

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de poblaciones celulares del linaje monocito-  
macrófago en órganos linfoides porcinos y su permisividad a  
la infección por el virus del síndrome respiratorio y  
reproductivo porcino (PRRSv)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Teresa Fernández Caballero**

Director

**Francisco Javier Domínguez Juncal**

Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Tesis Doctoral**

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES  
DEL LINAJE MONOCITO-MACRÓFAGO EN ÓRGANOS  
LINFOIDES PORCINOS Y SU PERMISIVIDAD A LA  
INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME  
RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRS<sub>v</sub>)**

Memoria presentada por  
**Teresa Fernández Caballero**  
para optar al grado de Doctor

Director: Dr. Francisco Javier Domínguez Juncal

Madrid, 2019





U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. \_\_\_\_\_,  
estudiante en el Programa de Doctorado \_\_\_\_\_,  
de la Facultad de \_\_\_\_\_ de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

\_\_\_\_\_

y dirigida por: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Fdo.:  \_\_\_\_\_

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.





El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biotecnología del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y financiado por fondos del Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos AGL2012-31556 y AGL2015-66187-P). Teresa Fernández Caballero ha sido beneficiaria de la beca BES-2013-066193 del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad.

*"No fracasé, sólo descubrí 999 maneras de cómo no hacer una bombilla."*

Thomas Alva Edison

## **Agradecimientos:**

Aunque parezca increíble, y todavía queden muchos obstáculos hasta la defensa de la tesis, ha llegado ese esperado momento en que la fase de escritura está ya casi acabada. Así que no me puedo olvidar de agradecer a toda la gente que ha estado presente y me ha ayudado de una forma u otra a lo largo de estos años.

En primer lugar, como corresponde, a mi director de tesis, Javier, porque siempre has estado ahí cumpliendo tu papel en la dirección, tanto en la fase experimental como en la escritura, siendo tan exquisito y detallista que no se te escapa un error, con tu disposición de ayuda, disponibilidad y humildad que te caracteriza. Por supuesto a los demás miembros laboratorio. A Ángel, por darnos ideas y valoraciones en algunos experimentos de la fase experimental y por haber revisado muchas partes de la escritura. A Fernando, porque le dabas un toque personal a esos días en el animalario y esos momentos ya de vuelta en el laboratorio procesando el pulmón con tus comentarios y debates sobre la vida y la política, con esa actitud entre irónica y sarcástica, y que se ha echado en falta tras tu jubilación. A Conchi, por tu ayuda también en tantas idas conjuntas al animalario, por aportar siempre ideas pragmáticas a los experimentos, y por tus charlas y temas variados en la comida de arte, historia, cocina, política y ..... vida en general. A Belén especialmente, porque eres una de las mejores profesionales que conozco además de una gran persona, porque he recurrido a ti tantas veces, sabes todos los protocolos y donde está todo en el laboratorio, además de razonar el por qué de cada paso y aportar ideas nuevas en caso de problemas. Siempre estás dispuesta a ayudar y tienes ese "sello de garantía" en cada cosa que haces.... y por esos momentos de relax en los cafés del mediodía. A María, gracias por hacer de "profe" cuando entré en el laboratorio enseñándome tanto de los siglecs, PRRSv... y por ser un torbellino de alegría y buen rollo. A Zoraida, por el buen acogimiento cuando llegué al laboratorio e intentar transmitirme todo lo que habías aprendido, y porque ahora te comprendo perfectamente sabiendo que a veces una retirada a tiempo es una victoria. A Elena, por todo tu trabajo diligente y silencioso preparando reactivos, titulando anticuerpos..... También a Paloma y a los dos últimos fichajes, Tere y Elvira, que le disteis un toque de vitalidad al laboratorio con vuestra llegada, y siempre tenéis buena disponibilidad y consejos. A Álvaro, aunque tu estancia en el laboratorio fuese corta, dejaste huella como trabajador y persona, y dos años más tarde te puedo seguir preguntando dudas existenciales de la tesis y la vida.

A todos los que he tenido la suerte de coincidir en el departamento, empezando por Marga con tu toque realista y sincero, que das siempre unos buenos minutillos de conversación cuando vienes a dejar el material limpio. A Paloma, por esas conversaciones en el cuarto de cultivos, cada una en una cabina, en la que alguna vez me serviste de desahogo para aguantar mis quejas del día a día. A Lucía, el único alma errante tantas tardes por el departamento... A Blanca, que espero que estés teniendo mucha suerte en tu aventura americana... Y a todos los demás miembros del departamento con los que he podido tener tan buenas comidas y cafés y habéis aceptado mi itinerancia entre comer arriba o en la cafetería: María, Andrés, Inma, Estela (gracias por sacarme del INIA en coche alguna noche), Ana, Miguel, Janin....

Además quiero agradecer la excelente oportunidad a nivel laboral y personal que han supuesto las estancias en otros laboratorios. A Virginia Aragón, por aceptarme en su grupo de investigación en el CreSA, aunque los resultados no fuesen tan prometedores y decidiésemos continuar la tesis en otras líneas, aprendí mucho en esos meses sobre técnicas en microbiología y fue una gran experiencia. Gracias a todas las personas del laboratorio, a Nuria Galofré, y a Sergi en especial, todavía recuerdo esa tarde que me ayudaste para que no me dieran las uvas y me quedara casi sin noche de Sant Joan!! A Salva, porque tienes un don especial, después de conversar cinco

minutos en la sala de becarios salía con menos cansancio y una sonrisa, y a Marta Sisteré que tuvimos la bonita oportunidad de compartir momentos ahí y aquí en Madrid en tu estancia posterior.

A Juan José Garrido, por darme la oportunidad de colaborar en esta tesis con pequeñas estancias en su laboratorio de la Universidad de Córdoba. Fueron semanas de intenso aprendizaje y finalmente fructíferas en los resultados, pero de las que además me llevo un recuerdo personal muy bueno. Agradecer a Sara Zaldívar por ser tan buena profesional con una enorme capacidad de organización del trabajo y ayudarme en la interpretación de los resultados. A Ángeles, por ayudarme también en todo con tu paciencia y cariño, y a Júber por tu ayuda también con las qPCR y por ser tan genial. Y a todos los demás, Héctor, Carmen, Natalia, Alicia, Juanma... por vuestra acogida y enseñarme Córdoba!

También quiero agradecer la colaboración con Cinta Prieto siempre que ha sido necesaria, y Javier Martínez que me ilustró en la qPCR de PRRSv con paciencia y buen hacer.

En el terreno personal, a África, gracias por compartir charlas y demás (aunque tengamos muchas quedadas pendientes), y por haber sido ese link con el programa de doctorado respondiéndome siempre a cualquier duda que pudieses solventar. A Ana, por llevarme alguna vez voluntariamente en su coche al terminar su jornada, y a otras personas que han pasado por el INIA, como Andrés y Safia, por las interesantes conversaciones sobre cualquier cosa que nos une a todos los ciudadanos del mundo. Y a Raquel, por estar ahí siempre para una conversación y preguntar sin agobiar.

No me olvido de mi familia, gracias a mis padres por haberme dado la oportunidad de estudiar y formarme con toda libertad, lo cual me ha hecho responsabilizarme de mis buenas o malas decisiones que me han llevado hasta aquí. A mis hermanos, porque sois ese apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, y por vuestra comprensión por haberos tenido más abandonados últimamente entre tantas cosas.

Y ... sobre todo muchas gracias a ti, Michael, que eres mi hogar. Porque todo este último tiempo hubiera sido sin ti, como dice Shakira, "una pésima combinación de mucho estrés y aburrimiento". Y sin embargo, en medio de este año difícil he sido tan feliz en nuestra vida compartida, no importa como vaya el día que cuando llegas por la noche sé que soy la persona más afortunada del mundo. La escritura de la tesis y la incertidumbre del futuro no me han hecho sacar mi mejor yo, pero tú me has querido en todos esos defectos, con tu paciencia y mimos infinitos. Y finalmente a ti, que eres el presente y el futuro, a la bebé en camino, que has sido una preciosa sorpresa formando parte esencial de este último tramo, afrontando juntas las últimas dificultades que quedan. Os quiero y ya somos nuestra pequeña familia.

Y a todas las personas que me hayan ayudado o contribuido positivamente a mi vida de cualquier forma o modo en este período, y no he nombrado por cuestión de espacio u olvido... gracias!!!



## ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>1. El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSv)</b> .....	11
1.1. Clasificación taxonómica y diversidad genética .....	11
1.2. Patogenia y signos clínicos de la enfermedad .....	12
1.3. Modulación de la respuesta inmune innata por PRRSv .....	13
1.4. Estructura del virión y su genoma .....	14
<b>2. Receptores celulares del virus del PRRS</b> .....	15
2.1. Infectividad del virus: ciclo celular y principales receptores implicados en la entrada a la célula .....	15
2.2. CD169 (Sialoadhesina; Siglec 1) .....	16
2.2.1. Estructura y funciones de CD169 .....	16
2.2.2. Interacción de CD169 con PRRSv .....	17
2.3. CD163 .....	18
2.3.1. Estructura y funciones de CD163 .....	18
2.3.2. Interacción de CD163 con PRRSv .....	20
2.4. Interrelación entre CD169, CD163 y PRRSv: apuntes finales .....	23
<b>3. Siglecs</b> .....	24
3.1. Introducción a los siglecs .....	24
3.2. Clasificación de los siglecs .....	24
3.3. Siglecs estudiados en porcino .....	25
3.4. Interacción de siglecs con patógenos sialilados .....	27
<b>4. El Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM): monocitos, macrófagos y células dendríticas</b> .....	28
4.1. Monocitos .....	29
4.1.1. Características generales de los monocitos .....	29
4.1.2. Heterogeneidad de los monocitos en el hombre y el ratón .....	29
4.1.3. Monocitos y migración: moléculas involucradas en reclutamiento y activación celular .....	32
4.1.4. Poblaciones de monocitos en cerdo .....	33
4.2. Macrófagos .....	35
4.2.1. Funciones y orígenes de los macrófagos .....	35

4.2.2. Plasticidad de los macrófagos: macrófagos tipo M1 o M2 .....	35
4.2.3. Los macrófagos de bazo porcino .....	37
4.3. Células dendríticas .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	42
<b>1. Animales</b> .....	43
<b>2. Obtención de células</b> .....	43
2.1. Células mononucleares sanguíneas (PBMC) .....	43
2.2. Macrófagos alveolares .....	44
2.3. Células de médula ósea .....	44
2.4. Células de bazo .....	44
<b>3. Separación de poblaciones celulares</b> .....	45
3.1. Separación magnética de macrófagos CD163 <sup>+</sup> de bazo .....	45
3.2. Separación mediante un citómetro separador (FACS) de los monocitos CD163 <sup>+</sup> y CD163 <sup>-</sup> de médula ósea .....	45
<b>4. Cultivo de células procedentes de médula ósea con factores de crecimiento</b> .....	46
4.1. Cultivo de las células de médula ósea con rpGM-CSF o rhM-CSF .....	46
4.2. Cultivo de las subpoblaciones de monocitos de médula ósea con rhM-CSF .....	46
<b>5. Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSv)</b> .....	47
5.1. Producción del virus .....	47
5.2. Titulación del virus por efecto citopático .....	47
5.3. Titulación del virus por RT-qPCR .....	48
5.3.1. Extracción del RNA .....	48
5.3.2. RT-PCR cuantitativa .....	48
5.4. Purificación y marcaje con biotina del virus .....	49
<b>6. Anticuerpos</b> .....	50
6.1. Producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) .....	51
6.2. Cuantificación de AcMo .....	52
6.3. Purificación de los anticuerpos .....	52
6.4. Marcaje de los anticuerpos .....	53
6.4.1. Marcaje con biotina .....	53
6.4.2. Marcaje con Alexa Fluor 488 .....	53
6.5. Obtención de los anticuerpos policlonales anti-Siglec 3 y anti-Siglec 5 .....	53
<b>7. Citometría de flujo</b> .....	54
7.1. Citometrías multiparamétricas .....	55
7.2. Permeabilización .....	55

7.3. Exclusión de células muertas .....	55
7.4. Adquisición de datos en el citómetro y análisis de los resultados .....	55
<b>8. Técnicas empleadas en el estudio de los macrófagos CD163<sup>+</sup> como dianas de PRRSv</b> .....	<b>56</b>
8.1. Detección de la unión de PRRSv a los siglecs 3 y 5 por ELISA .....	56
8.2. Ensayos de bloqueo con anticuerpos de la unión del virus a la célula y su infección .....	56
8.2.1. Efecto del bloqueo con anticuerpos sobre la unión del virus a la célula .....	57
8.2.2. Efecto del bloqueo con anticuerpos sobre la infección vírica .....	57
<b>9. Técnicas empleadas en el estudio de los monocitos de médula ósea</b> .....	<b>58</b>
9.1. Tinción de May Grünwald-Giemsa .....	58
9.2. Ensayos funcionales .....	59
9.2.1. Generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) .....	59
9.2.2. Ensayos de fagocitosis y procesamiento antigénico .....	60
9.3. Análisis de expresión de TLR y receptores de quimioquinas por RT-qPCR .....	61
9.3.1. Extracción del RNA .....	61
9.3.2. PCR convencional para confirmar la ausencia de DNA genómico .....	61
9.3.3. PCR con transcriptasa inversa .....	62
9.3.4. PCR cuantitativa .....	63
9.4. Producción de citoquinas .....	65
9.4.1. Cultivo de las poblaciones de monocitos con ligandos de TLR .....	65
9.4.2. Evaluación de la concentración de citoquinas por ELISA .....	65
<b>10. Análisis estadístico</b> .....	<b>66</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>Capítulo 1. Estudio del papel de los siglecs en la infección por PRRSv de macrófagos de bazo y células de médula ósea</b> .....	<b>68</b>
<b>1. Los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo como dianas de PRRSv: papel de los siglecs</b> .....	<b>68</b>
1.1. Replicación del virus del PRRS en los macrófagos CD163 <sup>+</sup> de bazo .....	68
1.2. Expresión de CD169, Siglec 3 y Siglec 5 en macrófagos alveolares y macrófagos CD163 <sup>+</sup> de bazo .....	70
1.3. Unión del virus de PRRS a los siglecs 3 y 5 .....	70
1.4. Efecto de los anticuerpos anti-CD169, anti-Siglec 3 y anti-Siglec 5 sobre la unión de PRRSv a los macrófagos y su infección .....	72
<b>2. Expresión de siglecs en células en cultivo procedentes de médula ósea</b> .....	<b>76</b>
2.1. Expresión de siglecs en células de médula ósea diferenciadas con rpGM-CSF sin infectar o infectadas con PRRSv .....	76

2.2. Estudio comparativo de las células de médula ósea cultivadas con rpGM-CSF o rhM-CSF .....	78
<b>Capítulo 2. Interacción del virus del PRRS con las poblaciones de monocitos de médula ósea</b> .....	81
<b>1. Infección por PRRSv de células de médula ósea</b> .....	81
<b>2. Infección por PRRSv de monocitos CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup> de médula ósea</b> .....	82
2.1. Caracterización fenotípica de subpoblaciones de monocitos de médula ósea	82
2.2. Permisividad de los monocitos de médula ósea a la infección por PRRSv .....	86
2.3. Producción de citoquinas por los monocitos de médula ósea en respuesta a la infección .....	88
2.4. Maduración <i>in vitro</i> de los monocitos de médula ósea con rhM-CSF .....	89
2.5. Efecto de la infección por PRRSv sobre el fenotipo de monocitos CD163 <sup>-</sup> de médula ósea .....	90
<b>Capítulo 3. Caracterización fenotípica y funcional de las poblaciones de monocitos de médula ósea</b> .....	93
<b>1. Caracterización fenotípica de las poblaciones de monocitos de médula ósea</b> 93	
1.1. Expresión de receptores de superficie en monocitos sanguíneos y de médula ósea .....	93
1.2. Análisis de la expresión génica de TLR y receptores de quimioquinas .....	95
<b>2. Caracterización funcional de las poblaciones de monocitos de médula ósea</b> 97	
2.1. Producción de citoquinas en respuesta a ligandos de TLR .....	97
2.2. Producción de ROS, endocitosis y procesamiento de antígenos solubles, y fagocitosis de microesferas .....	99
<b>DISCUSIÓN</b> .....	103
<b>CONCLUSIONES</b> .....	120
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	123
<b>ANEXO: PUBLICACIONES</b> .....	146



**SUMMARY:**

The title of this doctoral thesis is "Characterization of monocyte-macrophage lineage cell populations in porcine lymphoid organs and their susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSv) infection." This disease has a high prevalence in the swine industry worldwide, causing large economic losses. The etiologic agent is an RNA virus, PRRSv, that belongs to the genus *Betaartevirus* in the *Arteriviridae* family and based on their genetic differences is divided into two species: PRRSv-1 and PRRSv-2. The virus infects macrophages located in lung and lymphoid organs and it can also replicate *in vitro* in bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and monocyte-derived dendritic cells (MoDC). CD163 and CD169 have been described as the two most important receptors involved in PRRSv entry and replication. CD163 expression seems to be indispensable, while CD169 contribution is not strictly required, as genetically edited pigs that do not express CD169 are susceptible to PRRS disease. One of the main objectives of this thesis is the study of the PRRSv infection (using PRRSv-1 strain 5710) of spleen and bone marrow cell populations which express these receptors at different levels, since they could provide new information about these molecules and other possible viral receptors. Another objective is the phenotypic and functional characterization of CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> bone marrow monocyte populations.

In the first chapter the role of CD169 and other members of the siglec family in PRRSv infection of splenic CD163<sup>+</sup> macrophages has been studied. Unlike alveolar macrophages, those cells express very low levels of CD169. However, the virus efficiently replicated on them yielding slightly higher titers than in alveolar macrophages. Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages express higher levels of other siglecs, in particular Siglec 3 and Siglec 5, which, like CD169, bind sialic acids and might therefore contribute to the attachment of the virus to the cells. The ability of these molecules to bind PRRSv was evaluated by ELISA using recombinant proteins of Siglec 3, Siglec 5 or the four amino-terminal domains of CD169. Siglec 3 bound PRRSv particles, although with much lower affinity than CD169; however, binding to Siglec 5 was inconsistent. The capacity of antibodies against these siglecs to block the binding of virus to those macrophages and the subsequent infection was also

analysed. Whereas monoclonal antibody to CD169 blocked the attachment of virus and the infection of alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages, no reduction was observed after treatment of cells with antibodies to Siglec 3 or Siglec 5. In summary, CD169 plays a prominent role in PRRSv binding and infection of the cells, even when they display a low CD169 expression. On the contrary, Siglec 3 and Siglec 5 do not seem to participate in the PRRSv entry into the studied macrophages.

In the second chapter it was analysed if bone marrow cells were susceptible to PRRSv infection. There were very few data about the cells permissive to PRRSv replication in this organ, because most of the studies had been carried out with BMDC. Therefore, our objective was to determine if freshly extracted bone marrow cells were susceptible to infection. After incubation of the whole population of bone marrow cells with the virus, analysis of infected cells, identified by the expression of the viral nucleoprotein, showed that all of them were positive for CD172a (myeloid marker) but they were heterogeneous regarding CD163 expression. In order to know whether cells expressing or not CD163 are equally permissive to infection, two populations with high levels of CD172a and differences in CD163 were sorted: CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>. Both cell populations had typical morphological features and membrane markers of monocytes and they were negative for specific markers of other leukocytes. CD163<sup>+</sup> monocytes expressed SLA-DR, CD169, CD11R1 and TLR-2 at higher levels than CD163<sup>-</sup>. PRRSv efficiently replicated on CD163<sup>+</sup> monocytes, reaching similar titers to those obtained in alveolar macrophages, although delayed in time. CD163<sup>-</sup> monocytes also became infected, but with greater variability and slower kinetics than CD163<sup>+</sup> cells. Culture of CD163<sup>-</sup> monocytes with M-CSF induced CD163 and increased SLA-DR expression. Furthermore, after incubation with PRRSv it was also noticed an increase in CD163 levels. These data could explain viral replication in monocytes originally sorted as CD163<sup>-</sup>.

In the third chapter bone marrow monocyte populations were phenotypically and functionally analysed. When they were compared to their

equivalent peripheral blood populations, the cytometry profiles of most markers (TLR-2, TLR-4, SLA-DR, CD11R1, CD11R3, CD16 and Siglec 10) were very similar, the only exception was CD14, which was higher expressed in CD163<sup>-</sup> than in CD163<sup>+</sup> blood monocytes, while in bone marrow its expression was similar between each other. On the other hand, RT-qPCR results showed that bone marrow CD163<sup>+</sup> monocytes have significant greater levels of *CX<sub>3</sub>CR1* and *CCR5* transcripts, and lower of *CXCR4* and *CD62L* than CD163<sup>-</sup> cells; both cell types have similar *CCR2* expression. Most of the analysed TLRs (1-10) showed a similar expression in both monocyte populations, with some exceptions like *TLR-7*, which is more expressed in CD163<sup>+</sup> monocytes. Cytokine production in response to TLR ligands also differed between both types of monocytes. Finally, other functional characteristics of monocytes were evaluated. Both cell types phagocytose microspheres, CD163<sup>-</sup> cells tended to produce more reactive oxygen species, whereas CD163<sup>+</sup> cells were more efficient in endocytosing and processing antigens.

In summary, findings of this thesis expand the knowledge of the biology of porcine bone marrow monocyte populations and show the *in vitro* replication of PRRSv on these cells. The results also evidence the importance of CD169 in the attachment and entry of PRRSv in CD163<sup>+</sup> splenic macrophages, despite of its low expression.

**RESUMEN:**

Esta tesis doctoral versa sobre la "Caracterización de poblaciones celulares del linaje monocito-macrófago en órganos linfoides porcinos y su permisividad a la infección por el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSv)." Esta enfermedad presenta una gran prevalencia en la industria porcina a nivel mundial, en la que causa grandes pérdidas económicas. El agente etiológico, PRRSv, es un virus RNA perteneciente al género *Betaartevirus* y familia *Arteriviridae*, que por su variabilidad genética se subdivide en dos especies: PRRSv-1 y PRRSv-2. Infecta macrófagos del pulmón y de órganos linfoides, y también replica *in vitro* en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) o de monocitos (MoDC). CD163 y CD169 han sido descritos como los dos receptores más relevantes para la entrada y replicación del virus. La expresión de CD163 parece ser imprescindible, mientras que la contribución de CD169 no es estrictamente necesaria, ya que cerdos editados genéticamente que no expresan esta molécula son susceptibles a la enfermedad. Entre los objetivos de la tesis se encuentra el estudio de la infección por un aislado de la especie PRRSv-1 (cepa 5710) de células de bazo y médula ósea porcina que expresan diferentes niveles de estos receptores, y que podrían por ello aportar información nueva sobre los mismos y otros posibles receptores víricos. También han sido analizadas fenotípica y funcionalmente las poblaciones de monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de médula ósea.

En el primer capítulo ha sido estudiado el papel de CD169 y otros miembros de su familia (siglecs) en la infección por PRRSv de macrófagos CD163<sup>+</sup> esplénicos. Estas células, a diferencia de los macrófagos alveolares, expresan niveles muy bajos de CD169. Sin embargo, el virus replicó eficientemente en ellos, con títulos ligeramente superiores a los alcanzados en macrófagos alveolares. Los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo expresan niveles más altos de otros siglecs, como Siglec 3 y Siglec 5, que a semejanza de CD169, unen ácidos siálicos, de modo que podrían contribuir a la adhesión del virus a las células. La capacidad de unión del virus a los siglecs fue evaluada por ELISA utilizando proteínas recombinantes de Siglec 3, Siglec 5 o de los cuatro dominios amino-terminales de CD169. Siglec 3 se unió a las partículas de PRRSv, aunque con mucha menor afinidad que CD169; sin embargo, los resultados con Siglec 5 no fueron concluyentes. Además, analizamos la capacidad de anticuerpos monoclonales (AcMo) y policlonales frente a

estos siglecs para bloquear la unión del virus a los macrófagos y su infección. Mientras que el AcMo frente CD169 bloqueó tanto la unión del virus como la infección en macrófagos alveolares y CD163<sup>+</sup> esplénicos, estos procesos no se vieron afectados por el tratamiento con anticuerpos frente a Siglec 3 o 5. Los resultados indican que CD169, a pesar de su bajo nivel de expresión, juega un importante papel en la unión e infección del virus a estas células. Por el contrario, Siglec 3 y Siglec 5 no parecen contribuir a la entrada de PRRSv en dichos macrófagos.

En el segundo capítulo ha sido analizada la permisividad a la infección por PRRSv de las células de médula ósea. Existía muy poca información sobre las células en las que replica PRRSv en este órgano, ya que la mayoría de los estudios habían sido realizados con BMDC. Por ello, nuestro objetivo fue determinar si en la médula ósea recién extraída del cerdo ya existen células permisivas a la replicación vírica. El análisis de las células infectadas tras la incubación de la población total de células de médula ósea con el virus, identificadas por la expresión de la nucleoproteína vírica, mostró que todas expresaban CD172a (marcador mielóide) pero tenían una expresión heterogénea de CD163. Para analizar si tanto las células positivas como las negativas para CD163 son permisivas a la infección, aislamos dos poblaciones con altos niveles de CD172a y diferencias en CD163: CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>. Ambas poblaciones presentaron características morfológicas y marcadores de superficie típicos de monocitos, siendo negativas para marcadores específicos de otros leucocitos. Los monocitos CD163<sup>+</sup> expresaron niveles más altos de SLA-DR, CD169, CD11R1 y TLR-2 que los monocitos CD163<sup>-</sup>. PRRSv replicó eficientemente en los monocitos CD163<sup>+</sup>, alcanzando títulos similares, aunque a tiempos más tardíos, a los obtenidos en macrófagos alveolares. Las células CD163<sup>-</sup> también se infectaron, aunque con resultados variables entre experimentos y cinética más lenta que los CD163<sup>+</sup>. El cultivo de monocitos CD163<sup>-</sup> con M-CSF indujo la expresión de CD163 y aumentó la de SLA-DR. También tras la incubación con PRRSv se observó un aumento de los niveles de CD163. Estos datos podrían explicar la replicación vírica en monocitos seleccionados originalmente como CD163<sup>-</sup>.

En el tercer capítulo han sido caracterizadas fenotípica y funcionalmente las poblaciones de monocitos de médula ósea. Al comparar con las poblaciones homólogas

de sangre periférica los fenotipos (TLR-2, TLR-4, SLA-DR, CD11R1, CD11R3, CD16 y Siglec 10) fueron muy similares, con la excepción de CD14, que en sangre mostró niveles más altos en los monocitos CD163<sup>-</sup> que en los CD163<sup>+</sup>, mientras que en médula ósea su expresión era semejante en ambos. Por otra parte, análisis mediante RT-qPCR mostraron que los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea expresan mayores niveles de *CX<sub>3</sub>CR1* y *CCR5* y menores de *CXCR4* y *CD62L* que los CD163<sup>-</sup>, y ambos presentan niveles altos de *CCR2*. No se observaron diferencias relevantes entre las dos poblaciones de monocitos en la expresión de la mayoría de los TLR analizados (1-10), salvo excepciones como *TLR-7*, cuya expresión fue mayor en los monocitos CD163<sup>+</sup>. El patrón de producción de citoquinas en respuesta a ligandos de TLR también difirió entre ambos tipos de monocitos. Por último, fue evaluada la capacidad de los monocitos para realizar algunas funciones celulares. Ambos fagocitaron microesferas, los monocitos CD163<sup>-</sup> mostraron una tendencia a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno que los CD163<sup>+</sup>, mientras que éstos fueron más eficientes en la endocitosis y procesamiento de antígenos solubles.

Los resultados de esta tesis permiten avanzar en el conocimiento de la biología de las poblaciones de monocitos porcinos de médula ósea y acreditan la replicación *in vitro* de PRRSv en estas células. Además, confirman la importancia de CD169 en la unión y entrada del virus en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo.

**ABREVIATURAS:**

- AC:** anticuerpo(s)
- AcMo:** anticuerpo(s) monoclonal(es)
- AcP:** anticuerpo(s) policlonal(es)
- APC:** alofocianina
- BMDC:** célula(s) dendrítica(s) derivada(s) de médula ósea
- BSA:** albúmina de suero bovino
- Célula NK:** célula asesina natural (*natural killer*)
- Cf:** concentración final
- CHO:** línea celular de ovario de hámster chino (*chinese hamster ovary*)
- CMH:** célula(s) madre hematopoyética(s)
- CMP:** progenitor(es) mieloide(s) común(es)
- Ct:** ciclo umbral (*threshold cycle*)
- Cy7:** cianina 7
- DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol
- DC:** célula(s) dendrítica(s)
- DCF:** diclorofluoresceína
- DICT<sub>50</sub>:** dosis infectiva del 50% del cultivo tisular o celular
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato
- EAV:** Arteritis Viral Equina
- EDTA:** ácido etilen-diaminotetraacético
- ELISA:** enzimoimmunoensayo (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)
- Ex/Em:** excitación/emisión
- FACS:** separación celular activada por fluorescencia (*fluorescence-activated cell sorting*)
- FBS:** suero fetal bovino
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- FMO:** fluorescencia menos uno (*fluorescence minus mone*)
- FSC:** tamaño celular (*forward scatter*)
- g:** fuerza centrífuga relativa
- GM-CSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*)
- GMP:** progenitor(es) de granulocitos y monocitos
- GP:** glicoproteína
- H<sub>2</sub>DCF-DA:** diacetato de dihidro-diclorofluoresceína
- Hb:** hemoglobina

- HEPES:** ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano-sulfónico
- Hp:** haptoglobina
- Hpi:** horas post-infección
- IFN- $\alpha$ :** Interferón alfa
- Ig:** inmunoglobina
- IL:** interleucina
- IPC:** calibrador inter-ensayo (*inter-plate-calibrator*)
- Kb:** kilobase
- KDa:** kiloDalton
- LPS:** lipopolisacárido
- M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*)
- MDP:** progenitor(es) de monocitos y células dendríticas
- MFI:** mediana de la Intensidad de Fluorescencia
- MoDC:** célula(s) dendrítica(s) derivada(s) de monocito(s)
- MOI:** multiplicidad de infección
- M $\Phi$ :** macrófago(s)
- OPD:** o-fenilendiamina
- ORF:** marco de lectura abierto (*open reading frame*)
- PAM:** macrófago(s) alveolar(es) porcino(s)
- PBMC:** célula(s) mononuclear(es) de sangre periférica
- PBS:** tampón fosfato salino
- pDC:** célula(s) dendrítica(s) plasmacitoide(s)
- PE:** ficoeritrina
- PerCP:** complejo proteico peridina-clorofila
- Pi:** post-infección
- PMA:** forbol 12-miristato 13-acetato
- Poli I:C:** ácido polinosínico-policitidílico
- PRRS:** Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
- PRRSv:** Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
- qPCR:** PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real
- rhM-CSF:** M-CSF recombinante humano
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- rpGM-CSF:** GM-CSF recombinante porcino
- RT-PCR:** PCR con transcriptasa inversa
- RT-qPCR:** PCR con transcriptasa inversa y cuantitativa
- SD:** desviación estándar

**SEM:** error estándar de la media

**SFM:** sistema fagocítico mononuclear

**SLA-DR:** molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad porcino

**SRCR:** receptor *scavenger* con dominios ricos en cisteína (*scavenger receptor cysteine-rich*)

**SSC:** complejidad celular (*side scatter*)

**TA:** temperatura ambiente

**TC:** tampón de citometría

**TLR:** receptor tipo Toll (*toll-like receptor*)

**TM:** transmembrana

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**U:** unidad(es)

**Anglicismos:** en el texto hay algunos anglicismos escritos por estar ampliamente aceptados en su área de conocimiento.

***Burst oxidativo:*** estallido respiratorio

***Dotplot:*** diagrama de puntos

***Fold-change:*** factor de cambio o número de veces

***Forward:*** directo

***Knock-out:*** defectivo, bloqueo de la expresión

***Primer:*** cebador

***Quenching:*** extinción, aplacamiento

***Reverse:*** reverso

***Scavenger:*** eliminador o "carroñero"

# ***INTRODUCCIÓN***

---

---

En la introducción se desarrollarán tres temas que vertebran esta tesis: el virus del PRRS, las moléculas implicadas en su unión y entrada a la célula, y por último las células en las cuales vamos a estudiar la infección viral y su biología.

### **1. EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRSv).**

A finales de la década de los 80 surgieron en Europa Occidental y Norte América focos infecciosos en granjas de cerdos caracterizados por afecciones respiratorias y aumento del número de abortos en las cerdas. En 1991 el Instituto Veterinario Central de los Países Bajos aisló el agente etiológico de la enfermedad, al que llamó "virus de Lelystad" (Wensvoort *et al.*, 1991; Terpstra *et al.*, 1991). Un año más tarde se aisló la cepa norteamericana (Collins *et al.*, 1992) y finalmente se consensuó denominarlo "Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino" (PRRSv). Desde entonces la enfermedad se ha difundido rápidamente a la mayoría de los países productores de ganado porcino, europeos y asiáticos, ocasionando importantes pérdidas económicas en el sector y dándose casos en todos los continentes salvo Oceanía.

#### **1.1. Clasificación taxonómica y diversidad genética.**

PRRSv es un virus de RNA monocatenario de polaridad positiva que pertenece a la familia *Arteriviridae* y orden *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Aunque las manifestaciones clínicas de la enfermedad sean similares, existen dos genotipos de PRRSv muy bien diferenciados: el tipo 1 (también conocido como Europeo) y el tipo 2 (Norteamericano) (Meng *et al.*, 1995), que sólo muestran un 60% de identidad en sus secuencias nucleotídicas y presentan diferencias en su antigenicidad (van Woensel Forsberg, 2005). De hecho, recientemente han sido clasificados en dos especies distintas dentro del nuevo género *Betaarterivirus*: PRRSv-1 (*Betaarterivirus suis* 1) y PRRSv-2 (*Betaarterivirus suis* 2) ([https://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/animal-ssrna-viruses/7996](https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/animal-ssrna-viruses/7996); Stoian y Rowland, 2019).

La diversidad genética del virus del PRRS es muy elevada, existiendo muchos subtipos y cepas dentro de cada especie que están en constante evolución. A este

proceso han contribuido factores temporales y geográficos, como el transporte de animales entre diferentes regiones y la complicación añadida de ser un virus de RNA con una alta tasa de mutación (Brar *et al.*, 2014), originándose cada cierto tiempo nuevas cepas más virulentas que originan brotes en las granjas (Rossow *et al.*, 1999; Tianet *et al.*, 2007; Sinn *et al.*, 2016). En consecuencia, el control de esta enfermedad se ha visto dificultado, y aunque existen vacunas en el mercado, no hay ninguna que confiera cobertura a muchas cepas y que proporcione la suficiente protección y seguridad (Nan *et al.*, 2017).

### **1.2. Patogenia y signos clínicos de la enfermedad.**

La enfermedad se da exclusivamente en cerdos, y aunque el jabalí también es hospedador natural no hay datos que acrediten la patología en el animal salvaje. El cuadro clínico en el cerdo depende en gran medida de la edad, el estado fisiológico e inmunitario del animal y la virulencia de la cepa vírica (Johnson *et al.*, 2004; Klinge *et al.*, 2009). La vía de entrada más habitual es la oro-nasal, de manera que el virus accede a los pulmones e infecta los macrófagos alveolares (PAM), considerados la principal célula diana de PRRSv (Rossow *et al.*, 1995). El virus replica en las células y es liberado mediante apoptosis y lisis celular (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2007). En este proceso también se secretan citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) y antiinflamatorias (IL-10) que juegan un papel en la patogenia de la enfermedad (Rahe *et al.*, 2017). Posteriormente el virus se distribuye de forma sistémica a células mononucleares y macrófagos tisulares de todo el cuerpo.

En el transcurso de la infección vírica se pueden establecer dos fases. La primera cursa con una infección aguda caracterizada por una viremia que dura en promedio entre los siete y catorce días post infección (pi) y cuyo principal síntoma es la neumonía intersticial (Rossow *et al.*, 1995), aunque los signos clínicos pueden ser muy variados según la virulencia de la cepa. La segunda etapa, denominada "fase persistente", se caracteriza por ausencia de viremia, bajos niveles de replicación del virus y sólo en algunos órganos, pudiéndose encontrar virus en los órganos linfoides hasta los 300 días pi (Wills *et al.*, 2003). Uno de los cuadros clínicos de mayor impacto económico en las granjas es el fallo reproductivo en cerdas gestantes, ya que el virus atraviesa la barrera

placentaria ocasionando abortos, partos prematuros y camadas de cerdos nacidos muertos o débiles (Christianson *et al.*, 1992). Los lechones infectados presentan un cuadro clínico respiratorio grave y pueden padecer anorexia, cianosis de orejas y vulva, y fiebre (revisado en Rossow, 1998; Cheon y Chae, 2001; Martínez-Lobo *et al.*, 2011; Sinn *et al.*, 2016).

### **1.3. Modulación de la respuesta inmune innata por PRRSv.**

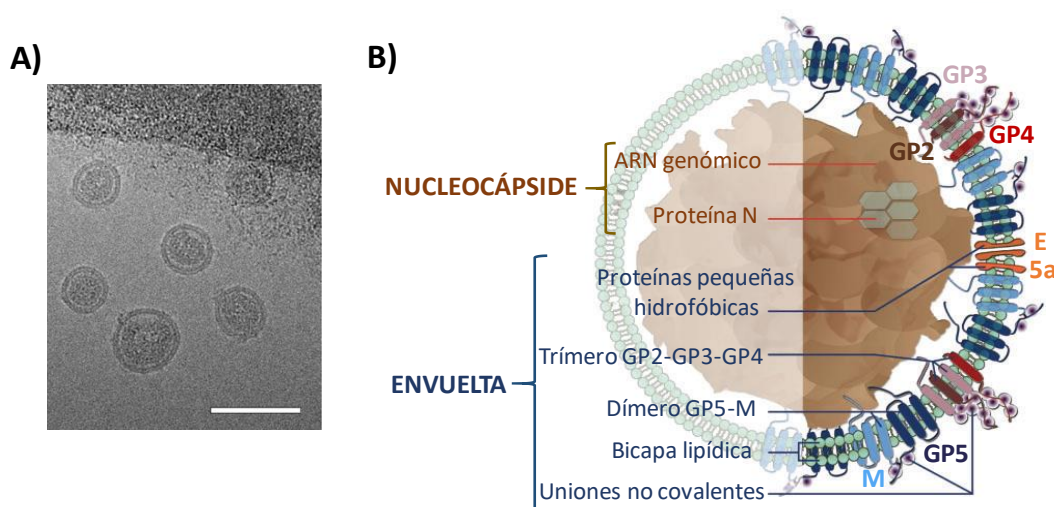
PRRSv provoca una depresión del sistema inmune que se asocia con una mayor susceptibilidad a otras infecciones bacterianas y víricas y un agravamiento de los cuadros clínicos desarrollados (Van Reeth *et al.*, 1996; Solano *et al.*, 1997; Wills *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2001; Palzer *et al.*, 2015). El número de monocitos circulantes disminuye, además de otras alteraciones funcionales de las células del sistema mononuclear-fagocítico y de las células *natural-killer* (NK) (Lunney *et al.*, 2016). El virus del PRRS es capaz de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  en macrófagos alveolares y células dendríticas plasmacitoides (pDC) (Albina *et al.*, 1998; Calzada-Nova *et al.*, 2011; López-Fuertes *et al.*, 2000) y de inducir la producción de citoquinas reguladoras como IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC) (Charentantanakul *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2006; Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Suradhat *et al.*, 2003).

La infección también reduce la expresión de las moléculas de MHC de clase I y clase II y moléculas coestimuladoras, como CD80/CD86 en MoDC, alterando su capacidad para la presentación de antígenos a las células T (Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). En los últimos años se han identificado varias proteínas de PRRSv implicadas en mecanismos de evasión del sistema inmune (Beura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2010), sin embargo, la relevancia de estos mecanismos puede variar dependiendo del tipo celular. Así, en macrófagos alveolares, hay diversas proteínas no estructurales que pueden jugar un papel importante. En cambio, en las pDC, principales células productoras de IFN- $\alpha$  y refractarias a la infección, se ha postulado que la interacción de la partícula viral (proteínas estructurales) con receptores de superficie puede transducir señales negativas al interior de la célula e inhibir la síntesis de IFN- $\alpha$

(Calzada-Nova *et al.*, 2011). Esta capacidad para modular la respuesta inmunitaria parece variar entre distintos aislados.

#### 1.4. Estructura del virión y su genoma.

La partícula vírica de PRRSv está cubierta por una envoltura lipídica pleomórfica, generalmente esférica o ligeramente ovalada de unos 55 nm de diámetro (Mardassi *et al.*, 1994; Dea *et al.*, 1995). En su interior se encuentra la hebra de RNA envuelta por proteínas de la nucleocápside que forman una cápside de 39 nm de media (Spilman *et al.*, 2009) (ver Fig. 1). El genoma de PRRSv consiste en una hebra de RNA de polaridad positiva de 15 kb poliadenilada en su extremo 3' que contiene once marcos de lectura abiertos conocidos (ORF). En el extremo 5' se localizan las ORF1a y 1b, que constituyen tres cuartas partes del genoma. Ambas ORF codifican dos poliproteínas denominadas pp1a y pp1b, que son procesadas en catorce proteínas no estructurales con actividad replicasa y polimerasa (revisado en Fang y Snijder, 2010). En el extremo 3' del genoma viral se localizan las demás ORF (de la 2 a la 7) que incluyen ocho genes relativamente pequeños con secuencias solapantes por ambos extremos con sus genes vecinos. Ahí se encuentran codificadas las tres glicoproteínas que se unirán en un trímero en la envoltura lipídica (GP2a, GP3 y GP4), así como la glicoproteína GP5 que se asociará con la proteína de membrana no glicosilada (M). En la envoltura también se encuentran otras proteínas



**Figura 1. A)** Ejemplos representativos de viriones de PRRSv en una fotografía tomada por criomicroscopía electrónica. La barra de escala representa 100 nm. Adaptada de Dokland, 2010. **B)** Representación esquemática de la estructura de un virión de PRRSv. Adaptado de Snijder y Kikkert, 2013.

pequeñas no glicosiladas (E, GP2b, ORF5a). En la parte más distal se localiza la ORF7, que codifica la nucleoproteína que formará la nucleocápside (proteína N) y que es la más inmunogénica (Meulenberg *et al.*, 1995a y 1995b; Firth *et al.*, 2011; Johnon *et al.*, 2011; Snijder *et al.*, 2013).

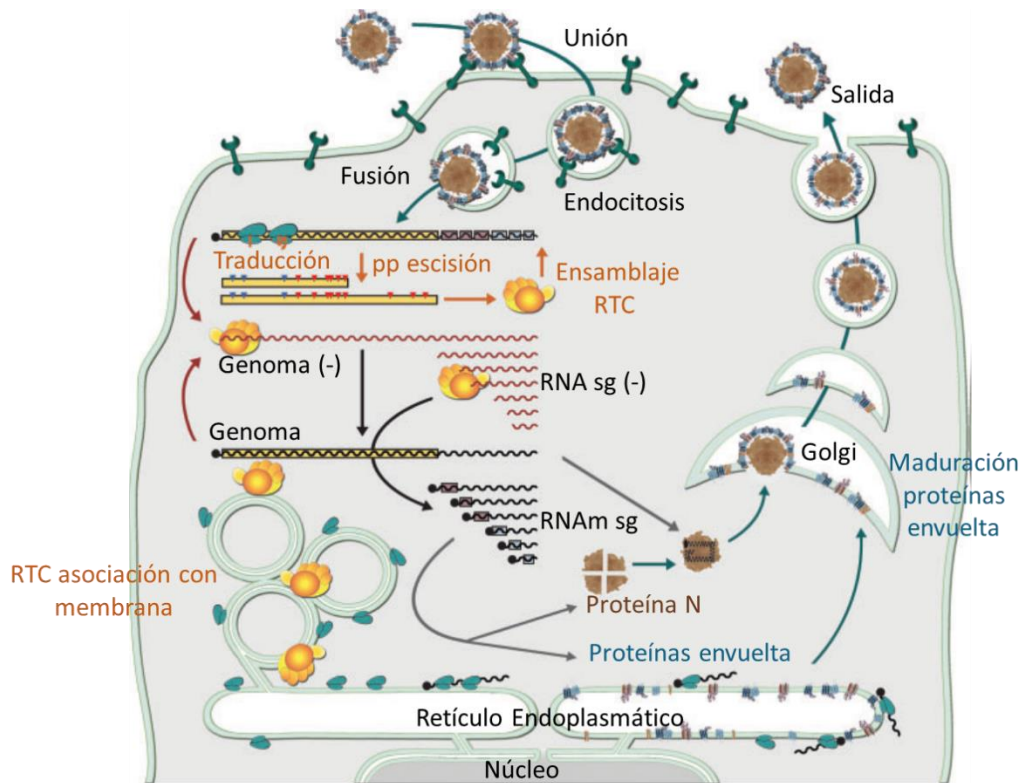
## 2. RECEPTORES CELULARES DEL VIRUS DEL PRRS.

### 2.1. Infectividad del virus: ciclo celular y principales receptores implicados en la entrada a la célula.

PRRSv infecta selectivamente células del linaje monocito-macrófago: los macrófagos de los pulmones y órganos linfoides son sus principales blancos (Duan *et al.*, 1997; Bordet *et al.*, 2018); en cambio, los monocitos de sangre recién aislados son considerados refractarios, aunque tras cultivarse con determinadas citoquinas pueden ser susceptibles a la infección (Singleton *et al.*, 2018). Además, el virus infecta células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC), macrófagos derivados de monocitos (Silva-Campa *et al.*, 2010) y células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). También puede replicar *in vitro* en las líneas celulares procedentes de células del riñón de mono verde africano (línea MA-104) y sus derivados CL2621 y MARC-145 (Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993).

El virus entra en la célula por endocitosis mediada por clatrina, y tras la acidificación del endosoma y la fusión de la membrana, la nucleocápside se libera al citosol (Kreutz y Ackermann, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999). El genoma se traduce dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1b, éstas son procesadas por proteasas internas en distintas proteínas no estructurales que se asocian formando un complejo de replicación y transcripción (RTC) que inicia la síntesis de cadenas negativas de RNA. A continuación, se producen copias de RNA del genoma completo, que servirán como moldes para replicar el genoma vírico, y copias de subgenomas que servirán como plantillas para la síntesis de RNA mensajeros subgenómicos (RNAm sg), a partir de los cuales se traducirán las proteínas estructurales del virión. Los genomas se empaquetan con las proteínas de la nucleocápside (Proteína N) y son envueltos por las membranas procedentes del retículo endoplasmático, donde se han producido y se han integrado las proteínas

víricas de la envoltura. El virión prosigue su ruta por el aparato de Golgi, en el que las glicoproteínas se glicosilan, y por último los viriones abandonan la célula por la ruta exocítica (Snijer *et al.*, 2013; ver Fig. 2).



**Figura 2.** Ciclo celular de PRRSV. El virus entra por endocitosis, el genoma es liberado y se traducen las replicasas. Se producen copias negativas de genomas completos y subgenomas, a partir de los cuales se formarán los genomas (+) del virus y los RNA mensajeros subgenómicos que producirán las proteínas estructurales del virión, respectivamente. El RNA se encapsida y se envuelve en vesículas del aparato de Golgi, donde previamente se habían insertado las proteínas de la envoltura viral. Finalmente, los viriones son liberados fuera de la célula por exocitosis. Figura adaptada y traducida de Snijder *et al.*, 2013.

Se han propuesto hasta seis moléculas distintas como posibles receptores celulares implicados en la entrada de PRRSV en la célula: heparán sulfato, CD151, CD163, CD169, vimentina y DC-SIGN (Calvert *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2009; Jusa *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006; Shanmukhappa *et al.*, 2007). De todos ellos, los datos que se han ido acumulando en la bibliografía señalan a CD163 y CD169 como los actores principales, siendo CD163 imprescindible para una infección vírica efectiva (Wells *et al.*, 2017; Prather *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Dada la importancia de estas dos moléculas en la infección y su relevancia en el tema de esta tesis, en los siguientes apartados serán analizados con más detalle diferentes aspectos de las mismas.

