el VFA durante las etapas tempranas de la infección, siendo la IL-10 secretada por las células B, la responsable de la respuesta humoral. Poco es lo que se sabe en relación a la génesis de la respuesta humoral tardía que permite mantener los niveles de anticuerpos protectivos altos por muchos años. En este sentido, está demostrado que el IFN- α es capaz de activar a las CD_s mieloides a primar e inducir en los linfocitos B la adquisición de un fenotipo de memoria vía la secreción de citoquinas inflamatorias (Jego y col., 2005), creemos que el VFA sería rápidamente eliminado por la activación de anticuerpos neutralizantes T-independientes como fue previamente demostrado, sin embargo, luego durante la fase tardía a través de la inducción de las citoquinas IL-6/IL-10/IFN- γ se promueve el desarrollo de una respuesta humoral T-dependiente y del desarrollo de memoria inmunológica (Childerstone y col., 1999; Díaz-San Segundo y col., 2009).

Por el contrario, la falla del virus inactivado de estimular la proliferación de linfocitos T la asociamos a la inducción de IL-10 por las CD_s, citoquina que media un efecto inmunosupresor tanto de la maduración como de la activación de linfocitos T (Frick y col., 2010; Rutella y col., 2004). Es sabido que las células T primadas por CD_s inmaduras o CD_s pre-tratadas con IL-10 inducen respuestas T regulatorias (Moore y col., 2001). Asimismo, el incremento en el porcentaje de las CD_s plasmacitoides en bazo de los ratones inoculados con la partícula inactivada también favorece el desarrollo de mecanismos de tolerancia (Adema, 2009; Sakaguchi, 2004). Por primera vez, se demuestra que la inoculación de ratones con VFA serotipo O1 Campos en su forma inactivada induce la expansión de linfocitos T regulatorios (CD4+CD25+ Foxp3+). A pesar del hecho de que a luego

de 3 días de la inoculación, los porcentajes de los linfocitos T CD8+ esplénicos aumentaron, los mismos sin embargo fueron incapaces de producir IFN- γ .

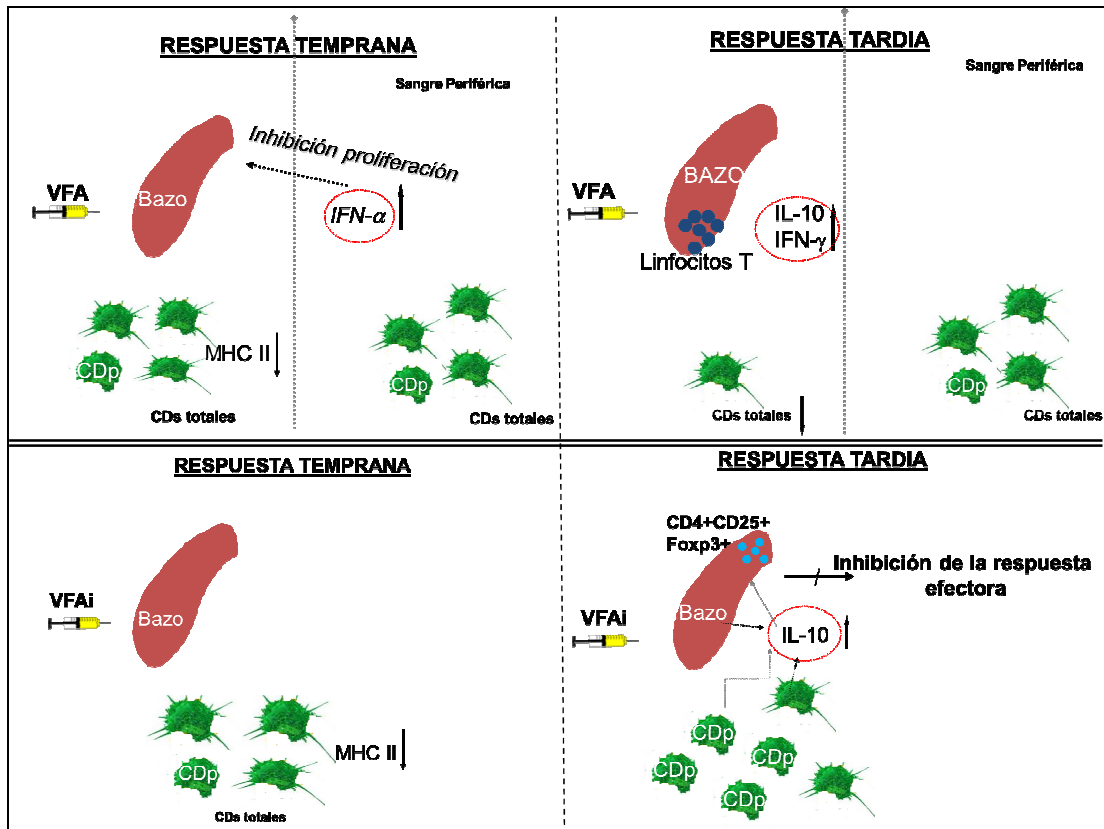
Un problema central en el diseño de vacunas anti-virales es que éstas carecen de habilidad para inducir una respuesta protectora mediada por IFN- γ (Kimman y col., 2009). Sin embargo, en nuestro modelo, esta incapacidad de secretar IFN- γ , más el hecho de que las CDs produjeran altos niveles de IL-10 podría favorecer la inducción de un perfil regulatorio asociado a la consiguiente inhibición de la respuesta T efectora. Recientemente, LeRoith y col. (2011) analizando el efecto de una vacuna contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PPRS), que afecta a cerdos, encontró que la inducción de células T regulatorias se asociaba a la exacerbación de dicha patología. Así, nosotros demostramos que el VFA inactivado rápidamente induce la génesis de una respuesta inflamatoria a través de la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α por las CDs. Además, del incremento de las CDsp de bazo y la producción de IL-10. En nuestro modelo, creemos que la inducción de un perfil regulatorio es un mecanismo que podría prevenir los efectos deletéreos mediados por la activación de linfocitos T CD8+ (Myers y col., 2009; Fogle y col., 2010).