## 2.2. CD169 (Sialoadhesina; Siglec 1).

### 2.2.1. Estructura y funciones de CD169.

CD169, también conocido como Sialoadhesina o Siglec 1, es el prototipo de una familia de receptores denominados siglecs, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), que reconocen residuos de ácido siálico expuestos en las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos. CD169 es una glicoproteína transmembrana de tipo I y consta de una región extracelular compuesta de un dominio Ig tipo V en el extremo amino-terminal que contiene la zona de unión al ácido siálico y 16 dominios Ig de tipo C<sub>2</sub>, una región transmembrana y una pequeña cola citoplasmática (Crocker *et al.*, 1994; Nath *et al.*, 1995) (ver Fig. 3). Esta última carece de motivos de señalización basados en tirosinas que caracterizan a otros siglecs. CD169 se encuentra localizada en poblaciones de macrófagos y su expresión se puede inducir con interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) en estas células y en monocitos (Delputte *et al.*, 2007a; Revilla *et al.*, 2009). Además de en el cerdo, se ha caracterizado en otras especies como humano, rata y ratón (Crocker y Gordon, 1989; Damoiseaux *et al.*, 1991; Hartnell *et al.*, 2001).

CD169 es una molécula de adhesión potencialmente involucrada en múltiples interacciones célula-célula (preferentemente células de origen hematopoyético, como granulocitos, monocitos, linfocitos (Crocker *et al.*, 1995) y células cancerosas (Nath *et al.*, 1999)) y célula-substrato. Realiza diversas funciones, entre las que destacan la regulación de la respuesta inmune, por ejemplo a través de la participación en la homeostasis de los linfocitos T (Wu *et al.*, 2009; Oetke *et al.*, 2006) y el papel en procesos inflamatorios de enfermedades autoinmunes (Jiang *et al.*, 2006). También puede interactuar con diversos patógenos recubiertos con ácidos siálicos como PRRSv (Delputte *et al.*, 2007b), HIV-1 (Rempel *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2011), *Campylobacter jejuni* (Heikema *et al.*, 2010) y *Neisseria meningitidis* (Jones *et al.*, 2003), facilitando su endocitosis.

### 2.2.2. Interacción de CD169 con PRRSv.

La unión del virus a la célula se inicia a través del heparán sulfato de la superficie celular que interactúa con la proteína M, que a su vez forma un dímero con la GP5 (complejo M-GP5) (Delputte *et al.*, 2002; Vanderheijden *et al.*, 2001). Este primer contacto facilita la interacción del virión con el dominio amino-terminal de CD169 a través de

residuos de ácido siálico  $\alpha$ 2-3 presentes en la glicoproteína vírica GP5 (Delputte et al., 2007b; Van Breedam *et al.*, 2010b). De esta forma, CD169 actúa como receptor responsable de la internalización del virus por un proceso de endocitosis mediado por clatrina que es independiente del heparán sulfato (Vanderheijden *et al.*, 2003; Delputte *et al.*, 2005, 2007b), pudiéndose bloquear la infección de los macrófagos alveolares con la preincubación con un AcMo contra CD169 (Delputte y Nauwynck, 2004).

Hay varios estudios que confirman la participación de CD169 en la internalización de PRRSv. Utilizando células PK-15 transfectadas que expresaban CD169 Vanderheijden *et al.* observaron que éstas eran capaces de internalizar el virus, a diferencia de las células PK-15 no transfectadas, aunque no se producía el proceso de desintegración de la nucleocápside vírica y liberación del genoma (Vanderheijden *et al.*, 2003). Estos resultados demostraban el rol de CD169 en la endocitosis del virus, pero apuntaban a la necesidad de otra/s molécula/s adicional/es en la célula para conseguir un ciclo de replicación vírico completo. Por otra parte, la línea celular MARC-145 expresa CD163 pero no CD169 y es permisible a la infección, lo que sugiere que CD169 no es imprescindible para la infección. En este sentido, un estudio con cerdos *knock-out* para CD169 ha demostrado que la ausencia de esta molécula en los cerdos no evitaba la viremia en los animales, ni había diferencias en el curso de la enfermedad clínica e histopatología respecto a los animales que sí expresaban este siglec (Prather *et al.*, 2013).

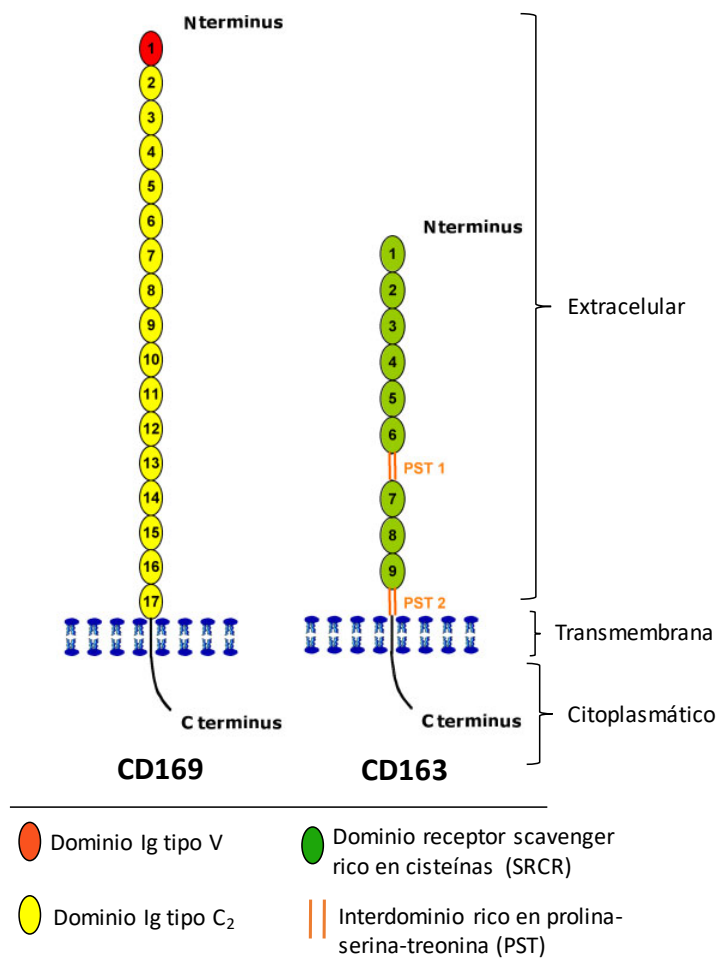
En resumen, existe controversia en torno al papel que juega CD169 en la infección por PRRSv, aunque el modelo actual más aceptado es que coopera con CD163 actuando en distintas fases del ciclo vírico de PRRSv (Van Gorp *et al.*, 2008), pero no es imprescindible, ya que el virus podría unirse a la célula a través de otras moléculas como heparán sulfato, vimentina o CD151 (Zhang *et al.*, 2015).

### **2.3. CD163.**

#### **2.3.1. Estructura y funciones de CD163.**

CD163 pertenece a la familia de receptores con dominios de tipo *scavenger* ricos en cisteínas (SRCR, del inglés *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*). Concretamente consta de nueve dominios SRCR repetidos en tándem, dos interdominios ricos en prolina-

serina-treonina (PST), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Law *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2008) (ver Fig. 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de CD169 y CD163. Figura adaptada de Van Breedam *et al.*, 2010a.

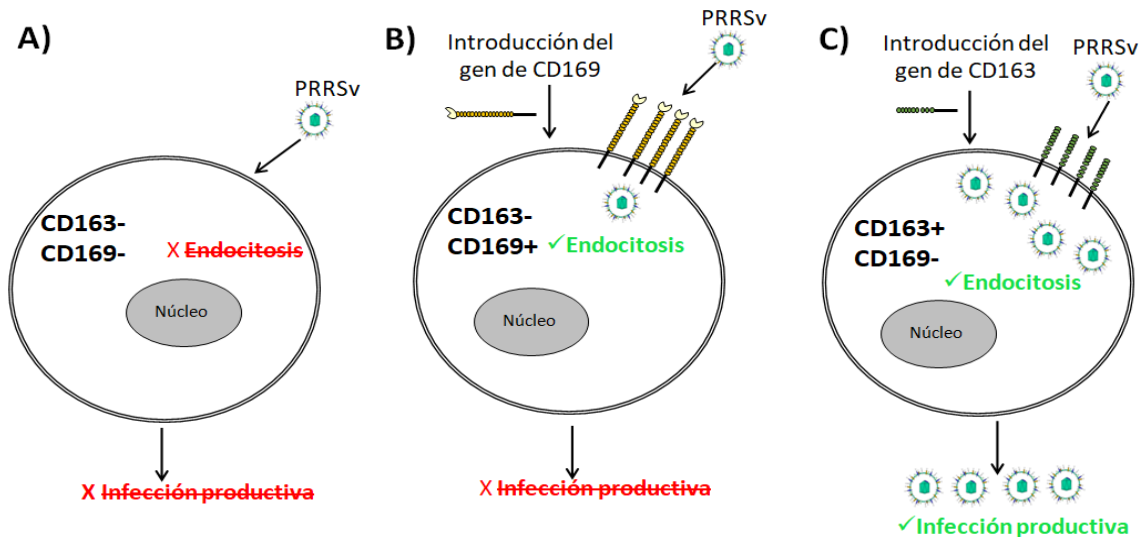
La función mejor caracterizada de CD163 es la eliminación de la hemoglobina (Hb) procedente de la hemólisis de los eritrocitos, y que junto con la haptoglobina (Hp) forma el complejo Hb-Hp. Este complejo se une a CD163 por un mecanismo dependiente de pH y calcio, y su endocitosis protege los tejidos del daño oxidativo que ocasionaría la Hb libre (Kristiansen *et al.*, 2001; Graversen *et al.*, 2002; Madsen *et al.*, 2001). El complejo Hb-Hp sigue su ruta por los endosomas tempranos donde CD163 se disocia y es reciclado hacia la membrana plasmática. En este punto, el ectodominio de CD163 puede ser cortado por una metaloproteasa (Hintz *et al.*, 2002) dando lugar a la forma soluble de CD163 que se encuentra en el plasma.

CD163 se expresa en células del linaje monocito-macrófago y ha sido caracterizado en cerdo, humano (Van den Heuvel *et al.*, 1999), rata (Dijkstra *et al.*, 1985) y ratón (Schaer *et al.*, 2001), entre otras especies. En porcino, CD163 se expresa a niveles indetectables o muy bajos en los precursores tempranos de monocitos en la médula ósea y va aumentando su expresión a medida que estos van madurando, hasta presentar una alta expresión en los macrófagos tisulares, por lo que es una molécula que puede ser empleada como marcador de maduración de esta ruta (Sánchez *et al.*, 1999). Debido a que diferentes señales pro y antiinflamatorias regulan la expresión de CD163 se ha postulado que podría estar implicado en el control de los procesos inflamatorios (Moestrup y Moller, 2004). De hecho, el CD163 soluble presente en el plasma puede inhibir la proliferación de los linfocitos T (Hogger y Sorg, 2001). Además, el complejo Hb-Hp no es el único ligando de CD163, sino que éste puede unir otras moléculas, estando involucrado en varios procesos de endocitosis y vías de señalización (Van Gorp *et al.*, 2010a) y también puede actuar como sensor de procesos infecciosos interactuando con bacterias (Fabriek *et al.*, 2009). Por otra parte, participa en procesos patológicos al ser utilizado por varios virus, por ejemplo, por el Virus de la Fiebre Hemorrágica de los Simios (SHFV) en primates no humanos (Cai *et al.*, 2015), además de mediar en la internalización de PRRSv en porcino (Calvert *et al.*, 2007; Van Breedam *et al.*, 2010).

En el cerdo CD163 se expresa en una gran variedad de macrófagos tisulares (macrófagos de la pulpa roja del bazo, macrófagos corticales y medulares del timo, macrófagos del seno subcapsular y áreas interfoliculares de los nódulos linfáticos y células de Kupffer del hígado (Pérez *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2014)), y en subpoblaciones de monocitos sanguíneos y de médula ósea (Chamorro *et al.*, 2000; Ezquerro *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 1999).

### 2.3.2. Interacción de CD163 con PRRSv.

En 2007 Calvert *et al.* identificaron a CD163 como una molécula clave para la infección de PRRSv tras el cribado de una genoteca de expresión obtenida a partir de PAM. Establecieron líneas celulares que expresaban de forma estable CD163 tras haber sido transfectadas con un vector de expresión con la secuencia codificante de



**Figura 4.** Representación esquemática del efecto de la transfección de CD169 o CD163 en líneas celulares originariamente no permisivas a la infección por PRRSv. **A)** Las células inicialmente no expresan ni CD163 ni CD169 y no son permisivas a la infección. **B)** Cuando son transfectadas con CD169 se produce la endocitosis de PRRSv, pero no hay replicación viral. **C)** Al transfectar con CD163 el virus es endocitado y tiene lugar el ciclo del virus completo, originándose progenie viral (infección productiva).

este receptor. Las células utilizadas fueron de riñón porcino (PK 032495), riñón de gato (NLFK) y de hámster (BHK-21), y todas ellas resultaron susceptibles a la infección y produjeron títulos altos de virus. Posteriormente, otros grupos también han conseguido transfectar otras líneas celulares (células LLC-PK (Patton *et al.*, 2009) y células PK-15 (Wang *et al.*, 2013)) con CD163 confirmando su susceptibilidad a la infección vírica. Además, en las células de cerdo que naturalmente se infectan con el virus existe una correlación entre infección vírica y expresión de CD163 (Patton *et al.*, 2009), y la línea celular MARC-145, que ha sido muy utilizada para la producción y adaptación del virus, también expresa este receptor.

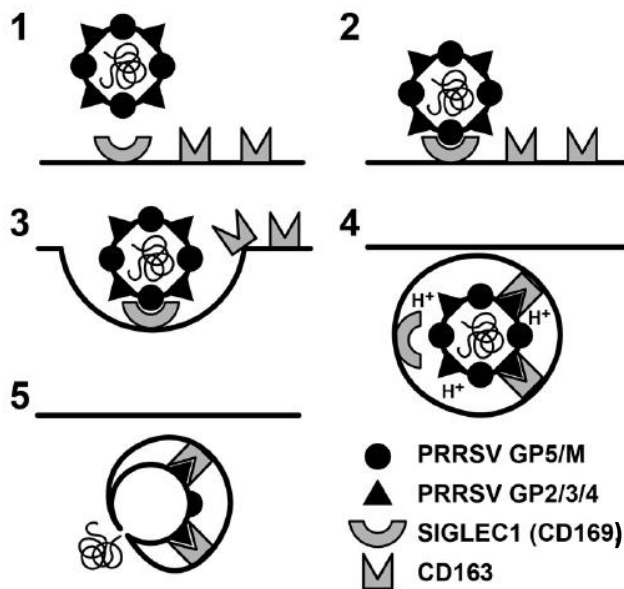
La prueba definitiva del papel de CD163 en relación a PRRSv llegó en el año 2016, con un estudio que mostraba que los cerdos editados genéticamente utilizando el sistema CRISPR/Cas9 para impedir la expresión de CD163, eran completamente resistentes a la infección por la cepa virulenta NVSL 97-7895 (PRRSv-2) (Whitworth *et al.*, 2016), indicando que CD163 es un receptor esencial para PRRSv. Posteriormente se repitió el procedimiento con más cepas de PRRSv-1 y PRRSv-2, confirmando que la ausencia de CD163 afectaba a todas ellas, por lo que se considera que CD163 es un receptor indispensable para ambos genotipos del virus (Wells *et al.*, 2017; Burkard *et al.*, 2017).

La base molecular de la interacción de CD163 con PRRSv radica en el dominio SRCR5 de CD163, que es esencial para la infección vírica de cepas de PRRSv-1, ya que cuando se sustituye por el dominio SRCR5 del homólogo humano de CD163 (hCD163-L1) la infección no es efectiva (Van Gorp *et al.*, 2010b). Sin embargo, parecen existir diferencias entre las dos especies de PRRSv. Así, en un estudio realizado por Wells y colaboradores en el que se intercambió el dominio SRCR5 por el dominio SRCR8 del CD163 humano, no se observó replicación vírica con ninguna de las cepas de PRRSv-1, en cambio sí la hubo con todas aquellas cepas de PRRSv-2, aunque los títulos alcanzados fueron más bajos que los obtenidos con células que expresaban el CD163 porcino no modificado (Wells *et al.*, 2017). Por otro lado, el dominio transmembrana (TM) de CD163, que presenta un alto grado de homología entre las diferentes especies, es necesario para conferir susceptibilidad a la infección vírica, pero puede ser reemplazado por dominios heterólogos, lo que sugiere que es necesario para el anclaje de CD163 a la membrana celular (Das *et al.*, 2010; Van Gorp *et al.*, 2010b; Welch y Calvert, 2010).

CD163 se une a las proteínas GP2a y GP4 del virus (Das *et al.*, 2010), y cuando se intercambia el fragmento del genoma que comprende desde la ORF2a a la ORF4 de PRRSv por el del virus del EAV (Arteritis Viral Equina), otro miembro de la misma familia, se modifica el tropismo de PRRSv, que deja de infectar macrófagos alveolares e infecta células susceptibles al EAV (Tian *et al.*, 2012), confirmando un importante papel de la combinación de las glicoproteínas víricas GP2a, GP3, GP4 y la proteína E en el ciclo celular de PRRSv. La proteína E es un canal iónico que parece estar involucrado en la decapsidación y liberación del genoma vírico al citoplasma. El bajo pH del endosoma podría causar los cambios conformacionales de la proteína E, situada en la envuelta vírica, y provocar una entrada de iones a través de poros a la cavidad interna del virión, dando lugar a cambios estructurales de la nucleocápside, que finalmente acabaría desintegrándose (Lee y Yoo, 2006). El hallazgo de la colocalización del virus con CD163 en los endosomas tempranos, pero no en los endosomas tardíos ni en la membrana plasmática (Van Gorp *et al.*, 2009) hace pensar que CD163 podría estar involucrado en este proceso de decapsidación y liberación del genoma vírico al citoplasma; no obstante hasta el momento la fusión de la membrana vírica con la celular es un proceso cuya base

molecular todavía se desconoce, por lo que también podría estar involucrado otro receptor todavía no identificado.

#### 2.4. Interrelación entre CD169, CD163 y PRRSV: apuntes finales.



**Figura 5.** Modelo propuesto de la unión, internalización y decapsidación de PRRSV en macrófagos alveolares que co-expresan CD169 y CD163. El virus se une a la célula a través de los ácidos siálicos del heterodímero GP5/M con el CD169 celular (paso 1), y entra a la célula en una vesícula cubierta de clatrina (pasos 2 y 3). La participación del heterotrímero vírico GP2a/GP3/GP4, CD163 y la acidificación del endosoma provocan la decapsidación y liberación del genoma vírico al citosol (pasos 4 y 5). Figura adaptada de Prather *et al.*, 2013.

Las moléculas más estudiadas en relación al virus del PRRS han sido CD169 y CD163. Teniendo en cuenta toda la bibliografía y sobre todo los últimos estudios realizados *in vivo* en cerdos editados genéticamente, CD169 participa en las primeras fases del ciclo, estableciendo contacto con los ácidos siálicos del virus e internalizándolo. Sin embargo, en ausencia de CD169 el virus puede valerse de otras alternativas para entrar dentro de la célula, dado que los cerdos *knock-out* para CD169 son susceptibles a la infección. En cambio, CD163 tiene una función clave, dado que su ausencia impide que haya replicación, por tanto, nueva progenie del virus e infección productiva. Su colocación con los endosomas tempranos apunta a un cometido relacionado con la decapsidación y liberación del genoma vírico al citoplasma. La base molecular de este proceso y de la fusión de la membrana vírica con la celular todavía se desconocen y no es descartable la participación de otras moléculas, por lo que la infección por PRRSV, CD163 y el estudio de otros receptores que pudieran tener un papel coadyuvante en el ciclo vírico es un campo de investigación activo.

### 3. SIGLECS.

#### 3.1. Introducción a los siglecs.

Dada la posibilidad que plantean algunos estudios de que otras proteínas puedan unirse a PRRSV en ausencia de CD169, surgió la hipótesis sobre si otros miembros de esta familia, los siglecs, podrían reconocer y/o participar en la entrada del virus en la célula. Los siglecs son receptores expresados en la superficie de células del sistema inmune innato que reconocen ácidos siálicos, los cuales son monosacáridos formados por un esqueleto de nueve carbonos que se encuentran en las terminaciones de los carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos de muchas células de mamíferos (Varki 1993; Chang *et al.*, 2014). Los siglecs reconocen diversos tipos de ácido siálico, estableciéndose habitualmente uniones de baja afinidad, pero por agrupamiento de receptores y ligandos se forman complejos multiméricos que pueden dar lugar a uniones estables y selectivas (Crocker y Feizi, 1996). Cada siglec muestra un patrón de reconocimiento de residuos de ácido siálico característico, aunque existe un notable grado de solapamiento entre ellos.

Ya que los ácidos siálicos son muy comunes en los mamíferos y poco habituales en patógenos microbianos, se cree que la principal función de los siglecs es la distinción entre lo "propio" y lo "ajeno", regulando la respuesta inmune. Desde un punto de vista estructural, los siglecs son proteínas integrales de membrana de tipo I, con una región extracelular compuesta de un dominio Ig tipo V en el extremo amino-terminal que contiene la zona de unión al ácido siálico, y un número variable de dominios Ig de tipo C<sub>2</sub>, un segmento transmembrana y una cola citosólica, que puede contener motivos de señalización (Crocker *et al.*, 2007).

#### 3.2. Clasificación de los siglecs.

Teniendo en cuenta criterios de homología de secuencia y grado de conservación evolutiva, los siglecs han sido clasificados en dos grupos. El primer grupo, evolutivamente más conservado, está constituido por los siglecs 1, 2, 4, y 15. Tiene ortólogos identificados en todas las especies de mamíferos examinadas, aunque entre ellos estén poco relacionados, ya que comparten sólo un 20-30% de homología de secuencia en su región extracelular y presentan notables diferencias en su región intra-citoplásmica. El

segundo grupo está constituido por siglecs relacionados con el Siglec 3 o CD33 (siglecs CD33r) con diferente número de miembros según la especie (diez en la especie humana, nueve en el perro y cinco en el ratón) (Cao y Crocker, 2010). Los siglecs CD33r presentan un alto grado de homología en su región extracelular (50-80%) y parecen estar evolucionando de forma rápida, probablemente como consecuencia de la competición entre hospedadores y patógenos en el reconocimiento de sus ácidos siálicos (Cao y Crocker, 2010; Cao *et al.*, 2009; Angata *et al.*, 2004; Varki y Angata, 2006). Esta rápida evolución dificulta la identificación de ortólogos.

Dentro de este segundo grupo la mayoría de ellos poseen dos motivos ITIM (*Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*) o *ITIM-like* en sus colas citoplasmáticas. Son motivos muy conservados basados en tirosinas que pueden ser fosforiladas tras la unión del ligando al siglec y reclutar tirosin-fosfatasa con dominios SH2 (*SRC homology 2*), como las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, que regulan la actividad celular suprimiendo señales de activación celular (Vely y Vivier, 1997; Falco *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999; Avril *et al.*, 2005). Algunos siglecs CD33r no contienen motivos ITIM, pero poseen aminoácidos cargados positivamente en su región transmembrana que interactúan con tirosin-quinasa que contienen motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosine based activation motif*), como DAP12 y DAP10 (Angata *et al.*, 2006; Blasius *et al.*, 2006; Avril *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008). Las tirosin-quinasa y tirosin-fosfatasa compiten por los mismos sustratos en las rutas de señalización que regulan la activación celular. De modo general, si prevalecen las quinasa, la célula se activará, mientras que si prevalecen las fosfatasa provocarán la inhibición de esa ruta de señalización (Ravetch y Lanier, 2000).

### **3.3. Siglecs estudiados en porcino.**

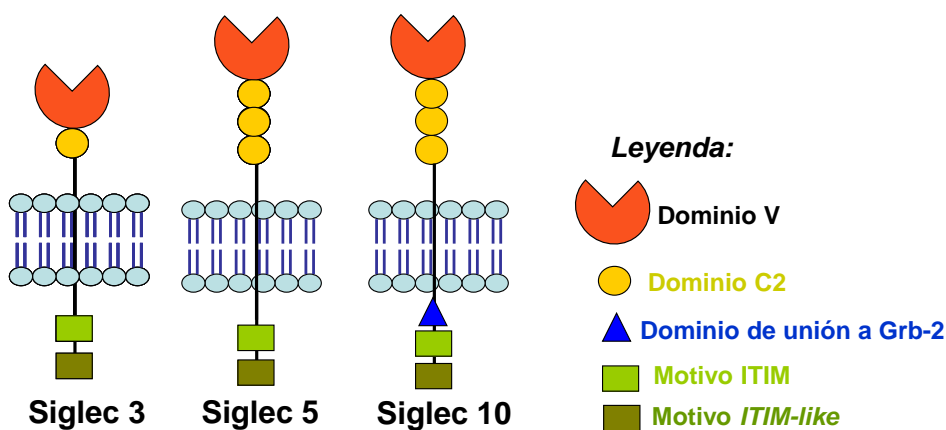
Además de CD169, en los últimos años han sido caracterizados molecular y funcionalmente nuevos siglecs en cerdo, en concreto los siglecs 3, 5 y 10, por el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis (Escalona *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2015; Escalona *et al.*, 2015). Se procederá a su descripción brevemente, dado que son relevantes para la tesis doctoral, en la cual ha sido analizado si dichos siglecs pudieran estar implicados en la interacción con PRRSv.

El Siglec 3 o CD33 porcino es una proteína de 50-60 kDa con un dominio amino-terminal tipo-V y otro dominio Ig tipo-C<sub>2</sub> en su región extracelular, una región

transmembrana y dos residuos de tirosina en su cola citoplasmática (Tyr-356 y Tyr-374), el primero de ellos se encuentra en un motivo ITIM y el segundo se localiza en un motivo que se asemeja a un motivo ITSM (*Immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (Álvarez *et al.*, 2015). Se expresa en monocitos y granulocitos sanguíneos y de la médula ósea y sus precursores, así como en los macrófagos alveolares y de la zona marginal del bazo y los senos subcapsulares de los nódulos linfoides. Une ácidos siálicos, mostrando preferencia por aquellos con enlace  $\alpha 2-6$  (Álvarez *et al.*, 2015.)

El Siglec 5 porcino es una proteína de unos 85 kDa con capacidad de unir ácidos siálicos. Su región extracelular consiste en un dominio Ig tipo-V seguido de tres dominios tipo-C<sub>2</sub>. Su cola citoplasmática contiene dos residuos de tirosina (Tyr-525 y Tyr-548), el primero en un motivo ITIM y el segundo incluido en un segmento que se asemeja a los motivos *ITIM-like* descritos en otros receptores de leucocitos (Escalona *et al.*, 2014). Se expresa en células mielomonocíticas y sus precursores, y a niveles más bajos en pDC y linfocitos B. También se expresa en macrófagos alveolares y de tejidos linfoides, aunque con menor intensidad que en monocitos (Escalona *et al.*, 2014).

El Siglec 10 porcino se expresa preferentemente en linfocitos B de la sangre y de los folículos de nódulos linfáticos y del bazo (Escalona *et al.*, 2015). Su región extracelular, con capacidad de unir ácidos siálicos, contiene el clásico dominio amino-terminal tipo-V, seguido de tres dominios tipo-C<sub>2</sub>. La región citoplasmática posee tres motivos basados en tirosinas, el más proximal (Tyr-516) está dentro de un segmento conservado que sirve como sitio de unión al dominio SH2 de Grb2, una proteína adaptadora involucrada en transducción de la señal a través de la ruta Ras/MAPK y que regula procesos de diferenciación y fagocíticos (Escalona *et al.*, 2015; Ackermann *et al.*, 2011; Kantonen *et al.*,



**Figura 6.** Representación esquemática de los siglecs 3, 5 y 10 porcinos.

2011). Los otros dos residuos de tirosinas (Tyr-585 y Tyr-608) se localizan en motivos ITIM.

### 3.4. Interacción de siglecs con patógenos sialilados.

La capacidad de los siglecs de modular las funciones de las células del sistema inmunitario ha sido aprovechada por diversos patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos, que han evolucionado incorporando ácidos siálicos en su cubierta o envoltura para mimetizarse con las células de sus hospedadores y a través de la interacción con estos receptores entorpecer el desarrollo eficaz de las respuestas inflamatoria e inmunitaria (Chang *et al.*, 2014b).

En la especie humana se han descrito varias bacterias patógenas que incorporan ácidos siálicos a los glicoconjugados de sus superficies a través de distintos mecanismos. Uno de los ejemplos más conocido es el *Streptococcus* del grupo B, agente causante de neumonía neonatal, septicemia y meningitis (Edwards, 2006; Heath y Schuchat, 2007), que expresa ácidos siálicos unidos por enlaces  $\alpha$ 2-3 en su cápsula de polisacáridos con los que interacciona con Siglec 9 (Carlin *et al.*, 2007; Carlin *et al.*, 2009) y CD169 (Chang *et al.*, 2014a). Además, esta bacteria también es capaz de interactuar con el Siglec 5 por un mecanismo independiente de ácidos siálicos, a través de una proteína  $\beta$  anclada en su superficie bacteriana (Carlin *et al.*, 2009). Otros ejemplos son *Campilobacter jejuni* que se une a Siglec 7 y CD169 (Jones *et al.*, 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (siglecs 3, 5, 7, 9 y 10; Khatua *et al.*, 2010), *Haemophilus influenzae* (siglecs 5 y 14; Angata *et al.*, 2013), sin olvidar la interacción de PRRSv con CD169 porcino, a la que se hace referencia en apartados anteriores. Entre los casos estudiados hay ejemplos en los que el patógeno utiliza la interacción con los siglecs como mecanismo de virulencia para subvertir la respuesta inmune del hospedador, pero también hay casos en los que el hospedador utiliza CD169 o siglecs con motivos ITAM para efectuar un mejor reconocimiento y respuesta al patógeno sialilado y favorecer la respuesta inmune (Chang *et al.*, 2014b). Los siglecs expresados en macrófagos y DC porcinas pueden jugar un papel importante en la fagocitosis de patógenos y en el procesamiento de antígenos derivados de los mismos. Así, CD169 y Siglec 5 favorecen la fagocitosis de variantes sialiladas de *Neisseria meningitidis* (Jones *et al.*, 2003).

#### **4. EL SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR (SFM): MONOCITOS, MACRÓFAGOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS.**

El sistema fagocítico mononuclear (SFM) incluye precursores monocíticos de la médula ósea, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Son células que enlazan la repuesta inmune innata mediante la fagocitosis (de bacterias, virus, partículas nocivas, células viejas o apoptóticas, restos celulares...) y la producción de citoquinas con la respuesta inmune adaptativa a través de la presentación de antígenos a linfocitos T. Los monocitos circulan por el torrente sanguíneo y en respuesta a una infección pueden migrar hacia los tejidos convirtiéndose en macrófagos o en células dendríticas (Van Furth y Cohn, 1968; Randolph *et al.*, 1999). Sin embargo, los experimentos realizados en los últimos años con ratones parabióticos han revelado que en condiciones basales la mayoría de los macrófagos residentes en los tejidos no proceden de monocitos adultos, sino que son poblaciones de origen embrionario que se auto-renuevan en el adulto; si bien es cierto que en condiciones de estrés (irradiación, infección y/o inflamación) los macrófagos derivados de monocitos pueden complementar a los macrófagos preestablecidos prenatalmente (Yona *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2013).

Los monocitos son producidos de modo continuo en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas en un proceso dirigido por el M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) en condiciones basales, y también por el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) en condiciones inflamatorias (Fleetwood *et al.*, 2009; Lenzo *et al.*, 2012; Ginhoux y Jung, 2014). En el ratón este proceso consta de varios estadios: primero la célula madre hematopoyética se diferencia a un progenitor mieloide común (CMP), la segunda fase, según muchos autores, correspondería al progenitor de granulocitos y monocitos (GMP), y éste maduraría para convertirse posteriormente en el progenitor de monocitos y células dendríticas (MDP) (Fogg *et al.*, 2006; Hettinger *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios recientes de Yáñez *et al.* (2017) en los que obtuvieron células MDP derivadas de CMP sin pasar por el paso intermedio de GMP cuestionan esta etapa de dicho modelo. Finalmente, el MDP puede diferenciarse a precursor de las células dendríticas (CDP) bajo la acción del FLT3 ligando (FLT3-l), o seguir la ruta determinada por el M-CSF hacia el progenitor comprometido

con los monocitos (cMoP), del que se obtienen los monocitos y los macrófagos derivados de monocitos (ver Fig. 7).

#### **4.1. Monocitos.**

##### 4.1.1. Características generales de los monocitos.

Los monocitos actúan como centinelas del sistema inmune innato y también contribuyen a la respuesta inmune adaptativa transportando los antígenos desde los tejidos periféricos hasta los órganos linfoides secundarios (Serbina *et al.*, 2008; Leiriao *et al.*, 2012; Jakubzick *et al.*, 2013). Son células encargadas de desarrollar una respuesta rápida ante un primer encuentro con patógenos muy diversos; para ello están equipados con receptores de reconocimiento de Patrones Asociados a Microorganismos Patógenos (PAMP) (receptores tipo Toll (TLR), receptores de N-formil-metionina y receptores de manosa), receptores de complemento y receptores específicos de anticuerpo (receptores Fc) (Janeway *et al.*, 2002). La unión del ligando a estos receptores provoca la primera respuesta del organismo frente al agente extraño induciendo rutas de señalización que finalmente conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y otros compuestos microbicidas. Además de la fagocitosis de los microbios y células muertas, los monocitos son determinantes en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, pudiendo ser movilizados rápidamente a los lugares de inflamación (Suresh y Mosser, 2013).

Los monocitos representan aproximadamente el 2-4 % de los leucocitos circulantes en la sangre de ratón y entre un 8 y 10% en la de humanos. También se encuentran en la médula ósea, donde son producidos, y en la especie humana existe una población permanente de monocitos en el bazo y en los pulmones, desde donde pueden ser movilizados según las necesidades (Swirski *et al.*, 2009; Ginhoux y Jung, 2014).

##### 4.1.2. Heterogeneidad de los monocitos en humano y ratón.

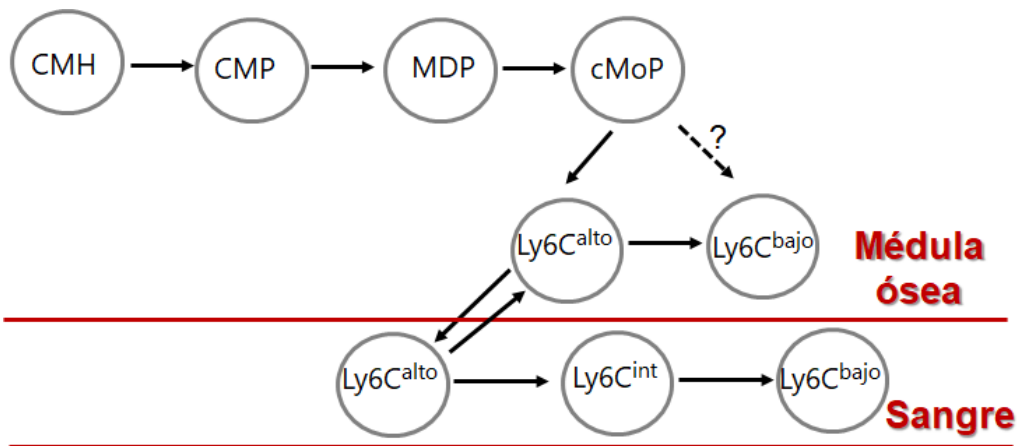
Las células del linaje monocito-macrófago se caracterizan por su heterogeneidad y plasticidad, bien estudiada en humanos y ratones. En la especie humana los monocitos se han clasificado en dos grandes grupos según la expresión en su superficie de CD14 y CD16 (Grage-Griebenow *et al.*, 2001; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). CD14 es el receptor

del complejo del lipopolisacárido (LPS) y de la proteína de unión al LPS (LBP); CD16 es un receptor de baja afinidad para el Fc de IgG (Janeway Jr. *et al.*, 2000). La población mayoritaria (90%) expresa niveles altos de CD14 pero no CD16; son los denominados monocitos "clásicos" (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). La otra población, o monocitos "no clásicos", expresan niveles bajos de CD14 y son positivos para CD16 (CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup>); además presentan niveles mayores de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) y producen más TNF- $\alpha$  tras ser estimulados con ligandos de TLR (Belge *et al.*, 2002; Szaflarska *et al.* 2004; Serbina *et al.* 2009). Posteriormente se añadió un tercer grupo, los monocitos "intermedios" (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), que son una población muy minoritaria pero con propiedades únicas (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Los monocitos "clásicos" (cM) pueden pasar a los tejidos en condiciones basales y de infección y madurar hacia macrófagos u otras células derivadas de monocitos (Varol *et al.*, 2009; Tamoutounour *et al.*, 2013; Bain *et al.*, 2014; Guilliams *et al.*, 2014), mientras que los "no clásicos" (ncM) patrullan las paredes de los vasos sanguíneos para reparar lesiones del endotelio y responden ante infecciones víricas (Auffray *et al.*, 2007). Esta clasificación de los monocitos en función de CD14 y CD16 también se mantiene en primates no humanos, en concreto en varias especies de macacos (Sugimoto *et al.*, 2015).

En ratón la clasificación de los monocitos ha sido realizada según la expresión de Ly6C. Los monocitos "clásicos" expresan niveles altos de este antígeno (Ly6C<sup>++</sup> o Ly6C<sup>alto</sup>), mientras que los "no clásicos" presentan una baja expresión (Ly6C<sup>+</sup> o Ly6C<sup>bajo</sup>); también existe una tercera población con expresión intermedia (Ly6C<sup>int</sup>) (Geissmann *et al.*, 2003). Estas poblaciones de monocitos comparten semejanzas con las humanas en sus características funcionales, lo que sugiere una conservación evolutiva de la heterogeneidad de los monocitos. Gracias a la microscopía intra-vital en ratones se ha comprobado que los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> se convierten en Ly6C<sup>bajo</sup> pasando por el estadio intermedio de los Ly6C<sup>int</sup> (Varol *et al.*, 2007; Yona *et al.*, 2013; Gamrekashvili *et al.*, 2016). Este campo de investigación sigue muy activo actualmente y todavía no se conocen en detalle las rutas moleculares implicadas, aunque se empiezan a descifrar algunos factores importantes, como el descubrimiento por Lessard *et al.* de que la diferenciación de los monocitos es dependiente de la estimulación del receptor NOD2 con ligandos como muramil dipéptido (MDP) (Lessard *et al.*, 2017). Los monocitos

Ly6C<sup>alto</sup> tienen una vida muy corta en la sangre (en torno a 20 horas) y pueden regresar a la médula ósea, mientras que los monocitos Ly6C<sup>bajo</sup> permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo (dos días aproximadamente) y no se ha observado que retornen a la médula ósea (Varol *et al.*, 2007 y revisión de Ginhoux y Jung, 2014). Los monocitos humanos “clásicos” también maduran hacia los “no clásicos”; aunque en ninguna de las dos especies se ha descartado por completo la posibilidad de que existan otras rutas alternativas de generación de “monocitos no clásicos” (Geissmann *et al.*, 2010; Hanna *et al.*, 2011; Ginhoux y Jung, 2014).

Otras especies animales en las que se ha estudiado la heterogeneidad de los monocitos son la rata (dependiendo de la expresión de CD43 (Ahuja *et al.*, 1995)) y la vaca (en función de CD14 y CD16 (Hussen *et al.*, 2013)).



**Figura 7.** Esquema de la diferenciación de los monocitos en ratón. CMH (célula madre hematopoyética); CMP (progenitor mielóide común); MDP (progenitor de monocitos y células dendríticas); cMoP (progenitor comprometido con los monocitos).

#### 4.1.3. Monocitos y migración: moléculas involucradas en reclutamiento y activación celular.

Las quimioquinas son responsables de la migración celular y en algunos casos también de la activación celular (Zou *et al.*, 2000). Los receptores de quimioquinas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y poseen siete segmentos transmembrana. La señalización a través de ellos produce una cascada de fosforilaciones de tirosinas (Wong y Fish, 2003) en la ruta de transducción Jak-Stat. Las proteínas Stat fosforiladas dimerizan y se trasladan al núcleo donde se unen a secuencias promotoras

y regulan la expresión génica (Mellado *et al.*, 2001). Las dos poblaciones mayoritarias de monocitos se diferencian en el patrón de receptores de quimioquinas que expresan (principalmente en CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1) y en algunas moléculas implicadas en adhesión celular, como CD62L. Tanto en ratón como en humano los monocitos “clásicos” expresan niveles altos de CCR2, intermedios de CX<sub>3</sub>CR1 y son CD62L<sup>+</sup>; en cambio, los monocitos “no clásicos” tienen baja expresión de CCR2, alta de CX<sub>3</sub>CR1 y son CD62L<sup>-</sup> (Palframan *et al.*, 2001; Geissmann *et al.*, 2003; Tacke y Randolph, 2006).

El receptor CCR2 se une a las quimioquinas CCL2 y CCL7, aunque esta última con menor afinidad (Le *et al.*, 2004). Los experimentos con ratones parabiontes en los que un animal no expresaba CCR2 demostraron que en ausencia de este receptor los monocitos no podían salir de la médula ósea hacia la circulación sanguínea (Serbina y Pamer, 2006). Asimismo la delección de alguna de estas quimioquinas (CCL2 o CCL7) resultó en una disminución de entre un 40-50 % en el reclutamiento de los monocitos durante un proceso infeccioso, reflejando su contribución al tráfico de los monocitos (Jia *et al.*, 2008; Tsou *et al.*, 2007). Los fibroblastos y las células endoteliales y epiteliales producen CCL2 cuando son expuestas a citoquinas inflamatorias o compuestos microbianos, generando una alta concentración de esta citoquina en el tejido inflamado (para permitir la salida de los monocitos desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos) y/o en la sangre (para que pasen los monocitos de la médula ósea a la sangre) (Tsou *et al.*, 2007).

Por el contrario, CX<sub>3</sub>CR1 y su ligando CX<sub>3</sub>CL1 favorecen la retención en la médula ósea reduciendo la motilidad celular (Jacquelin *et al.*, 2013). Los monocitos Ly6C<sup>bajo</sup> expresan niveles elevados de CX<sub>3</sub>CR1, lo que les permite una mayor retención en las paredes de los vasos sanguíneos para detectar células muertas y/o patógenos (Auffray *et al.*, 2007), ya que el arrastre por el endotelio (o *crawling* en inglés) requiere una unión firme al endotelio mediada por la  $\beta_2$ -integrina LFA-1 (CD11a/CD18) y el receptor de quimioquinas CX<sub>3</sub>CR1. Este receptor está también involucrado en el reclutamiento de monocitos Ly6C<sup>alto</sup> hacia el bazo en infecciones bacterianas: en la infección por *Listeria monocytogenes* se detecta expresión de CX<sub>3</sub>CL1 en la zona marginal del bazo y la delección de CX<sub>3</sub>CR1 se traduce un descenso en el reclutamiento de monocitos Ly6C<sup>alto</sup> a dicho órgano (Auffray *et al.*, 2009).

Otros receptores de quimioquinas implicados en el tráfico de monocitos son CXCR4 y CCR5. CXCR4 es el receptor de la quimioquina CXCL12 y en ratón se expresa en mayor medida en los monocitos más inmaduros, como los Ly6C<sup>alto</sup>, principalmente en los Ly6C<sup>alto</sup> de la médula ósea, ya que su función está relacionada con la retención de los monocitos en este órgano (Jung *et al.*, 2015). Su regulación es compleja, ya que cuando se activa CCR2 se insensibiliza el CXCR4 de la misma célula, de manera que ante estímulos inflamatorios los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> CCR2<sup>+</sup> abandonan la médula ósea, según el modelo propuesto por Jung *et al.* en 2015 de insensibilización cruzada de receptores de quimioquinas mediante la integración de múltiples señales. Además, CXCR4 controla las fluctuaciones rítmicas circadianas del número total de monocitos Ly6C<sup>alto</sup> circulantes y su tráfico hacia tejidos reserva de monocitos como el bazo (Chong *et al.*, 2016). Por otro lado, CCR5 es un receptor de quimioquinas que une CCL5, CCL3 y CCL4 (Samson *et al.*, 1996) y se encuentra involucrado en el reclutamiento de macrófagos, linfocitos y monocitos a los lugares de inflamación (Proost *et al.*, 1996; Spagnolo *et al.*, 2005).

El reclutamiento y tráfico celular también depende de integrinas y otras moléculas de adhesión como la selectina CD62L, expresada en los monocitos "clásicos" y ausente o a niveles muy bajos en los "no clásicos". CD62L media una rápida circulación de los monocitos por los vasos sanguíneos (Finger *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 1997), y tiene una importante función regulando el movimiento de los monocitos desde la sangre hacia los tejidos linfoides en condiciones inflamatorias (Xu *et al.*, 2008).

#### 4.1.4. Poblaciones de monocitos en cerdo.

Los primeros en describir la heterogeneidad de los monocitos sanguíneos en la especie porcina fueron Sánchez *et al.* en 1999, definiéndola en función de la expresión de CD163. Entre un 5-50% de los monocitos de la sangre (según el donante) expresan este receptor; los monocitos CD163<sup>+</sup> también expresan mayores niveles del antígeno de histocompatibilidad porcino tipo II (SLA-DR) y menores de CD14 que la población CD163<sup>-</sup>. Los monocitos CD163<sup>+</sup> muestran una mayor capacidad de presentar antígeno soluble (lisozima) a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, generando una mayor proliferación de las células T que sus homólogos CD163<sup>-</sup> (Chamorro *et al.*, 2005). Cuando la población CD163<sup>-</sup> es cultivada en medio que contiene suero porcino las células adquieren la

expresión de CD163 y otras características que recuerdan a la población CD163<sup>+</sup>, como la mayor expresión de SLA-DR (Sánchez *et al.*, 1999; Chamorro *et al.*, 2005).

Los análisis de expresión de algunos receptores de quimioquinas en las dos poblaciones de monocitos sanguíneos porcinos (CD163<sup>-</sup>SLA-DR<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>+</sup>) revelan que la población CD163<sup>+</sup> expresa más CX<sub>3</sub>CR1 y menos CCR2 y CXCR4 que los monocitos CD163<sup>-</sup> (Moreno *et al.*, 2010). Además, los monocitos CD163<sup>-</sup> son capaces de unir CCL2 y migran en respuesta a esta quimioquina (Moreno *et al.*, 2010). La expresión de CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1, junto con otras características estudiadas en los artículos anteriores, asemejan la población CD163<sup>-</sup> porcina a la población de monocitos “clásicos” de otras especies (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> en humanos) y los CD163<sup>+</sup> porcinos a los “no clásicos” (CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup>).

Subpoblación de monocitos en ratón	Otros receptores expresados	Equivalente en humano	Equivalente en cerdo
Ly6C <sup>alto</sup>	CCR2 <sup>++</sup> ; CX <sub>3</sub> CR1 <sup>medio</sup> ; CD62L <sup>+</sup>	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	CD163 <sup>-</sup>
Ly6C <sup>bajo</sup>	CCR2 <sup>bajo</sup> ; CX <sub>3</sub> CR1 <sup>++</sup> ; CD62L <sup>-</sup>	CD14 <sup>bajo</sup> CD16 <sup>+</sup>	CD163 <sup>+</sup>

**Tabla 1.** Poblaciones de monocitos y sus equivalencias en las especies de ratón, humano y cerdo. Es importante tener en cuenta que las correspondencias entre cada especie no son exactas; son poblaciones que aunque se asemejan entre sí en algunas características, también presentan particularidades propias de especie.

Ondrackova y colaboradores han estudiado los cambios que ocurren en estas poblaciones en cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria que causa una enfermedad respiratoria, o con *Salmonella enteritidis*, un patógeno intestinal (Ondrackova *et al.*, 2013a, 2013b). En los lechones infectados con *Salmonella* la población de monocitos CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>+</sup> se incrementó en la médula ósea y los nódulos linfáticos mesentéricos (Ondrackova *et al.*, 2013a). En los animales infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* se observó un aumento en el porcentaje de monocitos que expresaban CD163 y en la intensidad de dicho receptor en la médula ósea, sangre periférica y pulmones en comparación a los controles no infectados. En cambio, la expresión de SLA-DR en estas células se encontraba disminuida, a pesar de que en

condiciones no inflamatorias la mayoría de los monocitos CD163<sup>+</sup> son también SLA-DR<sup>+</sup> (Ondrackova *et al.*, 2013b).

## **4.2. Macrófagos.**

### 4.2.1. Funciones y orígenes de los macrófagos.

Los macrófagos se encargan de la defensa frente a patógenos en los tejidos del cuerpo y de iniciar y controlar las respuestas inmunes adaptativas (Mosser y Edwards, 2008). Entre sus funciones se encuentran la fagocitosis, la producción de factores de crecimiento, citoquinas pro- y antiinflamatorias y otros mediadores solubles, y la reparación del tejido tras la inflamación (Geissmann *et al.*, 2010; Gordon y Martínez, 2010). Su tarea de fagocitar células apoptóticas es esencial para la homeostasis y si falla puede dar lugar a enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Tibrewal *et al.*, 2008). Esta diversidad de cometidos se refleja en su plasticidad y heterogeneidad dependiendo del tejido o nicho donde residan y de su especialización funcional (Wynn *et al.*, 2013).

Aunque hasta hace pocos años se consideraba que todos ellos derivaban de monocitos circulantes, actualmente se conoce que pueden tener varios orígenes. Algunos, como es el caso de los del intestino y la dermis, proceden de los monocitos de la médula ósea, que pasan a la sangre y de ahí a los tejidos donde se diferencian a macrófagos, (van Furth y Cohn, 1968; van Furth, 1970; Bain *et al.*, 2013; Bain *et al.*, 2014). Otros, como las células de la microglía y las células de Kupffer del hígado tienen su origen en precursores derivados del saco vitelino que se diseminaron por los tejidos en la etapa embrionaria y maduraron a macrófagos tisulares que se mantienen por proliferación local (Ajami *et al.*, 2007). En un tercer grupo, que incluye a los macrófagos alveolares, los macrófagos de la pulpa roja del bazo y los peritoneales, están aquellos que derivan de células madre hematopoyéticas del hígado fetal (Yona *et al.*, 2013). En algunos órganos (hígado, dermis y corazón) los macrófagos pueden tener un origen dual (Epelman *et al.*, 2014a), encontrándose poblaciones que proceden del saco vitelino embrionario, de células madre embrionarias del hígado fetal y/o de monocitos de la médula ósea adulta (Epelman *et al.*, 2014b; Italiani y Boraschi, 2014).

### 4.2.2. Plasticidad de los macrófagos: macrófagos tipo M1 o M2.

En los tejidos los macrófagos tienen dos funciones principales según en qué momento se encuentren. Inicialmente, ante un patógeno deben desarrollar una fuerte defensa microbicida e inflamatoria, pero posteriormente hay que eliminar todas las células muertas que ha dejado el proceso, finalizar la inflamación y reparar el tejido. Cuando los macrófagos están en la primera fase adquieren un estado de polarización llamado M1 (macrófagos M1) y en la segunda etapa adquieren un estado de polarización M2 (macrófagos M2). Esta nomenclatura M1/M2 responde a una clasificación conceptual simplificada, ya que realmente son dos extremos de un continuo; es una forma de esquematizar la plasticidad de los macrófagos que cambian rápidamente en respuesta a las señales que reciben en su nicho tisular (Mosser y Edwards, 2008; Sica y Mantovani, 2012).

Los estudios *in vitro* indican que los macrófagos se activan en el programa funcional tipo M1 cuando están expuestos a moléculas relacionadas con microorganismos infecciosos, como LPS, TNF- $\alpha$  y/o IFN- $\gamma$ . Producen citoquinas proinflamatorias (IL-12, IL-23, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) y moléculas microbicidas como ROS (especies reactivas de oxígeno) y NO (óxido nítrico), y participan en la polarización de las respuestas de los linfocitos Th1 (T helper 1) (Italiani y Boraschi, 2014; Mosser, 2003; Gordon y Taylor, 2005).

Por el contrario, los macrófagos M2 responden ante citoquinas relacionadas con los linfocitos Th2 (IL-4 e IL-13) (Gordon, 2003), a los ligandos de receptores Fc $\gamma$  y TLR, y con moléculas antiinflamatorias como IL-10, TGF- $\beta$ , y glucocorticoides (Italiani y Boraschi, 2014). De hecho, en función de con qué estímulo se activen y otras diferencias funcionales los macrófagos M2 se subdividen en M2a, M2b y M2c (Gordon, 2003; Martínez *et al.*, 2008). Producen grandes cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$ , bajas de IL-12 (Martínez y Gordon, 2014; Ezquerro 2009), y tienen en su superficie muchos receptores *scavenger*, de manosa y galactosa. Los macrófagos M2 están implicados en la regulación de la inflamación, reparación del tejido y angiogénesis (Sica y Mantovani, 2012; Italiani y Boraschi, 2014). Otra de las diferencias entre los macrófagos M1 y M2 se encuentra en su metabolismo: en los macrófagos M2 el metabolismo de la arginina está encarrilado hacia la producción de ornitina y poliaminas, que participan y promueven la proliferación celular y la reparación tisular (Pesce *et al.*, 2009); en los M1 el metabolismo de la arginina

está enfocado a la producción de NO y citrulina, que tienen actividad microbicida (Mac Micking *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 2000).

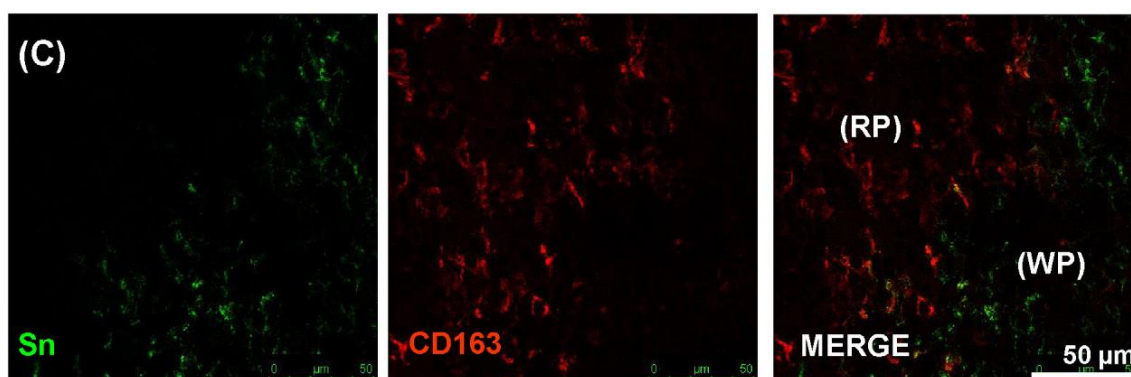
En resumen, los macrófagos son células muy versátiles y con una gran capacidad de cambio en función de las señales que reciben de su entorno. Esta característica es fundamental para elaborar una eficaz respuesta inmune frente a los patógenos, pero también para que esta respuesta sea regulable y no ocasione daños en el hospedador.

### 4.2.3. Los macrófagos de bazo porcino.

El bazo es un órgano linfoide secundario con varias funciones: participa en la generación de la respuesta inmune frente a antígenos que llegan por vía sanguínea y también en él se da la producción y almacenamiento de células sanguíneas, principalmente eritrocitos y plaquetas, y la eliminación de células de la sangre envejecidas o dañadas. En el bazo se distinguen dos zonas: la pulpa blanca y la pulpa roja. La pulpa blanca está constituida por folículos linfoides (con linfocitos, células plasmáticas y células presentadoras de antígeno) y por vainas linfoides periarteriales habitadas mayoritariamente por linfocitos T. La pulpa roja está formada por un entramado de cordones esplénicos, senos venosos y capilares. En ella se encuentran monocitos, eritrocitos, plaquetas y macrófagos.

El bazo contiene un abundante número de macrófagos con características diferentes dependiendo de su localización. Concretamente en el bazo porcino nuestro grupo ha descrito dos poblaciones de macrófagos: los CD163<sup>+</sup> en la pulpa roja, y los CD169<sup>+</sup> localizados en la zona marginal entre la pulpa blanca y la roja (Poderoso *et al.*, 2011; Revilla *et al.*, 2009). En un principio se consideró que la expresión de estos receptores era excluyente, al distinguirse una población de macrófagos CD163<sup>+</sup>CD169<sup>-</sup> y otra CD163<sup>-</sup>CD169<sup>+</sup> (Poderoso *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014). Ambos tipos celulares son CD172a<sup>+</sup>, como se esperaba por su origen mieloide, y mientras los macrófagos CD169<sup>+</sup> expresan niveles altos de CD11R1, los macrófagos CD163<sup>+</sup> apenas expresan este marcador. Los macrófagos CD169<sup>+</sup> son SLA-DR<sup>alto</sup> CD80/86<sup>alto</sup> CD11a<sup>+</sup> CD14<sup>int</sup> TLR-2<sup>+</sup> TLR-4<sup>+</sup>, receptores que son útiles para detectar antígenos bacterianos, ya que estas células están en una zona de entrada de posibles patógenos.

Por el contrario, los macrófagos CD163<sup>+</sup> expresan niveles intermedios de SLA-DR, CD80/86, TLR2 y TLR4 y son CD14<sup>-/bajo</sup> (Álvarez *et al.*, 2014). Ambas poblaciones celulares poseen capacidad de endocitosis y procesamiento de antígeno soluble, aunque éstas son menos eficientes que en los macrófagos alveolares. La expresión de CD107a, una proteína localizada en el lumen de los lisosomas, es elevada en las dos poblaciones, lo que parece indicar un alto contenido lisosomal relacionado con la degradación de virus y bacterias. Además los macrófagos CD163<sup>+</sup> están más especializados que los CD169<sup>+</sup> esplénicos en la presentación de antígeno soluble a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Álvarez *et al.*, 2014).



**Figura 8.** En el bazo los macrófagos CD169<sup>+</sup> se encuentran localizados en las zonas limítrofes entre la pulpa roja y la blanca, y los macrófagos CD163<sup>+</sup> se ubican en la pulpa roja de este órgano. RP (pulpa roja), WP (pulpa blanca), Sn (CD169). Extracto de una figura de Poderoso *et al.*, 2011.

### 4.3. Células dendríticas.

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras profesionales de antígeno localizadas mayoritariamente en la piel, mucosas y tejidos linfoides. Presentan el antígeno a los linfocitos T vírgenes, activándolos, y también median en la tolerancia hacia los antígenos propios, ambientales y nutricionales, para que no ocasionen reacciones inmunes indeseadas. Pueden presentar una gran variedad de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, y según los receptores que expresan, el tejido donde residan y las funciones que ejerzan, se distinguen varios tipos de DC, entre las que destacan las DC clásicas o convencionales, DC plasmacitoides, DC derivadas de monocitos y células de Langerhans (Steinman e Idoyaga, 2010). En porcino han sido caracterizadas las DC convencionales (cDC) y las plasmacitoides (pDC).

*In vitro* se pueden generar varios tipos de DC porcinas. Las DC derivadas de monocitos (MoDC) se obtienen cultivando monocitos sanguíneos con IL-4 y GM-CSF (Carrasco *et al.*, 2001; Paillot *et al.*, 2001), aunque también se han obtenido combinando GM-CSF con otras moléculas distintas a IL-4 (IFN- $\alpha$  o IL-13) (Balmelli *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2007). Fenotípicamente son CD1<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD80/86<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup> SLA-DR<sup>+</sup> (Carrasco *et al.*, 2001; Paillot *et al.*, 2001; Bautista *et al.*, 2007; Foss *et al.*, 2003; Chamorro *et al.*, 2004). Otra forma de generar DC es a partir de células hematopoyéticas de la médula ósea (BMDC), cultivándolas con GM-CSF más TNF- $\alpha$  o GM-CSF sólo durante siete-diez días (Carrasco *et al.*, 2001). Entre un 50-85% de las células no adherentes que se obtienen en esas condiciones presentan un fenotipo CD172a<sup>+</sup> SLA-DR<sup>+</sup> SWC8<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD1<sup>+</sup> con prolongaciones y extensiones dendríticas y que actúan como potentes activadores de linfocitos T alogénicos (Carrasco *et al.*, 2001).

Otros tipos de DC porcinas no generadas *in vitro*, sino que se encuentran de forma natural en el animal, son las DC sanguíneas convencionales (cDC), las DC plasmacitoides (pDC) y las DC de las mucosas (Summerfield y McCullough, 2009). Dentro de las cDC se pueden diferenciar dos subtipos, las que se asemejarían más a las cDC1 (SLA-DR<sup>alto</sup>CADM1<sup>alto</sup>CD172a<sup>-/bajo</sup>), que promueven la respuesta Th1, y las cDC2 (SLA-DR<sup>alto</sup>CADM1<sup>alto</sup>CD172a<sup>+</sup>) que estimulan las respuestas Th2 y Th17 (Summerfield *et al.*, 2015; Vu Manh *et al.*, 2015; Parra-Sánchez *et al.*, 2018; Soldevila *et al.*, 2018). Las pDC (CD172a<sup>int</sup> CD4<sup>alto</sup>) son células especializadas en responder a la infección viral con altas concentraciones de IFN de tipo I y con la migración al tejido linfoide (Liu, 2005; Riffault *et al.*, 1997; Riffault *et al.*, 2001). Entre las DC porcinas asociadas a mucosas se encuentran las DC localizadas en las placas de Peyer (Makala *et al.*, 1998), las de la lámina propia del intestino delgado (Haverson *et al.*, 2000) y las de la mucosa de la tráquea (Bimczok *et al.*, 2007).

## ***OBJETIVOS***

---

---

Teniendo en cuenta que en los últimos años algunos estudios apuntan a que la contribución de CD169 no parece ser estrictamente necesaria en la infección por PRRSv, nos planteamos analizar si otros miembros de esta familia, los siglecs, también podrían estar implicados en la interacción con el virus. Así mismo consideramos relevante estudiar las funciones y características de las diferentes poblaciones del linaje monocítico de médula ósea porcina, que se definen por la distinta expresión de los dos principales receptores descritos para el virus, CD163 y CD169, analizando también si difieren o no en la susceptibilidad a la infección. Consideramos que esta investigación puede proporcionar información acerca de la relación de estos receptores con la infección por PRRSv en células hasta ahora no estudiadas como dianas del virus. En función de estas hipótesis hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Estudio del papel de CD169, Siglec 3 y Siglec 5 en la infección por PRRSv de macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo y análisis de la expresión de estos siglecs en células dendríticas derivadas de médula ósea infectadas y sin infectar.
- 2) Estudio de la interacción de PRRSv con las poblaciones de monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de médula ósea.
- 3) Caracterización fenotípica y funcional de dichas poblaciones de monocitos de médula ósea.

# ***MATERIAL Y MÉTODOS***

---

---

## **1. ANIMALES.**

Las células porcinas utilizadas en esta tesis se obtuvieron de cerdos sanos de raza *Large-White* de edades comprendidas entre las tres y siete semanas. Para la obtención de las muestras de tejidos los cerdos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0,3 g/Kg) y sacrificados por desangrado. Por otra parte, en algunos experimentos también utilizamos sangre de cerdos adultos con edades comprendidas entre los tres y los 24 meses. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas del Comité de Ética y Experimentación Animal y Bioseguridad del INIA.

## **2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS.**

### **2.1. Células mononucleares sanguíneas (PBMC).**

La sangre se obtuvo en el momento del desangrado en los lechones o mediante punción de la vena cava anterior en los cerdos adultos, y fue recogida en tubos estériles con 8 mM EDTA (Merck, Alemania) como anticoagulante. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente (TA) siguiendo el protocolo descrito por González *et al.*, (1990). Se dejó sedimentar durante 40 minutos (sangre proveniente de lechones) o 30 minutos (si procedía de cerdos adultos) en una solución de dextrano (*Dextran from Leuconostoc mesenteroides*; Sigma-Aldrich, EE.UU.) preparada al 6% en PBS pH 7,4 (BioWhittaker™ Lonza; Bélgica). Se recogió la fase superior, rica en leucocitos y se centrifugó 15 minutos a 250 x *g*.

Con el sedimento celular obtenido se realizó una separación en un gradiente de Percoll (GE HealthCare Bio-Sciences AB, Suecia) al 61% centrifugando a 300 x *g* sin freno durante 15 minutos. Las PBMC, localizadas en la banda de la interfase, se recogieron y se lavaron dos veces en PBS con 2% FBS (BioWhittaker™ Lonza) previamente descomplementado a 57°C durante 30 minutos. A continuación, en aquellas muestras donde se observó contaminación con eritrocitos se llevó a cabo un tratamiento hipotónico para eliminarlos, resuspendiendo las células en 9 ml de agua destilada durante 28 segundos y parando la reacción con 3 ml de NaCl al 3,5%. Tras tres lavados con PBS con 2% FBS se resuspendieron las células en medio completo (RPMI 1640 (BioWhittaker™ Lonza) suplementado con 10% FBS descomplementado, 2mM de L-glutamina (BioWhittaker™ Lonza), 5x10<sup>-5</sup> M de β-mercaptoetanol (Serva, Alemania), 50

$\mu\text{g/ml}$  de gentamicina (BioWhittaker™ Lonza) y 20 mM de HEPES (Sigma-Aldrich)). El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer, utilizando azul Tripán al 0,1% (Dr. G. Grüber & Co. Leipzig, Alemania) en PBS como colorante vital.

Las células se resuspendieron en medio de congelación, consistente en una solución de FBS con 10% de DMSO (Sigma-Aldrich), conservándose en nitrógeno líquido hasta su uso.

### **2.2. Macrófagos alveolares.**

Se recogieron por lavado broncoalveolar, siguiendo el protocolo descrito por Bullido *et al.* (1996), que consiste en realizar varios lavados de los pulmones con una solución de PBS estéril con glucosa 1 mg/ml, EDTA 2 mM, y gentamicina 150  $\mu\text{g/ml}$ . Las células fueron resuspendidas en medio completo, se determinó su viabilidad utilizando azul tripán y se utilizaron en fresco o se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### **2.3. Células de médula ósea.**

Las células fueron obtenidas de fémures y tibias perforando por ambos extremos del hueso con una aguja de 18G e inyectando con una jeringa tampón de lavado (PBS con 2 mM EDTA, 2% FBS y 150  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina). Se lavaron dos veces por centrifugación con tampón de lavado y los eritrocitos se lisaron incubando con 150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM  $\text{NaHCO}_3$  pH 7,3 durante cinco minutos. Tras varios lavados, en algunos experimentos se procedió a eliminar los granulocitos maduros mediante centrifugación (300 x g 15 minutos TA sin freno) en un gradiente de Percoll discontinuo del 53%. Se recogió la interfase y tras lavar dos veces en RPMI 1640, las células se resuspendieron en medio completo. Fueron contadas y usadas en fresco o congeladas utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

### **2.4. Células de bazo.**

Las suspensiones celulares de bazo fueron obtenidas por disrupción mecánica del tejido, que fue disgregado con el émbolo de una jeringa sobre una placa de Petri que contenía medio completo y filtrado por un colador de 70  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, EE. UU.).

Los eritrocitos fueron lisados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado de la médula ósea. Después de un lavado las células fueron resuspendidas en medio completo. Todos los experimentos con células de bazo fueron realizados con células frescas.

### **3. SEPARACIÓN DE POBLACIONES CELULARES.**

#### **3.1. Separación magnética de macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo.**

Con el objetivo de purificar la población de macrófagos CD163<sup>+</sup> las células del bazo fueron incubadas durante 30 minutos con el AcMo 2A10/11 (anti-CD163; ver Tabla 3), lavadas tres veces con PBS más 5% FBS y 2 mM EDTA e incubadas durante 15 minutos con microesferas conjugadas con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG (H+L) de ratón (Miltenyi Biotec, EE. UU.). Luego las células fueron lavadas una vez, coladas por filtros de 70 µm para eliminar los agregados celulares y pasadas a través del separador magnético *autoMacs<sup>R</sup> Pro Separator* (Miltenyi Biotec) utilizando el programa *Posselds* (selección positiva en modo sensible) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción positiva resultante fue lavada, determinado su número y viabilidad celular y resuspendida en medio completo para proseguir con los experimentos pertinentes. Todo el proceso de la separación fue llevado a cabo a 4°C y los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo obtenidos mostraron una pureza ≥85% cuando fueron analizados por citometría de flujo.

#### **3.2. Separación mediante un citómetro separador (FACS) de los monocitos CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup> de médula ósea.**

Las células de médula ósea, previa eliminación de los granulocitos maduros por gradiente de Percoll 53% (ver apartado 2.3.) fueron incubadas durante 20 minutos con el AcMo anti-CD172a 74-22-15a (IgG2b) y el AcMo anti-CD163 2A10/11 (IgG1). En paralelo se incubaron en otros tubos con los anticuerpos controles negativos del mismo isotipo, 2H9 (IgG1) y 3E4 (IgG2b), y con distintas combinaciones de los anticuerpos positivos y negativos para conseguir los tubos FMO (Fluorescencia menos uno). Después de dos lavados con el "tampón de separación" ( PBS + 2% FBS + 2 mM EDTA) las células fueron incubadas con los anticuerpos de cabra anti-IgG2b de ratón conjugado

con PE y anti-IgG1 de ratón conjugado con APC (Southern Biotech, EE. UU.) durante 20 minutos. Las células fueron lavadas dos veces, pasadas por un filtro de 70  $\mu\text{m}$  y resuspendidas en "tampón de separación". Todo el proceso fue realizado a 4°C.

Las células muertas fueron excluidas por tinción con *SYTOX<sup>TM</sup> Blue* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las dos poblaciones de monocitos (CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>) fueron aisladas simultáneamente usando un citómetro separador *BD FACSAria<sup>TM</sup> III* (BD Biosciences, EE. UU.) basándonos en criterios de fluorescencia para CD172a y CD163 y el perfil característico de monocitos para SSC y FSC (SSC bajo y FSC alto), excluyendo de esta manera a los granulocitos que quedaban en la muestra. La pureza de las poblaciones separadas fue  $\geq 90\%$ .

#### **4. CULTIVO DE CÉLULAS PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA CON FACTORES DE CRECIMIENTO.**

##### **4.1. Cultivos de las células de médula ósea con GM-CSF o M-CSF.**

Las células de médula ósea total se cultivaron durante ocho días (a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>) en pocillos de placas M6 (Nunc, Dinamarca) a una concentración de 3x10<sup>6</sup> células por pocillo en 2 ml de medio completo. Se añadió GM-CSF recombinante porcino (rpGM-CSF) (Invitrogen, EE. UU.) a una concentración final (Cf) de 100 ng/ml. A los cuatro días se reemplazó el medio de cultivo para reponer nuevo rpGM-CSF. A los ocho días o bien las células se infectaron con PRRSv, o se recogieron y se analizó su fenotipo mediante citometría de flujo, según el perfil de cada experimento.

Las células de médula ósea total también se cultivaron con M-CSF recombinante humano (rhM-CSF) (Gibco® Thermo Fisher Scientific) a una Cf de 20 ng/ml. El cultivo y el cambio de medio fueron análogos a lo descrito anteriormente para el rpGM-CSF. Las células fueron recogidas para su análisis por citometría de flujo a los cinco y ocho días en cultivo.

##### **4.2. Cultivo de las subpoblaciones de monocitos de médula ósea con M-CSF.**

Las dos poblaciones de monocitos de médula ósea aisladas previamente en un citómetro separador (poblaciones CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>) fueron puestas en cultivo con 20 ng/ml de rhM-CSF en placas de 24 pocillos, a  $0,8 \times 10^6$  células por pocillo. Las células fueron recogidas para analizar su fenotipo por citometría a los dos, tres y cinco días en cultivo (en este último caso se repuso el medio con rhM-CSF al cuarto día). En paralelo se mantuvieron cultivos control (medio completo sin rhM-CSF).

### **5. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRSv).**

Todos los experimentos fueron realizados con la cepa 5710, de genotipo Europeo (PRRSv-1), aislada en 1992 en el norte de España y proporcionada a nuestro laboratorio por la Dra. Cinta Prieto (Facultad de Veterinaria, UCM).

#### **5.1. Producción del virus.**

Todos los experimentos de infección de células fueron realizados con lotes de virus crecidos en macrófagos alveolares porcinos. Para ello se cultivaron los macrófagos en medio completo y se dejaron adherir ( $\approx 16$  horas). Se retiró el medio y se añadió el inóculo de PRRSv a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Después de una hora de adsorción a TA se retiró el inóculo y se añadió RPMI 1640 con 5% FBS. Transcurridos tres-cuatro días de cultivo, cuando se observó efecto citopático en más del 80% de las células, los frascos de cultivo fueron congelados (a  $-80$  °C) y descongelados tres veces consecutivas. El homogeneizado celular resultante se centrifugó a  $3000 \times g$  10 minutos  $4$ °C para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se distribuyó en alícuotas que se congelaron a  $-80$ °C hasta su utilización. En paralelo en otros frascos de cultivo se produjo un inóculo control (*mock*) utilizando el mismo protocolo pero sin infectar las células.

#### **5.2. Titulación del virus por efecto citopático.**

Los lotes de virus producidos se titularon por efecto citopático en macrófago alveolar. Para ello se descongelaron macrófagos y se distribuyeron en placas de 96 pocillos, a  $2 \times 10^5$  células por pocillo, dejándolos adherir 16 horas en cultivo. A

continuación, se retiró el medio y se añadieron en octuplicados 50 µl por pocillo de diluciones seriadas en base 10 del lote viral durante  $\geq 1$  hora. Como control negativo se utilizó medio de cultivo. Transcurrido ese tiempo se completó el volumen de los pocillos añadiendo 150 µl de medio completo. Las células se mantuvieron en el incubador, realizándose diariamente lecturas de las placas para evaluar el efecto citopático producido por el virus en las células, hasta el séptimo día post-infección. El título viral se calculó con el método descrito por Reed y Muench (Reed y Muench, 1938), expresándose en forma de  $DICT_{50/ml}$ .

### **5.3. Titulación del virus por RT-qPCR.**

Los títulos virales producidos por los monocitos de médula ósea fueron evaluados también por detección de transcritos de *ORF7* (que codifica la nucleoproteína vírica) mediante RT-qPCR.

#### **5.3.1. Extracción del RNA.**

Para ello se aisló el RNA de los sobrenadantes de los cultivos previamente congelados y descongelados tres veces y centrifugados para eliminar los restos celulares. Se usó el kit *QiAamp Viral RNA MiniKit* (Qiagen, Reino Unido) y se partió de 140 µl de cada muestra. Se siguió el protocolo descrito en dicho kit utilizando como control negativo del proceso de extracción medio completo. Además se añadió a todas las muestras 4 µl de IPC (*Internal Positive Control*) del kit de la RT-qPCR. El RNA fue eluido en 60 µl de tampón de elución y almacenado a  $-20$  °C.

#### **5.3.2. RT-PCR cuantitativa.**

A continuación se procedió a la detección de PRRSv por RT-qPCR usando *VetMAX™ NA and EU PRRSV Reagents* (Thermo Fisher Scientific), un kit para realizar una RT-PCR cuantitativa multiplex de un paso, capaz de discriminar entre las cepas de PRRSv Norteamericana y Europea, y un IPC, que sirve como control positivo del proceso de extracción del RNA y para confirmar la ausencia de inhibidores de PCR en las muestras. Se siguió el protocolo descrito en el producto, añadiendo 7 µl de RNA extraído a 18 µl de "Mix PRRS EU/NA" (contiene los primers y las sondas para detectar el virus Norteamericano y Europeo y el IPC, el tampón de dilución de la PCR, la transcriptasa

reversa y la polimerasa). Se usó agua libre de DNasa/RNasa como control negativo de amplificación y un pocillo con "EPC-PRRS EU/NA" como control positivo externo (reactivo que contiene ácido nucleico ya extraído del virus). Se realizó una curva estándar con diluciones seriadas 1/10 de un lote de PRRSv con título conocido. Se usaron placas de reacción óptica con 96 pocillos *Applied Biosystems® MicroAmp® Fast* (Thermo Fisher Scientific) en una máquina *7500 Fast Real-time PCR System* de la misma casa comercial. Los títulos virales fueron determinados con la ecuación de la recta obtenida con la curva estándar que relaciona el Ct con el título viral expresado como DICT<sub>50</sub>/ml.

Paso	Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
Paso 1	1x	45 °C	10 min
Paso 2	1x	95 °C	10 min
Paso 3	40x	97 °C	2 seg
		60 °C	40 seg

**Tabla 2.** Programa utilizado para la RT-qPCR.

#### 5.4. Purificación y marcaje con biotina del virus.

El virus fue crecido en la línea celular Marc-145 (cultivadas en medio de cultivo DMEM (BioWhittaker™ Lonza) suplementado con 5% FBS descomplementado, 2mM de L-glutamina y 50 µg/ml de gentamicina) infectando con una MOI de 0,01 hasta conseguir a los tres-cuatro días un ≈80% de células lisadas por el virus. Los frascos de cultivo fueron congelados y descongelados tres veces consecutivas y se recogió el sobrenadante del cultivo tras centrifugación (3000 x g 10 minutos 4 °C). Se centrifugó una segunda vez a más velocidad (12.000 x g 30 minutos 4° C; centrífuga Avanti™ J-25I Beckman Coulter, rotor JA-20). Posteriormente el sobrenadante se añadió sobre un colchón de Sacarosa al 30% y se ultracentrifugó a 112.000 x g 3 horas 4 °C en un rotor SW28 (Optima L-90k Ultracentrifuge; Beckman Coulter). El sedimento resultante se resuspendió en el tampón de biotinización (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 40 mM pH 8,6) y se cuantificó la concentración de proteína viral con un kit de BCA (ácido bicínico) (Pierce® Thermo Fisher Scientific), ajustándose a 1 mg/ml.

Se añadieron 40 µl de biotina (Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific) por milígramo de proteína viral y se incubó la mezcla rotando en una noria

una hora a 4°C. A continuación se paró la reacción con el tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,5 y se separó el virus por una columna de Sephadex G-25, recogiendo las fracciones del eluido. Se midió la concentración del virus en el espectrofotómetro (Abs 280 nm), con el kit de BCA y mediante titulación del virus.

## 6. ANTICUERPOS.

Se utilizó una amplia variedad de anticuerpos en los distintos tipos de experimentos realizados en la tesis (citometría de flujo, separación de poblaciones celulares, ensayos celulares y funcionales, inmunofluorescencia, ELISAs... etcétera).

Los anticuerpos monoclonales empleados aparecen en la Tabla 3. Algunos fueron producidos en nuestro laboratorio, otros fueron amablemente cedidos por otros laboratorios y también se utilizaron anticuerpos comerciales. Según el experimento en concreto, los anticuerpos fueron utilizados sin purificar (en forma de sobrenadante de cultivo) o purificados y marcados con Alexa-488 o biotina. Cada anticuerpo se tituló previamente para determinar su concentración óptima de uso.

Especificidad	Clon	Isotipo	Referencia
CD115	ROS8G11	IgG <sub>2a</sub>	AbD-Serotec, GB
CD11a	3B9/VAN	IgG <sub>2a</sub>	Pérez <i>et al.</i> , no publicado
CD11R1	MIL-4	IgG <sub>1</sub>	<sup>2</sup> Haverson <i>et al.</i> , 1994
CD11R3	2F4/11	IgG <sub>1</sub>	Bullido <i>et al.</i> , 1996
CD14	MIL-2	IgG <sub>2b</sub>	AbD-Serotec, GB
CD16	G7	IgG <sub>1</sub>	AbD-Serotec, GB
CD163	2A10/11	IgG <sub>1</sub>	Bullido <i>et al.</i> , 1997a ; Sánchez <i>et al.</i> , 1999
CD169/ Siglec 1	1F1CR4	IgG <sub>2a</sub>	Revilla <i>et al.</i> , 2009
CD172a	BA1C11	IgG <sub>1</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2000b
CD172a	74-22-15a	IgG <sub>2b</sub>	<sup>1</sup> Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
CD172a	BL1H7	IgG <sub>1</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2000b
CD18	BA3H2	IgG <sub>1</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2000a; Domínguez <i>et al.</i> , 2001
CD203a	PM18-7	IgG <sub>1</sub>	AbD-Serotec, GB
CD45	2A5	IgG <sub>1</sub>	Saalmüller, 1996; Bullido <i>et al.</i> , 1997
CD8 $\alpha$	76-2-11	IgG <sub>2a</sub>	<sup>1</sup> Pescovitz <i>et al.</i> , 1984

Control isotipo IgG <sub>2a</sub> (VP30 del virus de la Peste Porcina Africana)	1D9	IgG <sub>2a</sub>	Producido en nuestro laboratorio; (Álvarez <i>et al.</i> ) no publicado
Control isotipo IgG <sub>1</sub> (Ig <sub>M</sub> trucha)	2H9	IgG <sub>1</sub>	Sánchez y Domínguez, 1991.
Control isotipo IgG <sub>1</sub> (Virus de la Necrosis pancreática infecciosa)	4B9	IgG <sub>1</sub>	Domínguez <i>et al.</i> , 1991
Control isotipo IgG <sub>2b</sub> (VP73 del virus de la Peste Porcina Africana)	3E4	IgG <sub>2b</sub>	Producido en nuestro laboratorio; (Álvarez <i>et al.</i> ) no publicado
Control isotipo Ig <sub>M</sub>		Ig <sub>M</sub>	AbD-Serotec
IFN- $\alpha$ porcino	K9	IgG <sub>1</sub>	PBL interferon source, EE.UU.
IFN- $\alpha$ porcino	F17	IgG <sub>1</sub>	Spíchal <i>et al.</i> , 1994
Neutrófilos	6D10	IgG <sub>2a</sub>	Pérez <i>et al.</i> , 2007
Proteína N PRRSv	SDOW-17A	IgG <sub>1</sub>	Rural Technologies Inc, EE.UU.
Proteína N PRRSv	1CH5	IgG <sub>2b</sub>	Ingenasa, España.
Siglec 10	2E9G11	IgG <sub>1</sub>	Escalona <i>et al.</i> , 2015
Siglec 3/CD33	5D5	IgG <sub>1</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2015
Siglec 5	4F7	IgG <sub>1</sub>	Escalona <i>et al.</i> , 2014
SLA-DR	1F12	IgG <sub>2b</sub>	Bullido <i>et al.</i> , 1997b
SLA-DR	2E9/13	IgG <sub>2b</sub>	Bullido <i>et al.</i> , 1997b
SWC8	MIL-3	Ig <sub>M</sub>	<sup>2</sup> Haverson <i>et al.</i> , 1994 y 1998
TLR2	1H11	IgG <sub>1</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2008
TLR4	3H3	Ig <sub>M</sub>	Álvarez <i>et al.</i> , 2013

**Tabla 3.** Anticuerpos monoclonales utilizados durante esta tesis. <sup>1</sup>Cedidos por J.K. Lunney (ARS, USDA, EE.UU.). <sup>2</sup>Cedidos por K. Haverson (Universidad de Bristol, UK).

### 6.1. Producción de anticuerpos monoclonales (AcMo).

Para la producción de AcMo generados en nuestro laboratorio se descongeló el hibridoma productor y se mantuvo en cultivo expandiendo el número de células hasta conseguir el volumen deseado. Dependiendo de si el hibridoma procedía de una fusión con la línea celular Sp2/0-Ag-14 o con la línea X63Ag.8.653 se utilizó "medio de cultivo Sp2" (RPMI 1640 más 10% FBS, 2 mM L-Glutamina y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina, OPI (1,1mM de oxalacetato, 0,45 mM de piruvato sódico y 0,04 U/ml de insulina bovina)) o "medio de cultivo X63" (RPMI 1640 más 10% FBS, 2 mM L-Glutamina, 1 mM de piruvato sódico y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina).

### 6.2. Cuantificación de AcMo.

La concentración de anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivo se determinó por ELISA. Se incubaron durante 18 horas a 4 °C placas de 96 pocillos de fondo plano Polysorp™ (Thermo Scientific™ Nunc™) con 10 µg/ml de un anticuerpo de conejo anti Igs de ratón (Agilent Technologies, Suecia) diluido en PBS. A continuación se lavaron las placas con PBS 0,5 % Tween 20 (Merck) (6 lavados) y se bloquearon con PBS-1% BSA (Sigma-Aldrich) durante una hora a 37 °C. Tras varios lavados, las placas se incubaron durante una hora a TA con diluciones seriadas del sobrenadante del hibridoma a cuantificar, utilizando como diluyente PBS-1%BSA-0,01% Tween 20. Se utilizaron anticuerpos del mismo isotipo purificados y de concentración conocida para obtener curvas patrón. Después de lavar se incubaron una hora a TA con un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (Dako, Dinamarca). Se lavaron y se añadió el sustrato O-fenildiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) disuelto en tampón citrato fostato 0,05 M pH 5 con 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se frenó la reacción con 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se cuantificó la absorbancia a 492 nm.

### 6.3. Purificación de los anticuerpos.

La purificación de las Ig se realizó mediante cromatografía de afinidad usando una columna con *CaptureSelect™ LC-kappa (mur) Affinity Matrix* (Thermo Fisher Scientific). Es una resina acoplada a anticuerpos monocatenarios de llama anti-cadena *kappa* de ratón. Se rehidrató la resina en PBS, y se equilibró la columna con dicho tampón. El sobrenadante de cultivo se aplicó directamente sobre la columna o diluido en PBS, eliminándose las proteínas no adsorbidas lavando con dicho tampón. Las Ig unidas a la columna se eluyeron con Glicina-HCl 0,1M pH 2,7 (tampón de elución) y se recogieron fracciones, las cuales fueron neutralizadas con Tris-HCl pH 9 y cuantificadas por espectrofotometría. Posteriormente se dializaron en PBS. Para determinar la concentración de Ig purificada se midió la absorbancia a 280 nm y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia a 280 nm}}{\text{Coeficiente de extinción molar (E}^{1\%}_{280\text{nm}})} \times 10 \text{ mg/ml}$$

El coeficiente de extinción molar estimado para las  $\gamma$ -globulinas es de 13,7 (Johnstone y Thorpe, 1982).

### **6.4. Marcaje de los anticuerpos.**

#### **6.4.1. Marcaje con biotina.**

Los AcMo fueron dializados en bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,3 y ajustada su concentración a 1 mg/ml. Se añadieron 125  $\mu$ g de N-hidroxisuccimida-biotina (Sigma-Aldrich) disuelta en DMSO por cada mg de AcMo, y se mantuvo en agitación durante cuatro horas a TA. A continuación se dializó en PBS.

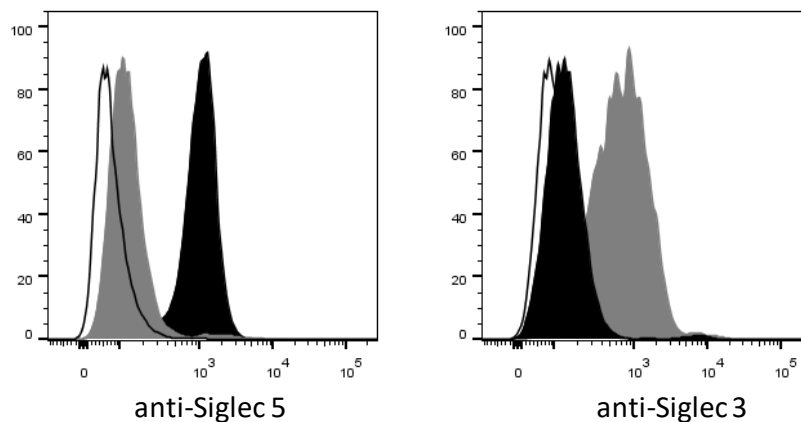
#### **6.4.2. Marcaje con Alexa Fluor 488.**

El marcaje se realizó con el kit comercial Molecular Probes® Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific). Se añadió un décimo del volumen de bicarbonato sódico 1 M al anticuerpo que estaba a una concentración de 2 mg/ml. Se añadieron 500  $\mu$ l de este anticuerpo mezclado al vial del fluorocromo, incubándose en agitación a TA una hora. El anticuerpo marcado se separó del fluorocromo libre mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Bio-Rad BioGel P-30 utilizando como tampón de elución PBS.

### **6.5. Obtención de los anticuerpos policlonales anti Siglec 3 y anti Siglec 5.**

Los anticuerpos policlonales de conejo frente a Siglec 3 y a Siglec 5 fueron obtenidos por inmunización por vía intramuscular con 200  $\mu$ g de proteínas recombinantes solubles consistentes en los dominios extracelulares de los correspondientes receptores fusionados con el fragmento Fc de la IgG1 humana, emulsionadas con adyuvante de Freund completo. El protocolo de obtención de estas proteínas recombinantes, Siglec 3-Fc y Siglec-5 Fc, está debidamente detallado en Álvarez *et al.*, 2015 y Escalona *et al.*, 2014 respectivamente. Los conejos fueron inoculados de nuevo con dosis similares los días 21, 42 y 63 después de la primera inmunización y el suero se recogió a los 7-10 días después de la última dosis. La especificidad de los

anticuerpos policlonales fue verificada por citometría de flujo usando células CHO transfectadas y no transfectadas con dichos siglecs.



**Figura 9.** Las células CHO que expresan las construcciones del Siglec 5-GFP porcino (histogramas negros) y el Siglec 3-GFP (histogramas grises) fueron teñidas con anticuerpos policlonales de conejo anti Siglec 5 o anti Siglec 3, seguido por un anticuerpo policlonal de ratón anti-conejo IgG marcado con biotina (BD Pharmigen, EE.UU.) y revelado con Streptavidina-APC (BD Pharmigen). También se muestra el control de la tinción sobre células CHO no transfectadas (histogramas sin relleno).

## 7. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las células se repartieron en Placas Microwell™ de poliestireno de 96 pocillos de fondo cónico Nunc™ (Thermo Scientific™) y se lavaron dos veces (centrifugando las placas a 340 x g durante 3 minutos) con Tampón de Citometría (TC), que contiene PBS, 0,1% BSA y 0,01% azida sódica. En el caso de ser células adherentes éstas se despegaron previamente con PBS + 10 mM EDTA. Todo el proceso de la citometría se realizó en hielo o a 4 °C, salvo que se especifique otra temperatura. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 30 minutos, y se usaron anticuerpos primarios irrelevantes (contra antígenos no porcinos o no presentes en las células que se estaban marcando) del mismo isotipo para determinar la unión inespecífica. Según el experimento se utilizaron como anticuerpos primarios sobrenadantes de cultivo sin purificar, o anticuerpos purificados marcados con Alexa Fluor 488 o con biotina. Tras tres lavados con TC las células se incubaron con los anticuerpos secundarios o estreptavidina conjugados con un fluorocromo durante 30 minutos y protegidos de la luz. Después de los lavados, las células se resuspendieron en TC o fueron fijadas con tampón fijador (PBS, 0,1% BSA, 0,01% azida sódica y 0,1% de formaldehído).

### **7.1. Citometrías multiparamétricas.**

En las citometrías multiparamétricas en modo secuencial se procedió inicialmente como en un marcaje simple, y después de los lavados del anticuerpo secundario las células se incubaron durante 10 minutos con TC + 10% de suero de ratón, con el objetivo de bloquear los sitios de unión residuales del anticuerpo secundario anterior. Sin eliminar el suero de ratón se añadieron los AcMo marcados con Alexa Fluor 488 y/o los AcMo marcados con biotina. Posteriormente se lavaron y se añadió la estreptavidina (marcada con PE o PerCP).

### **7.2. Permeabilización.**

Para detectar la infección viral se realizaron citometrías con un AcMo frente a la Proteína N de PRRSv, cuya localización es intracelular. Por ello las células fueron permeabilizadas previamente con metanol a -20°C durante 10 minutos. Tras realizar tres lavados para eliminar los restos de metanol las células fueron teñidas con el AcMo 1CH5-Alexa Fluor 488 (Ingenasa; IgG2b) o con el AcMo irrelevante 1D9-Alexa Fluor 488 durante 30 minutos, y lavadas a continuación.

### **7.3. Exclusión de células muertas.**

Según las características de cada experimento las células fueron teñidas con distintos reactivos para discriminar entre células vivas y muertas. Si la muestra iba a ser fijada en tampón fijador se utilizaba *LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen-ThermoFisher Scientific;  $\lambda$  Ex/Em: 405/450 nm) a 1  $\mu$ l por cada  $1 \times 10^6$  de células. Si la muestra no se fijaba en el paso final, se usaba *SYTOX™ Blue Dead Cell Stain* (Molecular Probes-ThermoFisher Scientific;  $\lambda$  Ex/Em: 444/480 nm) a una Cf de 0,5  $\mu$ M. En concreto se utilizó *SYTOX™* en todas las citometrías en las que se especifica que se excluyen las células muertas salvo en los triples marcajes de las Figuras 10 y 17 en los que se utilizó *LIVE/DEAD™*.

### **7.4. Adquisición de datos en el citómetro y análisis de los resultados.**

Las suspensiones celulares teñidas fueron adquiridas en un citómetro de flujo *FACSCanto™ II* (BD Biosciences, EE. UU.). El número de células adquiridas varió entre  $5 \times 10^3$  y  $2 \times 10^5$ , según el tipo de experimento. Se fijaron las condiciones óptimas de adquisición empleando controles negativos de isotipo, controles positivos marcados con un solo color y controles FMO (Fluorescencia Menos Uno) para establecer los parámetros para compensar el efecto del solapamiento de los espectros de emisión de los distintos fluorocromos. Además de la exclusión de células muertas, en algunos experimentos se realizó exclusión de dobletes u otros agregados celulares mediante *dotplots* de FSC-A frente a FSC-H, o FSC-W frente a FSC-H. El análisis de los datos se realizó con el programa *FlowJo v10.4.2.* (FlowJo LLC, EE.UU.).

### **8. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS MACRÓFAGOS CD163<sup>+</sup> COMO DIANAS DE PRRSv.**

#### **8.1. Detección de la unión de PRRSv a los siglecs 3 y 5 por ELISA.**

Para determinar si los siglecs 3 y 5 se unen al virus del PRRS se realizaron ensayos tipo ELISA con las proteínas de fusión Siglec 3-Fc y Siglec 5-Fc y el virus purificado. Las placas de 96 pocillos Polysorp™ fueron tapizadas con un anticuerpo de cabra contra el fragmento Fc de la IgG humana (10 µg/ml) durante una noche a 4 °C. Tras varios lavados, las placas fueron incubadas con diferentes concentraciones de Siglec 3-Fc, Siglec-5-Fc o una proteína recombinante consistente en los cuatro dominios amino-terminales de CD169 (Sn4D) fusionados al fragmento Fc de la IgG<sub>1</sub> humana (Escalona *et al.*, 2014 y Álvarez *et al.*, 2015). Como control negativo utilizamos IgG humana (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Tras varios lavados se incubó con PRRSv biotinilado (1 µg/pocillo) durante una hora a TA. A continuación, se lavó la placa y se añadió estreptavidina-peroxidasa (BioRad, EE. UU.) durante 45 min. La OPD (Sigma-Aldrich) fue usada como sustrato de la enzima y se midió la intensidad de color a 492 nm y a 620 nm, esta última como longitud de onda de referencia.

#### **8.2. Ensayos de bloqueo con anticuerpos de la unión del virus a la célula y su infección.**

Se analizó si los anticuerpos anti Siglec 1 (CD169), 3 o 5 eran capaces de bloquear la unión del virus a los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo y macrófagos alveolares y su infección.

### 8.2.1. Efecto del bloqueo con anticuerpos sobre la unión del virus a la célula.

En un primer grupo de experimentos se analizó la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión del virus a las células. Para ello, las células ( $10^5$ ) fueron preincubadas durante 30 minutos a 4 °C con 50 µl de AcMo contra CD169 (1F1CR4), Siglec 3 (5D5) o Siglec 5 (4F7). Como controles negativos fueron utilizados AcMo irrelevantes de isotipo IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>2a</sub> o medio de cultivo. Los AcMo estaban diluidos a una concentración de 10 µg/ml en este medio (medio completo). También se probaron anticuerpos policlonales contra Siglec 3 o Siglec 5 a una dilución 1/50, utilizando en este caso como control negativo suero normal de conejo. A continuación, sin lavar, se añadió virus PRRS biotinilado (1 µg) durante una hora. Tras varios lavados, las células fueron incubadas con estreptavidina-PE y analizadas por citometría de flujo.

### 8.2.2. Efecto del bloqueo con anticuerpos sobre la infección vírica.

Los macrófagos alveolares y los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo se dejaron adherir durante 18 horas a cubre-objetos dentro de placas de cultivo de 48 pocillos Nunc<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific) a razón de  $4 \times 10^5$  células por pocillo. Después de aspirar el medio de cultivo, se incubaron durante una hora a 37 °C con los AcMo contra CD169, Siglec 3, Siglec 5 (a una Cf de 10 µg/ml), o con anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo o medio de cultivo como controles negativos. También realizamos ensayos similares con los anticuerpos policlonales contra Siglec 3, Siglec 5 o suero normal de conejo, diluidos a 1/50. A continuación, las células fueron inoculadas con PRRSv a una MOI de 0,03 durante una hora a 37 °C. El virus fue retirado y las células lavadas y mantenidas en cultivo aproximadamente 18 horas.