Nuestros resultados demuestran que la modulación de la respuesta inmune es muy diferente entre el virus infeccioso y el inactivado en el modelo murino. El VFA infecta a las CDs murinas induciendo la inmunosupresión temprana y transitoria de la respuesta. Luego de este primer encuentro con el virus activo, las CDs son capaces de inducir proliferación de los linfocitos T y activar la respuesta inmune adaptativa y así generarse la memoria inmunológica. De hecho, la generación de altos títulos de anticuerpos específicos de larga vida requiere de la inducción de memoria inmunológica (López y col., 1990; Wigdorovitz y col., 1997).

Por el contrario, el virus inactivado induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, TNF- α e IL-6, y finalmente un estado regulatorio que inhibe los mecanismos efectores, lo cual podría explicar parcialmente, porque la vacuna que

utiliza partículas inactivadas, es efectiva en la neutralización viral, pero los títulos de anticuerpos rápidamente declinan y el animal debe ser re-vacunado para mantener altos títulos de anticuerpos.

Creemos en síntesis, que los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de Tesis, podrían constituir la base inmunológica que explicaría las diferencias cualitativas en la respuesta inmune entre la partícula infectiva y la inactiva. Asimismo, refuerzan los resultados previos obtenidos en el modelo murino, en el sentido que la respuesta inducida por la infección con el VFA se desarrolla en dos etapas bien diferenciadas, las cuales a su vez difieren dependiendo del estado de activación del virus, permitiéndonos diseñar un modelo hipotético de acción del VFA (Esquema 1).



Esquema 1: Diferencias en la respuesta temprana y tardía contra el VFA y el VFAi.

Respuesta contra el VFA: en la etapa temprana de la infección se produce secreción de IFN- α en sangre periférica que conduce a la inhibición de la respuesta de células T, sin embargo no afectaría a las CDs. En la respuesta tardía, la infección produce la muerte de las CDsp en bazo, además de altos niveles de IFN- γ e IL-10, que conducen a la activación de la respuesta linfoproliferativa.

Respuesta contra VFAi: La inoculación de VFAi incrementa la cantidad de CDsp en bazo, además de la inducción de altos niveles de IL-10 producida por las CDs, generando la activación de un perfil regulatorio con inhibición de la respuesta efectora.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Tanto la infección como la inmunización con VFA disminuyen la expresión de las moléculas del CMH clase II en las CDs esplénicas mientras que no modifican los niveles de expresión de la molécula CD86, indicando una marcada inhibición de la maduración de estas células,
- El virus infeccioso produce la disminución de los distintos subtipos de CDs, incluyendo la disminución de la subpoblación de CDsp de bazo, posiblemente este fenómeno esté dado por la inducción de muerte celular y/o la leve pero significativa secreción de IFN- α ,
- La infección induce una temprana secreción de IFN- α posiblemente por células distintas a las CDsp,
- El virus inactivado provoca aumento de las CDsp, y genera un perfil de citoquinas netamente proinflamatorio (IL-6 y TNF- α),
- El VFAi induciría CDs inmaduras secretoras de IL-10, capaces de activar LT regulatorios, induciendo un estado regulatorio que suprimiría los mecanismos efectores de la respuesta inmune a largo plazo,
- La rápida inmunosupresión inducida por el virus infeccioso, sería transitoria, ya que posteriormente las CDs serían capaces de inducir linfoproliferación y activar la respuesta inmune adaptativa,

Nuestros resultados demuestran que la respuesta disparada frente a la infección es diferente a la inducida por la inmunización atendiendo a las poblaciones

reclutadas y los perfiles de citoquinas inducidos. Lo cual modula diferencialmente la respuesta inmune adaptativa.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aandahl EM, Quigley MF, Moretto WJ, Moll M, Gonzalez VD, Sönerborg A, Lindbäck S, Hecht FM, Deeks SG, Rosenberg MG, Nixon DF, Sandberg JK. 2004. Expansion of CD7 (low) and CD7 (negative) CD8 T-cell effector subsets in HIV-1 infection: correlation with antigenic load and reversion by antiretroviral treatment. *Blood* 104(12):3672-8.
- Abbas AK, Lichtman AH. 2004. Células y tejidos del sistema inmune. En *Inmunología celular y molecular*. Editado por: Elsevier Science. Madrid/España. 16-40
- Adema GJ. 2009. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol. Lett.* 122:128-30.
- Agrawal S, Gupta S, Agrawal A. 2010. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *PLoS One* 5(10):e13418.
- Alexandersen S, Oleksiewicz MB, Donaldson AI. 2001. The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 82:747-55.
- Alexandersen S, Quan M, Murphy C, Knight J, Zhang Z. 2003. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.* 129:268-82.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-8.
- Ardavin C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3:582-90.
- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Brière F, Trinchieri G. 2001. Mouse type 1 IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature Immunol.* 2(12):1144-50.
- Bablanian GM, Grubman MJ. 1993. Characterization of the foot-and-mouth disease virus 3C protease expressed in *Escherichia coli*. *Virology* 197:320-7.
- Bachmann MF, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1997. Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:640-5.
- Bachmann M, Kopf M. 2002. Balancing protective immunity and immunopathology. *Curr. Opin. Immunol.* 14:413-9.

- Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17:341-52.
- Banchereau J, Steiman RM. 1998. DCs and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52.
- Barchet W, Cella M, Colonna M. 2005. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.* 17:253-61.
- Bartz H, Turkel O, Hoffjan S, Rothoef T, Gonschorek A, Schauer U. 2003. Respiratory syncytial virus decreases the capacity of myeloid dendritic cells to induce interferon-gamma in naive T cells. *Immunology.* 109:49-57
- Battegay M. 1996. Immunity to hepatitis C virus: a further piece of the puzzle. *Hepatology* 24:961-3.
- Bautista EM, Ferman GS, Golde WT. 2003. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92:61-73.
- Bautista EM, Ferman GS, Gregg D, Brum MC, Grubman MJ, Golde WT. 2005. Constitutive expression of alpha interferon by skin dendritic cells confers resistance to infection by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 79:4838-47.
- Becker T, Hartl FU, Wieland F. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158:1277-85.
- Belz GT, Heath WR, Carbone FR. 2002. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol. Cell Biol.* 80:463-8.
- Belz GT, Smith CM, Eitcner D, Shortman K, Karupiah G, Carbone FR et al. 2004. Conventional CD8 α + dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* 172:1996-2000.
- Bender A, Albert M, Reddy A, Feldman M, Sauter B, Kaplan G, Hellman W, Bhardwaj N. 1998. The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells. *Immunobiology* 198(5):552-67.
- Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, Mason PW, Baxt B. 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* 69:2664-6.
- Bilsborough J, George TC, Norment AM, Viney JL. 2003. Mucosal CD8 α + DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108(4):481-92.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189-220.

- Biron CA, 2010. Expansion, maintenance, and memory in NK and T cells during viral infections: responding to pressures for defense and regulation. *PLoS Pathog.* 6(3):e1000816.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196:1627-38.
- Borca MV, Fernandez FM, Sadir AM, Braun M, Schudel AA. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59:261-7.
- Borca MV, Garmendia AE, Baxt B, Moore DM, Srikumaran S, Morgan DO. 1993. Cross-reactive idiotopes among anti-foot and mouth disease virus neutralizing antibodies. *Immunology* 79:368-74.
- Brown F, Mowat N. 2003. Control of foot-and-mouth disease by vaccination. *Vet. Rec.* 152(12):376.
- Burns W, Billups LC, Notkins AL. 1975. Thymus dependence of viral antigens. *Nature* 256:654-6.
- Burrows R. 1968. The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J. Hyg. (Lond)* 66:633-40.
- Burrows R, Mann JA, Garland AJ, Greig A, Goodridge D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 91:599-609.
- Callis JJ. 1979. Foot-and-mouth disease--a world problem. *Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.* 261-9.
- Campbell DJ, Koch MA. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11:119-30.
- Cao X, Bergmann IE, Fullkrug R, Beck E. 1995. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 69:560-3.
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, Sadir AM, Gomez N, Salinas J, Escibano JM, Borca MV. 1998. Protective immune response to Foot and Mouth Disease Virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J. Virol.* 72(2):1688-90.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross- linking. *J. Exp. Med.* 180:1263-72.

- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-7.
- Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821-9.
- Childerstone AJ, Cedillo-Baron L, Foster-Cuevas M, Parkhouse RM. 1999. Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 80:663-9.
- Chinsangaram J, Koster M, Grubman MJ. 2001. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 75:5498-503.
- Chinsangaram J, Moraes MP, Koster M, Grubman MJ. 2003. Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J. Virol.* 77:1621-5.
- Clarke BE, Sangar DV. 1988. Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J. Gen. Virol.* 69(9):2313-25.
- Clarke P, Tyler KL. 2009. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:144-55.
- Colino J, Shen Y, Snapper CM. 2002. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* 195:1-13.
- Colonna M, Krug A, Cella M. 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14(3):373-9.
- Collen T, Pullen L, Doel TR. 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* 70(2):395-403.
- Cottral GE, Bachrach HL. 1968. Food-and-mouth disease viremia. *Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.* 72:383-99.
- Curry S, Abrams CC, Fry E, Crowther JC, Belsham GJ, Stuart DI, King AM. 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Virol.* 69:430-8.
- Curry S, Fry E, Blakemore W, Abu-Ghazaleh R, Jackson T, King A, Lea S, Newman J, Stuart D. 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 71:9743-52.

- Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naïve CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* 197(9):1141-51.
- Dalod M, Salazar-Mather, TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin- Paturel C, Briere F, Trinchieri G, Biron CA. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* 195:517-28.
- De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, et al. 2007. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol.* 37:445-5.
- de Waal Malefyt R. 1998. Interleukin-10. In *Cytokines*. A Mire-Sluis and R. Thorpe, editors, London.
- De Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J. Virol.* 80(7):3477-86.
- Diaz-San Segundo F, Salguero FJ, de Avila A, Fernandez de Marco MM, Sanchez-Martin MA, Sevilla N. 2006. Selective lymphocyte depletion during early stage of the immunoresponse to foot-and-mouth disease virus infection in swine. *J. Virol.* 80:2369-79.
- Diaz-San Segundo F, Rodriguez-Calvo T, de Avila A, Sevilla N. 2009. Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10. *PLoS ONE* 4:e5659.
- Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C. 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424(6946):324-8.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-31.
- Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B. 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73(10):3671-5.
- Domínguez PM, Ardavín C. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* 234:90-104.
- Donaldson AI, Ferris NP. 1980. Sites of release of airborne foot-and-mouth disease virus from infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 29:315-9.
- Donaldson AI, Gibson CF, Oliver R, Hamblin C, Kitching RP. 1987. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Res. Vet. Sci.* 43:339-46.

- D'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191(10):1661-74.
- Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17(3):251-63.
- Dubois B, Barthelemy C, Durand I, Liu YJ, Caux C, Briere F. 1999. Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J. Immunol.* 162:3428-36.
- Dubois B, Lamy PJ, Chemin K, Lachaux A, Kaiserlian D. 2001. Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol.* 214(2):173-83.
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Maradei E, Periolo O, Smitsaart E, Borca MV, Sadir AM. 2000. A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against Foot and mouth Disease. *Vet. Res. Comm.* 24: 261-73.
- Eble PL., Bouma A, de Bruin MG, van Hemert-Kluitenberg F, van Oirschot JT, Dekker A. 2004. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 22:1372-8.
- Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H. 2005. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.* 174(7):4407-14.
- Ellard FM, Drew J, Blakemore WE, Stuart DI, King AM. 1999. Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Gen. Virol.* 80(8):1911-8.
- Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, Chahroudi A, Cox WI, Steinman RM, Bhardwaj N. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* 163(12):6762-8.
- Escarmís C, Lázaro E, Arias A, Domingo E. 2008. Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J. Mol. Biol.* 376:367-79.
- Estes JD, Li Q, Reynolds MR, Wietgreffe S, Duan L, Schacker T, Picker LJ, Watkins DI, Lifson JD, Reilly C, Carlis J, Haase AT. 2006. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 193(5):703-12.
- Falk MM, Sobrino F, Beck E. 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 66:2251-60.

- Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Briere F. 1998. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* 48:563-70.
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L., Melioli G, Steinman RM, Munz C. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195(3):343-51.
- Fernandez FM, Borca MV, Sadir AM, Fondevila N, Mayo J, Schudel AA. 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.* 12:15-24.
- Fogle JE, Mexas AM, Tompkins WA, Tompkins MB. 2010. CD4 (+) CD25 (+) T regulatory cells inhibit CD8 (+) IFN-gamma production during acute and chronic FIV infection utilizing a membrane TGF-beta-dependent mechanism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26:201-16.
- Franco MA, Greenberg HB. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 238:169-79.
- Frick JS, Grünebach F, Autenrieth IB. 2010. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:19-24.
- Fujimoto N, Ishida H, Nakamura I, Ogasawara K, Itoh Y. 2003. Quantities of interleukin-12p40 in mature CD8alpha negative dendritic cells correlate with strength of TCR signal and determine Th cell development. *Microbiol. Immunol.* 47: 1017-24
- Fukaya T, Takagi H, Taya H, Sato K. 2011. DCs in immune tolerance in steady-state conditions. *Methods Mol. Biol.* 677:113-26.
- Galluzzi L, Kepp O, Morselli E, Vitale I, Senovilla L, Pinti M, Zitvogel L, Kroemer G. 2010. Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *J. Intern. Med.* 267:526-42.
- Garcia-Valcarcel M, Doel T, Collen T, Ryan M, Parkhouse RM. 1996. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 77(4):727-35.
- Garmendia AE, Morgan DO, Baxt B. 1989. Foot-and-mouth disease virus-neutralizing antibodies induced in mice by anti-idiotypic antibodies. *Immunology* 68:265-71.
- Geering W, Forman A, Nunn M. 1995. Exotic diseases of animals. Edited by A. G. P. Services. Canberra.
- Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 276:31-54.

- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195(3):327-33.
- Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski L, Gupta P, Rinaldo C. 1996. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J. Immunol.* 157:4028-36.
- Goeckeritz BE, Flora M, Witherspoon K, Vos Q, Lees A, Dennis GJ, Pisetsky DS, Klinman DM, Snapper CM, Mond JJ. 1999. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *Int. Immunol.* 11(10):1693-700.
- Golde WT, Nfon CK, Toka FN. 2008. Immune evasion during foot-and-mouth disease virus infection of swine. *Immunol. Rev.* 225:85-95.
- Goris N, Maradei E, D'Aloia R, Fondevila N, Mattion N, Perez A, Smitsaart E, Nauwynck HJ, La Torre J, Palma E, De Clercq K. 2008. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the "Protection against Podal Generalisation" test. *Vaccine* 26(27-28):3432-7.
- Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* 72(4):2733-7.
- Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumfheller C, Siegal FP, Steinman RM. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7669-74.
- Gregg DA, Schlafer DH, Mebus CA. 1995. African swine fever virus-infection of skin-derived dendritic cells in-vitro causes interference with subsequent foot-and-mouth disease virus-infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:44-51.
- Grubman MJ, Robertson BH, Morgan DO, Moore DM, Dowbenko D. 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 50:579-86.
- Grubman MJ, Baxt B. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:465-93.
- Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, Pena L, de los Santos T. 2008. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53:8-17.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-67.

- Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ. 2009. Signalling pathways leading to IFN- α production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J. Intern. Med.* 265:43-57.
- Gulbahar MY, Davis WC, Guvenc T, Yarim M, Parlak U, Kabak YB. 2007. Myocarditis associated with foot-and-mouth disease virus type O in lambs. *Vet. Pathol.* 44:589-99.
- Guzman E, Taylor G, Charleston B, Skinner MA, Ellis SA. 2008. An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. *J. Gen. Virol.* 89:667-75.
- Guzylack-Piriou L, Bergamin F, Gerber M, McCullough KC, Summerfield A. 2006. Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *Eur. J. Immunol.* 36:1674-83
- Harwood LJ, Gerber H, Sobrino F, Summerfield A, McCullough KC. 2008. Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *J. Virol.* 82:6379-94.
- Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H. 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat. Rev. Immunol.* 6:231-43.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194:769-79.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-9.
- Hilleman MR. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(2):14560-6.
- Hiltbold EM, Roche PA. 2002. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 14(1):30-5.
- Hindiyeh M, Li QH, Basavappa R, Hogle JM, Chow M. 1999. Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J. Virol.* 73:9072-9.
- House JA, Mebus CA. 1998. Foot-and-mouth disease. En *Foreign Animal Diseases*. Editado por C. o. F. A. D. i. t. U. S. A. H. Association. Richmond, VA, USA: Pat Campbell & Associates and Carter Printing Company. 213-224
- Hüsser L, Alves MP, Ruggli N, Summerfield A. 2011. Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. *Virus Res.* 159(1):9-16.

- Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM. 2009. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:1524-9.
- Iwasaki A, Kelsall BL. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 190:229.
- Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, Feng D, Chung E, Pitha PM, Fitzgerald-Bocarsly P. 2003. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc Biol.* 74(6):1125-38.
- Jackson T, Sheppard D, Denyer M, Blakemore W, King AM. 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74:4949-56.
- Jackson T, Mould AP, Sheppard D, King AM. 2002. Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 76:935-41.
- Jackson T, King AM, Stuart DI, Fry E. 2003. Structure and receptor binding. *Virus. Res.* 91:33-46.
- Jacobson MF, Baltimore D. 1968. Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61:77-84.
- Janeway CA Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:7461-8.
- Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19(2):225-34.
- Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. 2005. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr. Dir. Autoimmun.* 8:124-39.
- Jin H, Xiao C, Zhao G, Du X, Yu Y, Kang Y, Wang B. 2007. Induction of immature dendritic cell apoptosis by foot and mouth disease virus is an integrin receptor mediated event before viral infection. *J. Cell Biochem.* 102:980-91.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192:1213-22.
- Juleff N, Windsor M, Lefevre EA, Gubbins S, Hamblin P, Reid E, McLaughlin K, Beverley PCL, Morrison IW, Charleston B. 2009. Foot-and-Mouth Disease Virus Can Induce a Specific and Rapid CD4+ T-Cell-Independent Neutralizing and Isotype Class-Switched Antibody Response in Naïve Cattle. *Journal of Virology* 83(8):3626-36.
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 192:219-26.

- Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20:561-7.
- Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Horii M. 1999. Impaired all stimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J. Immunol.* 162:5584-91.
- Kawai T, Akira S. 2007. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19:24-32.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11:373-84.
- Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1:327-39.
- Kearney JF. 2005. Innate-like B cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:377-83.
- Keir ME, Sharpe AH. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 204:128-43.
- Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P. 2011. NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(5):257-76.
- Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N. 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27:3704-18.
- Klump W, Marquardt O, Hofschneider PH. 1984. Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3351-5.
- Knowles NJ, Samuel AR, Davies PR, Kitching RP, Donaldson AI. 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet. Rec.* 148:258-9.
- Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, Janssen E, Hoebe K. 2009. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 113(26):6593-602.
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21:107-19.
- Ku BK, Kim SB, Moon OK, Lee SJ, Lee JH, Lyoo YS, Kim HJ, Sur JH. 2005. Role of apoptosis in the pathogenesis of Asian and South American foot-and-mouth disease viruses in swine. *J. Vet. Med. Sci.* 67:1081-108.

- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 30:16-34.
- Lanier LL. 1998. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:359-93.
- Larcher C, Nguyen VA, Furhapter C, Ebner S, Solder E, Stossel H, Romani N, Sepp N. 2005. Human herpesvirus-8 infection of umbilical cord-blood-derived CD34+ stem cells enhances the immunostimulatory function of their dendritic cell progeny. *Exp. Dermatol.* 14(1):41-9.
- Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, Sastry KJ, Yao Q, Estes MK. 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* 406:1-11.
- Lee BO, Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Hartson L, Makris M, Sprague F, Lund FE, Randall TD. 2005. CD4 T cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *J. Immunol.* 175:5827-38.
- Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA. 2009. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J. Exp. Med.* 206:2235-51.
- Lee SH, Biron CA. 2010. Here today—not gone tomorrow: roles for activating receptors in sustaining NK cells during viral infections. *Eur. J. Immunol.* 40:923-32.
- Leforban Y. 1999. Prevention measures against foot-and-mouth disease in Europe in recent years. *Vaccine* 17:1755-9.
- León B, Martínez del Hoyo G, Parrillas V, Vargas HH, Sánchez-Mateos P, Longo N, López-Bravo M, Ardavín C. 2004. Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood* 103:2668-76.
- LeRoith T, Hammond S, Tood SM, Ni Y, Cecere T, Pelzer KD. 2011. A modified live PPRSV vaccine and the pathogenic parent strain induce regulatory T cells in pigs naturally infected with micoplasma. *Veterinary Imm. Immunopath.* 140:312-6.
- Liu K, Nussenzweig MC. 2010. Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 40:2099-102.
- Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and crossregulation. *Nat. Immunol.* 2:585-9.
- López-Bravo M, Ardavín C. 2008. In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. *Immunity* 29:343-51.

- Lopez OJ, Sadir AM, Borca MV, Fernandez FM, Braun M, Schudel AA. 1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24:313-21.
- Lore K, Sonnerborg A, Brostrom C, Goh LE, Perrin L, McDade H, Stellbrink HJ, Gazzard B, Weber R, Napolitano LA, van Kooyk Y, Andersson J. 2002. Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 16:683–92.
- Ludewig B, Maloy KJ, Lopez-Macias C, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2000. Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 30:185-96
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198:513-20.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:5598-603.
- MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. 2002. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J. Infect. Dis.* 185(6):720-7.
- Mahanty S, Hutchinson K, Agarwal S, McRae M, Rollin PE, Pulendran B. 2003. Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J. Immunol.* 170(6):2797-801.
- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, M Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587-92.
- Martin F, Kearney JF. 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol. Rev.* 175:70-9.
- Martin F, Kearney JF. 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13:195-201.
- Martín P, Del Hoyo GM, Anjuère F, Arias CF, Vargas HH, Fernández-L A, Parrillas V, Ardavín C. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8α+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100(2):383-90.
- Mason PW, Rieder E, Baxt B. 1994. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:1932-6.

- Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. 2003. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus. Res.* 91:9-32.
- Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Backstrom BT, Doorbar J, Hibma M. 2003. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J. Virol.* 77(15):8378-85.
- McCullough KC, Crowther JR, Butcher RN, Carpenter WC, Brocchi E, Capucci L, De Simone F. 1986. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology* 58:421-8.
- McCullough KC, Parkinson D, Crowther JR. 1988. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 65:187-91.
- McGuirk P, McCann C, KH Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 195(2):221-31.
- McVicar JW, Suttmoller P. 1976. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg. (Lond)* 76:467-81.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:94.
- Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3):255-8.
- Mikloska Z, Bosnjak L, Cunningham AL. 2001. Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 75(13):5958-64.
- Mills K. 2004. Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection?. *Nature Reviews Immunology* 4:841-56.
- Mittelbrunn M, Martínez del Hoyo G, López-Bravo M, Martín-Cofreces NB, Scholer A, Hugues S, Fetler L, Amigorena S, Ardavin C, Sánchez-Madrid F. 2009. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood* 113:75-84.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765.
- Moraes MP, Chinsangaram J, Brum MCS, Grubman MJ. 2003. Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine* 22:268-79

- Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. 1980. Vaccination against foot-and-mouth disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 47:169-78.
- Morrow G, Slobedman B, Cunningham AL, Abendroth A. 2003. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J. Virol.* 77(8):4950-9.
- Mosser DM, Zhang X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 226:205-18.
- Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. 2002. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 99:2913-21.
- Mulcahy G, Gale C, Robertson P, Iyisan S, DiMarchi RD, Doel TR. 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8:249-56.
- Myers L, Messer RJ, Carmody AB, Hasenkrug KJ. 2009. Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8+ T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *J. Immunol.* 1:1636-43.
- Nagendrakumar SB, Srinivasan VA, Madhanmohan M, Yuvaraj S, Parida S, Di Nardo A, Horsington J, Paton DJ. 2011. Evaluation of cross-protection between O1 Manisa and O1 Campos in cattle vaccinated with foot-and-mouth disease virus vaccine incorporating different payloads of inactivated O1 Manisa antigen. *Vaccine* 29(10):1906-12.
- Naldi A, Carneiro J, Chaouiya C, Thieffry D. 2010. Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput. Biol.* 6(9):e1000912.
- Neuenhahn M, Busch DH. 2007. Unique functions of splenic CD8 α + dendritic cells during infection with intracellular pathogens. *Immunology Letters* 114, 66-72.
- Nfon CK, Ferman GS, Toka FN, Gregg D, Golde WT. 2008. Interferon- α production by swine dendritic cells is inhibited during acute infection with foot-and-mouth disease virus. *Virol. Immunol.* 21:68-78.
- Nfon CK, Toka FN, Kenney M, Pacheco JM, Golde WT. 2010. Loss of plasmacytoid dendritic cell function coincides with lymphopenia and viremia during foot-and-mouth disease virus infection. *Viral. Immunol.* 23:29-41.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN- α beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169:4279-87.
- O'Connell PJ, Son YI, Giermasz A, Wang Z, Logar AJ, Thomson AW, Kalinski P. 2003. Type-1 polarized nature of mouse liver CD8 α - and CD8 α dendritic cells:

tissue-dependent differences offset CD8alpha-related dendritic cell heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* 33:2007-13.