Pasado ese tiempo se procedió a realizar la inmunofluorescencia para detectar la infección en las células. Para ello éstas se lavaron y se fijaron a continuación con

paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich), tras lo cual se permeabilizaron con paraformaldehído al 4% (Sigma -Aldrich). Después de varios lavados se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific). Tras nuevos lavados para eliminar los restos del detergente, las células fueron bloqueadas con PBS-BSA 1% + 5% suero de cabra durante una hora. Al retirar el bloqueo se añadieron los anticuerpos primarios durante una hora: el AcMo SDOW17-A, contra la nucleoproteína viral (Rural Technologies Inc., EE.UU.) o el control negativo de isotipo. Después de los lavados pertinentes, se añadió el anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con Alexa 488 (Southern Biotech, EE.UU.). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma-Aldrich) y los cubre-objetos fueron montados en los portas con *FluorSave Reagent* (Calbiochem, Alemania). La fluorescencia fue observada con un microscopio de fluorescencia (Eclipse TE2000 de Nikon) y se contaron como mínimo 1000 células por cada condición.

## 9. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS MONOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.

### 9.1. Tinción de May Grünwald-Giemsa.

Se realizaron cito-extensiones centrifugando las células en portaobjetos SuperFrost™ (Thermo Fisher Scientific) a 80 x g durante cuatro minutos en una centrífuga Shandon Cytospin 3 (Marshall Scientific, EE.UU.). Las preparaciones se fijaron en metanol frío durante 10 minutos y después de secarse a TA se tiñeron con la técnica de May Grünwald-Giemsa. En esta tinción se utiliza el reactivo de May-Grünwald eosina-azul de metileno (Merck KGaA, Alemania), el reactivo Giemsa (Merck KGaA) y tampón Giemsa. Dicho tampón está compuesto de fosfato bisódico 7 mM y fosfato monopotásico 40 mM pH 6.

Sumergimos las preparaciones celulares en cubetas siguiendo el siguiente protocolo:

- Cubeta 1: tampón Giemsa (5 minutos)
  - Cubeta 2: 50 ml de reactivo de May-Grünwald + 50 ml de tampón Giemsa diluido al 5% (3 minutos).
- Lavar en tampón Giemsa.

- Cubeta 3: 15 ml de reactivo Giemsa + 90 ml de tampón Giemsa diluido al 5% (15 minutos).

-Lavar en tampón Giemsa.

Tras lavar con agua y secar, las células fueron examinadas con un microscopio Leica DMLB (Alemania), usando un objetivo 40X.

### **9.2. Ensayos funcionales.**

#### **9.2.1. Generación de especies de oxígeno reactivo (ROS).**

La capacidad de las subpoblaciones de médula ósea para producir especies de oxígeno reactivo (ROS) se evaluó mediante citometría de flujo. Para ello previamente las células fueron teñidas para poder diferenciar a los monocitos en función de la expresión de CD172a y CD163. Se analizaron los macrófagos alveolares en paralelo, que también fueron teñidos siguiendo el mismo protocolo.

Las células fueron resuspendidas en Placas Microwell™ de 96 pocillos de fondo cónico Nunc™ (5x10<sup>5</sup> células por pocillo) y se marcaron con los AcMo anti-CD172a (74-22-15; IgG2b) y anti-CD163 (2A10/11; IgG1). Posteriormente se incubaron con dos anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón: el anti-IgG2b conjugado con PE-Cy7 (SouthernBiotech) y el anti-IgG1 conjugado con APC (Southern Biotech). El procedimiento se realizó según lo descrito anteriormente en el apartado 7 (Citometría de Flujo), pero empleando tampón de citometría sin azida. Se utilizaron anticuerpos irrelevantes de cada isotipo y todos los controles necesarios para la posterior compensación de cada fluorescencia en el citómetro.

Seguidamente las células fueron incubadas con 1 µM de diacetato de dihidro-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) diluida en un tampón salino con HEPES (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl pH 7,3) durante 5 minutos a 37 °C, seguido de PMA 10 ng/ml durante 7 minutos a la misma temperatura. En otros tubos no se añadió PMA como control negativo sin el agente inductor del estallido respiratorio.

La fluorescencia emitida por el DCF oxidado (diclorofluoresceína) fue analizada en el citómetro, calculándose la cantidad relativa de ROS por la mediana de la intensidad

de fluorescencia (MFI) de los subtipos de monocitos seleccionados. Las células muertas fueron excluidas con *SYTOX<sup>TM</sup> Blue* (Thermo Fisher Scientific).

### 9.2.2. Ensayos de fagocitosis y procesamiento antigénico.

La capacidad de los monocitos de médula ósea y los macrófagos alveolares para ingerir antígenos particulados fue analizada usando microesferas fluorescentes Crimson de poliestireno carboxiladas de 0,02  $\mu\text{m}$  (Life Technologies, EE.UU.), y la capacidad de procesar antígenos solubles fue analizada con *DQ<sup>TM</sup> Ovalbumin* (DQ-OVA; Thermo Fisher Scientific).

Se distribuyeron  $5 \times 10^5$  células en cada pocillo de las placas de 96 de fondo cónico y se mantuvieron en hielo 10 minutos antes de añadir  $10^5$  microesferas/célula o 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DQ-OVA. Se incubaron las muestras a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante una hora, mientras que los controles se incubaron en hielo. En paralelo como control negativo adicional se incubaron también células a 37 °C y en hielo sólo con RPMI 1640 (sin microesferas o sin DQ-OVA). Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y teñidas con los AcMo 74-22-15 (anti-CD172a) y 2A10/11 (anti-CD163). En los experimentos con DQ-OVA se utilizaron los mismos anticuerpos secundarios que en los experimentos sobre generación de ROS ( ver en apartado anterior: 9.2.1.). En cambio, en los experimentos de fagocitosis se utilizaron los anticuerpos de cabra anti-IgG2b de ratón conjugado con FITC (SouthernBiotech) y anti-IgG1 conjugado con PE (SouthernBiotech). En algunos experimentos se realizaron controles para comprobar la ausencia de granulocitos en las regiones seleccionadas de monocitos, incubando con el AcMo MIL3 (anti-SWC8; IgM), y revelándolo con el anticuerpo cabra anti-IgM de ratón conjugado con PerCP (EBioscience).

La fagocitosis y el procesamiento proteico fueron cuantificados por la intensidad de la fluorescencia en las regiones de monocitos seleccionadas, teniendo en cuenta que las microesferas tienen una  $\lambda$  Ex/Em de 625/645 nm, y el *DQ<sup>TM</sup> Ovalbumin* de 505/515 nm. Las células muertas fueron excluidas con *SYTOX<sup>TM</sup> Blue* (Thermo Fisher Scientific).

### 9.3. Análisis de expresión de TLR y receptores de quimioquinas por RT-qPCR.

#### 9.3.1. Extracción del RNA.

Los monocitos de médula ósea CD172a<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>, previamente separados por FACS (ver apartado 3.2.), fueron centrifugados en eppendorfs libres de RNasa ( $\approx 0,6 \times 10^6$  células). Se retiró el medio y las células fueron resuspendidas en 300  $\mu$ l de TriPure (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y agitadas intensamente con vórtex antes de ser congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras fueron descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}$ , se añadieron otros 300  $\mu$ l de TriPure y se mantuvieron a TA durante 5 minutos. A continuación se añadió cloroformo en una proporción final de 1:5 y se agitó vigorosamente. Se dejaron reposar hasta que se separaron bien las fases acuosa y orgánica y se centrifugaron en frío a  $10.000 \times g$  15 min. La fase superior acuosa fue trasvasada a un nuevo eppendorf y mezclada en un volumen igual de etanol absoluto. La extracción de RNA prosiguió con el kit *Direct-zol™ RNA MicroPrep* (Zymo Research, EE.UU.), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial y tratando las muestras con la DNasa I del kit. La cantidad y calidad del RNA obtenido fue evaluada en un espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000* (Thermo Fisher Scientific), oscilando las concentraciones entre los 34 ng/ $\mu$ l en la muestra más diluida y los 136 ng/ $\mu$ l en la más concentrada.

#### 9.3.2. PCR convencional para confirmar la ausencia de DNA genómico.

Dada la importancia de que no quedase DNA genómico en las muestras para la posterior RT-qPCR, se descartó su presencia realizando una PCR convencional del gen de la Interleucina-6 (IL-6) en las muestras de RNA. Para ello se usaron los oligonucleótidos de la IL-6 a una concentración final de 0,24  $\mu$ M, 0,75 U de la enzima *MyTaq™ DNA Polymerase* (Bioline Reagents, Ltd., Reino Unido), *5x MyTaq™ Reaction Buffer* (que contiene los dNTP, MgCl<sub>2</sub>, estabilizadores y potenciadores) y el RNA ( $\approx 100$  ng). Se utilizó agua como control negativo y dos muestras de DNA como controles positivos de la reacción.

Los productos de PCR se analizaron mediante separación electroforética en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato, usando *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, EE.UU.) para su visualización.

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95 °C	5 min
30x	95 °C	15 seg
	56 °C	15 seg
	72 °C	10 seg
1x	72°C	10 min

**Tabla 4.** Reacción de PCR del gen de la IL-6 para comprobar la ausencia de DNA genómico.

### 9.3.3. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Se hicieron dos réplicas de la RT-PCR por cada muestra. El RNA (300 ng) fue retro-transcrito a cDNA usando el *qScript™ cDNA Synthesis kit* (Quanta Biosciences, EE.UU.) en un volumen total de 20 µl, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El cDNA obtenido fue diluido a 1:3 en agua, y almacenado a -20 °C hasta su amplificación en las qPCR. Para comprobar la calidad de las réplicas del cDNA se realizó una PCR tradicional del gen que codifica para el RNA ribosómico 18S usando la enzima *MyTaq™ DNA Polymerase* mencionada anteriormente, y se corrió en un gel de agarosa al 1% con *GelRed™* usando como marcador de peso molecular del DNA IX (0,072-1,35 kbp) (Roche, Alemania).

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95 °C	5 min
30x	95 °C	30 seg
	58 °C	30 seg
	72 °C	30 seg
1x	72°C	5 min

**Tabla 5.** Reacción de PCR del gen 18S para comprobar la calidad de las réplicas de cDNA.

#### 9.3.4. PCR cuantitativa (qPCR).

Los análisis de expresión fueron realizados siguiendo las directrices establecidas en "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" de Bustin *et al.*, 2009. De cada muestra se corrieron las dos réplicas obtenidas en la RT-PCR y en cada placa tres pocillos de *Inter-Plate-Calibrator* (IPC; obtenido con una mezcla de cDNA de granulocitos porcinos y como gen la  $\beta$ -actina), además de un control negativo de cada gen. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 15  $\mu$ l, usando 2  $\mu$ l de cDNA, 3  $\mu$ l de *PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus con ROX* (Cultek Molecular Bioline, España), y los *primers* (cebadores) *forward* y *reverse* de cada gen a una Cf de 0,5  $\mu$ M. Los *primers* usados se muestran en la Tabla 6. La qPCR se llevó a cabo en una *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) en las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos que constan de un paso de 15 seg a 95 °C, otro de 20 seg a 58 °C y el paso final de 20 seg a 72 °C; a continuación se corrió la curva de fusión (*melting curve*) de 60 °C hasta 95 °C, para asegurar la especificidad de los amplicones esperados.

Los análisis de expresión fueron calculados usando el programa GenEx5 Pro (MultiD Analyses AB, Suecia) basándonos en los valores de Ct obtenidos. Después de las correcciones realizadas teniendo en cuenta los valores de los IPC, la eficiencia de cada pareja de *primers*, y las réplicas de cada muestra, se normalizó con los genes de referencia. Previamente, para seleccionar dichos genes, se probó la estabilidad de varios genes constitutivos usando los algoritmos NormFinder y geNorm. En concreto se probaron los genes ciclofilina (PPIA),  $\beta$ -actina (ACTB), proteína ribosomal L4 (RPL4),  $\beta$ -2 microglobulina (B2M), e hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT), y se escogieron los tres últimos como genes de referencia. Los datos se representaron de dos formas: a) como la expresión génica relativa entre los monocitos CD163<sup>-</sup> y los CD163<sup>+</sup> mediante el cálculo de los ratios de expresión según el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livack *et al.*, 2001) y b) como el ratio del promedio del Ct de los genes de referencia respecto al Ct del gen diana.

Símbolo gen	Longitud producto	Temp. anillamiento	Eficiencia (%)	Forward primer	Reverse primer
ACTB*	164	57	101	CAGGTATCACCATCGGCAACG	GACAGCACCGTGTGGCGTAGAGGT
18S	422	58	105	GACTCAACACACGGGAAACCTCAC	GCTTATGACCCCGACTTACTG
IL6*	132	57-60	99	TGGTACTGCCTTCCCTACC	CAGAGATTTGCCGAGGATG
PPIA*	69	57	100	CCTGAACATACGGGTCCTG	AACCTGGAAACCGTTTGTGTTG
B2M*	57	58	101	TCCGCCCCAGATTGAAAT	TGCTCCGGTTCATCTTCT
RPL4*	144	60	93	CAGGCCAGGAATCACAATAAT	TTTAACGCCCAACAGCCTTCT
HPRT*	135	60	97	TGGTAGGCTATGCCCTTGAC	GGGACTCCAGATGTTTCCAA
TLR-1*	102	57	112	TGCTGGATGCTAACGGATGTC	AAGTGGTTTCAATGTTTCAAAGTC
TLR-2*	162	57	97	TCACCTGTCTAACTTATCCTCTTGG	TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC
TLR-3*	110	57	98	AGTAAATGAATCACCCCTGCTAGCA	GCCGTTGACAAAACACATAAGGACT
TLR-4*	108	57	99	GCCATCGCTGCTAACATCATC	CTCATACTCAAAGATACACCATCGG
TLR-5*	122	57-60	98	CAGCGACCAAAAACAGATTGA	TGCTCACAGACAGACAACC
TLR-6*	95	57	123	AACCTACTGTATAAGCCTTCATTC	GTCTACCACAAATTCACCTTCTCAG
TLR-7*	105	57-60	99	TCAGTCAACCGCAAGTCTG	GATGGATCTGAGGGGAGCA
TLR-8*	105	57	108	AAGACCACCACTTAGCC	GACCTCAGATTTCATCCATCC
TLR-9*	122	57	105	CACGACAGCCGAATAGCAC	GGGAACAGGGAGCAGAGC
TLR-10*	106	57	98	CCTGTCCAACCTGCCTCATTG	CTAAGTGTCTAAGGATGTGTTTCTG
CCR2#	100	58	≥ 95	TGCCACTTGGAAAGCAACAGACCG	CAGAGAGTGAGATGTGGCAGCAGC
CX3CR1#	88	58	≥ 95	CCAGTCACTGTGGCAACCTACC	GGAAAGTGTGTTGGGCTGTGGCTC
CCR5#	86	58	≥ 95	TGGTCAGAGGAGCTGAGACA	AGAAGGGACTCGTGGTTGA
CXCR4#	108	58	≥ 95	TACCATGGACGGGTTCCGTATATTCACCTCAG	GCATTTCTCCCGGAAACAGGGTCC
CD62L#	132	58	≥ 95	AGCTTCTTGTGACGCCAGGTCATGC	CCCAGAGGCTCACACTGAGTCACGAAAC

**Tabla 6.** Parejas de primers usados en las PCR y qPCR. Las secuencias de los primers etiquetados con \* fueron descritos en Martins *et al.*, 2013, y aquellos etiquetados con # en Ondrackova *et al.*, 2013a. ( ACTB: β-actina; 18S: RNA ribosomal 18S; PPIA: ciclofilina; B2M: β-2 microglobulina; RPL4: proteína ribosomal L4; HPRT: hipoxantina guanina fosforribosil transferasa)

#### 9.4. Producción de citoquinas.

##### 9.4.1. Cultivo de las poblaciones de monocitos con ligandos de TLR.

En un primer grupo de experimentos se analizó la producción de citoquinas en los monocitos de médula ósea (CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup>) cuando eran estimulados con diferentes ligandos de TLR. Para ello los monocitos, previamente aislados por FACS, fueron puestos en cultivo en placas de 48 pocillos a una concentración de  $6,25 \times 10^5$  células/ml y estimulados con los siguientes agonistas de TLR: LPS (1 µg/ml, *E. coli* O55:B5; Sigma-Aldrich), CpG ODN 2216 (10 µg/ml; InvivoGen, Francia), o Imiquimod (10 µg/ml; InvivoGen ). Como control negativo utilizamos células sin estimular, cultivadas sólo en medio completo.

En un segundo grupo de experimentos analizamos la producción de citoquinas en las subpoblaciones de monocitos de médula ósea después de ser incubadas con PRRSv. Las dos poblaciones de monocitos aisladas (CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup>) fueron incubadas con PRRSv a una MOI de 0,5 o con *mock* (ver apartado 5.1.). Las células se incubaron con el virus en tubos de 15 ml durante una hora a 37 °C, luego fueron lavadas con RPMI 1640 por centrifugación y distribuidas en las placas de cultivo a razón de  $5 \times 10^5$  células/ml. En paralelo, se incubaron células con LPS (1 µg/ml, *E. coli* O55:B5), o con Poli I:C (10 µg/ml; Sigma-Aldrich).

En el primer grupo de experimentos se recogieron los sobrenadantes de los cultivos tras 21 horas, y en el segundo grupo de experimentos tras 21 y 46 horas. Se centrifugaron para eliminar los restos celulares y se congelaron a -80 °C hasta el momento en que se realizaron los ELISAs.

##### 9.4.2. Evaluación de la concentración de citoquinas por ELISA.

La concentración de IL-8, IL-10 y TNF-α en los sobrenadantes fue analizada usando ELISAs de Invitrogen siguiendo los protocolos descritos por la casa comercial. El ELISA para IFN-α fue realizado usando los anticuerpos monoclonales K9 y el F17 biotinilado según el protocolo descrito en Guzylack-Piriou *et al.*, 2004 y desarrollado inicialmente en Díaz de Arce *et al.*, 1992. La cantidad de citoquinas producidas en

respuesta al virus fue calculada restándole la concentración obtenida en los cultivos estimulados con *mock*.

### **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Las diferencias estadísticas en los valores de expresión de RNAm entre los dos grupos de monocitos de médula ósea (ver apartado 9.3.4.) fueron calculadas usando el test de t de Student con el programa SigmaPlot v10.0 (Sytat Software Inc., EE.UU.). Los análisis estadísticos de datos de todos los demás experimentos fueron realizados con el test no paramétrico de Mann-Whitney usando el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, EE.UU.). El número de animales usado en cada análisis estadístico se especifica en las figuras del apartado de Resultados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$  (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; ns=no significativo).

# ***RESULTADOS***

---

---

**CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS SIGLECS EN LA INFECCIÓN POR PRRSv DE MACRÓFAGOS DE BAZO Y CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.****1. LOS MACRÓFAGOS CD163<sup>+</sup> DE BAZO COMO DIANAS DE PRRSv: PAPEL DE LOS SIGLECS.**

En función de la expresión de CD163 y CD169 se pueden identificar dos poblaciones de macrófagos en el bazo: los macrófagos CD163<sup>+</sup>, que se localizan en la pulpa roja de este órgano, y los macrófagos CD169<sup>+</sup>, que se encuentran situados en la zona marginal (Poderoso *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014). En este apartado de la tesis hemos estudiado la presencia de otros miembros de la familia del CD169 (siglecs) y su posible función en la infección viral de los macrófagos CD163<sup>+</sup>. Esta población celular presenta una expresión muy débil de CD169.

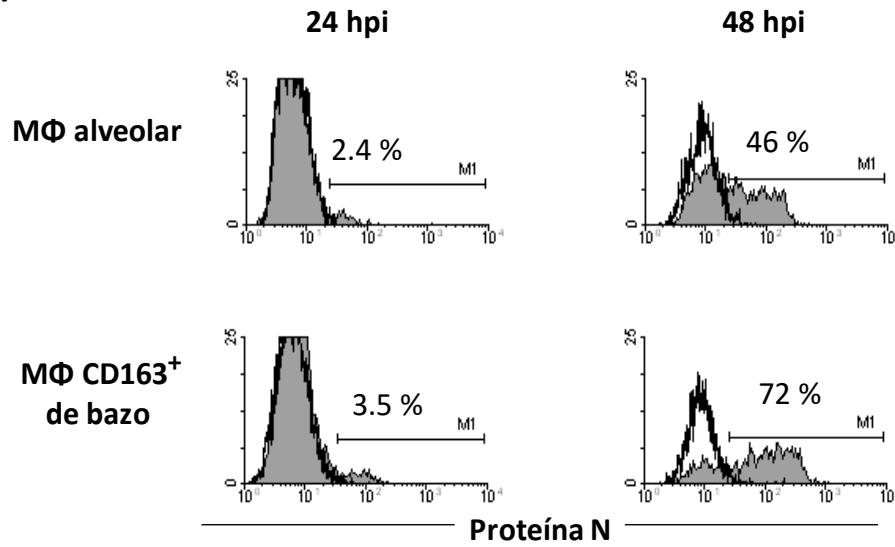
**1.1. Replicación del virus del PRRS en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo.**

Comparamos la susceptibilidad a la infección por PRRSv de los macrófagos CD163<sup>+</sup> esplénicos y los macrófagos alveolares (Fig. 10A). Los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo fueron aislados por separación magnética e infectados, en paralelo con macrófagos alveolares de los mismos individuos, a una MOI de 0,5. La incubación con el virus fue realizada en la placa de cultivo y después se realizó un lavado para eliminar el virus no adsorbido. La infección fue monitorizada analizando la expresión de la Proteína N viral por citometría de flujo a 0, 24 y 48 hpi. A 24 hpi ya se detectaba la nucleoproteína viral, aunque en un bajo número de macrófagos alveolares y CD163<sup>+</sup> esplénicos (2 -6%). A las 48 hpi entre el 45% y el 80% de las células eran positivas para esta proteína, siendo habitualmente mayor este porcentaje en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo que en los alveolares.

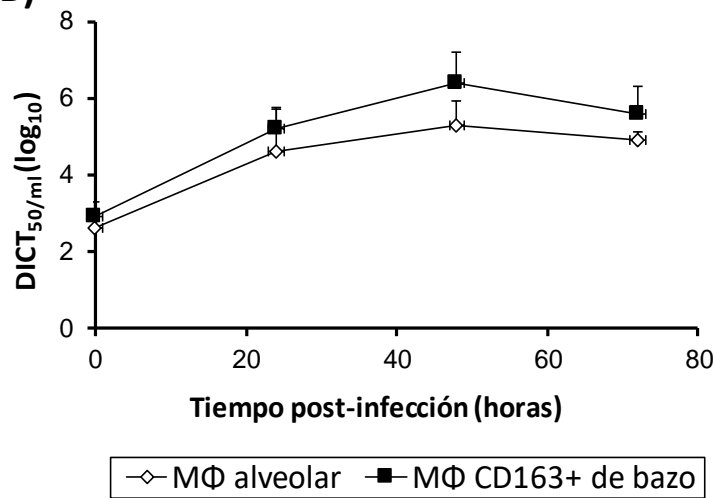
También se determinó la concentración de virus infectivo en los cultivos de ambos tipos de macrófagos a las 0, 24, 48, y 72 hpi. Los lisados celulares y sobrenadantes recogidos a estos tiempos post-infección fueron mezclados y titulados evaluando el efecto citopático causado en macrófagos alveolares procedentes de dos animales (Fig. 10B). En todos los tiempos analizados se observó una tendencia de títulos ligeramente

superiores en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo comparados con los alveolares, pero sin llegar a alcanzar una diferencia estadísticamente significativa. Los títulos víricos más altos se alcanzaron a las 48 hpi, con valores próximos a 10<sup>6</sup> DCIT<sub>50/ml</sub> en los macrófagos de bazo y a ≈10<sup>5</sup> en los macrófagos alveolares. Estos resultados indican que los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo son permisivos a la infección y soportan eficientemente la replicación de PRRSv.

A)



B)



**Figura 10. Replicación de PRRSv en macrófagos alveolares y macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo. A)** Detección por citometría de flujo de la nucleoproteína del virus de PRRS a 24 y 48 hpi mediante tinción con el AcMo 1CH5-Alexa Fluor 488 de las células previamente infectadas. Los histogramas grises corresponden a las células infectadas y los histogramas sin relleno a las células sin infectar. Los resultados mostrados son un ejemplo representativo de los tres experimentos independientes realizados. **B)** Los títulos víricos de las células infectadas fueron determinados a las 0, 24, 48 y 72 hpi mediante titulación por efecto citopático en macrófagos alveolares de otros dos animales tal y como se especifica en Material y Métodos. Se representa la media más el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. (MΦ: macrófago).

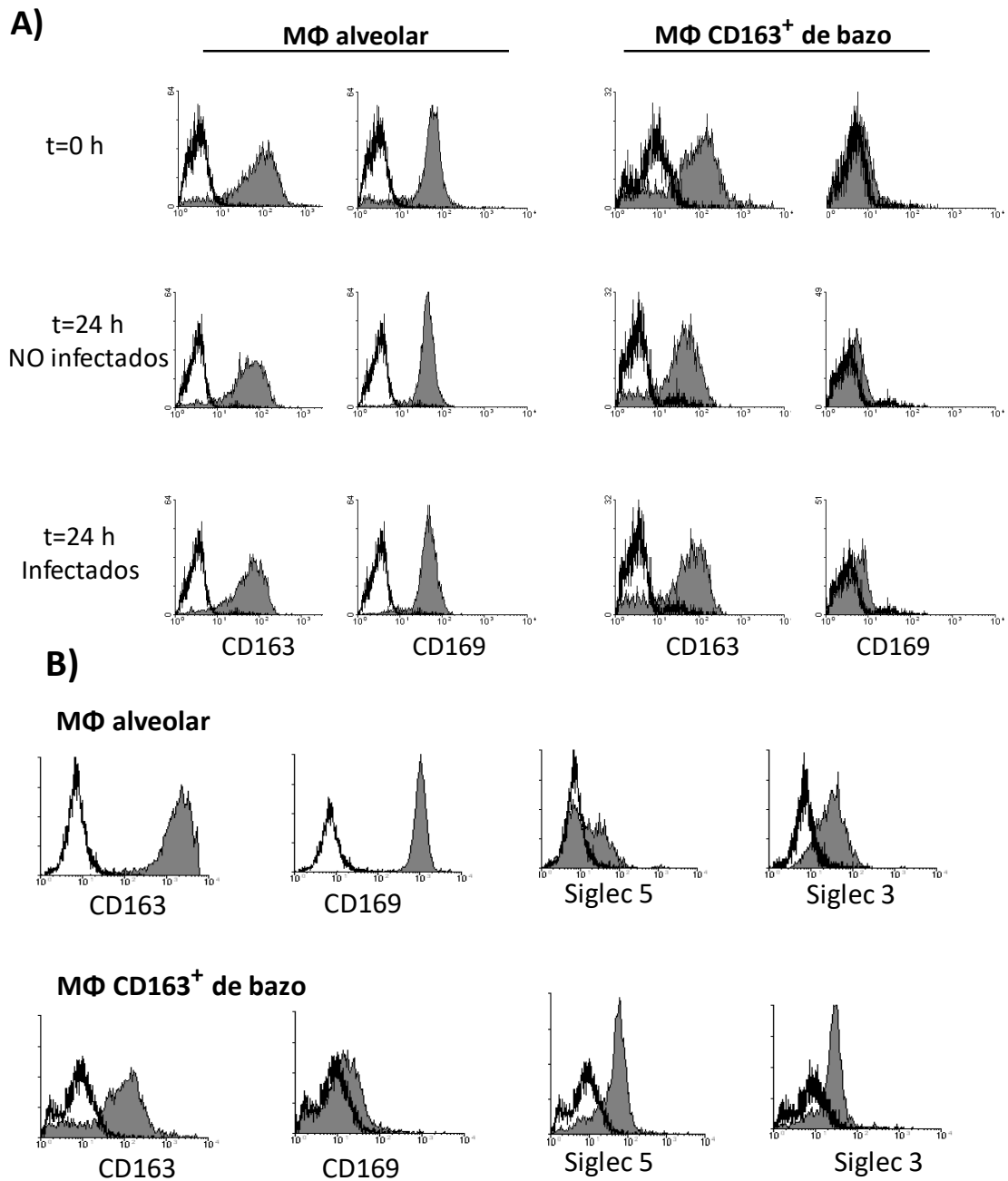
## **1.2. Expresión de CD169, Siglec 3 y Siglec 5 en macrófagos alveolares y macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo.**

Dado que los macrófagos esplénicos CD163<sup>+</sup> eran susceptibles a la infección viral aún cuando expresaban niveles muy bajos de CD169, casi indetectables en algunos animales, quisimos comprobar si se producía un aumento de CD169 durante el cultivo. Como se muestra en la Fig. 11A, a las 24 horas de cultivo, tanto en células sin infectar como en células infectadas no detectamos cambios en la expresión de CD163 ni CD169 en ninguno de los macrófagos estudiados. Los macrófagos alveolares se mantuvieron positivos para CD163 y CD169, mientras que los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo mantuvieron sus bajos niveles de CD169. Cuando analizamos la expresión de otros miembros de la misma familia de CD169, en concreto Siglec 3 y Siglec 5, los macrófagos alveolares resultaron ser Siglec 5<sup>+bajo</sup> y Siglec 3<sup>+</sup>, mientras que los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo eran positivos para ambos siglecs.

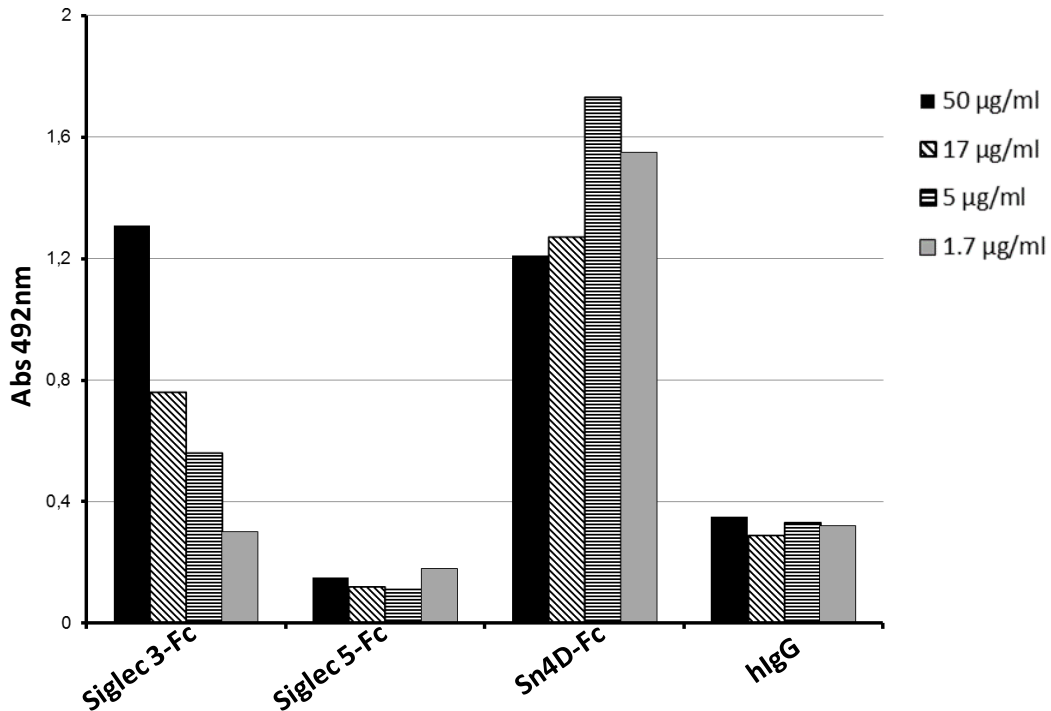
## **1.3. Unión del virus de PRRS a los siglecs 3 y 5.**

Considerando que los macrófagos esplénicos CD163<sup>+</sup> expresaban niveles más altos de los siglecs 3 y 5 que de CD169 y se infectaban con el virus, evaluamos la capacidad de estos siglecs de unir partículas de PRRSv. Para ello pusimos a punto un ensayo en fase sólida utilizando proteínas de fusión de los dominios extracelulares de Siglec 3 o Siglec 5 o de los cuatro dominios amino-terminales de CD169 (Sn4D) con el fragmento Fc de la IgG1 humana (Siglec 3-Fc, Siglec 5-Fc y Sn4D-Fc), y analizamos su capacidad de unir partículas de PRRSv marcadas con biotina. Como control negativo usamos IgG humana (hIgG). El virus se unió tanto a Sn4D-Fc como a Siglec 3-Fc, aunque la unión a este último fue menos eficiente (Fig. 3), siendo mayor la cantidad de virus unida a 5 µg/ml de Sn4D-Fc que a 50 µg/ml de Siglec 3-Fc. La unión del virus a Sn4D-Fc se mantuvo alta a todas las concentraciones analizadas (entre 50 y 1,7 µg/ml) mientras que en el caso de Siglec 3-Fc presentó un máximo a 50 µg/ml y luego decreció de forma dosis dependiente. La unión a Siglec 5-Fc no fue consistente, siendo negativa en algunos

experimentos, como se muestra en la Fig. 12, y positiva en otros (datos no mostrados), por lo que no pudimos alcanzar una conclusión definitiva respecto a dicha molécula.



**Figura 11. A) Expresión por citometría de flujo de CD163 y CD169 en macrófagos alveolares y macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo a distintos tiempos post-infección con PRRSv.** Las células fueron cultivadas 16 horas antes de añadir el virus (t=0 h) a una MOI de 0,5. Se recogieron las células a las 24 hpi y se tiñeron con AcMo anti-CD163 o anti-CD169 (histogramas grises) o con un AcMo irrelevante del mismo isotipo como control negativo (histogramas sin relleno), revelándose a continuación con anticuerpos de cabra anti-IgG1 o anti-IgG2a conjugados con APC. **B) Patrones de expresión de CD169, Siglec 3 y Siglec 5 en cada tipo de macrófagos.** Las células fueron incubadas con AcMo anti-CD163, anti-CD169, anti-Siglec 5, anti-Siglec 3 (histogramas grises) o con un AcMo irrelevante control (histogramas sin relleno). Finalmente las células fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti-Ig F(ab')<sub>2</sub> de ratón conjugado con PE. En ambos apartados los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de los cuatro experimentos independientes realizados.



**Figura 12. Estudio de la unión de PRRSv a Siglec 3 y Siglec 5 mediante ELISA.** Se tapizaron las placas con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana y se incubaron con diferentes concentraciones de proteínas recombinantes Siglecs-Fc. Como control negativo se utilizó IgG humana. Posteriormente se incubaron con virus de PRRS biotinilado y la unión de éste a la placa se reveló con estreptavidina-peroxidasa y OPD midiéndose la absorbancia a 492nm. Se muestra el resultado de un experimento representativo de los tres realizados.

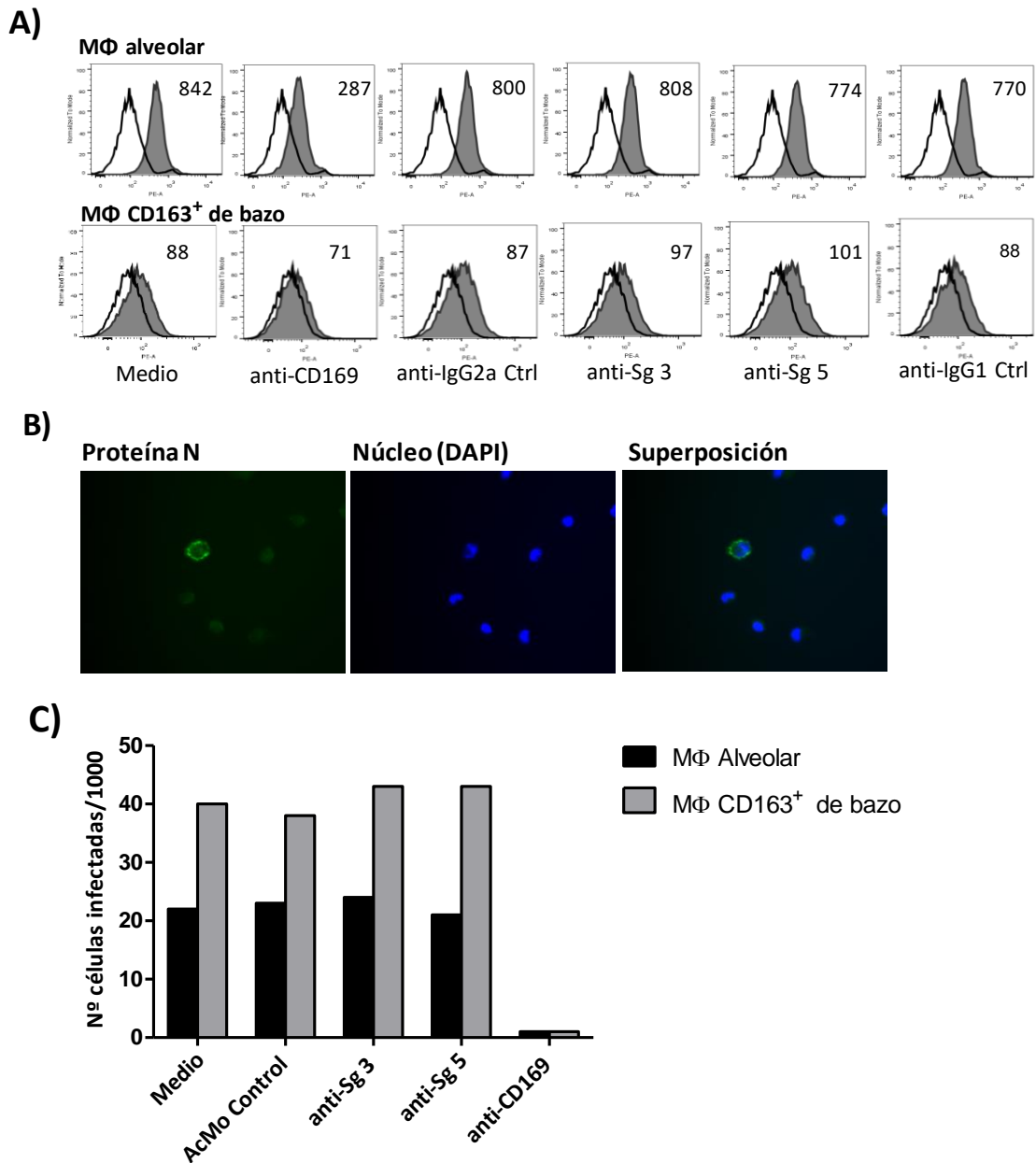
#### 1.4. Efecto de los anticuerpos anti-CD169, anti-Siglec 3 y anti-Siglec 5 sobre la unión de PRRSv a los macrófagos y su infección.

Como los ensayos tipo ELISA indicaron que Siglec 3 tenía capacidad de unir partículas de PRRSv y los niveles de esta molécula y de Siglec 5 en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo eran más altos que la débil expresión de CD169, analizamos si contribuían a la unión del virus a esas células. Utilizamos en paralelo el macrófago alveolar, célula en la que CD169 juega un papel importante en la adhesión y entrada del virus (Delputte *et al.*, 2004). Para ello incubamos las células con AcMo contra CD169, Siglec 3 y Siglec 5 o con anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo como controles negativos durante 30 minutos a 4°C para que se uniesen a las células. A continuación añadimos el virus purificado biotinilado durante una hora a la misma temperatura. Después de lavar las células varias veces se añadió estreptavidina-PE para revelar el virus biotinilado que permanecía unido a los macrófagos. Se analizaron las muestras en el

citómetro cuantificando la unión del virus por la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) asociada a las células. Se observó una reducción de la unión del virus a los macrófagos alveolares cuando éstos habían sido preincubados con el AcMo anti-CD169 en comparación con el anticuerpo control. Este efecto fue también notable, aunque menos pronunciado, en los macrófagos esplénicos. En cambio, con los anticuerpos frente a los otros siglecs no observamos ningún efecto sobre la unión del virus a las células (Fig. 13A).

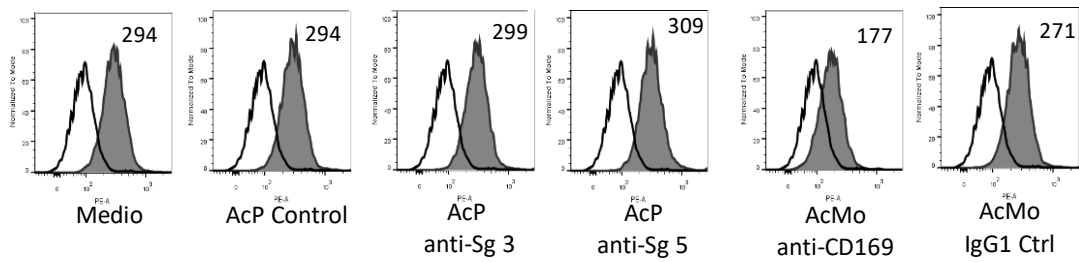
Asimismo, analizamos si dichos anticuerpos eran capaces de bloquear la infección en macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo y alveolares. Las células se distribuyeron sobre cubreobjetos en placas de cultivo y se incubaron durante 30 min a 37 °C con una concentración saturante de AcMo. Seguidamente añadimos el virus a una baja multiplicidad de infección (0,03) durante una hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo las células fueron lavadas para eliminar los restos de virus no adsorbido y cultivadas durante 18 horas. A continuación se realizó una inmunofluorescencia para detectar la infección viral en las células tiñendo con un AcMo contra la Proteína N de PRRSv. Como se observa en la Figura 13B sólo el AcMo anti-CD169 bloqueó la infección en macrófagos alveolares y en macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo. Los anticuerpos frente a los otros siglecs no redujeron el porcentaje de células infectadas comparados con los controles (medio completo o anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo).

Para excluir la posibilidad de que los AcMo contra Siglec 3 y Siglec 5 no bloqueasen la infección viral porque no reconociesen epítopos de la molécula que estuviesen relacionados con la unión al virus, se repitieron los experimentos descritos anteriormente con anticuerpos policlonales de conejo (Fig. 14). Los resultados fueron similares a los obtenidos con los AcMo, no observándose ningún efecto sobre la unión ni la infección vírica. En conclusión, el conjunto de estos datos indica que niveles muy bajos de CD169 son suficientes para permitir la unión de PRRSv de genotipo europeo (PRRSv-1) a los macrófagos alveolares y CD163<sup>+</sup> esplénicos. En cambio, los otros miembros de esta familia estudiados (Siglec 3 y Siglec 5) no parecen contribuir en este proceso.

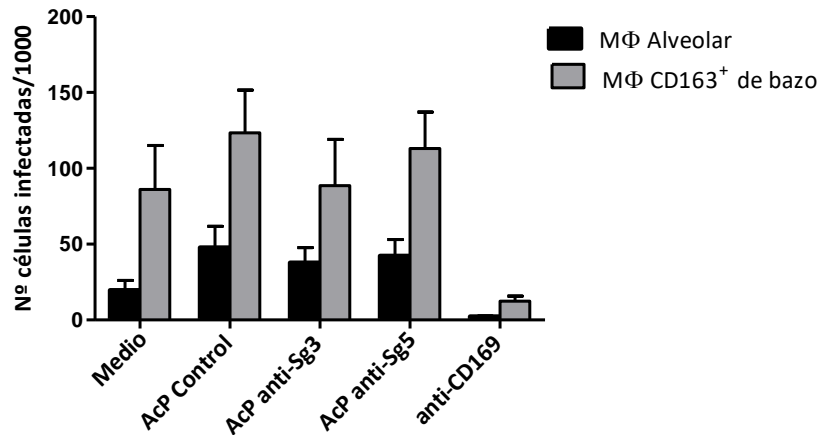


**Figura 13. Efecto de los AcMo contra los siglecs (1, 3 y 5) sobre la unión del PRRSv a macrófagos alveolares y macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo y su infección. A) Efecto de los AcMo sobre la unión del virus a las células.** El virus unido a las células fue revelado por citometría de flujo, para ello previamente las células habían sido incubadas con AcMo contra varios siglecs, como se indica en el texto. Los histogramas sin relleno corresponden a las células tratadas de la misma forma pero sin virus, y los grises a aquellas que sí fueron incubadas con el virus. Se muestran los resultados de un experimento representativo de los tres realizados y en los histogramas se indica la intensidad media de fluorescencia (MFI). **B) Detección de la nucleoproteína de PRRSv por inmunofluorescencia.** Las células (en este ejemplo de la fotografía macrófagos alveolares preincubados con el AcMo anti-Siglec 3 (5D5)) fueron infectadas con PRRSv (MOI 0,03) y a las 18 hpi fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con el AcMo SDOW-17A contra la Proteína N vírica y reveladas con el anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón IgG1 conjugado con Alexa488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **C) Efecto de los AcMo sobre la infección de las células por el virus.** Se contaron en el microscopio de fluorescencia al menos 1000 células por cada condición (preincubación con AcMo contra cada siglec) y experimento de inmunofluorescencia descrito en el apartado B. La gráfica muestra un experimento representativo de los tres realizados. (Sg: Siglec).

A)



B)

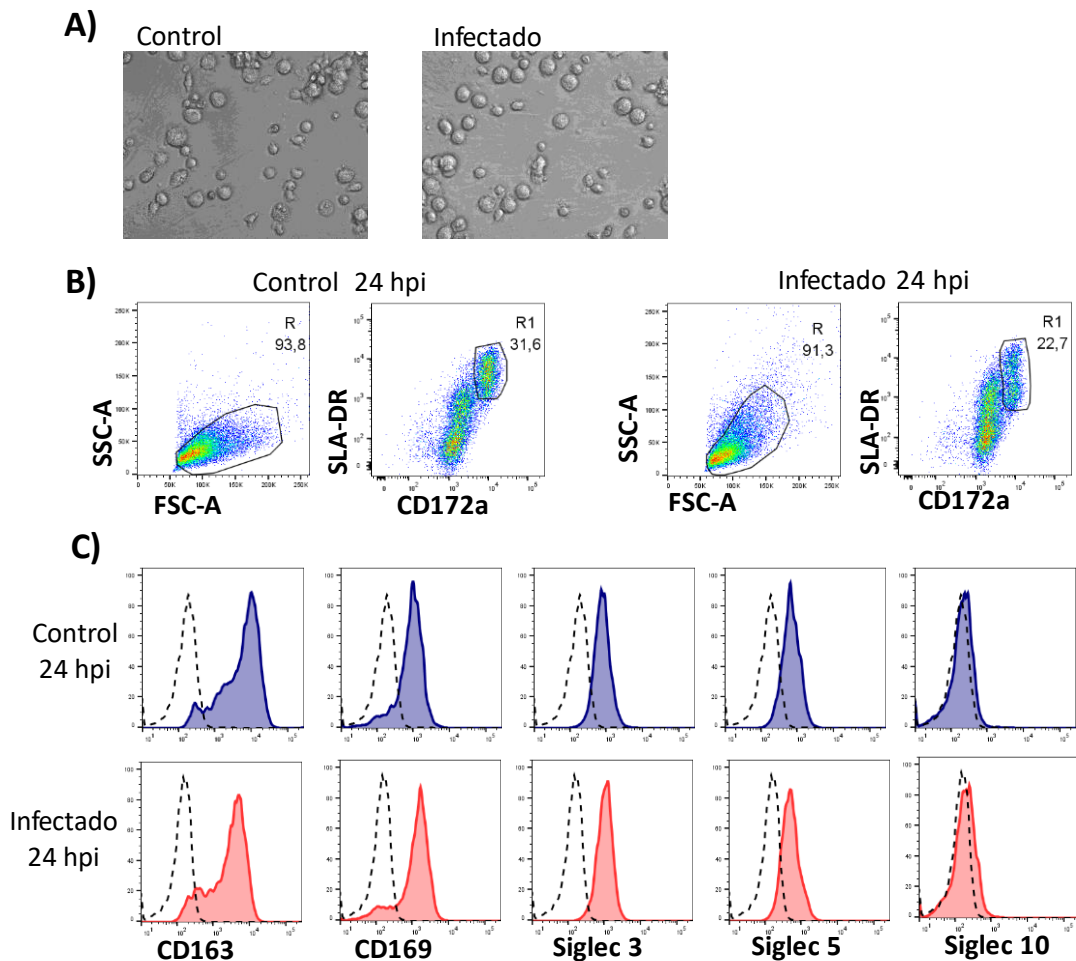


**Figura 14. Efecto de los anticuerpos policlonales (AcP) de conejo anti-Siglec 3 y anti-Siglec 5 sobre la unión de PRRSV a macrófagos alveolares y su infección. A) Efecto de los AcP sobre la unión del virus a los macrófagos alveolares.** El procedimiento fue el mismo que el descrito en la Figura 13A, pero en vez de preincubar con AcMo se utilizaron anticuerpos policlonales. Se midió la intensidad media de fluorescencia (MFI) por citometría de flujo. Los histogramas sin relleno corresponden a las células no infectadas y los grises a aquellas que sí fueron incubadas con el virus. Se muestran los resultados de un experimento representativo de los tres realizados. **B) Efecto de los AcP sobre la infección de los macrófagos alveolares y macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo por el virus.** Se realizó una inmunofluorescencia similar a la descrita en la Figura 13B y 13C pero preincubando con anticuerpos policlonales contra los Siglecs 3 y 5, en lugar de AcMo. Se contaron en el microscopio de fluorescencia al menos 1000 células por cada condición y experimento. En la gráfica se muestra la media + SEM de los datos obtenidos en tres experimentos independientes realizados con células de diferentes animales.

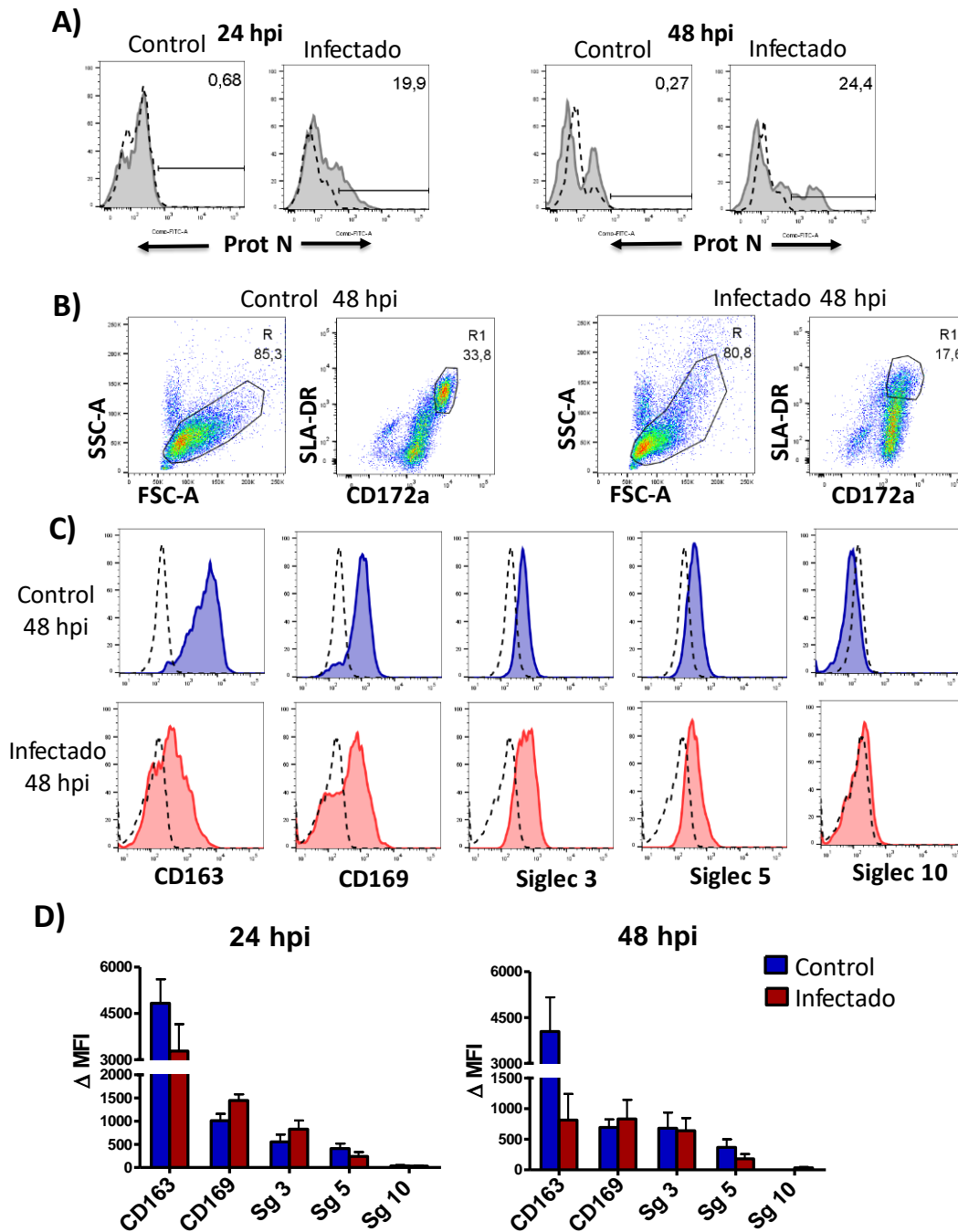
## 2. EXPRESIÓN DE SIGLECS EN CÉLULAS EN CULTIVO PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA.

### 2.1. Expresión de siglecs en células de médula ósea diferenciadas con rpGM-CSF sin infectar o infectadas con PRRSv.

Trabajos previos de distintos grupos (Chang *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2011) han puesto de manifiesto la susceptibilidad de las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a la infección por el virus del PRRS. Por ello consideramos de interés analizar



**Figura 15. Expresión de siglecs y CD163 en BMDC a las 24 horas de la infección con PRRSv.** Las células extraídas de la médula ósea fueron cultivadas con rpGM-CSF durante ocho días e infectadas a continuación con PRRSv a una MOI de 0,1. Como control se utilizaron células diferenciadas con rpGM-CSF no infectadas con el virus. **A)** Fotografías adquiridas con el microscopio de contraste de fases (objetivo 40X) de células no infectadas (control) e infectadas a las 24 hpi. **B)** Por citometría de flujo se seleccionaron las células dendríticas (R1) mediante marcaje con anticuerpos anti-CD172a (BL1H7-Alexa Fluor 488) y anti-SLA-DR (1F12-Biotina). Se indica el porcentaje de células de cada región. **C)** Expresión de CD163 y siglecs (CD169, siglecs 3, 5 y 10) en las regiones R1 seleccionadas en los *dotplots* del apartado anterior de la figura. Las células se incubaron con los AcMo correspondientes que fueron revelados con un anticuerpo de cabra anti Ig de ratón conjugado con APC. Los histogramas sin relleno corresponden a anticuerpos control negativo. Se muestra un experimento representativo de los tres realizados.



**Figura 16. Expresión de siglecs, CD163 y nucleoproteína vírica (Prot N) en BMDC a las 24 y 48 hpi. A)** Marcaje intracelular de la Proteína N de PRRSV en células dendríticas control (no infectadas) e infectadas a las 24 y 48 hpi. Las células fueron teñidas con AcMo anti-CD172a (BA1C11) y anti-SLA-DR (1F12) y con anticuerpos de cabra anti ratón (anti IgG1-PE y anti IgG2b-APC), seguidamente fueron permeabilizadas con metanol antes de ser incubadas con el anticuerpo 1CH5-Alexa Fluor 488 contra la Proteína N (histogramas grises) o con un anticuerpo irrelevante (1D9-Alexa Fluor 488; histogramas sin relleno). En la figura están expresados los porcentajes de células dendríticas positivas para Proteína N respecto al anticuerpo irrelevante. **B)** Se seleccionaron las células dendríticas (R1) a las 48 hpi mediante marcaje con BL1H7-Alexa Fluor 488 (anti-CD172a) y 1F12-Biotina (anti-SLA-DR). **C)** Expresión de CD163 y siglecs (CD169, 3, 5 y 10) a las 48 hpi en las regiones R1 seleccionadas en los *dotplots* del apartado B. Se realizó el mismo marcaje descrito en la Figura 15. **D)** Gráficas donde se representan a las 24 y 48 hpi la media + SEM (para 24 hpi n=3 y para 48 hpi n=4 animales) de la mediana de la fluorescencia de cada molécula menos la mediana de fluorescencia de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo utilizado como control negativo ( $\Delta$  MFI).

la expresión de los distintos siglecs y CD163 en estas células y estudiar si dicha expresión se ve afectada por la infección con PRRSv.

Las BMDC se obtuvieron tras cultivo de las células de médula ósea con rpGM-CSF durante ocho días. Transcurrido ese tiempo las células fueron infectadas con PRRSv a una MOI de 0,1 y analizadas por citometría a las 24 y 48 hpi. Seleccionamos las células dendríticas, que se caracterizan por ser células no adherentes que expresan niveles altos de CD172a y SLA-DR y ser susceptibles a la infección (Chang *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2016; Gimeno *et al.*, 2011). En las células infectadas detectamos una menor expresión de SLA-DR, que concuerda con los datos publicados por Rodríguez-Gómez *et al.* 2013, así como una disminución en la intensidad de CD172a. En la región de células dendríticas comparamos la expresión de CD163, CD169, Siglec 3, Siglec 5 y Siglec 10 entre células control (no infectadas) e infectadas a las 24 y 48 hpi. A 24 hpi no se percibieron cambios significativos en los niveles de expresión de ninguna de las moléculas analizadas, siendo tanto las células control como las infectadas positivas para CD163, CD169, Siglec 3, Siglec 5 y negativas para Siglec 10 (Fig. 15).

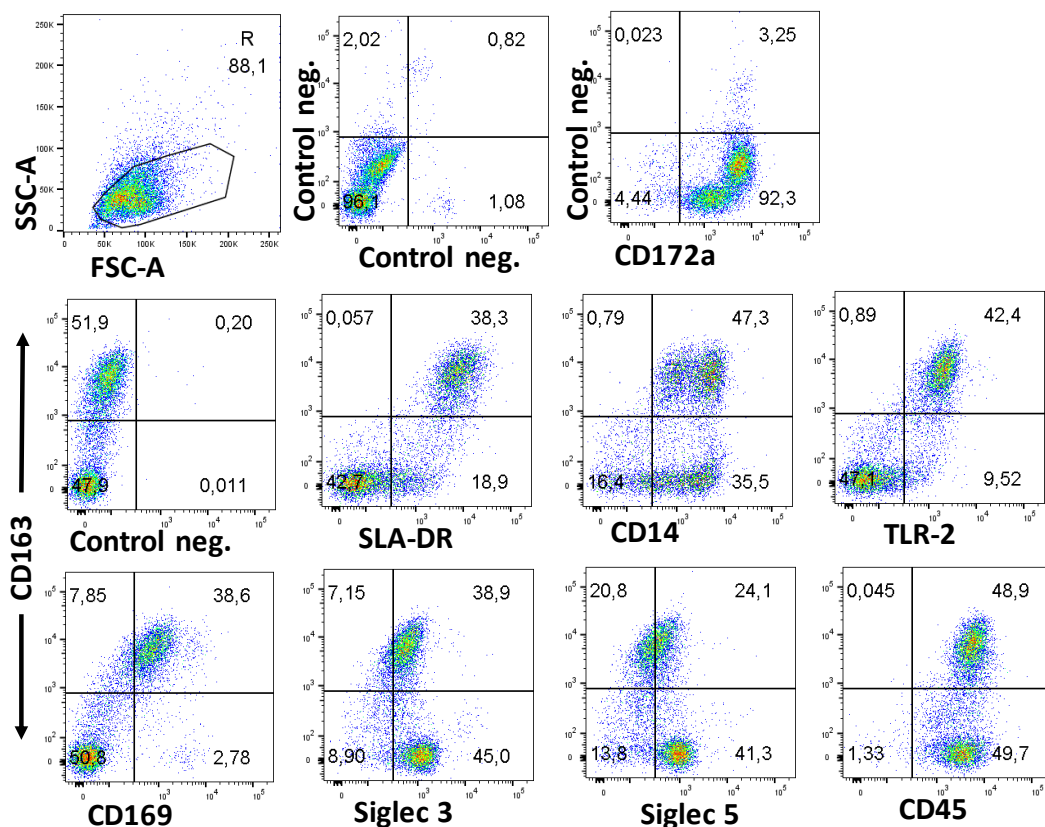
A 48 hpi detectamos una disminución en la expresión de CD163 en las células infectadas respecto a las control, repitiéndose este efecto en todos los experimentos analizados. A pesar de observar esta tendencia, la diferencia en la expresión de CD163 entre las células infectadas y sin infectar no fue estadísticamente significativa ( $p=0,057$ ; test de Mann-Whitney) con el número de experimentos realizados ( $n=4$ ). En cuanto a los niveles de expresión de los distintos siglecs tampoco encontramos diferencias entre las células control y las infectadas a los dos tiempos estudiados. La expresión de CD169 en las células infectadas a las 48 hpi disminuyó en dos experimentos (como el mostrado en la Fig. 16C) y se incrementó en otros dos, no encontrándose a nivel general una diferencia relevante (Fig. 16D). La presencia de la nucleoproteína vírica, que confirma la infección, también fue detectada por citometría de flujo (Fig. 16A).

## **2.2. Estudio comparativo de las células de médula ósea cultivadas con rpGM-CSF o rhM-CSF.**

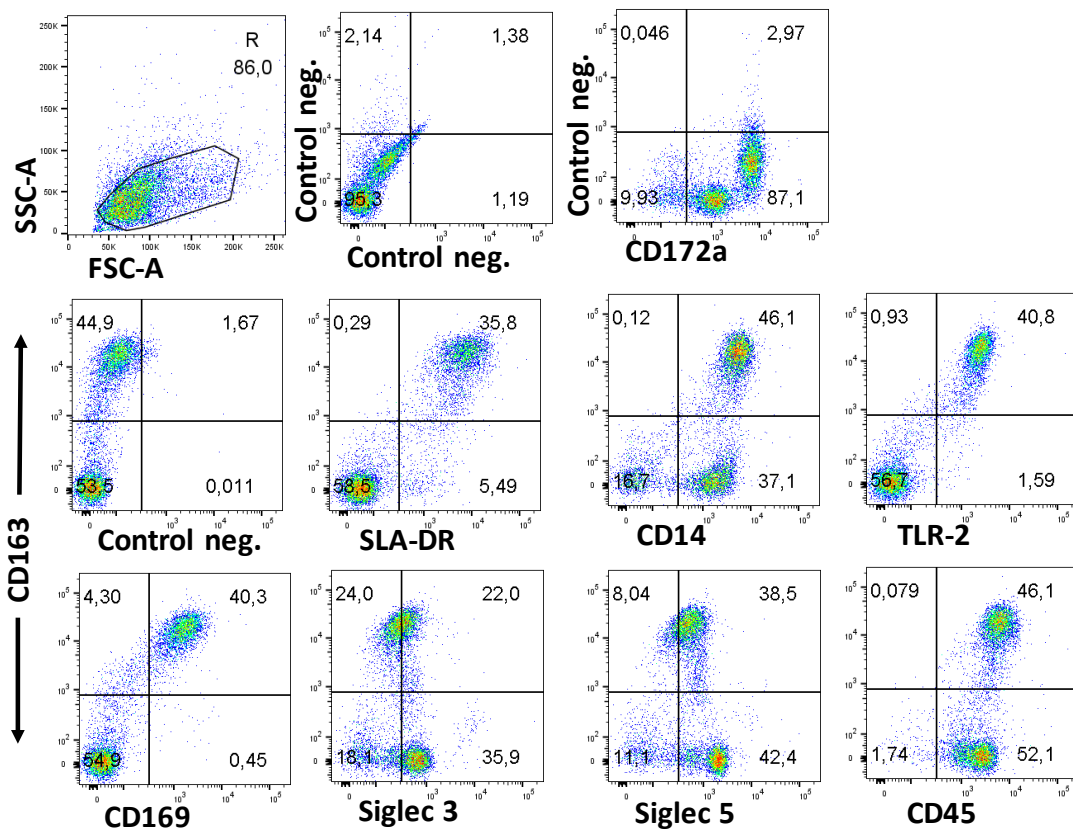
También analizamos la expresión de siglecs y otras moléculas en células de médula ósea cultivadas con rhM-CSF. Este factor de crecimiento regula la diferenciación de monocitos y macrófagos en condiciones homeostáticas y la molécula recombinante humana posee actividad sobre células porcinas (Kapetanovic *et al.*, 2012). Comparamos las células de médula ósea de un mismo animal que habían permanecido en cultivo durante ocho días con rpGM-CSF o con rhM-CSF y realizamos un doble marcaje cruzando la expresión de CD163 con la de otras moléculas (Fig. 17).

Los resultados mostraron un fenotipo similar para los marcadores analizados, expresando tanto las células CD163<sup>+</sup> obtenidas con el cultivo con rhM-CSF como las obtenidas con rpGM-CSF niveles altos de CD172a y SLA-DR, además de ser positivas para TLR2, CD169 y el marcador leucocitario CD45. Además ambas expresaban niveles bajos de Siglec 3 y Siglec 5. En cuanto a CD14, receptor del LPS, las células CD163<sup>+</sup> obtenidas por el cultivo con rhM-CSF presentaron una distribución homogénea con un alto nivel de expresión de este receptor, mientras que aquellas células CD163<sup>+</sup> que fueron obtenidas utilizando rpGM-CSF tenían una expresión más heterogénea para CD14, existiendo dos subpoblaciones: una positiva débil y otra con alta expresión.

**A) Médula Ósea + GM-CSF**



**B) Médula Ósea + M-CSF**



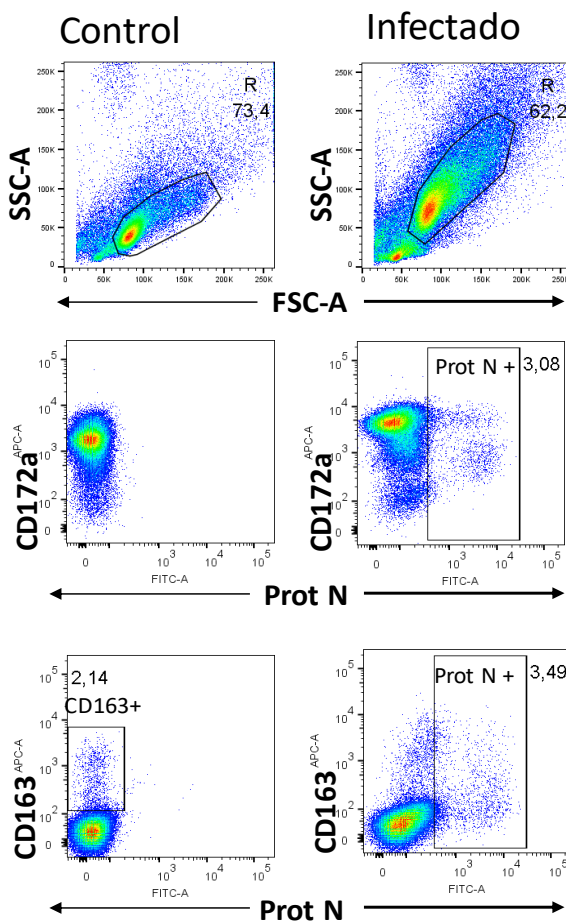
**Figura 17. Análisis fenotípico de células derivadas de médula ósea cultivadas con rpGM-CSF o con rhM-CSF.** Las células fueron cultivadas durante ocho días con 100 ng/ml de rpGM-CSF o 20 ng/ml de rhM-CSF. Para su análisis por citometría de flujo fueron teñidas primero con AcMo contra SLA-DR, CD14, TLR2, CD169, Sg 3, Sg 5 y CD45, que fueron revelados con un anticuerpo de cabra anti Ig de ratón conjugado con APC. Para marcar el CD163 se utilizó el AcMo 2A10-Biotina que fue revelado con estreptavidina-PE. En el apartado **A)** se muestran los resultados obtenidos en las células cultivadas con rpGM-CSF y en el **B)** con rhM-CSF. Los *dotplots* corresponden a un experimento representativo de los cuatro que se realizaron con diferentes animales.

**CAPÍTULO 2. INTERACCIÓN DEL VIRUS DEL PRRS CON LAS POBLACIONES DE MONOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.**

**1. INFECCIÓN POR PRRSv DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.**

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, la mayoría de los trabajos publicados sobre la interacción del virus de PRRS con células de médula ósea han sido realizados infectando *in vitro* células que habían sido maduras durante varios días con factores de crecimiento, dando lugar a macrófagos o a células dendríticas susceptibles a la infección (Chang *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2016; Gimeno *et al.*, 2011). Sin embargo, apenas existen datos sobre los tipos de células ya presentes en la médula ósea del animal que puedan soportar la replicación del virus. En este sentido, se han detectado lesiones y presencia de antígenos virales o Proteína N en la médula ósea en lechones infectados *in vivo* tanto por cepas norteamericanas como europeas (Feng *et al.*, 2001; Amarilla *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

El primer paso para iniciar nuestro estudio fue realizar experimentos infectando *ex vivo* células de médula ósea inmediatamente después de la extracción y



**Figura 18. Expresión de la Proteína N de PRRSv en la población total de médula ósea.** Las células fueron infectadas con PRRSv a una MOI de 0,5 y 40 horas después se realizó un doble marcaje para analizar las células por citometría de flujo. Se incubaron con AcMo contra CD172a, CD163, o AcMo control del mismo isotipo (controles no mostrados), y a continuación con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con APC. Tras permeabilizar con metanol las células fueron teñidas con un AcMo contra la Proteína N vírica (1CH5-Alexa Fluor 488) o con un anticuerpo irrelevante como control negativo (1D9-Alexa Fluor 488). En los *dotplots* de SSC-A vs. FSC-A se seleccionaron las células mieloides (región R). Los otros *dotplots* mostrados (CD172a y CD163 vs. Prot N) muestran células dentro de la región R. Los números indican los porcentajes de células en las regiones seleccionadas.

procesamiento del órgano del animal. La médula ósea fue infectada con una MOI de 0,5 y el virus permaneció en cultivo con las células durante 40 horas. Pasado ese tiempo, analizamos mediante citometría de flujo la expresión del marcador pan-mieloide CD172a y el receptor de PRRSv, CD163. Como se muestra en la Fig. 18 en las células no infectadas el porcentaje de células CD163<sup>+</sup> era muy bajo, aproximadamente entre un 2-3% del total. Por otro lado, el porcentaje de células infectadas representaba en torno a un 3-3,5%. Estos experimentos mostraron que las células positivas para la Proteína N vírica tenían una expresión media o alta para CD172a. Los resultados relativos a la expresión de CD163 fueron menos claros. A pesar de ser el receptor clave para la infección vírica, por lo que esperábamos que las células positivas para la Proteína N lo fueran también para CD163, observamos que aquellas células con altos niveles de la nucleoproteína eran CD163<sup>-</sup> o expresaban debilmente este receptor, aunque también detectamos células CD163<sup>+</sup> que coexpresaban la proteína del virus.

Este inesperado resultado podría deberse a que CD163 es un receptor endocítico y, como se ha mostrado anteriormente (Fig. 16), su expresión en la superficie celular disminuye tras la infección, por lo que las células infectadas podrían provenir de células que eran inicialmente CD163<sup>+</sup>. Aunque tampoco podíamos descartar que las células infectadas procedieran de células originariamente negativas para este receptor. Para resolver esta cuestión decidimos aislar por separado células de médula ósea CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y células CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> y estudiar la infección vírica en cada población celular.

## **2. INFECCIÓN POR PRRSv DE MONOCITOS CD163<sup>+</sup> Y CD163<sup>-</sup> DE MÉDULA ÓSEA.**

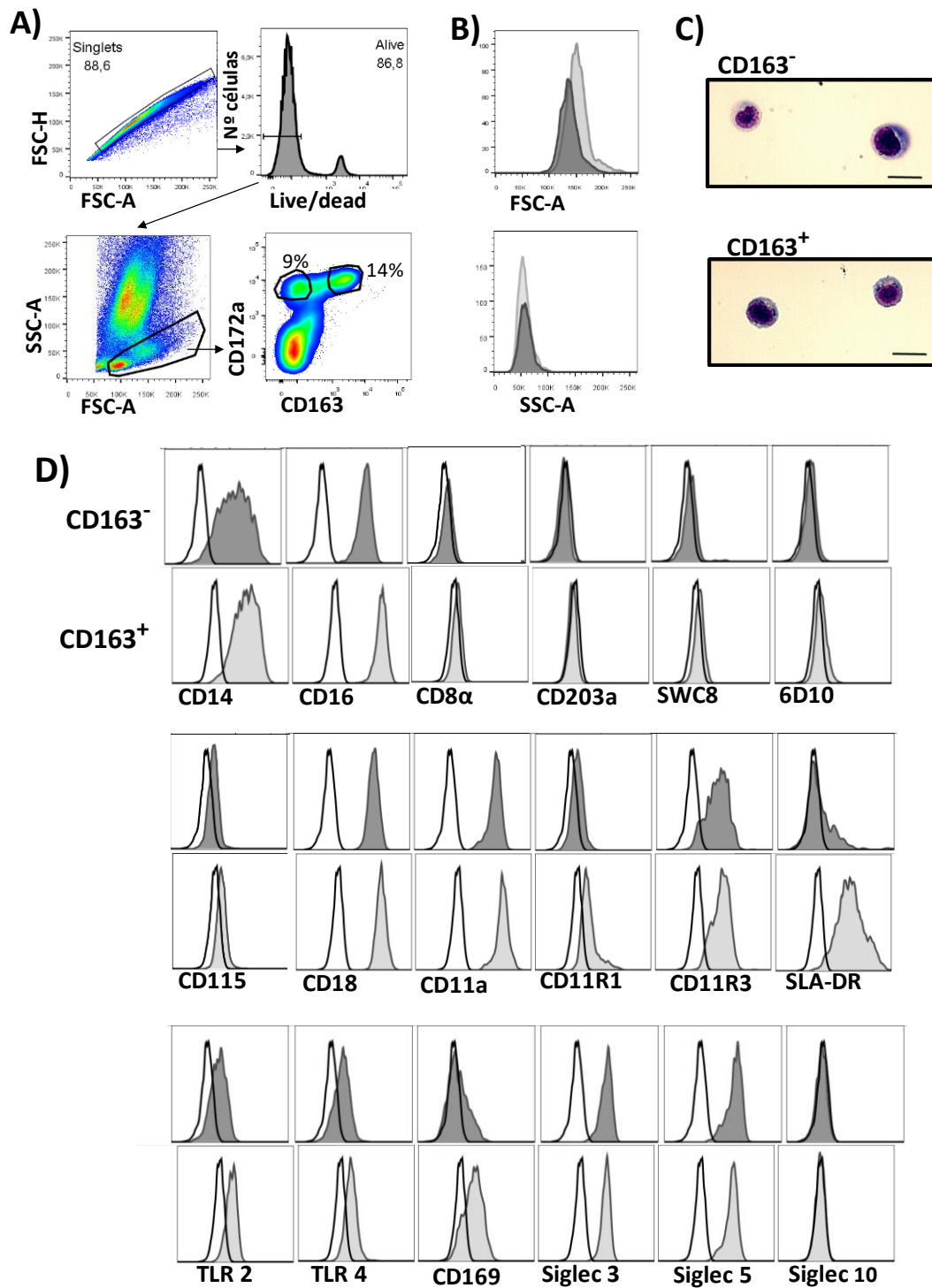
### **2.1. Caracterización fenotípica de subpoblaciones de monocitos de médula ósea.**

Como se ha descrito en la introducción, PRRSv es un virus con tropismo por células del linaje monocítico-macrofágico. En este apartado identificamos mediante citometría de flujo poblaciones de monocitos de médula ósea en función de la expresión de CD172a y CD163. Brevemente, el procedimiento del triple marcaje realizado fue el siguiente: primero las células fueron teñidas con AcMo frente a los antígenos indicados

en la Fig. 19D y fueron revelados con un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con APC. A continuación las células se incubaron con AcMo frente CD172a y CD163 marcados con biotina y Alexa Fluor 488 respectivamente, y finalmente con estreptavidina-PerCP

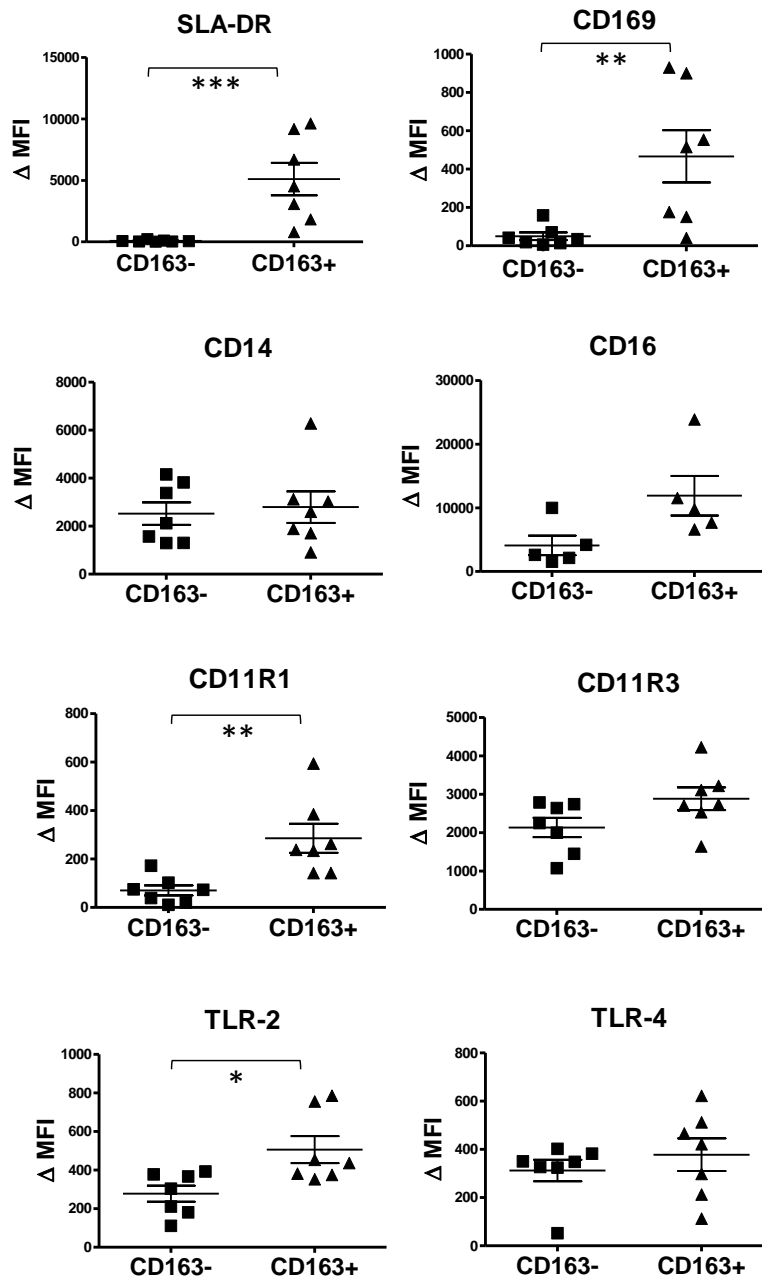
Como se observa en la Fig. 19A, excluimos a los granulocitos basándonos en sus características de dispersión de la luz causadas por su complejidad celular, seleccionando una región de tamaño (FSC-A) medio a alto pero baja complejidad (SSC-A), características típicas de las células mononucleares de la médula ósea. Dentro de esta región los monocitos fueron identificados por su alta expresión del antígeno pan-mielomonocítico CD172a. Al cruzarlo con la expresión de CD163 observamos que ésta presentaba una distribución heterogénea, formando un continuo que comprendía desde células negativas para CD163 a células con alta expresión de CD163. Con el propósito de comparar poblaciones celulares lo más distantes entre sí realizamos una región para las células CD163 negativas, a la que denominamos CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup>, y otra región seleccionando las células CD163 positivas altas, identificada como CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>. Estas últimas muestran un FSC-A ligeramente mayor que las CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> pero parecido SSC-A (Fig. 19B). Cuando posteriormente las células fueron aisladas mediante un citómetro separador, la tinción de May Grünwald-Giemsa confirmó que ambas poblaciones mostraban la morfología típica de los monocitos, es decir, células redondeadas con un núcleo con una pequeña hendidura que le confiere aspecto de alubia (Fig. 19C).

En ambas regiones las células fueron negativas para SWC8 y 6D10 (marcadores de granulocitos), CD8 $\alpha$  (marcador de una subpoblación de linfocitos T y células NK) y Siglec 10 (linfocitos B) (Fig. 19D). También fueron negativas para CD203a (SWC9), que se expresa en macrófagos pero no en monocitos (Domínguez *et al.*, 1998). Al comparar entre estas dos poblaciones celulares la expresión de varios antígenos de la superficie celular, observamos que los monocitos CD172a<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> expresaban mayores niveles de SLA-DR, CD11R1, CD169 y TLR-2; siendo muy marcada la diferencia de expresión en el caso de SLA-DR ( $p=0,0006$  aplicando el test estadístico de Mann-Whitney), que se expresaba en los monocitos CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> (a partir de ahora designados únicamente como CD163<sup>+</sup> para acortar), pero solamente en una pequeña fracción de los



**Figura 19. Caracterización de las poblaciones de monocitos de médula ósea mediante citometría de flujo.** **A)** Después de excluir los dobles y las células muertas, las células mononucleares fueron seleccionadas basándose en su perfil SSC-A vs. FSC-A y se definieron dos subpoblaciones de monocitos (CD172a<sup>++</sup>) en función de la expresión de CD163. **B)** Perfil FSC-A y SSC-A de las células CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> (histogramas grises oscuros) y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> (histogramas grises claros). **C)** Morfología de células CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> aisladas mediante un citómetro separador y teñidas con May Grünwald-Giemsa. La barra de escala representa 20 μm. **D)** Expresión de marcadores de superficie relevantes en las subpoblaciones definidas en A). El marcaje con el anticuerpo específico se representa en histogramas grises claros (CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>) u oscuros (CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup>) y los histogramas sin relleno corresponden al marcaje con los anticuerpos controles de isotipo.

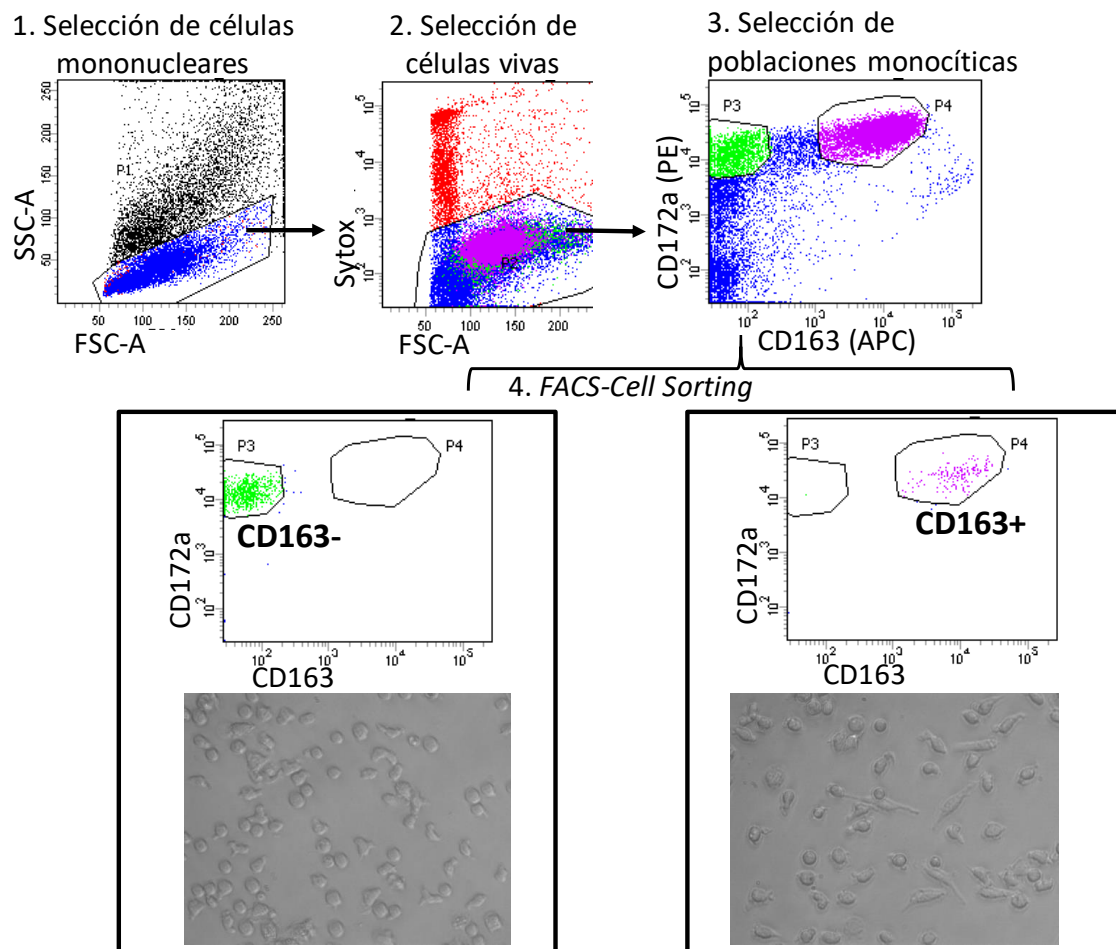
CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> (a partir de ahora denominados CD163<sup>-</sup>). Respecto a la expresión de CD169, ésta era muy baja en la población CD163<sup>-</sup>, mientras que las células CD163<sup>+</sup> tenían una expresión moderada. En cambio, otras moléculas como CD11a, CD11R1, CD18, Siglec 3, Siglec 5, CD14 o CD115 mantenían un nivel de expresión similar en ambas poblaciones. CD16 mostró una tendencia a una mayor expresión en los monocitos CD163<sup>+</sup> (p=0,056), pero sin existir una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 20).



**Figura 20. Comparación de los niveles de expresión (ΔMFI: media ± SEM) de algunos de los antígenos representados en la figura anterior.** Cada animal se representa por un cuadrado para las células CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> o un triángulo para las CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>. La ΔMFI representa la diferencia entre la mediana de intensidad de fluorescencia del anticuerpo indicado y la mediana del anticuerpo control negativo. Para el análisis estadístico de las diferencias entre los dos grupos de células se utilizó el test U de Mann-Whitney. (\*) p ≤ 0.05; (\*\*) p ≤ 0.01; (\*\*\*) p ≤ 0.001.

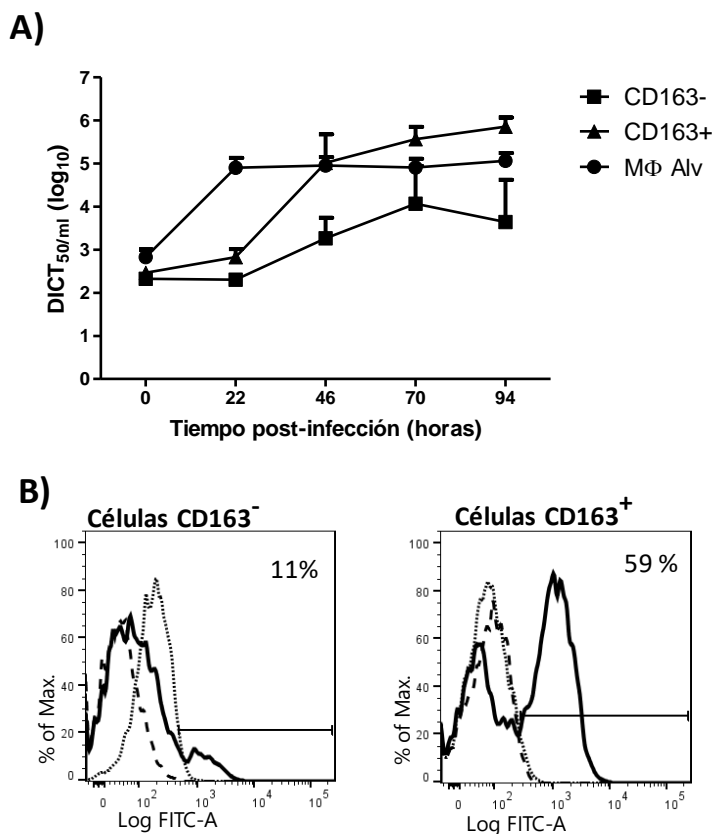
## 2.2. Permisividad de los monocitos de médula ósea a la infección por PRRSv.

Para poder realizar los experimentos expuestos en los siguientes apartados fue necesario separar las dos poblaciones de monocitos de médula ósea ( $CD163^-$  y  $CD163^+$ ) mediante un citómetro separador (FACS). El procedimiento se explica en detalle en el apartado de Material y Métodos 3.2. En la Fig. 21 se muestra un esquema ilustrativo de la estrategia seguida para la separación.



**Figura 21. Esquema de la estrategia seguida para el aislamiento de los monocitos  $CD172a^{++}CD163^-$  y  $CD172a^{++}CD163^+$ .** Las células de médula ósea fueron centrifugadas en un gradiente de Percoll 53% para eliminar los granulocitos maduros. Posteriormente fueron incubadas con AcMo anti- $CD172a$  (74-22-15a) y anti- $CD163$  (2A10/11) que fueron revelados con anticuerpos de cabra anti-IgG2b de ratón conjugado con PE y anti-IgG1 de ratón conjugado con APC. Las células se tiñeron con SYTOX™ Blue para identificar las muertas y fueron procesadas por un citómetro separador. El proceso de selección de las células a separar consistió en acotar una primera región de FSC-A vs. SSC-A para excluir a los granulocitos remanentes, y seguidamente en otra región se seleccionaron las células vivas. Dentro de éstas y en función de la fluorescencia en PE ( $CD172a$ ) y APC ( $CD163$ ) se acotaron dos regiones con alta expresión de  $CD172a$ : una negativa para  $CD163$  y otra positiva alta para este receptor. Se muestran fotografías adquiridas con un microscopio de contraste de fases (objetivo 40X) de las células separadas y mantenidas en cultivo durante 18 horas.

El hecho de que las poblaciones de monocitos de médula ósea se diferencien en su expresión en CD163 y CD169, los principales receptores para el virus del PRRS, las convierte en células interesantes para comparar su susceptibilidad a la infección por este virus. Los monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> recién separados y macrófagos alveolares de los mismos animales fueron infectados con una MOI de 0,5. Después de una hora de incubación las células se lavaron dos veces para eliminar restos del virus no adsorbido y se distribuyeron en placas de cultivo. A distintos tiempos post-infección se evaluó la cantidad de virus producida en cada cultivo celular por RT-qPCR, amplificando la ORF-7, que codifica para la proteína de la nucleocápside (Fig. 22A). En algunos experimentos las titulaciones virales también se confirmaron evaluando el efecto citopático en cultivos de macrófagos alveolares obteniéndose resultados similares por las dos técnicas.



**Figura 22. Replicación viral en los monocitos de médula ósea.**

**A)** Los monocitos CD163<sup>+</sup> o CD163<sup>-</sup> o los macrófagos alveolares fueron infectados con PRRSv (MOI 0,5) y a diferentes tiempos pi se recogieron los sobrenadantes y los lisados celulares y se extrajo el RNA viral. Éste se cuantificó por RT-qPCR, comparándolo con una curva patrón obtenida a partir de diluciones seriadas de un inóculo viral titulado en DICT<sub>50/ml</sub>. En la gráfica se representa la media de los títulos virales + SEM de cinco experimentos independientes.

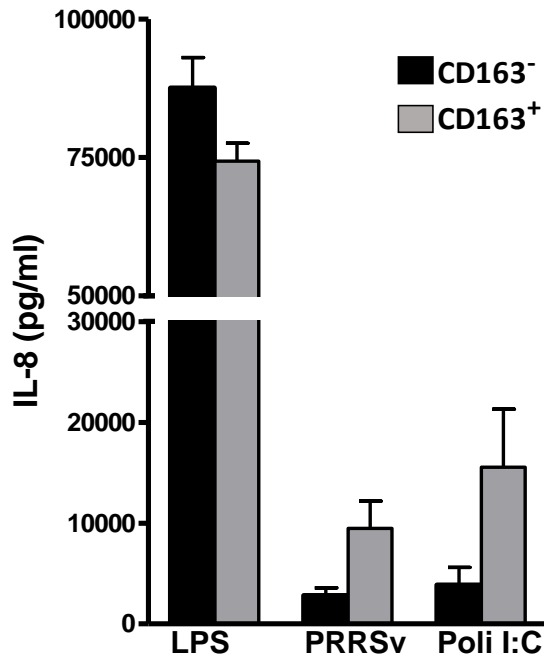
**B)** Detección por citometría de flujo de la Proteína N de PRRSv. A las 66 hpi se recogieron las células y se permeabilizaron y tiñeron con el AcMo 1CH5-Alexa Fluor 488. Los histogramas con línea continua corresponden a las células de los cultivos infectados y aquellos con línea discontinua a células de los controles no infectados. Los histogramas punteados representan células de cultivos infectados teñidas con un AcMo irrelevante (1D9-Alexa Fluor 488).

PRRSv replicó rápidamente en los macrófagos alveolares alcanzando títulos máximos ( $\approx 10^5$  DICT<sub>50/ml</sub>) a las 22 hpi. En todos los experimentos (n=5), realizados con células de distintos animales y cuya media se representa en la Fig. 22A, hubo replicación viral en los monocitos CD163<sup>+</sup>, obteniendo títulos incluso ligeramente superiores a los del macrófago alveolar aunque con una cinética más lenta, con picos de infección a partir de las 46 hpi. Esta homogeneidad de resultados no se observó en los monocitos CD163<sup>-</sup>, en los que hubo algunos experimentos donde se detectaron títulos virales altos a partir de las 70 hpi ( $\geq 10^5$  DICT<sub>50/ml</sub>), mientras que en otros no se detectó virus a ninguno de los tiempos analizados. En concordancia con estos resultados, en un experimento en el que además se analizó la expresión de Proteína N viral mediante citometría de flujo, una alta proporción de monocitos CD163<sup>+</sup> (59%) fueron positivos para esta proteína a las 66 hpi, frente a sólo un 11% de los monocitos CD163<sup>-</sup> (Fig. 22B).

### **2.3. Producción de citoquinas por los monocitos de médula ósea en respuesta a la infección.**

En la médula ósea de animales infectados con cepas de la especie PRRSv-1 se ha descrito un aumento local de citoquinas proinflamatorias asociado a cambios patológicos en este órgano (Amarilla *et al.*, 2017). Por ello nos planteamos analizar la producción de citoquinas en las poblaciones de monocitos de médula ósea en respuesta al virus. Como controles se utilizaron cultivos de estas células tratadas con ligandos de TLR como LPS (TLR-4) o Poli I:C (TLR-3).

No se detectó TNF- $\alpha$ , IL-10 o IFN- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos de las células CD163<sup>-</sup> ni CD163<sup>+</sup> incubadas con el virus. En cambio, ambas poblaciones producían IL-8 en respuesta al inóculo viral, aunque en cantidades mucho menores a cuando eran estimuladas con LPS (Fig. 23). Los monocitos CD163<sup>+</sup> mostraron una tendencia a producir mayores cantidades de IL-8 frente al virus que los CD163<sup>-</sup>, aunque sin llegar a alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Las células positivas para CD163 también producían más IL-8 que las negativas cuando eran incubadas con Poli I:C.