- O'Donnell V, Pacheco JM, LaRocco M, Burrage T, Jackson W, Rodriguez LL, Borca MV, Baxt B. 2011. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology* 410(1):142-50.
- Oleksiewicz MB, Donaldson AI, Alexandersen S. 2001. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J. Virol. Methods* 92:23-35.
- Oliver AM, Martin F, Kearney JF. 1999. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* 162:7198-207.
- Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Geffner JR, Sadir AM, Lopez OJ. 2005. Impairment of thymus-dependent responses by murine dendritic cells infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol.* 175(6):3971-9.
- Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Zamorano PI, Sadir AM, Geffner JR, Lopez OJ. 2007. The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. *J. Virology* 81:9357-67.
- Paul WE. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Pejawar SS, Parks GD, Alexander-Miller MA. 2005. Abortive versus productive viral infection of dendritic cells with a paramyxovirus results in differential upregulation of select costimulatory molecules. *J. Virol.* 79:7544-57.
- Pérez-Filgueira DM, Berinstein A, Smitsaert E, Borca MV, Sadir AM. 1995. Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. *Vaccine* 13:953-60.
- Piatti, PG, Berinstein A, Lopez OJ, Borca MV, Fernandez FM, Schudel AA, Sadir AM. 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* 72(7):1691-4.
- Plotnicky-Gilquin H, Cyblat D, Aubry JP, Delneste Y, Blaecke A, Bonnefoy JY, Corvaia N, Jeannin P. 2001. Differential effects of parainfluenza virus type 3 on human monocytes and dendritic cells. *Virology.* 285:82-90.
- Pollara G, Speidel K, Samady L, Rajpopat M, McGrath Y, Ledermann J, Coffin RS, Katz DR, Chain B. 2003. Herpes simplex virus infection of dendritic cells: balance among activation, inhibition, and immunity. *J. Infect. Dis.* 187:165-78.
- Pollara G, Kwan A, Newton PJ, Handley ME, Chain BM, Katz DR. 2005. Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? *Int. J. Exp. Pathol.* 86:187.

- Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78(3):389-98.
- Quattrocchi V, Langellotti C, Pappalardo JS, Olivera V, Di Giacomo S, Mongini C, Waldner C, Zamorano P. 2008. Development of a fast release immunomodulated vaccine against foot-and-mouth disease virus. Induced immunity. The European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (EuFMD). October, meeting abstract Sicily.
- Quattrocchi V, Langellotti C, Pappalardo JS, Olivera V, Di Giacomo S, van Rooijen N, Mongini C, Waldner C, Zamorano PI. 2011. Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. *Antiviral Res.* 92(2):262-70
- Racaniello VR. 2001. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. En *Fields Virology*. Editado por Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus S E. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 165.
- Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5:617-28.
- Reid E, Juleff N, Gubbins S, Prentice H, Seago J, Charleston B. 2011. Bovine plasmacytoid dendritic cells are the major source of type-1 interferon in response to foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 85:4297-08.
- Reis e Sousa C. 2006. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptative immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16:21-5.
- Rigden RC, Carrasco CP, Summerfield A, McCullough KC. 2002. Macrophage phagocytosis of foot-and-mouth disease virus may create infectious carriers. *Immunology* 106:537-48.
- Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, Zucchini N, Rupp B, Ruzsics Z, Sacher T, Tomasello E, Vivier E, Koszinowski UH, Dalod M. 2007. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* 3(8):e123.
- Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J. 1998. The evolution of the type I interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:805-16.
- Robertson BH, Grubman MJ, Weddell GN, Moore DM, Welsh JD, Fischer T, Dowbenko DJ, Yansura DG, Small B, Kleid DG. 1985. Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J. Virol.* 54:651-60.
- Robinson L, Windsor M, McLaughlin K, Hope J, Jackson T, Charleston B. 2011. Foot-and-Mouth Disease Virus Exhibits an Altered Tropism in the Presence of Specific Immunoglobulins, Enabling Productive Infection and Killing of Dendritic Cells. *J. Virol.* 85(5):2212-23.

- Rueckert RR, Wimmer E. 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* 50:957-9.
- Rueckert RR. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication. En *Field's Virology*. Editado por B. N. Fields, D. M. Knipe y P. H. Howley. Philadelphia/New York: Lippincott-Raven. 609-654
- Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, Mariotti A, Capoluongo E, Contemi AM, Ameglio F, Curti A, De Ritis DG, Voso MT, Perillo A, Mancuso S, Scambia G, Lemoli RM, Leone G. 2004. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. *Eur. J. Immunol.* 34:1291-302.
- Ryan MD, King AM, Thomas GP. 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J. Gen. Virol.* 72(11):2727-32.
- Saiz M, Nunez JI, Jimenez-Clavero MA, Baranowski E, Sobrino F. 2002. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect.* 4:1183-92.
- Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 22: 531-62.
- Salguero FJ, Sanchez-Martin MA, Diaz-San Segundo F, de Avila A, Sevilla N. 2005. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology* 332:384-96.
- Salio M, Cella M, Suter M, Lanzavecchia A. 1999. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 29(10):3245-53.
- Sallustro F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400.
- Sallustro F, Lanzavecchia A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189:611-14.
- Sangar DV, Newton SE, Rowlands DJ, Clarke BE. 1987. All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs. *Nucleic. Acids. Res.* 15:3305-15.
- Sanz-Parra A, Sobrino F, Ley V. 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79(3):433-6.
- Satoguina J, Mempel M, Larbi J, Badusche M, Loliger C, Adjei O, Gachelin G, Fleischer B, Hoerauf A. 2002. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect.* 4(13):1291-300.

- Scharton TM, Scott P. 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 178:567-77.
- Sellers RF, Parker J. 1969. Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg. (Lond)* 67:671-7.
- Sellers RF, Herniman KA, Mann JA. 1971. Transfer of foot-and-mouth disease virus in the nose of man from infected to non-infected animals. *Vet. Rec.* 89:447-9.
- Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, Manie S, Le Deist F, Azocar O, Hanau D, Fischer A, Roubourdin-Combe C. 2000. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J. Immunol.* 164(4):1753-60.
- Shrivastava S, Raychoudhuri A, Steele R, Ray R, Ray RB. 2011. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology* 53:406-14.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-7.
- Song H, Wang Z, Zheng D, Fang W, Li Y, Liu Y, Niu Z, Qiu B. 2005. A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. *Biotechnol. Lett.* 27(21):1669-74.
- Steinman RM. 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111:675-97.
- Steinman RM, Hemmi H. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 311:17-58.
- Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419-26.
- Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25:373-81.
- Strebel K, Beck E. 1986. A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 58:893-9.
- Stumbles PA. 1999. Regulation of T helper cell differentiation by respiratory tract dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 77:428.
- Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Schaub A, Carrasco CP, Tache V, Charley V. 2003. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110:440-9.
- Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Harwood L, McCullough KC. 2009. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: current understanding and future directions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:205-10

- Szabo G, Dolganiuc A. 2008. The role of plasmacytoid dendritic cell-derived IFN alpha in antiviral immunity. *Crit. Rev. Immunol.* 28:61-94.
- Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. 1996. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183(2):403-11.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197(7):823-9.
- Tomlins C, Storey A. 2010. Cutaneous HPV5 E6 causes increased expression of Osteoprotegerin and Interleukin 6 which contribute to evasion of UV-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 31:2155-64.
- Tough DF. 2004. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leukemia and Lymphoma* 45:257-64.
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol.* 3:133-46.
- Tu L, Fang TC, Artis D, Shestova O, Pross SE, Maillard I, Pear WS. 2005. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J. Exp. Med.* 202(8):1037-42.
- Turner BC, Hemmila EM, Beauchemin N, Holmes KV. 2004. Receptor-dependent coronavirus infection of dendritic cells. *J. Virol.* 78(10):5486-90.
- Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, Cunningham AL. 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 3(10):975-83.
- Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. 2007. The receptor of the type I interferon family. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 316:71-95.
- Vabulas RM, Wagner H, Schild H. 2002. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270:169-84.
- Vakharia VN, Devaney MA, Moore DM, Dunn JJ, Grubman MJ. 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* 61:3199-207.
- van Vlijmen H, Curry S, Schaefer M, Karplus M. 1998. Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J. Mol. Biol.* 275:295-308.
- Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, Shapira I, Hareuveni M, Ben-Tal O, Kutikov I, Gill O, Mevorach D. 2002. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp. Med.* 196(12):1553-61.

- Villadangos JA, Schnorrer P, Wilson NS. 2005. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol. Rev.* 207:191-205.
- Villadangos JA, Schnorrer P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7(7):543-55.
- Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC. 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 77(24):13288-300.
- Vos Q, Lees A, Wu Z, Snapper CM, Mond JJ. 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* 176:154-70.
- Wakim LM, Bevan MJ. 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471(7340):629-32.
- Wherry EJ, Day CL, Draenert R, Miller JD, Kiepiela P, Woodberry T, Brander C, Addo M, Klenerman P, Ahmed R, Walker BD. 2006. HIV-specific CD8 T cells express low levels of IL-7R α : implications for HIV-specific T cell memory. *Virology* 353(2):366-73.
- Wigdorovitz A, Zamorano P, Fernandez FM, Lopez O, Prato-Murphy M, Carrillo C, Sadir AM, Borca MV. 1997. Duration of the foot-and-mouth disease virus antibody response in mice is closely related to the presence of antigen-specific presenting cells. *J. Gen. Virol.* 78(5):1025-32.
- Windsor MA, Carr BV, Bankowski B, Gibson D, Reid E, Hamblin P, Gubbins S, Juleff N, Charleston B. 2011. Cattle remain immunocompetent during the acute phase of foot-and-mouth disease virus infection. *Veterinary Research* 42:108-19.
- Wortis HH, Berland R. 2001. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J. Immunol.* 166:2163-6.
- Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. 1998. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol.* 161:1313-9.
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169(12):6668-72.
- Yoneyama M, Fujita T. 2010. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity *Rev. Med. Virol.* 20:4-22.
- Zhang Z, Bashiruddin JB, Doel C, Horsington J, Durand S, Alexandersen S. 2006. Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Comp. Pathol.* 134:56-62.