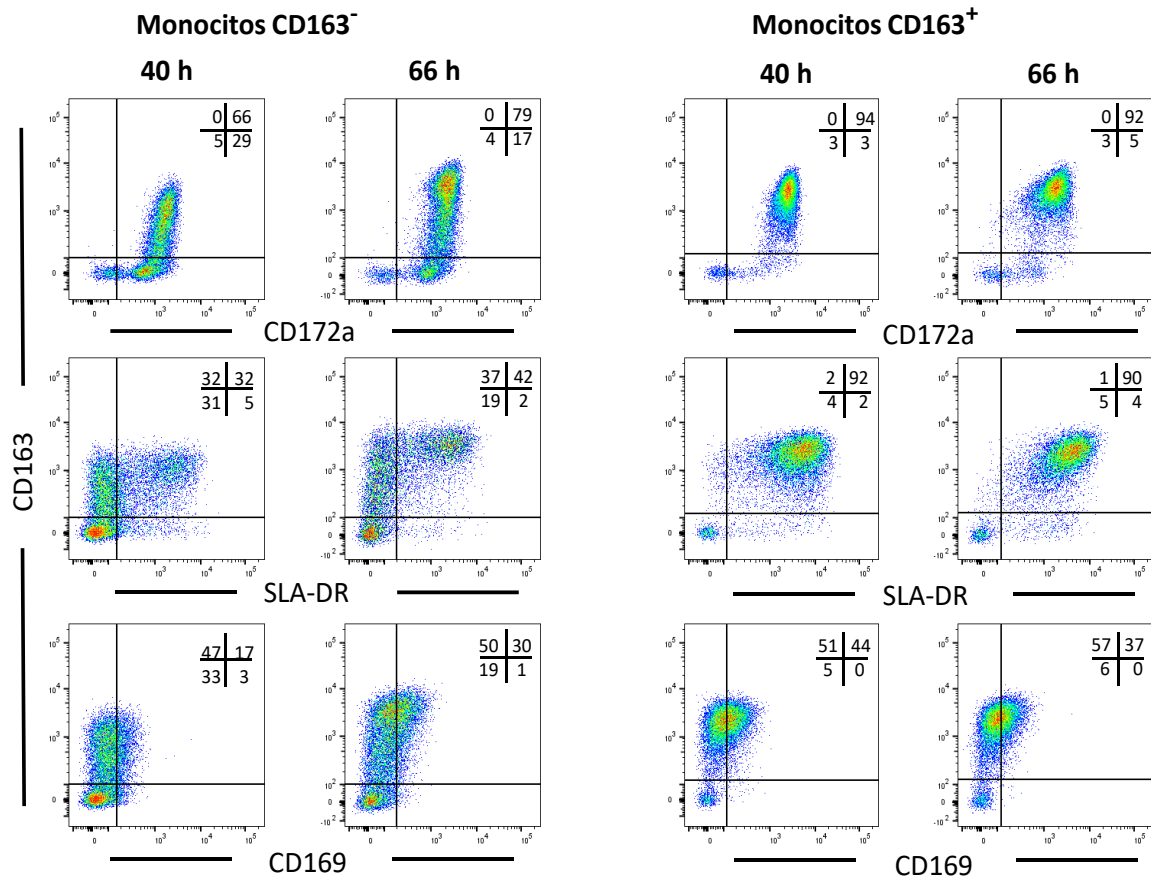


**Figura 23. Producción de IL-8 en los monocitos de médula ósea en respuesta a la infección por PRRSv.** Los monocitos CD163<sup>-</sup> o CD163<sup>+</sup> de médula ósea fueron incubados con PRRSv a MOI 0,5 durante una hora. Tras retirar el inóculo viral y lavar las células se mantuvieron en cultivo durante 46 horas. Por otra parte, los monocitos también fueron incubados en cultivos paralelos con *mock* (sobrenadante de macrófagos alveolares no infectados) en las mismas condiciones. Otros cultivos fueron tratados con LPS (1 µg/ml) o Poli I:C (10 µg/ml) durante 21 horas. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 por ELISA. En la gráfica se representa la media + SEM de tres animales. En el caso de las células infectadas con PRRSv ha sido restada la producción de IL-8 obtenida en los monocitos incubados sin virus.

#### 2.4. Maduración *in vitro* de los monocitos de médula ósea con rhM-CSF.

En varias especies se ha demostrado una relación madurativa entre las distintas poblaciones de monocitos (Ginhoux y Jung, 2014). Además, previamente en esta tesis ha sido descrito que el número de células de médula ósea positivas para CD163 aumenta tras el cultivo con rhM-CSF. Por ello decidimos investigar el efecto de este factor de crecimiento sobre los monocitos.

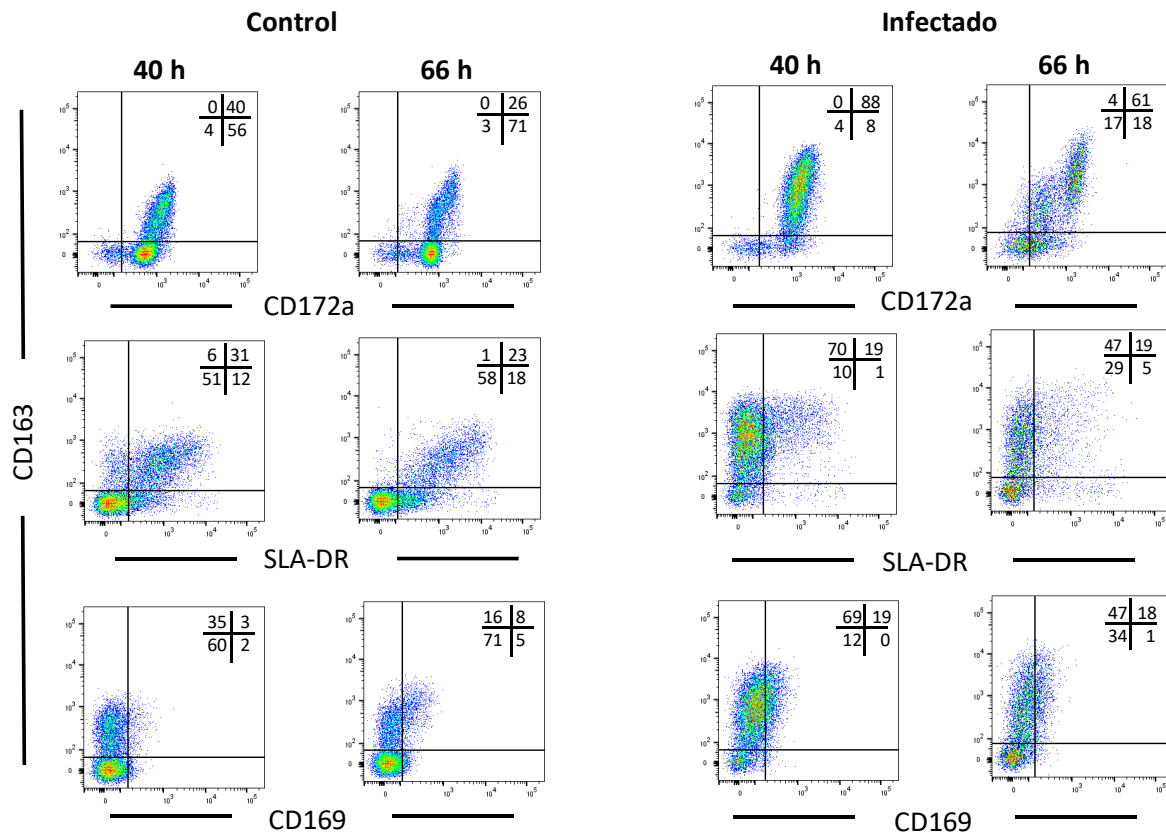
Después de 40 horas en cultivo con rhM-CSF, una alta proporción de los monocitos de médula ósea que originariamente eran CD163<sup>-</sup> resultaron positivos para CD163 (Fig. 24). Un porcentaje notable de estas células también expresaron SLA-DR y niveles bajos de CD169, adquiriendo así un fenotipo semejante a los monocitos CD163<sup>+</sup>. Los porcentajes e intensidades de estos marcadores aumentaron ligeramente cuando se repitió la citometría un día más tarde (66 horas). Estos datos demuestran una convertibilidad entre ambas poblaciones de monocitos, de manera que los monocitos CD163<sup>-</sup> pueden madurar a CD163<sup>+</sup> tras ser estimulados con rhM-CSF. Por su parte, los monocitos que habían sido seleccionadas como CD163<sup>+</sup> mantuvieron mayoritariamente su fenotipo (CD163<sup>+</sup> SLA-DR<sup>+</sup> CD169<sup>bajo</sup>), aunque también se detectó un pequeño porcentaje de células CD163<sup>-</sup> SLA-DR<sup>-</sup> CD169<sup>-</sup>.



**Figura 24. Efecto de la maduración con rhM-CSF sobre el fenotipo de las poblaciones de monocitos de médula ósea.** Los monocitos CD163<sup>-</sup> o CD163<sup>+</sup> separados por FACS fueron cultivados en medio suplementado con rhM-CSF (20 ng/ml). A los tiempos indicados (40 y 66 h) las células fueron analizadas por citometría, excluyendo los dobletes y células muertas. Los AcMo se revelaron con anticuerpos de cabra anti IgG1-APC, anti IgG2b-PE o anti IgG2a-PE de ratón. Se muestra la expresión de CD163 vs. CD172a, SLA-DR y CD169. En cada dotplot se indica el porcentaje de células de cada cuadrante. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de los tres realizados.

## 2.5. Efecto de la infección por PRRSv sobre el fenotipo de monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea.

CD163 es un receptor indispensable para que el ciclo viral de PRRSv sea completo y efectivo (Whitworth *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2017). Sin embargo, en los monocitos de médula ósea que originariamente no expresaban CD163 en su superficie celular se detectó replicación viral en algunos experimentos (Fig. 22). Una posible explicación a este hallazgo podría estar relacionada con los resultados del apartado anterior: los monocitos CD163<sup>-</sup> pueden madurar y expresar CD163 tras ser estimulados con determinados factores. Por ello investigamos si la infección con PRRSv también induce la expresión de CD163.



**Figura 25. Efecto de la infección por PRRSv sobre el fenotipo de monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea.** Los monocitos CD163<sup>-</sup> fueron infectados con PRRSv a una MOI de 1 o cultivados con sobrenadante de macrófagos alveolares no infectados (control). A los tiempos indicados (40 y 66 horas), las células fueron teñidas con AcMo como se explica en la Fig. 24 y analizadas por citometría después de la exclusión de los dobletes y células muertas. Se muestra la expresión de CD163 frente a CD172a, SLA-DR y CD169. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de los dos realizados.

Los monocitos CD163<sup>-</sup> fueron infectadas con PRRSv (MOI 1) o incubados con *mock*, es decir, sobrenadante de macrófagos alveolares no infectados (control negativo). Pasada una hora el virus o el *mock* fueron retirados y las células lavadas y mantenidas en cultivo. A las 40 o 66 hpi se realizó un doble marcaje para detectar por citometría de flujo la expresión de CD163 *versus* CD172a, SLA-DR o CD169 (Fig. 25). A las 40 horas la diferencia en la expresión de CD163 entre las células infectadas y las no infectadas (control) era considerable; aunque en las células control también se indujo la expresión de CD163, fue en un porcentaje de células más pequeño ( $\approx 40\%$ ) y con una intensidad de fluorescencia mucho más baja que en las células infectadas, la mayoría de las cuales ( $\approx 88\%$ ) expresaban este receptor. A las 66 horas la expresión de CD163 disminuyó un poco tanto en las células infectadas como en las control. Estos resultados sugieren que PRRSv puede provocar una mayor expresión de CD163, que resultaría beneficiosa para el virus

y que explicaría los resultados obtenidos en la Fig. 22, aunque para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar más experimentos.

**CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LAS POBLACIONES DE MONOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.**

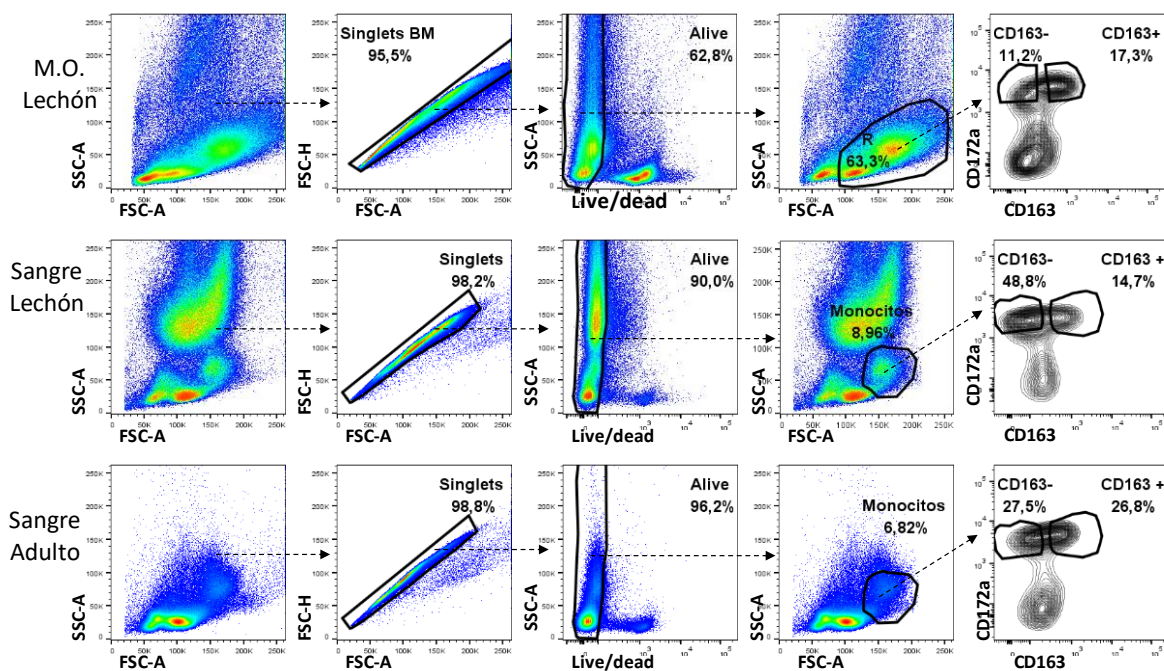
El objetivo de este apartado fue caracterizar en detalle las dos poblaciones de monocitos de médula ósea descritas. Para ello, primero realizamos un análisis de la expresión de diversos receptores de superficie en estas células y en las poblaciones de monocitos de sangre periférica. En segundo lugar, comparamos los niveles de expresión de RNAm de TLR y receptores de quimioquinas en ambas poblaciones de monocitos de médula ósea. Por último estudiamos la producción de citoquinas en las dos poblaciones de monocitos en respuesta a diferentes ligandos de TLR y su comportamiento en ensayos de fagocitosis, procesamiento antigénico y *burst* oxidativo.

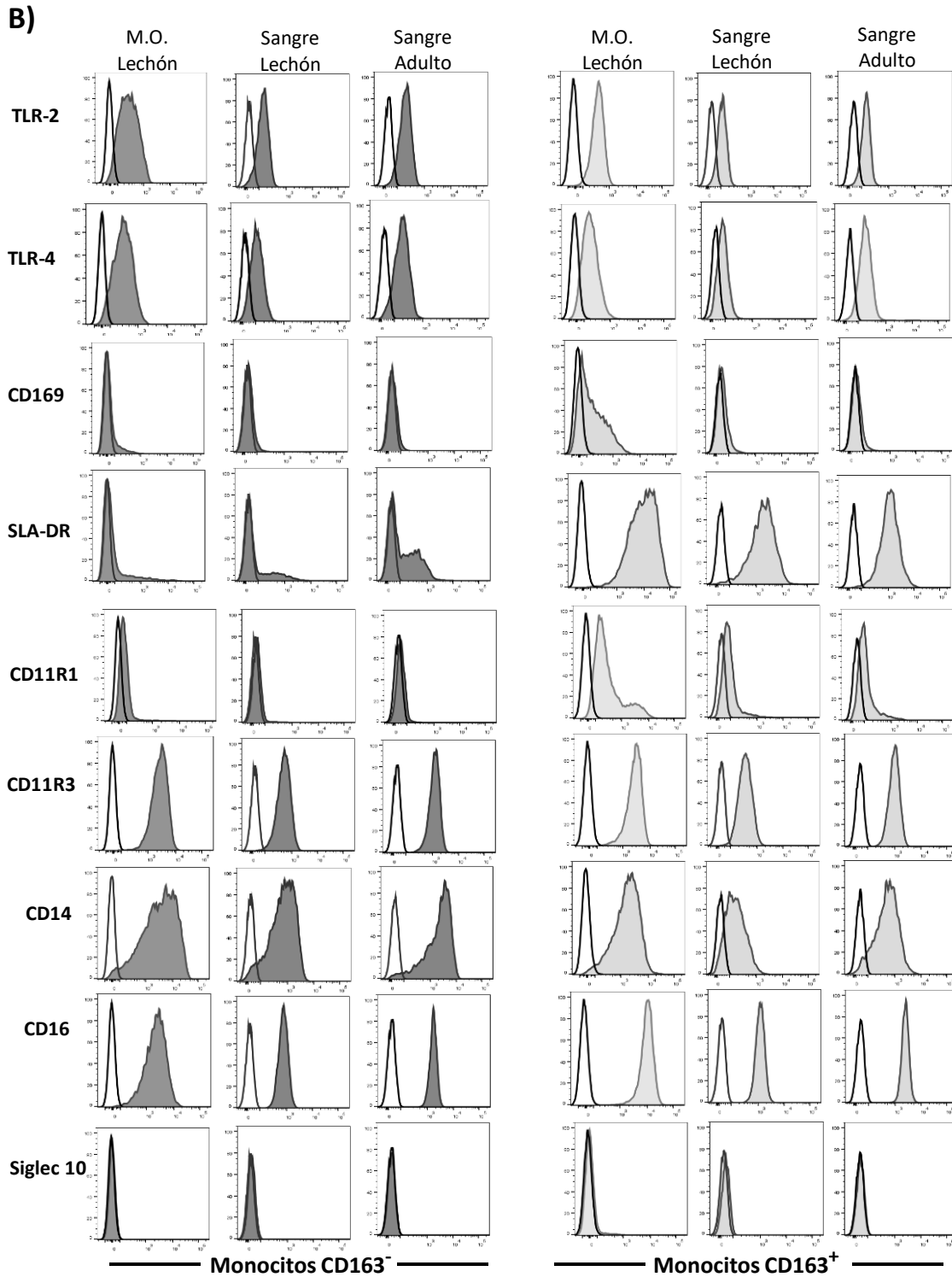
**1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE MONOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.**

**1.1. Expresión de receptores de superficie en monocitos sanguíneos y de médula ósea.**

Nuestro grupo fue el primero en describir la existencia de poblaciones de monocitos en sangre periférica en porcino basándose en la presencia o ausencia de CD163 (Sánchez *et al.*, 1999; Chamorro *et al.*, 2005). En la etapa post-fetal del animal los

A)





**Figura 26. Comparación del fenotipo de los monocitos de médula ósea y los monocitos sanguíneos de lechón y de adulto. A)** Se realizó un triple marcaje combinando los AcMo frente a los distintos receptores indicados en la parte B de la figura con los AcMo BA1C11-Biotina (anti-CD172a) y 2A10/11-Alexa Fluor 488 (anti-CD163). Para el análisis se seleccionaron las células vivas y por FSC-A y SSC-A las regiones de células mononucleares en la médula ósea o de monocitos en la sangre (en adulto además la sangre se sometió a un gradiente de Percoll para purificar las PBMC) sobre las que se acotaron dos regiones de monocitos en función de su expresión de CD172a y CD163. **B)** El marcaje específico de cada antígeno se representa en histogramas grises oscuros (región de monocitos CD163<sup>+</sup>) o claros (región de monocitos CD163<sup>-</sup>), y los histogramas sin relleno corresponden a los anticuerpos controles de isotipo. (M.O.: médula ósea).

monocitos se desarrollan en la médula ósea, migran a la sangre y finalmente pasan a los tejidos. Para estudiar la relación entre las distintas poblaciones (CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup>) de médula ósea y sangre comparamos la expresión de diversos marcadores de superficie característicos del linaje monocito-macrófago. Como los estudios previos en poblaciones de sangre se habían realizado con células que provenían de cerdos adultos (Chamorro *et al.*, 2005; Revilla *et al.*, 2009), y en esta tesis hemos trabajado con lechones, analizamos también la posible influencia de la edad comparando las poblaciones de sangre de lechones y adultos

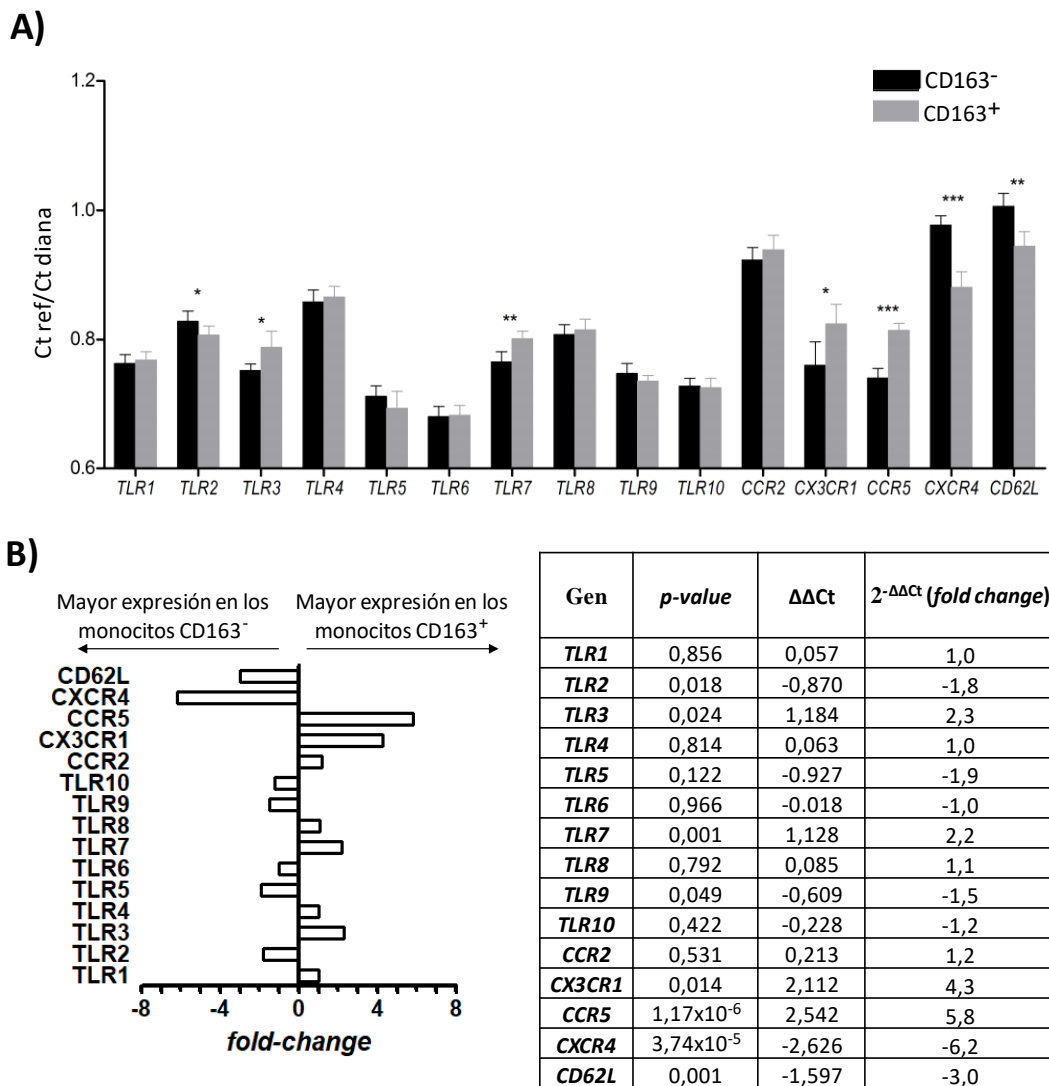
Los resultados mostraron que los perfiles de las moléculas estudiadas eran muy similares en las poblaciones de médula ósea y sangre (Fig. 26). Los monocitos CD163<sup>-</sup> y los CD163<sup>+</sup> de sangre expresaron también TLR-2, TLR-4, CD11R3 y CD16. El perfil de SLA-DR se asemejaba mucho al de la médula ósea: mayoritariamente negativo en los monocitos CD163<sup>-</sup> y positivo en los CD163<sup>+</sup>. Ambas poblaciones celulares también expresaron CD14, aunque en el caso de la sangre la expresión era mayor en los monocitos CD163<sup>-</sup> que en los CD163<sup>+</sup>.

Los dos tipos de monocitos de sangre habían sido descritos como CD169 negativos por Delputte *et al.*, 2007 y Revilla *et al.*, 2009, aunque en ambos artículos también se mostraba que CD169 podía ser inducido por el IFN- $\alpha$  o por suero porcino. Para este trabajo de tesis se realizaron cuatro experimentos con animales diferentes, y en la mitad de ellos no se detectó expresión de CD169 pero en la otra mitad sí que se observó una expresión baja de este siglec. Estos resultados fueron independientes de la edad de los animales. Aquellos animales que sí expresaban CD169 lo hicieron en niveles bajos en los monocitos CD163<sup>-</sup> y más altos en los monocitos CD163<sup>+</sup>.

## **1.2. Análisis de la expresión génica de TLR y receptores de quimioquinas.**

Varios estudios realizados en distintas especies animales describen que las subpoblaciones de monocitos sanguíneos se diferencian en su respuesta a ligandos de TLR (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 1999; Chamorro *et al.*, 2005; Cros *et al.*, 2010) y en su patrón de expresión de receptores de quimioquinas, fundamentalmente

en CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1, y de moléculas de adhesión como CD62L, implicadas en la salida de la médula ósea y en la migración a tejidos (Shi y Pamer, 2011), por lo que estudiamos el perfil de expresión de estas moléculas en las poblaciones de monocitos porcinos de médula ósea. Frente a muchas de ellas no se dispone de anticuerpos específicos, así que analizamos la expresión de los genes que las codifican. Extrajimos el RNA de monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de médula ósea, que habían sido separados previamente, y tras realizar la retrotranscripción, mediante qPCR comparamos la expresión de los genes de los TLR



**Figura 27. Expresión génica relativa de TLR, receptores de quimioquinas y CD62L en las subpoblaciones de monocitos de médula ósea.** **A)** La expresión de estos genes fue evaluada por RT-qPCR y expresada como la media de la ratio entre los valores de Ct de los genes de referencia (Ct ref) y del gen diana (Ct diana)  $\pm$  desviación estándar (SD) en los monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de cinco animales diferentes. **B)** Los mismos resultados son representados como la expresión de RNAm relativa calculando las ratios de expresión entre los monocitos CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup> según el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La significación estadística de las diferencias entre ambos grupos se determinó con el t-test de Student pareado. (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,005$ .

(del 1 al 10), los receptores de quimioquinas CCR2, CX<sub>3</sub>CR1, CXCR4, CCR5 y la molécula de adhesión CD62L (también conocida como L-Selectina) en las dos poblaciones celulares. Como control para normalizar los resultados de la cuantificación se analizaron en paralelo varios genes que se expresan de forma constitutiva (ciclofilina, β-actina, proteína ribosomal L4, β-2 microglobulina e hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa).

La expresión relativa de los transcritos se representa en la Fig. 27, en la cual se observa que ambas poblaciones expresaron todos los TLR, correspondiendo los niveles más altos a *TLR-4*, seguido de *TLR-2* y *TLR-8*. La expresión de *TLR-7*, *TLR-3* y *TLR-1*, aunque menor, fue también considerable. En general, la mayoría de los TLR mostraron niveles similares en las dos poblaciones de monocitos, observándose las diferencias más significativas en *TLR-7*, que presentó mayor expresión en las células CD163<sup>+</sup> que en las CD163<sup>-</sup>.

En cambio, en la expresión de los receptores de quimioquinas y CD62L sí que se detectaron importantes diferencias. Los monocitos de médula ósea CD163<sup>+</sup> mostraron niveles significativamente mayores de *CX<sub>3</sub>CR1* y *CCR5* y menores de *CXCR4* y *CD62L* que los monocitos CD163<sup>-</sup>; sin embargo no se observaron diferencias para *CCR2*, que presentó una alta expresión en las dos poblaciones.

## **2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS POBLACIONES DE MONOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.**

### **2.1. Producción de citoquinas en respuesta a ligandos de TLR.**

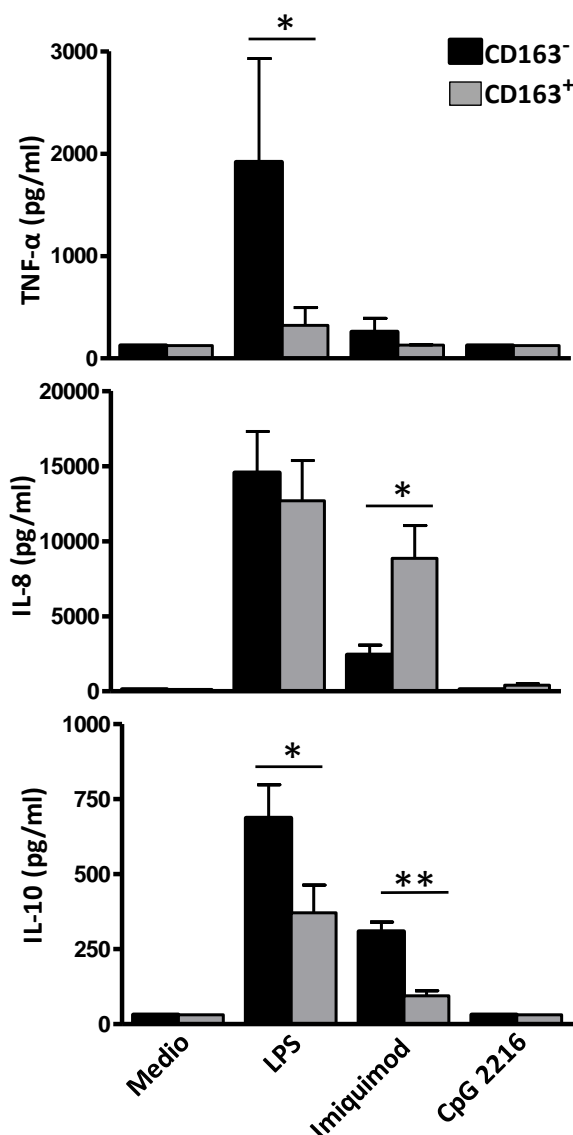
Se han encontrado diferencias en la producción de citoquinas entre las distintas subpoblaciones de monocitos murinos, humanos y de otras especies cuando son estimuladas con diferentes ligandos de TLR y en procesos infectivos (Farina *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2015). Por esa razón decidimos estudiar si las poblaciones de monocitos de médula ósea porcina también difieren en el patrón de citoquinas que producen cuando son cultivadas con ligandos de TLR.

Los monocitos CD163<sup>-</sup> o CD163<sup>+</sup> fueron estimulados durante 21 horas con las siguientes moléculas: LPS (ligando del TLR-4), Imiquimod (TLR-7) o el oligonucleótido

sintético CpG/ODN2216 (TLR-9). Como control negativo se utilizaron células incubadas sólo con medio completo. Las cantidades de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 e IFN- $\alpha$  presentes en los sobrenadantes fueron determinadas por ELISA (Fig. 28).

No se detectó producción de citoquinas en las células no estimuladas (con medio). Los monocitos CD163<sup>-</sup> sintetizaron mayores concentraciones de TNF- $\alpha$  e IL-10 que los CD163<sup>+</sup> cuando ambos eran incubados con LPS. Las células CD163<sup>-</sup> también produjeron mayores niveles de IL-10 en respuesta a Imiquimod. En cambio, las células CD163<sup>+</sup> secretaron más IL-8 que las CD163<sup>-</sup> al ser estimuladas por este compuesto, mientras que con LPS ambas poblaciones produjeron cantidades similares y más elevadas de IL-8.

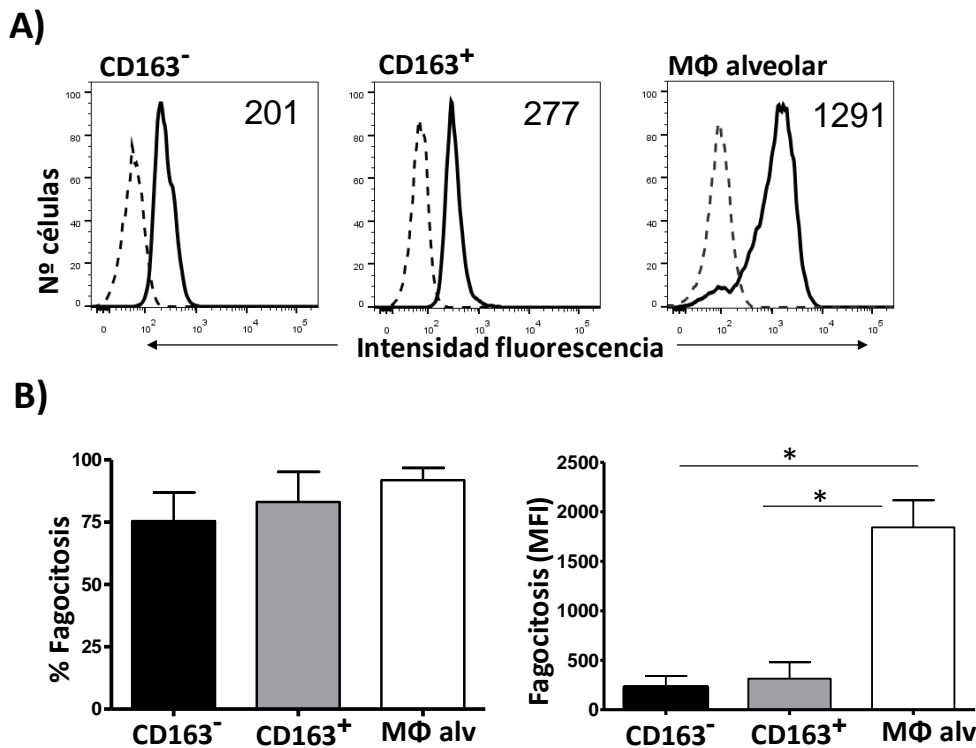
El oligonucleótido CpG/ODN2216 no indujo producción detectable de las citoquinas estudiadas. No se detectó secreción de IFN- $\alpha$  en los sobrenadantes de los monocitos CD163<sup>-</sup> ni CD163<sup>+</sup> de médula ósea con ninguno de los ligandos de TLR analizados.



**Figura 28. Producción de citoquinas en los monocitos de médula ósea en respuesta a ligandos de TLR.** Los monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de médula ósea, previamente separados por FACS fueron incubados con LPS (1  $\mu$ g/ml), Imiquimod (10  $\mu$ g/ml), Clase A-CpG/ODN2216 (10  $\mu$ g/ml) o cultivados únicamente en medio completo. Después de 21 horas de cultivo se recogieron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de diversas citoquinas por ELISA. Las gráficas muestran la media + SEM de la producción de las citoquinas obtenida en seis animales diferentes. La significación estadística de las diferencias entre ambos grupos se determinó usando el test U de Mann-Whitney. (\*) p < 0.05; (\*\*) p < 0.01.

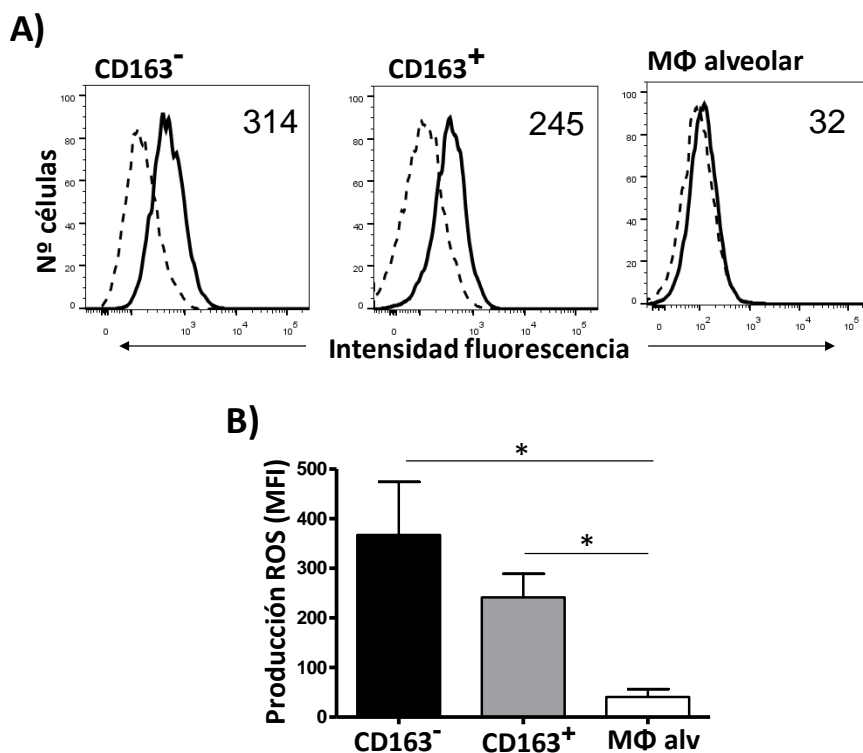
**2.2. Producción de ROS, endocitosis y procesamiento de antígenos solubles, y fagocitosis de microesferas.**

Por último, evaluamos la capacidad de las poblaciones de monocitos de médula ósea para realizar diversas funciones celulares como producción de especies de oxígeno reactivas, endocitosis y procesamiento de antígenos solubles, y fagocitosis de microesferas. Para la realización de estos ensayos utilizamos muestras de médula ósea de las que se seleccionaron las poblaciones de los monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> por citometría de flujo, utilizando criterios de FSC-A y SSC-A y dobles marcajes de CD172a frente a CD163, según la estrategia descrita en la Fig 19A. Las capacidades funcionales de los monocitos se compararon en paralelo con las de los macrófagos alveolares.



**Figura 29. Capacidad fagocítica.** **A)** Histogramas mostrando la fluorescencia asociada a la fagocitosis de las microesferas en cada una de las poblaciones analizadas (monocitos de médula ósea CD163<sup>-</sup>, CD163<sup>+</sup> o macrófagos alveolares) a 37 °C (línea continua) *versus* 4 °C (línea discontinua). Se muestran los datos de un experimento representativo y el número de cada histograma es la diferencia de las medianas de intensidad de fluorescencia (MFI) a 37°C y 4°C. **B)** En la gráfica de la izquierda se representa la media + SEM del porcentaje de células con una intensidad de fluorescencia superior al control negativo (4° C); en la gráfica de la derecha se representa como media de las MFI de las distintas poblaciones + SEM tras haber restado las medianas obtenidas a 4 °C. Las medias fueron realizadas a partir de cuatro experimentos independientes procedentes de diferentes animales. La significación estadística de las diferencias entre los grupos se determinó con el test U de Mann-Whitney. (\*) p ≤ 0,05.

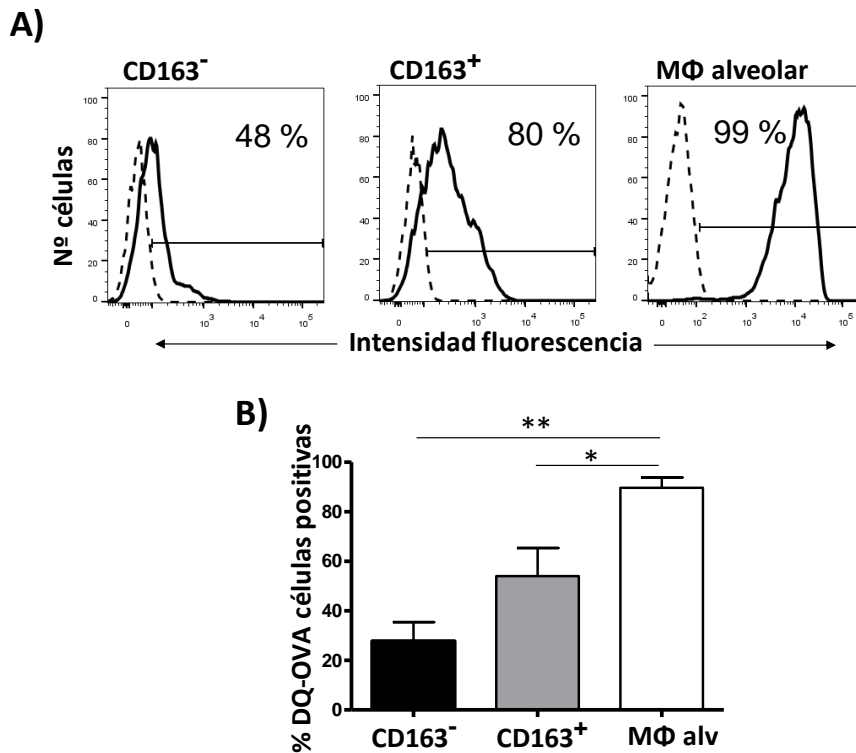
La capacidad fagocítica de los monocitos de médula ósea CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> y de los macrófagos alveolares fue evaluada usando microesferas fluorescentes de poliestireno. Como la fagocitosis es un proceso dependiente de energía, las células fueron puestas a incubar con las microesferas a 37 °C, y en paralelo como control negativo se incubaron células con microesferas en una placa sobre hielo. Después de los lavados pertinentes las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD172a y anti-CD163 y sus respectivos anticuerpos secundarios para poder identificar posteriormente en el análisis en el citómetro las dos poblaciones de monocitos. Como se observa en la Fig. 29, ambas poblaciones de monocitos fagocitaron con una eficiencia similar, aunque a unos niveles significativamente más bajos que los macrófagos alveolares, que habían sido utilizados como control positivo.



**Figura 30. Capacidad de producción de ROS. A)** Los histogramas con líneas continuas representan la fluorescencia del DCF oxidado en las poblaciones CD163<sup>-</sup> o CD163<sup>+</sup> de médula ósea o en la muestra de los macrófagos alveolares activadas con PMA, mientras que los histogramas con línea discontinua representan la fluorescencia de las células no estimuladas (control negativo). Se muestran los datos de un experimento representativo y el número de cada histograma es la diferencia de las medianas de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células activadas y no activadas con PMA (control negativo). **B)** La generación de ROS fue estimada calculando la diferencia entre las MFI de las células con y sin PMA, y representada como la media + SEM obtenida de cuatro experimentos independientes con diferentes animales. La significación estadística de las diferencias entre grupos se determinó con el test U de Mann-Whitney. (\*) p≤0,05.

Al activarse los monocitos se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son oxidantes muy activos capaces de destruir a los microorganismos. La capacidad de producir ROS en los monocitos de médula ósea CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup> y en los macrófagos alveolares fue medida usando acetato de dihidro diclorofluoresceína (DCFH-DA). Este compuesto entra en las células y se hidroliza a DCFH, que no es fluorescente en su forma reducida, pero cuando se oxida a DCF es altamente fluorescente. Para inducir la producción de ROS y así provocar la oxidación del DCFH utilizamos PMA. Finalmente el *burst* oxidativo fue analizado cuantificando la fluorescencia emitida por este producto en las regiones acotadas para las poblaciones de monocitos. Los monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea, y en menor medida los CD163<sup>+</sup>, produjeron de forma eficiente ROS, sin encontrarse diferencias significativas entre ambas poblaciones. Por el contrario, la producción de ROS en los macrófagos alveolares fue prácticamente indetectable (Fig. 30).

Para evaluar la capacidad de endocitosis y procesamiento de antígenos solubles de las poblaciones de monocitos utilizamos el compuesto DQ<sup>TM</sup>-Ovalbumin (DQ-OVA). En este reactivo comercial la ovoalbúmina está conjugada con una alta densidad del fluorocromo BODIPY-FL, de forma que no emite fluorescencia debido a un fenómeno de *autoquenching*. Cuando la proteína es procesada e hidrolizada en pequeños fragmentos se libera del efecto *quenching*, generándose productos altamente fluorescentes ( $\lambda$ Ex 505/  $\lambda$ Em 515 nm). Las células fueron incubadas con este compuesto a 37 °C o a 4 °C (control negativo), y a continuación se realizó el marcaje con los AcMo anti CD172a y CD163, analizándose finalmente la fluorescencia emitida por el DQ-OVA en cada población celular mediante citometría de flujo. El DQ-OVA fue degradado por los macrófagos alveolares, y en menor medida por los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea. Los monocitos CD163<sup>-</sup> de este órgano también procesaron el DQ-OVA, aunque con menos eficiencia que sus homólogos CD163<sup>+</sup>, sin ser las diferencias entre ambos estadísticamente significativas. No se detectó fluorescencia en las muestras incubadas a 4 °C, confirmando que es un proceso dependiente de energía.



**Figura 31. Internalización y degradación de antígenos exógenos. A)** Los histogramas con líneas continuas representan la fluorescencia producida por el DQ-OVA hidrolizado cuando las células se incubaron a 37 °C, y los histogramas con líneas discontinuas corresponden a la fluorescencia de las células incubadas con el DQ-OVA a 4 °C. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de cinco realizados. **B)** La gráfica representa la media + SEM del porcentaje de células con fluorescencia positiva tras la hidrólisis de DQ-OVA a 37°C a la que se sustrae la fluorescencia basal a 4°C (control negativo) en cinco experimentos independientes con animales distintos. La significación estadística de las diferencias entre grupos se determinó con el test U de Mann-Whitney. (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

## ***DISCUSIÓN***

---

---

El virus del PRRS provoca un gran impacto económico en la industria porcina (Neumann *et al.*, 2005; Nieuwenhuis *et al.*, 2012). La aparición en los últimos años de brotes atípicos asociados a cepas altamente patógenas, junto a la gran variabilidad genética y antigénica del virus y la carencia de una vacuna efectiva, evidencian la necesidad de seguir progresando en el estudio de la patogenia de esta enfermedad y en el desarrollo de medidas de control (Tian *et al.*, 2007; Karniychuk *et al.*, 2010; Sinn *et al.*, 2016; Canelli *et al.*, 2017).

CD163 y CD169 han sido identificados como los receptores más importantes para la entrada y replicación del virus en los macrófagos. Los últimos estudios otorgan a CD163 un papel imprescindible, sin embargo, existe cierta controversia sobre la relevancia de CD169, ya que los experimentos con cerdos modificados genéticamente indican que su función puede ser reemplazada por otros receptores (Prather *et al.*, 2013; Whitworth *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2017). PRRSv afecta a los macrófagos pulmonares, pero también se ha encontrado infección en tonsilas y órganos linfoides (Rowland *et al.*, 2003; Lunney *et al.*, 2016), detectándose replicación vírica en la médula ósea y el bazo entre otros órganos (Amarilla *et al.*, 2017; Senthilkumar *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011). Con esos precedentes, hemos analizado la permisividad a la infección de poblaciones celulares con una expresión diferencial de CD163 y CD169 (macrófagos esplénicos CD163<sup>+</sup>CD169<sup>-bajo</sup> y monocitos de médula ósea CD163<sup>-</sup>CD169<sup>-bajo</sup> y CD163<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>) para profundizar en la relevancia de estos receptores y la posible implicación de otras moléculas de la familia de CD169.

Varios grupos han documentado la replicación de PRRSv en el bazo durante la fase aguda de la enfermedad, aunque los títulos obtenidos suelen ser más bajos que los alcanzados en tonsilas y nódulos linfáticos (Duan *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011; Beyer *et al.*, 2000; Rowland *et al.*, 2003). Sin embargo, las poblaciones de macrófagos afectadas por la infección en este órgano no han sido caracterizadas. En estudios previos, nuestro grupo había identificado dos poblaciones de macrófagos en el bazo que difieren en la expresión de los receptores CD163 y CD169: una población CD163<sup>+</sup>CD169<sup>-bajo</sup>, localizada en la pulpa roja, y otra CD163<sup>-</sup>CD169<sup>+</sup>, situada en la zona marginal y en los elipsoides. Las células CD163<sup>+</sup> expresan CD169 a niveles muy bajos,

por lo que en los primeros estudios fueron consideradas como negativas para este marcador (Poderoso *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014), aunque en esta tesis sí hemos detectado una expresión débil de CD169. A pesar de ello, hemos observado que PRRSv replica en estas células con una eficiencia similar o incluso ligeramente superior que en los macrófagos alveolares. Por ello pensamos que estos macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo podrían representar un buen modelo para estudiar posibles receptores alternativos a CD169 en la infección por PRRSv.

En el macrófago alveolar el virus se une a través de residuos de ácido siálico  $\alpha$ 2-3 presentes en las proteínas de su envuelta (complejo proteico M-GP5) a CD169, que actúa como el receptor responsable de la internalización del virus (Vanderheijden *et al.*, 2003; Delputte y Nauwynck, 2004; Delputte *et al.*, 2005, 2007b). En esa unión del virus de PRRS al macrófago alveolar también parecen intervenir, aunque en menor medida, sialósidos con enlaces  $\alpha$ 2-6 (Delputte y Nauwynck, 2004). Además de CD169, los macrófagos pueden expresar otros siglecs (Crocker *et al.*, 2007). Aunque cada siglec muestra un patrón de reconocimiento de residuos de ácido siálico característico, existe un notable grado de solapamiento entre ellos. En este trabajo hemos confirmado la expresión en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo de otros dos miembros de la familia de CD169: Siglec 3 y 5. El homólogo porcino de Siglec 3 reconoce, al igual que CD169, residuos de ácido siálico con enlaces  $\alpha$ 2-3 además de enlaces  $\alpha$ 2-6 (Álvarez *et al.*, 2015), y en ensayos de fase sólida hemos podido demostrar su capacidad de unión a PRRSv, aunque con una afinidad mucho menor que CD169. Desconocemos la especificidad del Siglec 5 porcino, mas su homólogo humano también reconoce residuos de ácidos siálicos con enlaces  $\alpha$ 2-3 o  $\alpha$ 2-6 (Cornish *et al.*, 1998).

Los ensayos de bloqueo de la unión del virus a macrófagos alveolares y de inhibición de la infección con AcMo, en los que se alcanzó una inhibición de este proceso superior al 90% utilizando un AcMo anti-CD169 diferente al utilizado por el grupo de Nauwynck, confirman la función de esta molécula en la infección por PRRSv, como había sido descrito por estos investigadores (Delputte y Nauwynck, 2004; Van Gorp *et al.*, 2008). Esto es coherente con la alta expresión de CD169 en estas células y su mayor afinidad por el virus en los ensayos de fase sólida. Cuando realizamos esos mismos ensayos en macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo, y a pesar de la mínima expresión de CD169, el AcMo anti-

CD169 fue capaz de bloquear tanto la unión del virus a la célula como la infección. En cambio, ni la unión ni la infección se vieron afectadas cuando las células fueron pretratadas con anticuerpos frente Siglec 3 o Siglec 5, tanto monoclonales como policlonales. Trabajamos también con los policlonales para reducir la posibilidad de un fallo en el bloqueo debido a la unión de los AcMo a una región de la molécula diferente al sitio de reconocimiento de ácidos siálicos. Estos resultados reflejan un papel muy eficiente de CD169 en la unión y endocitosis de PRRSv-1, de modo que muy pocas moléculas de este receptor parecen ser suficientes para ello. Por el contrario, ni Siglec 3 ni Siglec 5 parecen contribuir, al menos de forma significativa, a la entrada del virus en los macrófagos alveolares ni en los CD163<sup>+</sup> esplénicos.

La falta de detección de unión del virus a Siglec 3 en los ensayos celulares puede deberse a la menor afinidad de esta molécula comparada con CD169, así como a su menor accesibilidad. Al ser una molécula de pequeño tamaño -sólo dos dominios Ig en su región extracelular frente a los 17 dominios de CD169 (Álvarez *et al.*, 2015)- su capacidad de unirse a residuos de ácidos siálicos en *trans* presentes en otras células o patógenos puede verse dificultada por interacciones en *cis* con sialoglicoconjugados expresados en la misma célula (Pillai *et al.*, 2012).

Los macrófagos CD163<sup>+</sup> esplénicos pueden fagocitar micropartículas y procesar y presentar antígeno a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (Álvarez *et al.*, 2014), por lo que su infección podría afectar el desarrollo de la respuesta inmunitaria provocando un retraso de la misma, efecto que ha sido descrito en animales infectados con PRRSv (López-Fuertes *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004). Además, la replicación vírica en este órgano podría facilitar la propagación a otros tejidos, como ocurre con el virus del dengue, que también infecta los macrófagos de la pulpa roja (Prestwood *et al.*, 2012).

Los siguientes apartados de la tesis se centraron en el estudio de células de médula ósea. Primero empezamos nuestro estudio en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) que son susceptibles a la infección con PRRSv (Chang *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018), por lo que nos pareció un buen modelo para analizar el efecto de la infección en la expresión de CD163, CD169 y otros

siglecs. Para obtener las BMDC cultivamos las células extraídas de médula ósea durante ocho días con GM-CSF y recogimos las células no adherentes, que constituyen una población mixta de granulocitos, precursores inmaduros y células dendríticas (Carrasco *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2018). Para los análisis, realizados por citometría de flujo, seleccionamos las células dendríticas dentro de esa población heterogénea, de acuerdo con lo descrito por Carrasco *et al.*, 2001, como células con alta expresión de CD172a y SLA-DR. Las células dendríticas son poblaciones muy minoritarias y sus marcadores difieren entre sí según el órgano donde se encuentren, de hecho a veces son difíciles de distinguir de los macrófagos (Geissmann *et al.*, 2010; Merad *et al.*, 2013), pero éstos se adhieren a las placas de cultivo, a diferencia de las BMDC.

Como se había descrito anteriormente, las BMDC expresan CD163, CD169 y Siglec 3 (Álvarez *et al.*, 2015), y en esta tesis además se ha confirmado la expresión de Siglec 5 y la ausencia de Siglec 10 en estas células. Cuando se infectan con PRRSv disminuye la expresión de SLA-DR (Chang *et al.*, 2008; Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007), lo que dificulta un poco su acotamiento en los análisis de citometría. A las 24 y 48 hpi no observamos cambios en las moléculas analizadas en las células infectadas respecto a las control, salvo en CD163, cuya expresión se ve reducida en las BMDC infectadas a las 48 hpi en todos los experimentos realizados. Una posible explicación podría ser que CD163, como receptor endocítico (Kristiansen *et al.*, 2001), fuese internalizado tras su interacción con el virus, disminuyendo su expresión en la superficie celular. También es posible una regulación a nivel génico como consecuencia de la infección vírica, ya que se ha visto que hay una respuesta de microRNAs celulares diferente según la cepa vírica (Cong *et al.*, 2014), y en concreto se ha demostrado que el microRNA-181 puede disminuir la expresión proteica de CD163 a través de su unión a la región 3'UTR del RNAm de CD163 (Gao *et al.*, 2013).

La expresión de los siglecs 3, 5 y 10 no se altera por la infección vírica. Otro estudio reciente sugiere, al igual que nuestros resultados con macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo, que los siglecs 3 y 5 no juegan un papel relevante en la infección por PRRSv, mientras que Siglec 10 podría coadyuvar en la infección, participando en la unión e internalización del virión (Xie *et al.*, 2017). Esta afirmación se basa en que en células PK-15 transfectadas con CD163 y Siglec 10 el porcentaje de células infectadas era mayor que

en las células PK-15 que sólo expresaban CD163 (Xie *et al.*, 2017). Sin embargo, en el cerdo Siglec 10 se expresa preferentemente en linfocitos B, no en macrófagos ni células dendríticas, y sólo se ha detectado y de forma ocasional, una expresión débil en monocitos (Escalona *et al.*, 2015). Por ello, la relevancia que este receptor puede tener en la replicación del virus en el animal parece discutible. No obstante, la interacción de PRRSv con el Siglec 10 expresado por los linfocitos B podría tener efectos ventajosos para el virus, por ejemplo facilitando su transporte a órganos linfoides o modulando la activación de esos linfocitos. Un aspecto a considerar en los estudios de interacción con siglecs es el aislado de PRRSv utilizado. En el estudio de Xie *et al.*, el aislado que se vio más favorecido por la coexpresión de Siglec 10 fue MN-184 (perteneciente a la especie PRRSv-2) (Xie *et al.*, 2017), mientras que nosotros hemos trabajado con el aislado 5710, de la especie PRRSv-1. La influencia del genotipo en el uso de un receptor u otro ha sido confirmada en otro artículo del mismo grupo, donde compararon una amplia gama de aislados de ambas especies. Mientras que los aislados PRRSv-1 infectaron en mayor medida las células transfectadas con CD169 y CD163, los de genotipo 2 infectaban preferentemente células transfectadas con Siglec 10 y CD163 (Xie *et al.*, 2018).

La mayoría de los trabajos publicados sobre médula ósea y PRRSv han sido realizados en BMDC o macrófagos obtenidos tras el cultivo *in vitro* de médula ósea, (Chang *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2016; Gimeno *et al.*, 2011). Sin embargo, este abordaje tiene el inconveniente de ser un sistema "artificial", ya que esas células no se encuentran de forma natural en el animal, sino que son obtenidas tras días de cultivo. La presencia de lesiones, junto con RNA y antígenos virales en la médula ósea de lechones infectados (Feng *et al.*, 2001; Amarilla *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016), evidencian que hay células de este órgano susceptibles a PRRSv, de manera que otro de los objetivos de esta tesis fue trabajar con médula ósea recién extraída del lechón para caracterizar las células que se infectan en este órgano.

El primer paso fue examinar si se producía infección en las células de médula ósea incubadas con el virus, analizando la presencia de la nucleoproteína de PRRSv en paralelo con la expresión de CD172a o CD163. Elegimos CD163 ya que se considera el único receptor indispensable para la infección de PRRSv (Whitworth *et al.*, 2016; Wells *et al.*,

2017). Respecto a CD172a, trabajos previos de Wang *et al.*, 2016 habían detectado la expresión de la nucleoproteína de PRRSv en células de médula ósea CD172a<sup>+</sup>SWC8<sup>-</sup> de lechones infectados con una cepa virulenta de PRRSv-2 (HuN4), es decir, en células mieloides no granulocíticas. CD172a es una molécula también conocido como SWC3 que se expresa en todas las células del linaje mieloides porcino y su homólogo humano es el SIRPα (Ezquerro *et al.*, 2009). La expresión de CD172a se va incrementando con la diferenciación de las células mieloides a estados más maduros (Summerfield y McCullough, 1997; Rehakova *et al.*, 1998). En nuestros experimentos, aproximadamente un 3-3,5% de las células de médula ósea expresaron la nucleoproteína vírica, presentando estas células una alta o moderada intensidad de CD172a. En relación a CD163, las células positivas para la nucleoproteína vírica comprendían un continuo de niveles de expresión, desde células CD163<sup>-</sup> hasta células positivas para este marcador. Este resultado parecía entrar en contradicción con que CD163 fuera imprescindible para la replicación del virus (Whitworth *et al.*, 2016), y planteaba una nueva pregunta sobre si eran células CD163<sup>-</sup> que se habían infectado, o células CD163<sup>+</sup> que tras la infección habían perdido la expresión de este receptor.

Para abordar esta cuestión se aislaron monocitos CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup> y CD172a<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> de médula ósea con la finalidad de evaluar la replicación vírica en cada población celular por separado. PRRSv infecta células del sistema fagocítico mononuclear, por lo que los monocitos de médula ósea son una posible diana, y tienen la ventaja añadida de que se diferencian en su expresión de CD163 (Ezquerro *et al.*, 2009). Los monocitos CD163<sup>+</sup> tienen una expresión moderada de CD169, mientras que los CD163<sup>-</sup> son mayoritariamente negativos, aunque en un pequeño porcentaje de los mismos es posible detectar una débil expresión de esta molécula. Por tanto estas poblaciones se diferencian en dos importantes receptores para PRRSv.

PRRSv infectó los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea, alcanzando títulos superiores a 10<sup>5</sup> a partir de las 46 hpi, superando ligeramente a aquellos obtenidos con macrófagos alveolares de los mismos animales, aunque la cinética de replicación viral en los macrófagos fue más rápida, con títulos altos a partir de las 22 hpi. Una de las posibles explicaciones al retraso de los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea respecto a los

macrófagos alveolares, podría ser la menor expresión de los receptores, sobre todo de CD169, aunque por otro lado los resultados anteriores con los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo muestran la eficacia de CD169 en la unión e infección vírica incluso a niveles muy bajos. También podría deberse al requerimiento de otros factores celulares que se irían adquiriendo con la maduración de las células en cultivo. Por ejemplo, MYH9 (cadena pesada de la miosina no muscular) interacciona con la proteína GP-5 de PRRSv, y se ha confirmado en algunas líneas celulares necesitan expresar MYH9 además de CD163 para que la infección sea efectiva (Gao *et al.*, 2016).

En los monocitos CD163<sup>-</sup> se alcanzaron de media títulos más bajos y más tarde que en los monocitos CD163<sup>+</sup> y los macrófagos alveolares, pero contrariamente a lo esperado, también se infectaron. Cuando analizamos por separado cada uno de los cinco experimentos realizados observamos que, mientras que en los macrófagos alveolares y los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea las diferencias entre experimentos eran pequeñas, infectándose con éxito todos ellos, los monocitos CD163<sup>-</sup> mostraron un comportamiento más heterogéneo: en dos experimentos no detectamos infección a ninguno de los tiempos analizados, y en los otros tres experimentos sí se infectaron, aunque alcanzando títulos altos a 46, 70 y 94 hpi, dependiendo del experimento. Aunque se puede dar una cierta variabilidad entre animales en la permisividad de sus células a la infección por PRRSv debido a la edad y las condiciones inmunitarias del animal (Kingle *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2004), este no parece ser el caso, ya que no observamos esas diferencias en la infectividad en los macrófagos alveolares y monocitos CD163<sup>+</sup> de los mismos animales

La replicación del virus en células CD163<sup>-</sup> ha sido también descrita por otros grupos: Li *et al.* han detectado proteína de la nucleocápside de PRRSv en las BMDC CD163<sup>-</sup>, siempre y cuando en el mismo cultivo hubiera también células CD163<sup>+</sup>, aunque éstas tuvieran una baja expresión (Li *et al.*, 2018). Además, recientemente se ha descubierto que PRRSv puede ser transmitido entre células a través de exosomas, y que gracias a esa comunicación intercelular se puede establecer infección en las células destinatarias, incluso aunque en un principio no fuesen susceptibles, como es el caso de las células PK-15 que son negativas para CD163 (Wang *et al.*, 2018). Por tanto, nuestros

resultados podrían explicarse por la presencia de una fracción residual de células con expresión débil de CD163 en la población aislada como CD163<sup>-</sup>. Otra explicación podría ser la existencia de un receptor diferente que permita la infección vírica, como ha sido sugerido en la infección de MoDC por Singleton *et al.*, 2016. Esta última hipótesis parece poco probable tras los estudios en cerdos editados genéticamente que no expresan CD163 y son resistentes a la enfermedad (Whitworth *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2017).

No obstante, otra posibilidad es que los monocitos CD163<sup>-</sup> puedan convertirse en CD163<sup>+</sup>, y por tanto en dianas de PRRSv, infectándose por el virus residual que permaneciese adherido a las células tras la retirada del inóculo, o que hubiera sido internalizado por CD169, que se expresa a bajos niveles en estas células. Ha sido descrito que los monocitos sanguíneos CD163<sup>-</sup> se diferencian a CD163<sup>+</sup> cuando se cultivan en presencia de suero porcino (Sánchez *et al.*, 1999; Chamorro *et al.*, 2005), y que en el ratón los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> maduran a Ly6C<sup>bajo</sup> en condiciones no inflamatorias (Yona *et al.*, 2013). El M-CSF modula la diferenciación de los monocitos en condiciones basales (Ginhoux y Jung, 2014), por lo que se evaluó el efecto del cultivo con esta citoquina durante 40 y 66 horas en monocitos que originariamente eran CD163<sup>-</sup> o CD163<sup>+</sup>. En los cultivos de monocitos CD163<sup>-</sup> después de 40 horas con M-CSF un 66% de las células expresaron CD163 en su superficie, y este porcentaje se incrementó con el tiempo (79% a las 66 horas). Además, la expresión de otras moléculas características de los monocitos CD163<sup>+</sup>, como SLA-DR y CD169, también aumentó a medida que transcurría el cultivo con el factor de crecimiento, lo que sugiere que la población de monocitos de médula ósea CD163<sup>-</sup> tiene capacidad de madurar hacia CD163<sup>+</sup>. Este desarrollo madurativo que conlleva la expresión del receptor del virus podría explicar la infección tardía de los monocitos que en un principio fueron seleccionados como CD163<sup>-</sup>. Para estudiarlo infectamos con PRRSv monocitos CD163<sup>-</sup> y evaluamos la expresión de CD163 a lo largo del tiempo.

Al cultivar monocitos CD163<sup>-</sup> en medio con *mock*, observamos un aumento de la expresión de CD163 (40% de células positivas a las 40 horas), así como de SLA-DR y CD169, aunque en menor medida que en los cultivos con M-CSF. Hay que destacar que al infectar las células con PRRSv el incremento de la expresión de CD163 fue mucho

mayor (88% células positivas a 40 horas), mientras otros marcadores como SLA-DR aumentaron mucho menos (21%). En animales infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha identificado una población de monocitos CD163<sup>+</sup> que no expresan SLA-DR (CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>-</sup>), y que han sido denominados monocitos “inflamatorios” (Ondrackova *et al.*, 2013b). La infección de PRRSv parece ocasionar un fenotipo similar, ya que aumenta mucho la expresión de CD163 pero la de SLA-DR apenas cambia, encontrándonos una alta proporción de células CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>-</sup> a 40 hpi. En cambio, cuando adquirimos las muestras a las 66 horas después de la infección observamos que la expresión de CD163 había disminuido (65%) respecto a la de las 40 horas.

Estos resultados sugieren que la expresión de CD163 en la superficie celular puede ser modulada por la infección de PRRSv, aunque desconocemos si esto ocurre por un mecanismo directo o indirecto, por ejemplo a través de factores solubles o citoquinas generadas en la infección. Podría ser una regulación a nivel génico o una movilización del CD163 almacenado en compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. Aunque parezca paradójico, posteriormente con el transcurso de la infección disminuyen ligeramente los niveles de CD163 en la superficie celular, como también ocurría en las BMDC infectadas con PRRSv a las 48 hpi. Algunas de las posibles explicaciones están relacionadas con las oscilaciones en la expresión de CD163 estudiadas en otros trabajos, como el de Hintz *et al.*, que describe que el estímulo inflamatorio LPS induce que la metaloproteasa ADAM17 corte el CD163 de la membrana plasmática de los monocitos humanos, aumentando su forma soluble y reduciendo el CD163 de la superficie celular. A tiempos posteriores, el CD163 de la membrana aumenta en respuesta a la IL-10 producida, poniendo de manifiesto la alta movilidad del receptor ante estímulos pro y antiinflamatorios (Hintz *et al.*, 2002). Cuando se incubaba con el virus ocurre el proceso inverso en los monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea, primero se incrementa la expresión en la superficie celular y posteriormente disminuye. El descenso de CD163 en la membrana plasmática debido a la infección por PRRSv ya había sido estudiado en otras células (Patton *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014), y en él participa la metaloproteasa ADAM17 cortando el ectodominio y dejándolo en su forma soluble (Guo *et al.*, 2014). De todas formas, hay que tener en cuenta que en nuestros experimentos hemos excluido las

células muertas, pero no hemos utilizado un marcador de apoptosis, por lo que no es descartable que la apoptosis sea una posible causa de la reducción de CD163, ya que incluso en los monocitos CD163<sup>-</sup> control a tiempos largos disminuye de forma moderada CD163 (26% células positivas a las 66 horas frente a 40% a las 40 horas de cultivo).

Como ya se ha comentado, algunas citoquinas pueden afectar a la expresión de CD163, en concreto en monocitos sanguíneos IL-10 aumenta su expresión en la membrana celular (Hintz *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008), e IL-4 y GM-CSF la disminuyen (Pérez *et al.*, 2008). Además la infección vírica provoca una respuesta celular en forma de producción de citoquinas, que dependerá de la cepa de PRRSv y la célula infectada (Gimeno *et al.*, 2011). Por ello analizamos las citoquinas producidas por los monocitos de médula ósea CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> infectados y sin infectar en los sobrenadantes de los cultivos a las 46 hpi. Escogimos un tiempo relativamente largo debido a que la infección se manifestaba a tiempos tardíos. No detectamos mayor producción de TNF- $\alpha$ , IL-10 o IFN- $\alpha$  en las células infectadas respecto a las control, aunque sí más concentración de IL-8, principalmente en las CD163<sup>+</sup> infectadas, aunque esta cantidad era menor que la producida con el Poli I:C (ligando de TLR-3) y mucho más reducida que con el LPS. De tal forma que en nuestro caso el aumento de CD163 en las células infectadas no parece debido a la acción de IL-10.

Resumiendo, los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea pueden soportar eficientemente la replicación de PRRSv. Además hemos detectado replicación en algunos casos en los monocitos CD163<sup>-</sup>. La infección de estas células en la médula ósea podría afectar a su migración hacia la sangre periférica y contribuir al descenso en el número de monocitos sanguíneos, como ha sido detectado en animales infectados por PRRSv (Morgan *et al.*, 2013).

Una vez analizada la susceptibilidad a la infección por PRRSv de los monocitos de médula ósea, profundizamos en la funcionalidad y características de estas células. Los experimentos de citometría de flujo revelaron que los monocitos CD163<sup>-</sup> son mayoritariamente negativos para CD11R1 (cadena alfa de integrina), mientras que los CD163<sup>+</sup> son positivos débiles e incluso una parte apreciable de ellos muestra una alta

expresión de CD11R1, existiendo diferencias significativas entre ambos tipos de monocitos. La diferencia más notable entre las poblaciones de monocitos de médula ósea se encontró en la expresión de SLA-DR: mientras que los monocitos CD163<sup>-</sup> son mayoritariamente negativos (salvo una minoría de ellos que expresan SLA-DR de forma débil) los monocitos CD163<sup>+</sup> sí expresan niveles altos de esta molécula. Esta diferencia podría reflejar, junto con su mayor capacidad de endocitosis y procesamiento antigénico, una mayor capacidad de presentación de antígeno, al igual que se ha demostrado para los monocitos CD163<sup>+</sup> sanguíneos, que son más eficientes presentando antígenos solubles a los linfocitos T que los monocitos CD163<sup>-</sup> (Chamorro *et al.*, 2005). Otra diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de monocitos de médula ósea se da en la expresión de CD169, que tiene una expresión débil en los monocitos CD163<sup>-</sup> y alcanza niveles más altos en los CD163<sup>+</sup>. Los monocitos sanguíneos habían sido descritos como negativos para CD169, aunque se especificaba que el suero porcino o el IFN- $\alpha$  podían inducir su expresión (Delputte *et al.*, 2007; Revilla *et al.*, 2009). En la mitad de nuestros experimentos hemos detectado CD169 en monocitos sanguíneos, y también en un estudio publicado recientemente los monocitos CD163<sup>+</sup> sanguíneos expresan CD169 (Álvarez-Estrada *et al.*, 2019).

En los análisis fenotípicos incluimos los marcadores CD14 y CD16, que se han utilizado para definir las poblaciones de monocitos en la especie humana (Passlick *et al.*, 1989; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993; Grage-Griebenow *et al.*, 2001). Sin embargo, en el cerdo estas moléculas presentan una expresión muy similar en ambas poblaciones de monocitos, no mostrando diferencias estadísticamente significativas; si bien es cierto que CD14 exhibe una distribución más heterogénea en los monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea, que abarca desde células moderadamente positivas hasta células con una alta expresión de esta molécula, mientras que en los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea su expresión es más homogénea. En los monocitos sanguíneos porcinos sí existen diferencias en los niveles de expresión de CD14, teniendo los monocitos CD163<sup>-</sup> más CD14 que los CD163<sup>+</sup>, como había sido publicado previamente (Chamorro *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2010; Ondrackova *et al.*, 2013a; ) y hemos corroborado en esta tesis con monocitos de sangre periférica de los mismos animales de los que fueron extraídas las muestras de médula ósea. Por otra parte, nuestros resultados también muestran que

tanto los monocitos CD163<sup>-</sup> y CD163<sup>+</sup> de médula ósea como los de sangre son positivos para CD16, mostrando una tendencia a una mayor expresión de CD16 en los CD163<sup>+</sup>. Los niveles de CD16 podrían guardar relación con la capacidad de fagocitar partículas opsonizadas con anticuerpo, aunque los monocitos también expresan otros receptores para Fc (CD32, CD64) (van den Winkel y Anderson, 1991; van den Winkel *et al.*, 1993). En general, las respectivas poblaciones de monocitos de médula ósea y sanguíneas son muy semejantes en la mayoría de los receptores analizados, lo que sugiere que podrían ser las mismas células que pasan de médula a sangre.

Los monocitos suelen expresar una amplia variedad de receptores tipo Toll (TLR) que reconocen patrones moleculares expresados por agentes infecciosos y estimulan la producción de citoquinas necesarias para desarrollar una respuesta efectiva frente a ellos. En los análisis de citometría de flujo ambos tipos de monocitos presentan niveles moderados de TLR-2 y TLR-4, siendo ligeramente mayor la expresión de TLR-2 en los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea que en los CD163<sup>-</sup>. Este resultado contrasta con el obtenido por RT-qPCR, que reveló una expresión menor en los monocitos CD163<sup>+</sup>, aunque hay que tener en cuenta que esa diferencia en la expresión génica es pequeña. La causa de esta discrepancia es desconocida, no obstante podría explicarse porque no todo lo que se transcribe a RNAm es traducido a proteína y plegado e insertado en la membrana satisfactoriamente. De hecho, diferencias entre niveles de transcritos y expresión de proteína en superficie han sido descritas para otros receptores celulares en poblaciones de monocitos de otras especies (Ingersoll *et al.*, 2010). Es más, en los monocitos humanos también se han encontrado discrepancias entre los niveles de RNAm y expresión de la proteína TLR-2. Belge *et al.* describen una mayor expresión de TLR-2 en los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> que en los clásicos CD14<sup>++</sup> por citometría de flujo, pero al medir por RT-qPCR el transcrito de *TLR-2* se expresa ligeramente menos en los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Belge *et al.*, 2002).

Los resultados de la RT-qPCR también mostraron que los monocitos CD163<sup>+</sup> expresan más *TLR-7* y *TLR-3* que los CD163<sup>-</sup>. Ambos TLR reconocen patrones asociados a virus: TLR-3 une RNA de doble cadena (Alexopoulou *et al.*, 2001) y TLR-7 detecta RNA de cadena sencilla en endosomas (Heil *et al.*, 2004). La mayor expresión de *TLR-7* semeja

los monocitos CD163<sup>+</sup> porcinos a los monocitos humanos “no clásicos” CD14<sup>débil</sup>CD16<sup>+</sup>, que interactúan con ácidos nucleicos de virus a través de TLR-7 y TLR-8 produciendo citoquinas inflamatorias (IL1-β y TNF-α) (Cros *et al.*, 2010). De hecho, los monocitos CD163<sup>+</sup> porcinos produjeron cantidades mayores de IL-8, una citoquina proinflamatoria, que los CD163<sup>-</sup> cuando fueron estimulados con Imiquimod, una amina imidazoquinolina sintética que se une a TLR-7, o con Poli I:C, un análogo sintético de RNA de doble hebra que estimula TLR-3. Por el contrario, los monocitos CD163<sup>-</sup> respondieron en mayor medida al Imiquimod que los CD163<sup>+</sup> en cuanto a producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Estas poblaciones también difieren en su capacidad de secretar citoquinas en respuesta a LPS, aunque expresan niveles similares de TLR-4. Así los monocitos CD163<sup>-</sup> producen más TNF-α e IL-10 que los CD163<sup>+</sup> al ser estimulados con LPS. El hecho de que ambos monocitos presenten niveles similares de CD14 y TLR-4, que forman un complejo al que se une el LPS, pero respondan de forma distinta ante este estímulo, sugiere que otros mecanismos podrían estar contribuyendo a la desigual producción de las citoquinas. En este sentido, Cros *et al.* propusieron que en la especie humana un mismo TLR podría desencadenar la activación de diferentes rutas de señalización según el tipo de monocitos (Cros *et al.*, 2010).

Los perfiles de citoquinas producidas en respuesta a la estimulación de TLR por las poblaciones de monocitos difieren entre especies. Los monocitos CD16<sup>+</sup> humanos sintetizan altas concentraciones de citoquinas inflamatorias, mientras que los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> son los mayores productores de estas citoquinas en ratón (Tolouei Semnani *et al.*, 2014; Barbalat *et al.*, 2009; Dunay *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Así, aunque los monocitos CD16<sup>-</sup> humanos se parecen a los Ly6C<sup>alto</sup> murinos en cuanto a expresión de receptores de quimioquinas, se diferencian en su capacidad de síntesis de citoquinas proinflamatorias (Serbina *et al.*, 2008; Cros *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2014; Boyette *et al.*, 2017). En el cerdo, según nuestros resultados en respuesta a la incubación con LPS, los monocitos CD163<sup>-</sup> de la médula ósea se asemejan más a los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> de ratón, que producen altas cantidades de TNF-α ante infecciones de patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Toxoplasma gondii* (Serbina *et al.*, 2008).

Cuando comparamos los patrones de citoquinas producidos por los monocitos de médula ósea con los descritos en monocitos sanguíneos porcinos, observamos algunas diferencias que pueden ser en parte debidas a las distintas técnicas y abordajes utilizados. Así, en el estudio de Sánchez *et al.*, tanto en los monocitos sanguíneos CD163<sup>-</sup> como en los CD163<sup>+</sup>, aislados mediante separación magnética, se observan transcritos de *TNF- $\alpha$*  e *IL-1 $\alpha$*  cuando las células son estimuladas con LPS durante seis horas, pero la expresión de *IL-10* sólo es detectada en los monocitos CD163<sup>-</sup> (Sánchez *et al.*, 1999). En otro trabajo (Chamorro *et al.*, 2005) se analizó la producción de *TNF- $\alpha$*  en monocitos sanguíneos estimulados durante cuatro horas con una combinación de LPS e *IFN- $\gamma$* . Por citometría de flujo se determinó que se produce más *TNF- $\alpha$*  a nivel intracelular en los monocitos CD163<sup>+</sup> que en los CD163<sup>-</sup> (Chamorro *et al.*, 2005), pero el tiempo más corto (en esta tesis las células fueron incubadas 21 horas) y el uso de *IFN- $\gamma$*  pudieron ser determinantes en el resultado obtenido. Por otra parte, tampoco se puede descartar como responsable de estas diferencias la influencia del entorno tisular, ya que los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea podrían volverse más inflamatorios tras su paso a sangre periférica.

Las quimioquinas y sus receptores regulan la migración de los monocitos desde la médula ósea a la sangre y de ésta a los tejidos, y su patrón de expresión también difiere entre las poblaciones de monocitos (Palframan *et al.*, 2001; Geissmann *et al.*, 2003; Tacke y Randolph, 2006). Los análisis de expresión génica de los receptores de quimioquinas evaluados mediante RT-qPCR indicaron que los monocitos de médula ósea expresan niveles altos de *CXCR4* y *CD62L* (que codifica para la molécula de adhesión L-selectina), existiendo una expresión significativamente mayor en los CD163<sup>-</sup>. Por el contrario, los monocitos CD163<sup>+</sup> son los que más expresan *CX<sub>3</sub>CR1* y *CCR5*; mientras que no existen diferencias significativas en cuanto a la transcripción de *CCR2*, que es positivo en ambas poblaciones. Por lo tanto, el patrón de expresión de los receptores de quimioquinas es similar al descrito en monocitos sanguíneos porcinos, exceptuando *CCR2*, que se expresa a niveles más bajos en los monocitos CD163<sup>+</sup> sanguíneos que en los CD163<sup>-</sup> (Moreno *et al.*, 2010). *CCR2* participa en la salida de las células de la médula ósea a la sangre (Serbina y Pamer, 2006), por lo que se puede especular que ambas poblaciones de monocitos de médula ósea podrían ser capaces de salir a sangre en

respuesta a agonistas de CCR2 y que una vez en la circulación sanguínea, los monocitos CD163<sup>+</sup> reducirían la expresión de este receptor. De hecho, otros autores también han sugerido que las poblaciones porcinas de médula ósea y de sangre son las mismas, porque comparten un fenotipo muy parecido, sobre todo en cuanto a receptores de la superficie celular (Ondrackova *et al.*, 2013a).

El perfil de los receptores de quimioquinas y CD62L de los monocitos CD163<sup>-</sup> de médula ósea porcinos se corresponde con el de los monocitos "clásicos" murinos (Ly6C<sup>alto</sup>) y humanos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>), que se caracterizan por altos niveles de CCR2, intermedios de CX<sub>3</sub>CR1 y ser CD62L<sup>+</sup>. En cambio, los monocitos "no clásicos" (Ly6C<sup>bajo</sup> murinos y CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> humanos) expresan niveles bajos de CCR2, altos de CX<sub>3</sub>CR1 y son CD62L<sup>-</sup>, concordando más este patrón con el de los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea porcinos, aunque existen pequeñas diferencias, ya que como se ha comentado previamente, éstos tienen una expresión alta de CCR2, similar a la de los monocitos CD163<sup>-</sup>.

En relación a los receptores de quimioquinas expresados en monocitos de médula ósea porcina hay pocos estudios publicados. Ondrackova *et al.* analizaron la expresión de estas moléculas en monocitos de médula ósea y de sangre porcina, pero sólo en la población CD163<sup>+</sup> (Ondrackova *et al.*, 2013b). Estos autores describen una expresión alta de CX<sub>3</sub>CR1 y CXCR4 y baja para CCR2, CCR5 y CD62L en estas células, mientras que nosotros detectamos niveles altos de CCR2 y CD62L. Si bien es cierto que la edad de los animales era diferente, desconocemos que otros factores han podido contribuir a esta discrepancia.

Por último, analizamos algunas funciones típicas de monocitos en las poblaciones de médula ósea. Los dos tipos de monocitos fagocitan microesferas eficientemente, y los monocitos CD163<sup>-</sup> producen más ROS que los CD163<sup>+</sup>, aunque sin llegar a alcanzar diferencias estadísticamente significativas. En este aspecto los monocitos CD163<sup>-</sup> son más parecidos a los monocitos humanos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Cros *et al.*, 2010). Esto unido a la mayor producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-8) que secretan cuando son estimulados con LPS, confiere a los monocitos CD163<sup>-</sup> funciones relacionadas con la inflamación. Por otro lado, los monocitos CD163<sup>+</sup> tienen más capacidad de

procesamiento antigénico y mayor expresión de SLA-DR. No obstante, nuestros datos sugieren que los monocitos CD163<sup>-</sup>SLA-DR<sup>-</sup> pueden madurar a CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>+</sup>, así que podemos estar hablando de las mismas células, que ante un estímulo microbiano responden produciendo citoquinas inflamatorias y maduran hacia un fenotipo CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>+</sup> con el fin de presentar el antígeno a los linfocitos T. Esto explicaría que en infecciones como la causada por *Salmonella enteritis* disminuya el número de monocitos CD163<sup>-</sup>SLA-DR<sup>-</sup> en la médula ósea y nódulos linfáticos mesentéricos y aumente el de los monocitos CD163<sup>+</sup>SLA-DR<sup>+</sup> (Ondrackova *et al.*, 2013). También se ha detectado un aumento de la expresión de CD163 en los monocitos sanguíneos durante la sepsis inducida por la infección de *Haemophilus parasuis*, y se propone que la causa es el mayor reclutamiento de monocitos CD163<sup>+</sup> procedentes de la médula ósea (Álvarez-Estrada *et al.*, 2019).

En resumen, en esta tesis ha sido evaluada la permisividad al virus de PRRS en varias poblaciones de células porcinas, concretamente macrófagos de bazo CD163<sup>+</sup> y monocitos de médula ósea CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup>. De esta forma, han sido identificadas nuevas células diana en estos órganos donde el virus puede replicar y desde ahí dispersarse al resto del organismo, o servir como reservorio viral en la llamada "fase persistente" de la enfermedad. Además, la caracterización fenotípica y funcional de las poblaciones de monocitos de médula ósea porcina revela que estas células presentan analogías, pero también notables diferencias con las de otras especies. Todo ello evidencia la importancia en patología infecciosa de hacer estudios con células del hospedador natural, ya que presentan sus propias particularidades que pueden determinar su interacción con el patógeno y el curso de la enfermedad.

# ***CONCLUSIONES***

---

---

1. El virus de PRRS (PRRSv) replica eficientemente en los macrófagos CD163<sup>+</sup> de bazo. A pesar de su bajo nivel de expresión, CD169 juega un papel importante en la unión del virus a estos macrófagos y en su posterior infección. Otros siglecs como Siglec 3 o Siglec5, que muestran una mayor expresión en estas células, no parecen estar implicados en la infección por este virus.
2. Se han caracterizado fenotípicamente dos poblaciones de monocitos en la médula ósea porcina, que se definen de acuerdo a la presencia de CD163. Los monocitos CD163<sup>+</sup> expresan niveles más altos de CD169, SLA-DR, CD11R1, CX<sub>3</sub>CR1, CCR5 y TLR7 que los monocitos CD163<sup>-</sup>, mientras que estos últimos expresan más CXCR4 y CD62L.
3. Estas dos poblaciones de monocitos difieren también en sus capacidades funcionales, como evidencian las diferencias en la secreción de citoquinas en respuesta a varios ligandos de TLR. Así, los monocitos CD163<sup>-</sup> estimulados con LPS producen más TNF- $\alpha$  e IL-10 que los CD163<sup>+</sup>, y también responden con mayor secreción de IL-10 cuando son incubados con Imiquimod. En cambio, los CD163<sup>+</sup> producen más IL-8 en respuesta a este compuesto.
4. Los monocitos CD163<sup>-</sup> tienden a producir más especies reactivas de oxígeno que los CD163<sup>+</sup> cuando son estimulados con un éster de forbol (PMA), mientras que los monocitos CD163<sup>+</sup> tienen mayor capacidad de endocitar y procesar antígenos solubles. Ambas poblaciones celulares fagocitan microesferas de poliestireno con una eficiencia similar.
5. El tratamiento de los monocitos CD163<sup>-</sup> con M-CSF induce la expresión de CD163, SLA-DR y CD169, adquiriendo estas células un fenotipo semejante al de los monocitos CD163<sup>+</sup>, lo que sugiere una relación madurativa entre ambas poblaciones.

6. El virus de PRRS (PRRSv) infecta los monocitos CD163<sup>+</sup> de médula ósea, alcanzando títulos virales similares a los obtenidos en los macrófagos alveolares, aunque con una cinética más lenta.

## ***REFERENCIAS***

---

- Ackermann, J.A., Radtke, D., Maurberger, A., Winkler, T.H., Nitschke, L. (2011). Grb2 regulates B-cell maturation, B-cell memory responses and inhibits B-cell Ca<sup>2+</sup> signalling. *EMBO J.* 30, 1621–1633.
- Ahuja, V., Miller, S.E., Howell, D.N. (1995). Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43. *Cell Immunol.* 163, 59-69.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 10, 1538–1543.
- Albina, E, Carrat, C, Charley, B. (1998). Interferon- $\alpha$  response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interf Cytokine Res.* 18, 485–490.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 413(6857), 732–738.
- Álvarez, B., de la Riva, P. M., Handler, A., Revilla, C., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2013). Expression of TLR4 in swine as assessed by a newly developed monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol.* 153(1-2), 134-139.
- Álvarez, B., Domènech, N., Alonso, F., Sánchez, C., Gómez del Moral, M., Ezquerra, A. and Domínguez, J. (2000a). Molecular and functional characterization of porcine LFA-1 using monoclonal antibodies to CD11a and CD18. *Xenotransplantation.* 7, 258-66.
- Álvarez, B., Escalona, Z., Uenishi, H., Toki, D., Revilla, C., Yuste, M., Gómez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerra, A., J. Domínguez. (2015). Molecular and functional characterization of porcine Siglec-3/CD33 and analysis of its expression in blood and tissues. *Dev Comp Immunol.* 51, 238–250.
- Álvarez, B., Gómez-Hernández, N., Garrido, J.J., Yerle, M., Revilla, C., Chamorro, S., Alonso, F., Domínguez, J., Ezquerra, A. (2007). Molecular cloning characterization and expression of porcine immunoreceptor SIRP-alpha. *Dev Comp Immunol.* 31, 307–318.
- Álvarez, B., Martínez, P., Yuste, M., Poderoso, T., Alonso, F., Domínguez, J., Ezquerra, A., Revilla, C. (2014). Phenotypic and functional heterogeneity of CD169+ and CD163+ macrophages from porcine lymph nodes and spleen. *Dev Comp Immunol.* 44, 44-49.
- Álvarez, B., Revilla, C., Doménech, N., Pérez, C., Martínez, P., Alonso, F., Ezquerra, A. Domínguez, J. (2008). Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues. *Vet Res.* 39(2), 1-12.
- Álvarez, B., Sánchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., Ezquerra, A. and Domínguez, J. (2000b). A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens.* 55, 342-351.
- Álvarez-Estrada, Á., Rodríguez-Ferri, E. F., Martínez-Martínez, S., Álvarez, B., Fernández-Caballero, T., Domínguez, J., Gutiérrez-Martín, C. B. (2019). TLR2, Siglec-3 and CD163 expressions on porcine peripheral blood monocytes are increased during sepsis caused by *Haemophilus parasuis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 64, 31-39.
- Amarilla, S. P., Gómez-Laguna, J., Carrasco, L., Rodríguez-Gómez, I. M., Caridad y Ocerín, J.M., Graham, S. P., Frossard, J-P., Steinbach, F., Salguero, F. J. (2017). Porcine reproductive and respiratory syndrome type 1 viruses induce hypoplasia of erythroid cells and myeloid cell hyperplasia in the bone marrow of experimentally infected piglets independently of the viral load and virulence. *Vet Microbiol.* 201, 126-135.
- Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A., Nakamura, M. (2006). Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J.* 20, 1964–1973.

- Angata, T., Ishii, T., Motegi, T., Oka, R., Taylor, R.E., Soto, P.C., Chang, Y.C., Secundino, I., Gao, C.X., Ohtsubo, K., Kitazume, S., Nizet, V., Varki, A., Gemma, A., Kida, K., Taniguchi, N. (2013). Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Cell Mol Life Sci.* 70, 3199–3210.
- Angata, T., Margulies, E.H., Green, E.D., Varki, A. (2004). Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *PNAS.* 101, 13251–13256.
- Auffray, C., Fogg, D. K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., Hume, D. A., Cumano, A., Lauvau, G., F. Geissmann. (2009). CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> common macrophage/DC precursors and the role of CX<sub>3</sub>CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 206(3), 595-606.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 317, 666–670.
- Avril, T., Attrill, H., Zhang, J., Raper, A., Crocker, P. R. (2006). Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs. *Biochem Soc Trans.* 34(6), 1024-1027.
- Avril, T., Freeman, S.D., Attrill, H., Clarke, R.G., Crocker, P.R. (2005). Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif phosphorylation. *J Biol Chem.* 280, 19843–19851.
- Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gómez Perdiguero E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L. C., Artis, D., Mowat, A. M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Nat Immunol.* 15(10), 929-937.
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guillems, M., Malissen, B., Agace, W. W., Mowat, A. M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C(hi) monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 6(3), 498-510.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gómez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol.* 15, 929–937.
- Balmelli, C., Ruggli, N., Mc Cullough, K., Summerfield, A. (2005). Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol.* 77, 923–933.
- Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M., Barton, G.M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol.* 10, 1200–1207.
- Bautista, E.M., Nfon, C., Ferman, G.S., Golde, W.T. (2007). IL-13 replaces IL-4 in development of monocyte derived dendritic cells (MoDC) of swine. *Vet Immunol Immunopathol.* 115, 56–67.
- Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. (2002). The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 168(7), 3536-3542.
- Beura, L. K., Sarkar, S. N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A. K., Osorio, F. A. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol.* 84(3), 1574-1584.
- Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmair, H., Polster, U., Weiland, E., Wege, H. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 47(1), 9-25.

- Bimczok, D., Rau, H., Wundrack, N., Naumann, M., Rothkotter, H.J., McCullough, K., Summerfield, A. (2007). Cholera toxin promotes the generation of semi-mature porcine monocyte-derived dendritic cells that are unable to stimulate T cells. *Vet Res.* 38, 597–612.
- Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., Colonna, M. (2006). Siglec-H is an IPC specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood.* 107, 2474–2476.
- Bordet, E., Maisonnasse, P., Renson, P., Bouguyon, E., Crisci, E., Tiret, M., Descamps, D., Bernelin-Cottet, C., Urien, C., Lefèvre, F., Jouneau, L., Bourry, O., Leplat, J.-J., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N. (2018). Porcine alveolar macrophage-like cells are pro-inflammatory pulmonary intravascular macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Sci Rep.* 8(1), 10172.
- Boyette, L. B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B. D., Walters, J. T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J. M., Lakkis, F. G., Mete, D. M. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE.* 12(4), e0176460.
- Brar, MS, Shi, M., Hui, RK-H, Leung, FC-C. (2014). Genomic evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) isolates revealed by deep sequencing. *PLoS ONE.* 9(4).
- Bullido, R., Alonso, F., Gómez del Moral, M., Ezquerra, A., Álvarez, B., Ortuño, E., Domínguez, J. (1996). Monoclonal antibody 2F411 recognizes the  $\alpha$  chain of a porcine  $\beta$ 2 integrin involved in adhesion and complement mediated phagocytosis. *J Immunol Methods.* 195(1-2), 125-134.
- Bullido, R., Doménech, N., Álvarez, B., Alonso, F., Babín, M., Ezquerra, A., Ortuño, E., Domínguez, J. (1997b). Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev Comp Immunol.* 21(3), 311-322.
- Bullido, R., Gómez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerra, A., Zapata, A., Sánchez, C., Ortuno, E., Álvarez, B. and Domínguez, J. (1997a). Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. *Tissue Antigens.* 49, 403-413.
- Burkard, C., Lillico, S. G., Reid, E., Jackson, B., Mileham, A. J., Ait-Ali, T., Whitelaw, C. B. A., Archibald, A. L. (2017). Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog.* 13(2), e1006206.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 55(4), 611–622.
- Cafruny, W.A., Duman, R.G., Wong, G.H., Said, S., Ward-Demo, P., Rowland, R.R., Nelson, E.A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection. *Virology.* 3,90.
- Cai, Y., Postnikova, E.N., Bernbaum, J.G., Yu, S.Q., Mazur, S., Deiuliis, N.M., Radoshitzky, S.R., Lackemeyer, M.G., McCluskey, A., Robinson, P.J., Haucke, V., Wahl-Jensen, V., Bailey, A.L., Lauck, M., Friedrich, T.C., O'Connor, D.H., Goldberg, T.L., Jahrling, P.B., Kuhn, J.H. (2015). Simian hemorrhagic fever virus cell entry is dependent on CD163 and uses a clathrin-mediated endocytosis-like pathway. *J Virol.* 89(1), 844–856.
- Calvert, J. G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol.* 81, 7371–7379.

- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W. M., Husmann, R. J., Zuckermann, F. A. (2011). North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses inhibit type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *J Virol.* 85(6), 2703-2713.
- Canelli, E., Catella, A., Borghetti, P., Ferrari, L., Ogno, G., De Angelis, E., Corradi, A., Passeri, B., Bertani, V., Sandri, G., Bonilauri, P., Leung, F. C., Guazzetti, S., Martelli, P. (2017). Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol.* 210, 124-133.
- Cao, H., Crocker, P.R. (2010). Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology.* 132, 18-26.
- Cao, H., de Bono, B., Belov, K., Wong, E. S., Trowsdale, J., Barrow, A. D. (2009). Comparative genomics indicates the mammalian CD33rSiglec locus evolved by an ancient large-scale inverse duplication and suggests all Siglecs share a common ancestral region. *Immunogenetics.* 61(5), 401-417.
- Cao, H., Lakner, U., de Bono, B., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Barrow, A.D. (2008). SIGLEC 16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and nonfunctional alleles in humans. *Eur J Immunol.* 38, 2303-2315.
- Carlin, A.F., Lewis, A.L., Varki, A., Nizet, V. (2007). Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol.* 189, 1231-1237.
- Carlin, A.F., Uchiyama, S., Chang, Y.C., Lewis, A.L., Nizet, V., Varki, A. (2009). Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood.* 113, 3333-3336.
- Carrasco, C.P., Rigden, R.C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S, Takamatsu, H., Bertoni, G., McCullough, K.C., Summerfield, A. (2001). Porcine dendritic cells generated *in vitro*: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunol.* 104, 175-184.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol.* 142, 629-633.
- Chamorro, S., Revilla, C., Álvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, Á., Domínguez, J. (2005). Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology.* 114, 63-71.
- Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2000). Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiol.* 202, 82-93.
- Chamorro, S., Revilla, C., Gómez, N., Álvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2004). *In vitro* differentiation of porcine blood CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiol.* 209, 57-65.
- Chang, H-C, Peng, Y.-T., Chang, H-L, Chaung, H-C, Chung, W-B. (2008). Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 129, 281-293.
- Chang, Y.C., Olson, J., Louie, A., Crocker, P.R., Varki, A., Nizet, V. (2014). Role of macrophage sialoadhesin in host defense against the sialylated pathogen group B *Streptococcus*. *J Mol Med.* 92(9), 951-959.
- Chang, Y-C., Nizet, V. (2014). The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology.* 24 (9), 818-825.

- Charentantanakul, W., Platt, R., Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Roth, J. A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 109(1): 99-115.
- Chaudhuri, S., McKenna, N., Balce, D.R., Yates, R.M. (2016). Infection of porcine bone marrow-derived macrophages by porcine respiratory and reproductive syndrome virus impairs phagosomal maturation. *J Gen Virol.* 97, 669–679.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y. (2010). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology.* 398, 87–97
- Cheon, D. S., Chae, C. (2001). Distribution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J Pathol.* 124, 231-237.
- Chong, S. Z., Evrard, M., Devi, S., Chen, J., Lim, J. Y., See, P., Zhang, Y., Adrover, J. M., Lee, B., Tan, L., Li, J. L.Y., Liong, K. H., Phua, C., Balachander, A., Boey, A., Liebl, D., Tan, S. M., Chan, J. K.Y., Balabanian, K., Harris, J. E., Bianchini, M., Weber, C., Duchene, J., Lum, J., Poidinger, M., Q. Chen, *et al.* (2016). CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. *J Exp Med.* 213(11), 2293.
- Christianson, W. T., Collins, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W, Morrison, R.B., Joo, H.S. (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res.* 53(4), 485-488.
- Collins, J.E., Benfield, D. A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D., Chladek, D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest.* 4, 117-126.
- Cong, P., Xiao, S., Chen, Y., Wang, L., Gao, J., Li, M., He, Z., Guo, Y., Zhao, G., Zhang, X., Chen, L., Mo, D., Liu, X. (2014). Integrated miRNA and mRNA transcriptomes of porcine alveolar macrophages (PAM cells) identifies strain-specific miRNA molecular signatures associated with H-PRRSV and N-PRRSV infection. *Mol Biol Rep.* 41(9), 5863-5875.
- Cornish, A. L., Freeman, S., Forbes, G., Ni, J., Zhang, M., Cepeda, M., Gentz, R., Augustus, M., Carter, K. C., Crocker, P. R. (1998). Characterization of Siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood.* 92(6), 2123-2132.
- Crocker, P. R., Feizi, T. (1996). Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell—cell interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 6(5), 679-691.
- Crocker, P. R., Freeman, S., Gordon, S., Kelm, S. (1995). Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage. *J Clin Invest.* 95(2), 635–643.
- Crocker, P. R., Gordon, S. (1989). Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *JEM.* 169 (4), 1333.
- Crocker, P. R., Mucklow, S., Bouckson, V., McWilliam, A., Willis, A. C., Gordon, S., Milon, G., Kelm, S., Bradfield, P. (1994). Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains. *EMBO J.* 13, 4490–4503.
- Crocker, P. R., Paulson, J. C., Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 7, 255.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J-P., D’Cruz, D., Casanova, J-L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010). Human CD14dim

- monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 33, 375-386.
- Damoiseaux, J. G., Dopp, E.A., Dijkstra, C.D. (1991). Cellular binding mechanism on rat macrophages for sialylated glycoconjugates, inhibited by the monoclonal antibody ED3. *J Leukoc Biol*. 49, 434-441.
- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K. (2010). The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol*. 84, 1731–1740.
- Dea, S., Sawyer, N., Alain, R., Athanassious, R. (1995). Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. *Adv Exp Med Biol*. 380, 95-98.
- Delputte P.L., Van Breedam. W., Barbé F., Van Reeth K., Nauwynck H.J. (2007a). IFN- treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor Sialoadhesin. *J Interferon Cytokine Res*. 27, 757–766.
- Delputte, P. L., Costers, S., Nauwynck, H. J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol*. 86(5), 1441-1445.
- Delputte, P. L., Nauwynck, H.J. (2004). Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J Virol*. 78(15), 8094–8101.
- Delputte, P. L., Van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R., Nauwynck, H.J. (2007b). Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J Virol*. 81, 9546–9550.
- Delputte, P. L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H. J. Pensaert, M. B. (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol*. 76(9), 4312-4320.
- Díaz de Arce, H., Artursson, K., L'Haridon, R., Perers, A., La Bonnardiere, C., Alm, G.V. (1992). A sensitive immunoassay for porcine interferon-alpha. *Vet Immunol Immunopathol*. 30(4), 319-327.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2006). Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology*. 351(2), 249-259.
- Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Joling, P., Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 54, 589–599.
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Res*. 154(1), 86-97.
- Domínguez, J., Álvarez, B., Alonso, F., Thacker, E., Haverson, K., McCullough, K., Summerfield, A. Ezquerra, A. (2001). Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11 specificity. *Vet Immunol Immunopathol*. 80, 111-119.
- Domínguez, J., Babín, M., Sánchez, C., Hedrick, RP. (1991). Rapid serotyping of infectious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 31(1), 93-103.
- Domínguez, J., Ezquerra, A., Alonso, F., Bullido, R., McCullough, K., Summerfield, A., Bianchi, A., Zwart, R.J., Kim, YB., Blecha, F., Eicher, S., Murtaugh, MP., Pampusch, M., Burger, K. (1998). Workshop studies with monoclonal antibodies identifying a novel porcine differentiation antigen, SWC9. *Vet Immunol Immunopathol*. 60(3-4), 343-349.

- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B. (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol.* 72, 4520–4523.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B. (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 56(1-2), 9-19.
- Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., *et al.* (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 29, 306–317.
- Edwards, M.S. (2006). Issues of antimicrobial resistance in group B *streptococcus* in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 17, 149–152.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E. L., Ivanov, S., Satpathy, A. T., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., and E. C. Forsberg, Yokoyama, W., Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J., Mann, D. L. (2014a). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 40(1), 91-104.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity.* 41(1), 21-35.
- Escalona, Z., Álvarez, B., Uenishi, H., Toki, D., Yuste, M., Revilla, C., del Moral, MG., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2015). Molecular characterization of porcine Siglec-10 and analysis of its expression in blood and tissues. *Dev Comp Immunol.* 48(1), 116-123.
- Escalona, Z., Álvarez, B., Uenishi, H., Toki, D., Yuste, M., Revilla, C., Gómez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2014). Molecular characterization and expression of porcine Siglec-5. *Dev Comp Immunol.* 44, 206-216.
- Ezquerra, A., Revilla, C., Álvarez, B., Pérez, C., Alonso, F., Domínguez, J. (2009). Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol.* 33, 284–298.
- Fabriek, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., Ligtenberg, A.J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R.P., Dijkstra, C.D., van den Berg, T.K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 113, 887–892.
- Falco, M., Biassoni, R., Bottino, C., Vitale, M., Sivori, S., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1999). Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells. *J Exp Med.* 190, 793–802.
- Fang, Y., Snijder, E. J. (2010). The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res.* 154, 61–76.
- Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., Meinel, E. (2004). Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol.* 16 (6), 799-809.
- Feng, W-H., Laster, S. M., Tompkins, M., Brown, T., Xu, J-S., Altier, C., Gómez, W., Benfield, D., McCaw, M-B. (2001). In utero infection by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol.* 75(10), 4889–4895.
- Finger, E.B., Puri, K.D., Alon, R., Lawrence, M.B., von Andrian, U.H., Springer, T.A. (1996). Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature.* 379, 266–269.
- Firth, A. E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Posthuma, C.C. (2011). Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J Gen Virol.* 92, 1097–1106.

- Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D, Hertzog, P.J., Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF and M-CSF dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol.* 86, 411–421.
- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, F. A., Hernández, J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol.* 15(4), 720-725.
- Fogg, D. K., Sibon, C., Chaouki M., Steffen J., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A., Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 311(5757), 83-87.
- Forsberg, R. (2005). Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol Biol Evol.* 22(11), 2131-2134.
- Foss, D.L., Bennaars, A.M., Pennell, C.A., Moody, M.D., Murtaugh, M.P. (2003). Differentiation of porcine dendritic cells by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expressed in *Pichia pastoris*. *Vet Immunol Immunopathol.* 91, 205–215.
- Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseño, C. G., Ramasamy, S. K., Krishnasamy, K., Limbourg, A., Häger, C., Kapanadze, T., Ishifune, C., Hinkel, R., Radtke, F., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Napp, L. C., Bauersachs, J., Haller, H., Yasutomo, K., Kupatt, C., Murphy, K. M., Adams, R. H., Weber, C., Limbourg, F. P. (2016). Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat Commun.* 7, 12597.
- Gao, J., Xiao, S., Xiao, Y., Wang, X., Zhang, C., Zhao, Q., Nan, Y. et al. (2016). MYH9 is an essential factor for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection. *Sci Rep.* 6, 25120.
- Gao, L., Guo, X-K., Wang, L., Zhang, Q., Li, N., Chen, X-X., Wang, Y., Feng, W-H. (2013). MicroRNA 181 suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection by targeting PRRSV receptor CD163. *J Virol.* 87(15), 8808–8812.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19(1), 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 327(5966), 656-661.
- Gimeno, M., Darwich, L., Díaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martín, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E. (2011). Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res.* 42(1),9.
- Ginhoux, F., Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 14, 392-404.
- González, S., Mendoza, C., Sánchez-Vizcaino J.M., Alonso F. (1990). Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation. *Vet Immunol Immunopathol.* 26(1), 71-80.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23–35.
- Gordon, S., Martínez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32, 593e604.
- Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5: 953–964.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., Ernst, M. (2001). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol.* 69, 11–20.

- Graversen, J. H., Madsen, M., Moestrup, S.K. (2002). CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(4), 309–314.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 14, 571–578.
- Guo, L., Niu, J., Yu, H., Gu, W., Li, R., Luo, X., Huang, M., Tian, Z., Feng, L., Wang, Y. (2014). Modulation of CD163 expression by metalloprotease ADAM17 regulates Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus entry. *J Virol.* 88(18): 10448-10458.
- Guzylack-Piriou, L., Balmelli, C., Mc Cullough, K.C., Summerfield, A. (2004). Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-12. *Immunology.* 112: 28–37.
- Hanna, R. N., Carlin, L. M., Hubbeling, H. G., Nackiewicz, D., Green, A. M., Punt, J. A., Geissmann, F., Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and survival of Ly6C<sup>-</sup> monocytes. *Nature Immunol.* 12(8), 778-785.
- Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D.G., Crocker, P.R. (2001). "Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations." *Blood.* 97, 288-296.
- Hashimoto, D. Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W, Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 38, 792–804.
- Haverson, K., Bailey, M., Higgins, V.R., Bland, P.W., Stokes, C.R. (1994). Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. *J Immunol Methods.* 170(2), 233-245.
- Haverson, K., Singha, S., Stokes, C.R., Bailey, M. (2000). Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology.* 101, 492–500.
- Heath, P.T., Schuchat, A. (2007). Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 21, 411–424.
- Heikema, A. P., Bergman, M.P., Richards, H., Crocker, P.R., Gilbert, M., Samsom, J.N., van Wamel, W.J., Endtz, H.P., van Belkum, A. (2010). Characterization of the specific interaction between sialoadhesin and sialylated *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *Infect Immun.* 78: 3237–3246.
- 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(5663), 1526–1529.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* 14, 821e830.
- Hintz, K., Rassias A.J., Wardwell, K., Moss, M.L., Morganelli, P.M., Pioli, P.A., Givan, A.L., Wallace, P.K., Yeager, M.P., Guyre, P.M. (2002). Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol.* 72, 711-717.
- Hoogger, P., Sorg, C., (2001). Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 288, 841-843.

- Huang, Y. W., Dryman, B.A., Li, W., Meng, X.J. (2009). Porcine DC-SIGN: molecular cloning, gene structure, tissue distribution and binding characteristics. *Dev Comp Immunol.* 33, 464–480.
- Hussen, J., Duvel, A., Sandra, O., Smith, D., Sheldon, I.M., Zieger, P., Schuberth, H.J. (2013). Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. *PLoS One.* 8, e71502.
- Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J., Ziegler-Heitbrock, L., Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood.* 115(3), e10-9.
- Italiani, P., Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 5, 514.
- Jacquelin, S., Licata, F., Dorgham, K., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Deterre, P., Hume, D. A., Combadière, C., Boissonnas, A. (2013). CX3CR1 reduces Ly6C<sup>high</sup> monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood.* 122(5), 674-683.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J.R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D.W., Yokoyama, W.M., Ginhoux, F., Henson, P.M., Randolph, G.J. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity.* 39, 599e610.
- Janeway Jr. *et al.* (2000). *Inmunobiología: el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Barcelona: Ed. Masson, SA.
- Janeway, C. A. Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology.* 20(1), 197-216.
- Jia, T., Serbina, N.V., Brandl, K., Zhong, M.X., Leiner, I.M., Charo, I.F., Pamer, E.G. (2008). Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 180, 6846-6853.
- Jiang, H. R., Hwenda, L., Makinen, K., Oetke, C., Crocker, P.R., Forrester, J.V. (2006). Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol.* 177, 2258-2264.
- Johnson, C. R., Griggs, T.F., Gnanandarajah, J., Murtaugh, M.P. (2011). Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol.* 92, 1107–1116.
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P. (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 102, 233-247.
- Johnstone, A., Thorpe, R. (1982). *Immunochemistry in Practice.* Oxford, Reino Unido. Ed: Backwell Scientific Publications.
- Jones, C., Virji, M., Crocker, P.R. (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol.* 49, 1213–1225.
- Jung, H., Mithal, D. S., Park, J. E., Miller, R. J. (2015). Localized CCR2 Activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4. *PLoS ONE.* 10(6), e0128387.
- Jusa, E. R., Inaba, Y., Kouno, M., Hirose, O. (1997). Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res.* 58, 488–491.

- Kantonen, S., Hatton, N., Mahankali, M., Henkels, K.M., Park, H., Cox, D., Gómez-Cambronero, J. (2011). A novel phospholipase D2-Grb2-WASp heterotrimer regulates leukocyte phagocytosis in a two-step mechanism. *Mol Cell Biol.* 31, 4524–4537.
- Kapetanovic, R., Fairbairn, L., Beraldi, D., Sester, D.P., Archibald, A.L., Tuggle, C.K., Hume, D.A. (2012). "Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide." *J Immunol.* 188, 3382-3394.
- Karniyuchuk, U. U., Geldhof, M., Vanhee, M., Van Doorselaere, J., Saveleva, T. A., Nauwynck, H. J. (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res.* 6(1), 30.
- Khatua, B., Ghoshal, A., Bhattacharya, K., Mandal, C., Saha, B., Crocker, P.R., Mandal, C. (2010). Sialic acids acquired by *Pseudomonas aeruginosa* are involved in reduced complement deposition and siglec mediated host-cell recognition. *FEBS Lett.* 584, 555–561.
- Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol.* 133, 477–483.
- Kim, J. K., Fahad, A.M., Shanmukhappa, K., Kapil, S. (2006). Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J Virol.* 80, 689–696.
- Kim, Y.G., Kamada, N., Shaw, M.H., Warner, N., Chen, G.Y., *et al.* (2011). The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity.* 34, 769–780.
- Klinge, K. L., Vaughn, E. M., Roof, M. B., Bautista, E. M., Murtaugh, M. P. (2009). Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology.* 6(1), 177.
- Kreutz, L. C., Ackermann, M. R. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137–147.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 409,198–201.
- Kuhn, J.H., Lauck, M., Bailey, A.L., Shchetinin, A.M., Vishnevskaya, T.V., Bào, Y., Fei Fan Ng, T., LeBreton, M., Schneider, B.S., Gillis, A., Tamoufe, U., Ledoux Diffo, J., Michel Takuo, J., Kondov, N.O., Coffey, L.L., Wolfe, N.D., Delwart, E., Clawson, A.N., Postnikova, E., Bollinger, L., Lackemeyer, M.G., Radoshitzky, S.R., Palacios, G., Wada, J., Shevtsova, Z.V., Jahrling, P.B., Lapin, B.A., Deriabin, P.G., Dunowska, M., Alkhovsky, S.V., Rogers, J., Friedrich, T.C., O'Connor, D.H., Goldberg, T.L. (2016). Reorganization and expansion of the Nidoviral family *Arteriviridae*. *Arch Virol.* 161(3), 755-768.
- Larson, R.S., Springer, T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev.* 114, 181-217.
- Law, S. K., Micklem, K.J., Shaw, J.M., Zhang, X.P., Dong, Y., Willis, A.C., Mason, D.Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol.* 23, 2320-2325.
- Le, Y., Zhou Y., Iribarren P., Wang J. (2004). Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol.* 1(2), 95-104.
- Lee, C., Yoo, D. (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology.* 355, 30–43.
- Lee, S.M., Kleiboeker, S.B. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology.* 365, 419-434.

- Leiriao, P., del Fresno, C., Ardavin, C. (2012). Monocytes as effector cells: activated Ly6C<sup>high</sup> mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-present antigens to CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol.* 42, 2042e2051.
- Lenzo, J.C., Turner, A.L., Cook, A.D., Vlahos, R., Anderson, G.P., Reynolds, E.C., Hamilton, J.A. (2012). Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol Cell Biol.* 90, 429e440.
- Lessard, A.J., LeBel, M., Egarnes, B., Préfontaine, P., Thériault, P., Droit, A., Brunet, A., Rivest, S., Gosselin, J. (2017). Triggering of NOD2 Receptor converts inflammatory Ly6C<sup>high</sup> into Ly6C<sup>low</sup> monocytes with patrolling properties. *Cell Reports.* 20(8), 1830-1843.
- Li, Y.L., Darwich, L., Mateu, E. (2018). Characterization of the attachment and infection by Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 isolates in bone marrow-derived dendritic cells. *Vet Microbiol.* 223, 181-188.
- Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 23,275–306.
- Livak, K.J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 25(4), 402-408.
- López-Fuertes, L., Campos, E., Doménech, N., Ezquerra, A., Castro, J.M., Domínguez, J., Alonso, F. (2000). Porcine reproductive and respiratory síndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res.* 69, 41–46.
- Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G.J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci.* 4, 129-154.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15, 323–350.
- Madsen, M., Graversen, J.H., Moestrup, S.K. (2001). Haptoglobin and CD163: captor and receptor gating hemoglobin to macrophage lysosomes. *Redox Rep.* 6, 386–388.
- Makala, L.H., Haverson, K., Stokes, C.R., Bailey, M., Bland, P.W. (1998). Isolation and characterisation of pig Peyer's patch dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 61, 67–81.
- Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., Dea, S. (1994). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Can J Vet Res.* 58(1), 55-64.
- Martínez, F.O., Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6,13.
- Martínez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453–461.
- Martínez-Lobo, F. J., Díez-Fuertes, F., Segalé, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C. (2011). Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet Microbiol.* 154, 58-68.
- Martins, R. P., M. Collado-Romero, et al. (2013). Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica serovar Typhimurium*: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36(2), 149-160.

- Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernández, S., Martín de Ana, A., Jones, D.R., Torán, J.L., Martínez-A. C. (2001). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J.* 20(10), 2497-2507.
- Meng, X.J., Paul, P. S., Halbur, P.G., Lum, M.A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol.* 140(4), 745-755.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 31, 563-604.
- Meulenberg, J. J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G. (1995a). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology.* 206(1), 155-163.
- Meulenberg, J. J., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G. (1995b). Characterization of structural proteins of Lelystad virus. *Adv Exp Med Biol.* 380, 271-276.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 164, 6166-6173.
- Moestrup, S.K., Moller, H.J. (2004). CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 36, 347-354.
- Moreno, S., Álvarez, B., Poderoso, T., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F., Domínguez, J. (2010). Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2. *Vet Res.* 41(5), 76.
- Morgan, S.B., Graham, S.P., Salguero, F.J., Sánchez Cordon, P.J., Mokhtar, H., Rebel J.M., Weesendorp, E., Bodman-Smith, K.B., Steinbach, F., Frossard, J.P. (2013). Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Vet Microbiol.* 163, 13-22.
- Mosser, D. M., Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-969.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 7, 209-212.
- Mukherjee, R., Barman, P. K., Thatoi P. K., Tripathy R., Das B.K., Ravindran B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 5: 13886.
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y-J, Zhou, E-M. (2017). Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective. *Front Microbiol.* 8, 1635.
- Nath, D., Hartnell, A., Happerfield, L., Miles, D.W., J., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou J., Crocker, P.R. (1999). Macrophage-tumour cell interactions: identification of MUC1 on breast cancer cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin. *Immunology.* 98(2), 213-219.
- Nath, D., van der Merwe, P. A., Kelm, S., Bradfield, P., Crocker, P. R. (1995). The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22. *J Biol Chem.* 270, 26184-26191.
- Nauwynck, H. J., Duan, X., Favoreel, H. W., Van Oostveldt, P., Pensaert, M. B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 80, 297-305.

- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A. H., Green, A.L., Zimmerman, J.J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory síndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 227, 385–392.
- Nieuwenhuis, N., Duinhof, T. F., van Nes, A. (2012). Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec.* 170(9), 225-225.
- Oetke, C., Vinson, M.C., Jones, C., and Crocker, P.R. (2006). Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol.* 26, 1549-1557.
- Ondrackova, P., Leva, L., Kucerova, Z., Vicenova, M., Mensikova, M., Faldyna, M. (2013b). Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. *Vet Res.* 44, 98.
- Ondrackova, P., Matiasovic, J., Volf, J., Domínguez, J., Faldyna, M. (2013a). Phenotypic characterisation of the monocyte subpopulations in healthy adult pigs and *Salmonella*-infected piglets by seven-colour flow cytometry. *Res Vet Sci.* 94, 240–245.
- Paillet, R., Laval, F., Audonnet, J.C., Andreoni, C., Juillard, V. (2001). Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunol.* 102, 396–404.
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., von Andrian, U.H. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med.* 194, 1361e1373.
- Palzer, A., Haedke, K., Heinritzi, K., Zoels, S., Ladinig, A., Ritzmann, M. (2015). Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. *Can Vet J.* 56(3), 285-287.
- Park, J.Y., Kim, H.S., Seo, S.H. (2008). Characterization of interactions between porcine reproductive and respiratory síndrome virus and porcine dendritic cells. *J Microbiol Biotechnol.* 18(10), 1709-1716.
- Parra-Sánchez, H., Puebla-Clark, L., Reséndiz, M., Valenzuela, O., Hernández, J. (2018). Characterization and expression of DEC205 in the cDC1 and cDC2 subsets of porcine dendritic cells from spleen, tonsil, and submaxillary and mesenteric lymph nodes. *Mol Immunol.* 96, 1-7.
- Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 74,2527-2534.
- Patton, J.B., Rowland, R.R., Yoo, D., Chang, K.O. (2009). Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res.* 140, 161–171.
- Peng, Y.T., Chaung, H.C., Chang, H.L., Chang, H.C., Chung, W.B. (2009). Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 136(3-4), 359-365.
- Pérez, C., Ortuño, E., Gómez, N., García-Briones, M., Álvarez, B., Martínez de la Riva, P., Alonso, F., Revilla, C., Domínguez, J., Ezquerra, A. (2008). Cloning and expresión of porcine CD163: its use for characterization of monoclonal antibodies to porcine CD163 and development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *Spanish J of Agr Res.* 6, 1-14.
- Pérez, C., Revilla, C., Álvarez, B., Chamorro, S., Correa, C., Domènech, N., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. (2007). Phenotypic and functional characterization of porcine granulocyte developmental stages using two new markers. *Dev Comp Immunol.* 31(3), 296-306.

- Pesce, J.T., Ramalingam, T.R., Mentink-Kane, M.M., Wilson, M.S., El Kasmi, K.C., Smith, A.M., Thompson, R.W., Cheever, A.W., Murray, P.J. Wynn, T.A. (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 5, e1000371.
- Pescovitz, M. D., Lunney, J. K. Sachs, D. H. (1984). Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol.* 133(1), 368-375.
- Pillai, S., Netravali, I.A., Cariappa, A., Mattoo, H. (2012). Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol.* 30, 357–392.
- Poderoso, T., Martínez, P., Álvarez, B., Handler, A., Moreno, S., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J., Revilla, C. (2011). Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. *Vaccine.* 29, 4813– 4820.
- Prather, R. S., Rowland, R.R.R., Ewen, C., Tribble B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J.M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Egen, T., Green, J.A. (2013). An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Virol.* 87(17), 9538-9546.
- Prather, R. S., Wells, K.D., Whitworth, K.M., Kerrigan, M.A., Samuel, M.S., Mileham, A., Popescu, L.N., Rowland R.R.R. (2017). Knockout of maternal CD163 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Virol.* 7: 13371.
- Prestwood, T.R., May, M.M., Plummer, E.M., Morar, M.M., Yauch, L.E., Shresta, S. (2012). Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets of dengue virus in mice. *J Virol.* 86, 12138–12147.
- Proost, P., Wuyts, A., van Damme, J. (1996). The role of chemokines in inflammation. *Clin Exp Med.* 26(4), 211–223.
- Puri, K.D., Finger, E.B., Springer, T. (1997). The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J Immunol.* 158, 405–413.
- Rahe, M. C., Murtaugh M.P. (2017). Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses.* 9: 148.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M., Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*. *Immunity.* 11, 753–761.
- Ravetch, J.V., Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science.* 290, 84-89.
- Reed L.J., Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *A J Epidemiol.* 27(3), 493–497.
- Rehakova, Z., Trebichavsky, I., Sinkora, J., Splichal, I., Sinkora, M. (1998). Early ontogeny of monocytes and macrophages in the pig. *Physiol Res.* 47, 357–363.
- Rempel, H., Calosing, C., Sun, B., Pulliam, L. (2008). Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS ONE.* 3, e1967.
- Revilla C., P. T., Martínez P., Álvarez B., López-Fuertes L., Alonso F., Ezquerra A., Domínguez J. (2009). Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells." *Vet Res.* 40(3), 14-29.
- Riffault, S., Carrat, C., Besnardeau, L., La Bonnardiere, C., Charley, B. (1997). *In vivo* induction of interferon-alpha in pig by noninfectious coronavirus: tissue localization and in situ phenotypic characterization of interferon-alpha producing cells. *J Gen Virol.* 78, 2483–2487.
- Riffault, S., Carrat, C., van Reeth, K., Pensaert, M., Charley, B. (2001). Interferon-alpha producing cells are localized in gut-associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infected piglets. *Vet Res.* 32, 71–79.

- Rodríguez-Gómez, I.M., Gómez-Laguna, J., Carrasco, L. (2013). Impact of PRRSV on activation and viability of antigen presenting cells. *World J Virol.* 2(4), 146-151.
- Rossow K.D., Shivers J. L., Yeske P.E., Polson D.D., Rowland R.R., Lawson S.R., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Collins J.E. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet record.* 144(16), 444-448.
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol.* 35, 1-20.
- Rossow, K. D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 32, 361-373.
- Rowland, R. R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D. A. (2003). Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet Microbiol.* 96(3), 219-235.
- Saalmuller, A. (1996). Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today.* 17, 352-354.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry.* 35(11), 3362-3367.
- Sánchez, C., Domènech, N., Vázquez, J., Alonso, F., Ezquerro, A., Domínguez, J. (1999). The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol.* 162, 5230-5237.
- Sánchez, C., Domínguez, J. (1991). Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 28(11), 1271-1277.
- Schaer, D.J., Boretti, F.S., Hongegger, A., Poehler, D., Linnscheid, P., Staeger, H., Muller, C., Schoedon, G., Schaffner, A. (2001). Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics.* 53, 170-177.
- Senthilkumar, D., Rajukumar, K. Sen, A., Kumar, M., Shrivastava, D., Kalaiyarasu, S., Gautam, S., Singh, F., Kulkarni, D. D., Singh, V. P. (2018). Pathogenic characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of Indian origin in experimentally infected piglets. *Transbound Emerg Dis.* 0,1-15.
- Serbina, N. V., Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunol.* 7, 311-317.
- Serbina, N.V., Cherny, M., Shi, C., Bleau, S.A., Collins, N.H., Young, J.W., Pamer, E.G. (2009). Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* Conidia. *J Immunol.* 183(4), 2678-2687.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 26, 421-452.
- Shanmukhappa, K., Kim, J.K., Kapil, S. (2007). Role of CD151, a tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology.* 4, 62.
- Shi C., Pamer E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 11(11), 762-774.
- Sica, A., Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 122, 787-795.

- Silva-Campa, E., Córdoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., Hernández, J. (2010). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology*. 396(2), 264-271.
- Singleton H., Graham S.P., Bodman-Smith, K.B., Frossard, J.P., Steinbach F. (2016). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Front Microbiol*. 7,832.
- Singleton, H., Graham S.P., Frossard, J.-P., Bodman-Smith, K.B., Steinbach, F. (2018). Infection of monocytes with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) strain Lena is significantly enhanced by dexamethasone and IL-10. *Virology*. 517, 199-207.
- Sinn L.J., Klingler E., Lamp B., Brunthaler R., Weissenböck H., Rümenapf T., Ladinig A. (2016). Emergence of a virulent Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria. *Porcine Health Manag*. 2, 28.
- Sirinaramitr, T., Zhang, Y., Kluge, J.P., Halbur, P.G., Paul, P.S. (1998). A pneumovirulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both *in vitro* and *in vivo*. *J Gen Virol*. 79, 2989–2995.
- Snijder, E. J., Kikkert, M. (2013). Arterivirus. *Fields Virology*, 6 edn. Págs 859-879. Editado por Knipe D.M. y Howley P.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Snijder, E. J., Kikkert, M., Fang, Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J Gen Virol*. 94, 2141-2163.
- Solano, G. I., Segalés, J., Collins, J.E., Molitor, T.W., Pijoan, C. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*. 55, 247-257.
- Soldevila, F., Edwards, J. C., Graham, S.P., Stevens, L. M., Crudgington, B., Crooke, H.R., Werling, D., Steinbach, F. (2018). Characterization of the myeloid cell populations' resident in the porcine palatine tonsil. *Front Immunol*. 9(1800).
- Spagnolo, P., Renzoni, E.A., Wells, A.U., Copley, S.J., Desai, S.R., Sato, H., Grutters, J.C., Abdallah, A., Taegtmeier, A., du Bois, R.M., Welsh, K.I. (2005). C-C chemokine receptor 5 gene variants in relation to lung disease in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 172(6), 721–728.
- Spilman, M. S., Welbon, C., Nelson, E. Terje, Dokland T. (2009). Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J Gen Virol*. 90, 527-535.
- Šplíchal I., Bonneau M., Charley B. (1994). Ontogeny of interferon alpha secreting cells in the porcine fetal hematopoietic organs. *Immunology Lett*. 43(3), 203-208.
- Steinman, R.M., Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 234, 5-17.
- Stoian, A. M. M., Rowland, R. R. R. (2019). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine design: reviewing virus glycoprotein interactions with CD163 and targets of virus neutralization. *Vet Sci*. 6,9.
- Sugimoto, C., Hasegawa, A., Saito, Y., Fukuyo, Y., Chiu, K. B., Cai, Y., Breed M.W., Mori K., Roy, C.J., Lackner, A.L., Kim, W-K., Didier, E. S., Kuroda, M. J. (2015). Differentiation kinetics of blood monocytes and dendritic cells in macaques: insights to understanding human myeloid cell development. *J Immunol*. 195(4), 1774–1781.
- Summerfield, A., Auray, G., Ricklin, M. (2015). Comparative dendritic cell biology of veterinary mammals. *Annu Rev Anim Biosci*. 3, 7.1–7.25.
- Summerfield, A., McCullough, K.C. (1997). Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *J Leukoc Biol*. 62, 176–185.

- Summerfield, A., McCullough, K.C. (2009). The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol.* 33, 299–309.
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., Poovorawan, Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 84(2), 453-459.
- Suresh, R. D., Mosser, M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ.* 37(4), 284-291.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J-L, Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 325 (5940), 612–616.
- Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Weglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., Zembala, M. (2004). Antitumor response of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation. *Exp Hematol.* 32(8), 748-755.
- Tacke, F., Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 211, 609e618.
- Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sánchez, C. *et al.* (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity.* 39, 925–938.
- Taylor, V.C., Buckley, C.D., Douglas, M., Cody, A.J., Simmons, D.L., Freeman, S.D. (1999). The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem.* 274, 11505–11512.
- Terpstra, C., Wensvoort, G., Pol, JM. (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q.* 13(3), 131-136.
- Tian, D., Wei, Z., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Liu, R., Tong, G., Snijder, E.J., Yuan, S. (2012). Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture. *J Virol.* 86, 3701–3712.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, G.F. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE.* 2(6), e526.
- Tibrewal, N., Wu, Y., D’Mello, V., Akakura, R., George, T.C., Varnum, B., Birge, R.B. (2008). Autophosphorylation docking site Tyr-867 in Mer receptor tyrosine kinase allows for dissociation of multiple signaling pathways for phagocytosis of apoptotic cells and down-modulation of lipopolysaccharide-inducible NF-kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem.* 283, 3618e3627.
- Tolouei Semnani, R., Moore, V., Bennuru, S., McDonald-Fleming, R., Ganesan, S., Cotton, R., Anuradha, R., Babu, S. Nutman, T. B. (2014). Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. *Infect Immun.* 82(11), 4438-4446.
- Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 117, 902-909.

- Van Breedam, W., Delputte, P.L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., Nauwynck, H.J. (2010a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol.* 91, 1659–1667.
- Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2010b). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 6(1), e1000730.
- Van de Winkel, J.G., Anderson, C.L. (1991). Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 49,511-524.
- Van de Winkel, J.G., Capel, P.J. (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today.* 14,215-221.
- Van den Heuvel, M.M., Tensen, C.P., van As, J.H., Van den Berg, T.K., Fluitsma, D.M., Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Droste, A., Van Gaalen, F.A., Sorg, C., Hogger, P., Beelen, R.H. (1999). Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol.* 66, 858–866.
- Van Furth, R. (1970). Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Semin Hematol.* 7, 125–41.
- Van Furth, R., Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 128, 415–435.
- Van Gorp, H., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2010). Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol.* 47, 1650-1660.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2008). "Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *J Gen Virol.* **89**: 2943–2953.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch Virol.* 154, 1939–1943.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Van Doorselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2010b). Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 84, 3101–3105.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. (1996). Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol.* 48, 325-335.
- Van Woensel, P. A., Liefkens, K., Demaret, S. (1998). Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet Rec.* 142(19), 510-512.
- Vanderheijden, N., Delputte P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel P.A., Nauwynck H.J. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol.* 77(15), 8207–8215.
- Vanderheijden, N., Delputte, P., Nauwynck, H., Pensaert, M. (2001). Effects of heparin on the entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into alveolar macrophages. *Adv Exp Med Biol.* 494, 683-689.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology.* 3, 97–130.
- Varki, A., Angata, T. (2006). Siglecs: the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology.* 16, 1R–27R.

- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med.* 204, 171-180.
- Vely, F., Vivier, E. (1997). Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and non inhibitory/activatory counterparts. *J Immunol.* 159, 2075–2077.
- Vu Manh, T.P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Ruscanu, S., Jouneau, L., Bourge, M., Moroldo, M., Foucras, G., Salmon, H., Marty, H., Quéré, P., Bertho, N., Boudinot, P., Dalod, M., Schwartz-Cornil I. (2015). Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics. *Front Immunol.* 6, 299.
- Wang, G., Li, L., Yu, Y., Tu, Y., Tong, J., Zhang, C., Liu, Y., Li, Y., Han, Z, Jiang, C., Wang, S., Zhou, E.M., He, X., Cai, X. (2016). Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and induction of apoptosis in bone marrow cells of infected piglets. *J Gen Virol.* 97, 1356-1361.
- Wang, T., Fang, L., Zhao, F., Wang, D., Xiao, S. (2018). Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 92(4), e01734-01717.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol.* 152(2), 289-303.
- Wang, X., Wei, R., Li, Q., Liu, H., Huang, B., Gao, J., Mu, Y., Wang, C., Hsu, W.H., Hiscox, J.A., Zhou, E.M., (2013). PK-15 cells transfected with porcine CD163 by PiggyBac transposon system are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods.* 193, 383–390.
- Welch, S.K., Calvert, J.G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* 154, 98–103.
- Wells, K.D., Bardot, R., Whitworth, K. M., Tribble, B.R., Fang, Y., Mileham, A., Kerrigan, M.A., Samuel, M.S., Prather, R.S., Rowland, R.R. (2017). Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Virol.* 91(2), e01521-01516.
- Wensvoort, GTC., Pol, JM., ter Laak, EA., Bloemraad, M., de Kluyver, EP., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A, Wagenaar, F. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 13(3), 121-130.
- Whitworth, K.M., Rowland, R. R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., McLaren, D., Mileham, A., Wells, K.D., Prather, RS. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol.* 34, 20-22.
- Wills, R. W., Doster, A. R., Galeota J.A., Sur, J-H., Osorio, F.A. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with Porcine Reproductive and Respiratory Synndrome Virus. *J Clin Microbiol.* 41(1), 58-62.
- Wills, R. W., Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Yoon, K.J., Ladely, S., Zimmermana, J.J. (2000). Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol.* 71(3-4), 177-192.
- Wong, K.CL., Tai, J. J-Y, Wong, W-C, Han, H., Sem, X., Yeap, W-H, Kourilsky, P., Wong, S-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 118, e16-e31.

- Wong, M.M., Fish, E.N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol.* 15(1), 5-14.
- Wu, C., Rauch, U., Korpos, E., Song, J., Loser, K., Crocker, P.R., Sorokin, L.M. (2009). Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *J Immunol.* 182, 6508-6516.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496, 445-455.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P. (2004). The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol.* 78, 5923-5933.
- Xie, J., Christiaens, I., Yang, B., Trus, I., Devriendt, B., Cui, T., Wei, R., Nauwynck, H. J. (2018). Preferential use of Siglec-1 or Siglec-10 by type 1 and type 2 PRRSV strains to infect PK15S1-CD163 and PK15S10-CD163 cells. *Vet Res.* 49, 67.
- Xie, J., Christiaens, I., Yang, B., Van Breedam, W., Cui, T., Nauwynck, H. J. (2017). Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Gen Virol.* 98(8), 2030-2042.
- Xu, H., Manivannan, A., Crane, I., Dawson, R., Liversidge, J. (2008). Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. *Blood.* 112(4), 1166-1174.
- Yakubenko, V. P., Belevych, N., Mishchuk, D., Schurin, A., Lam, S. C. T., Ugarova, T. P. (2008). The role of integrin  $\alpha(D)\beta(2)$  (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res.* 314(14), 2569-2578.
- Yáñez, A., Coetzee, S.G., Olsson, A., Muench, D.E., Berman, B.P., Hazelett, D.J., Salomonis, N., Grimes, H.L., Goodridge, H.S. (2017). Granulocyte-monocyte progenitors and monocyte-dendritic cell progenitors independently produce functionally distinct monocytes. *Immunity.* 47, 890-902.e4.
- Yang, H., Zhang, J., Zhang, X., Shi, J., Pan, Y., Zhou, R., Li, G., Li, Z., Cai, G., Wu, Z. (2018). CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.* 151, 63-70.
- Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 38, 79-91.
- Yoo, D., Song, C., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., Liu, H-C. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154(1), 48-60.
- Zhang, Q., Yoo, D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol.* 177, 229-241.
- Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000). Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 67(5), 603-606.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23, 2053-2058.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G. (1992). Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood.* 79, 503-511.

- Ziegler-Heitbrock, L. (2014). Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 289, 135-139.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y-J, MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl H., Zembala, M., Austyn, J. M., Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 116(16), e74-e80.
- Zou, W., Borvak, J., Marches, F., Wei, S., Galanaud, P., Emilie, D., Curiel, T.J. (2000). Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol.* 165(8), 4388-4396.
- Zou, Z., Chastain, A., Moir, S. J., Trandem, K., Martinelli, E., Cicala, C., Crocker, P., Arthos, J., Sun, P.D. (2011). Siglecs facilitate HIV-1 infection of macrophages through adhesion with viral sialic acids. *PLoS One.* 6(9), e24559.

## ***ANEXO: PUBLICACIONES***

Los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

Yuste, M.<sup>1</sup>, **Fernández-Caballero, T.**<sup>1</sup>, Prieto, C., Álvarez, B., Martínez-Lobo, J., Simarro, I., Castro, J.M., Alonso, F., Ezquerra, Á., Domínguez, J., Revilla, C. (2017). Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages as targets of porcine reproductive and respiratory virus: Role of Siglecs. *Veterinary Microbiology*. 198, 72–80.

<sup>1</sup> Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

**Fernández-Caballero, T.**, Álvarez, B., Revilla, C., Zaldívar-López, S., Alonso, F., Garrido, J.J., Ángel Ezquerra, Domínguez, J. (2018). Phenotypic and functional characterization of porcine bone marrow monocyte subsets. *Developmental and Comparative Immunology*. 81, 95-104.

**Fernández-Caballero, T.**, Álvarez, B., Alonso, F., Revilla, C., Martínez-Lobo, J., Prieto, P., Ezquerra, Á., Domínguez, J. (2018). Interaction of PRRS virus with bone marrow monocyte subsets. *Veterinary Microbiology*. 219, 123-127





## Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages as targets of porcine reproductive and respiratory virus: Role of Siglecs



María Yuste<sup>a,1</sup>, Teresa Fernández-Caballero<sup>a,1</sup>, Cinta Prieto<sup>b</sup>, Belén Álvarez<sup>a</sup>,  
Javier Martínez-Lobo<sup>b</sup>, Isabel Simarro<sup>b</sup>, José María Castro<sup>b</sup>, Fernando Alonso<sup>a</sup>,  
Ángel Ezquerro<sup>a</sup>, Javier Domínguez<sup>a,2</sup>, Concepción Revilla<sup>a,2,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid 28040, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 March 2016

Received in revised form 30 November 2016

Accepted 2 December 2016

#### Keywords:

CD163

CD169

Siglecs

PRRS virus

Alveolar macrophages

Splenic red pulp macrophages

### ABSTRACT

CD169 and CD163 have been involved in the process of PRRS virus attachment and infection in macrophages, although recent studies have challenged the requirement for CD169. In addition to CD169, macrophages express other siglecs, whose role in PRRS virus infection is so far unknown. Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages express Siglec-3 and Siglec-5 but almost undetectable levels of CD169. Hence, we considered this cell population appropriate for analysing the role of these siglecs in the attachment and internalization of PRRS virus into macrophages. PRRS virus replicated efficiently in these macrophages, yielding even higher titres than in alveolar macrophages. Besides, a recombinant protein consisting in the ectodomain of porcine Siglec-3 fused to the Fc fragment of human IgG1 (Siglec3-Fc) was able to bind PRRS virus, while binding to Siglec-5-Fc was inconsistent. Antibodies to CD169 but not to Siglec-3 or Siglec-5 blocked the binding and infection of PRRS virus on alveolar macrophages. Unexpectedly, our antibody to CD169 also blocked the binding of PRRS virus to splenic CD163<sup>+</sup> macrophages, whereas antibodies to Siglec-3 or Siglec-5 had no effect. These results show that very low levels of CD169 expression are enough to support the attachment and internalization of PRRS virus into macrophages, whereas Siglec-3 and Siglec-5 do not seem to contribute to the virus entry in these cells.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is characterised by severe reproductive and respiratory disorders that affect swine populations causing important economic losses (Neumann et al., 2005). The aetiological agent of this disease, the PRRS virus, belongs to the family *Arteriviridae*, a family of positive-stranded RNA viruses (Cavanagh, 1997). *In vivo*, the virus has a limited tropism for monocyte/macrophage lineage cells located in different organs like lung, heart, liver or kidney, being alveolar macrophages their primary target cells (Duan et al., 1997; Beyer et al., 2000; Rowland et al., 2003). Lymphoid tissue macrophages are also targets for PRRS virus being these cells infected very early compared with alveolar macrophages (Beyer et al., 2000). However, there are no data about macrophage subsets infected

in these tissues. *In vitro*, the virus infects primary cultures of alveolar macrophages, IFN $\alpha$  cultured monocytes, monocyte-derived dendritic cells, bone marrow-derived dendritic cells and the immortalized monkey kidney cell line MA-104 and its derivative, the MARC-145 cell line (Kim et al., 1993; Chang et al., 2007; Delputte et al., 2007a).

Several reports have identified CD169, also named Siglec-1 or sialoadhesin, and CD163, two receptors expressed in alveolar macrophages, as the most relevant receptors for cellular attachment, internalization and uncoating of the virus (Duan et al., 1998; Vanderheijden et al., 2003; Delputte et al., 2004; Van Gorp et al., 2008).

CD163 is a member of the family of proteins with scavenger receptor cysteine-rich domains that is expressed on monocytes, some subsets of DC, and specific subsets of tissue macrophages (Sánchez et al., 1999; Flores-Mendoza et al., 2008; Ezquerro et al., 2009; Marquet et al., 2011; Poderoso et al., 2011). CD163 has been shown to colocalize with PRRS virus in early endosomes, having been involved in viral uncoating and genome release in PRRS virus infection (Van Gorp et al., 2008). CD163 interacts with the minor

\* Corresponding author.

E-mail address: [crevilla@inia.es](mailto:crevilla@inia.es) (C. Revilla).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> These two authors share the senior authorship.

envelope glycoproteins of PRRS virus GP2a and GP4, being the scavenger cysteine-rich domain 5 of CD163 essential for PRRS virus infection (Das et al., 2010). Recently it has been shown that pigs lacking CD163 are protected from PRRS virus challenge (Whitworth et al., 2016).

CD169, a member of the family of sialic acid binding proteins (Siglecs), shows an expression restricted to some populations of tissue macrophages. Several reports have described a role for CD169 in the attachment and internalization of PRRS virus into cells. In this respect, PRRS virus infection of alveolar macrophages can be blocked in a dose-dependent manner by mAbs to CD169 (Duan et al., 1998; Vanderheijden et al., 2003). Moreover, expression of CD169 in non-permissive PK-15 cells results in binding and internalization of PRRS virus, although uncoating does not take place (Vanderheijden et al., 2003). The interaction between CD169 and PRRS virus occurs through the binding of its N-terminal domain to sialic acids on PRRS virus surface (Delputte and Nauwynck 2004; Delputte et al., 2007b; An et al., 2010). In spite of these results, the importance of CD169 as the primary receptor of PRRS virus has been put in question. MARC-145 cells are infected by the virus although they do not express CD169, and the infection can be blocked by a polyclonal antibody to CD163 (Duan et al., 1998; Calvert et al., 2007). Moreover, expression of CD163 into non-permissive PK-15 and PK032495 cell lines, negative for CD169 mRNA expression, is sufficient to render them fully permissive to PRRS virus infection (Calvert et al., 2007; Wang et al., 2013). Finally, CD169 knockout pigs were infected by PRRS virus showing a clinical outcome, viremia and histopathological signs similar to normal animals (Prather et al., 2013).

In previous studies we have identified in the porcine spleen two main macrophage subsets which differ in the expression of those receptors: a CD163<sup>+</sup>CD169<sup>-/low</sup> population located in the red pulp, and a CD163<sup>-</sup>CD169<sup>+</sup> population mostly restricted to the marginal zone and ellipsoids (Poderoso et al., 2011; Alvarez et al., 2014). In this study, we have analysed the permissiveness of splenic CD163<sup>+</sup> macrophages to PRRS virus infection. These cells efficiently support the replication of virus, yielding titres slightly higher than alveolar macrophages. Since CD169 is barely expressed in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages we wondered whether other members of the Siglec family could contribute to the binding of the virus to these cells. Although splenic CD163<sup>+</sup> macrophages express Siglec-3 and Siglec-5, and Siglec-3 was found to bind the PRRS virus in a solid phase assay, the binding of virus to these cells and the infection were blocked with antibodies to CD169 but not to Siglec-3 or Siglec-5, suggesting a dominant role of CD169 in virus binding even at very low levels of expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and cells

Spleen samples and alveolar macrophages were obtained from healthy, conventionally reared, 3-week-old Large-White × Landrace pigs that had been anesthetized with sodium pentobarbital (0.3 g/kg), and euthanized by exsanguination. Alveolar macrophages were collected from bronchoalveolar lavage. Spleen samples were teased at 4 °C with a scalpel in RPMI 1640 medium containing 2% foetal calf serum (FCS) and 120 µg/ml gentamicin (washing medium). Then, cell suspensions were prepared by mechanical disruption of tissue with forceps and sieving cells through a nylon mesh. Erythrocytes were lysed by hypotonic treatment. Finally, cells were resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 5 × 10<sup>-5</sup> 2-mercaptoethanol and 50 µg/ml gentamicin (complete medium). All experiments were performed with fresh cells. The reported experiments have

been executed in full compliance with guidelines of ethical and animal welfare committees of the Institute.

### 2.2. Antibodies

Monoclonal antibodies to CD163 (2A10/11, IgG<sub>1</sub>), CD169 (1F1, IgG<sub>2a</sub>), Siglec-3 (5D5, IgG1), Siglec-5 (4F7, IgG1) and isotype controls 1D9 (IgG2a) and 4B9 (IgG1) were produced in our laboratory. MAb to PRRS virus nucleoprotein (1CH5, IgG<sub>2b</sub>) was purchased from Ingenasa (Spain) and labelled with Alexa Fluor 488 dye following the manufacturer's protocol (Molecular Probes, USA). MAb to PRRS virus nucleoprotein (SDWO-17A, IgG<sub>1</sub>) was purchased from Rural Technologies, Inc., USA.

Rabbit polyclonal antibodies (PAb) to porcine Siglec-3 and Siglec-5 were obtained by immunization with 200 µg of soluble recombinant proteins consisting in the extracellular domains of the corresponding receptor fused to the Fc portion of human IgG1, emulsified with complete Freund's adjuvant. Recombinant Siglec-3-Fc and Siglec-5-Fc proteins were purified by affinity chromatography, from culture supernatants of transfected CHO cells stably expressing these constructs, using a column of Sepharose 4 Fast Flow coupled with a llama antibody fragment recognizing human IgG (CaptureSelected human Fc, BAC's, Holland), as previously described (Escalona et al., 2014; Alvarez et al., 2015). Rabbits were boosted with the same amount of protein in Freund's incomplete adjuvant at days 21, 42 and 63 after the first immunization. Sera from immunized rabbits were collected 7–10 days after last boost, and the specificity of polyclonal antibodies was verified by flow cytometry using transfected and non-transfected CHO cells (Supplementary Figure 1).

### 2.3. Sorting of spleen CD163<sup>+</sup> macrophages

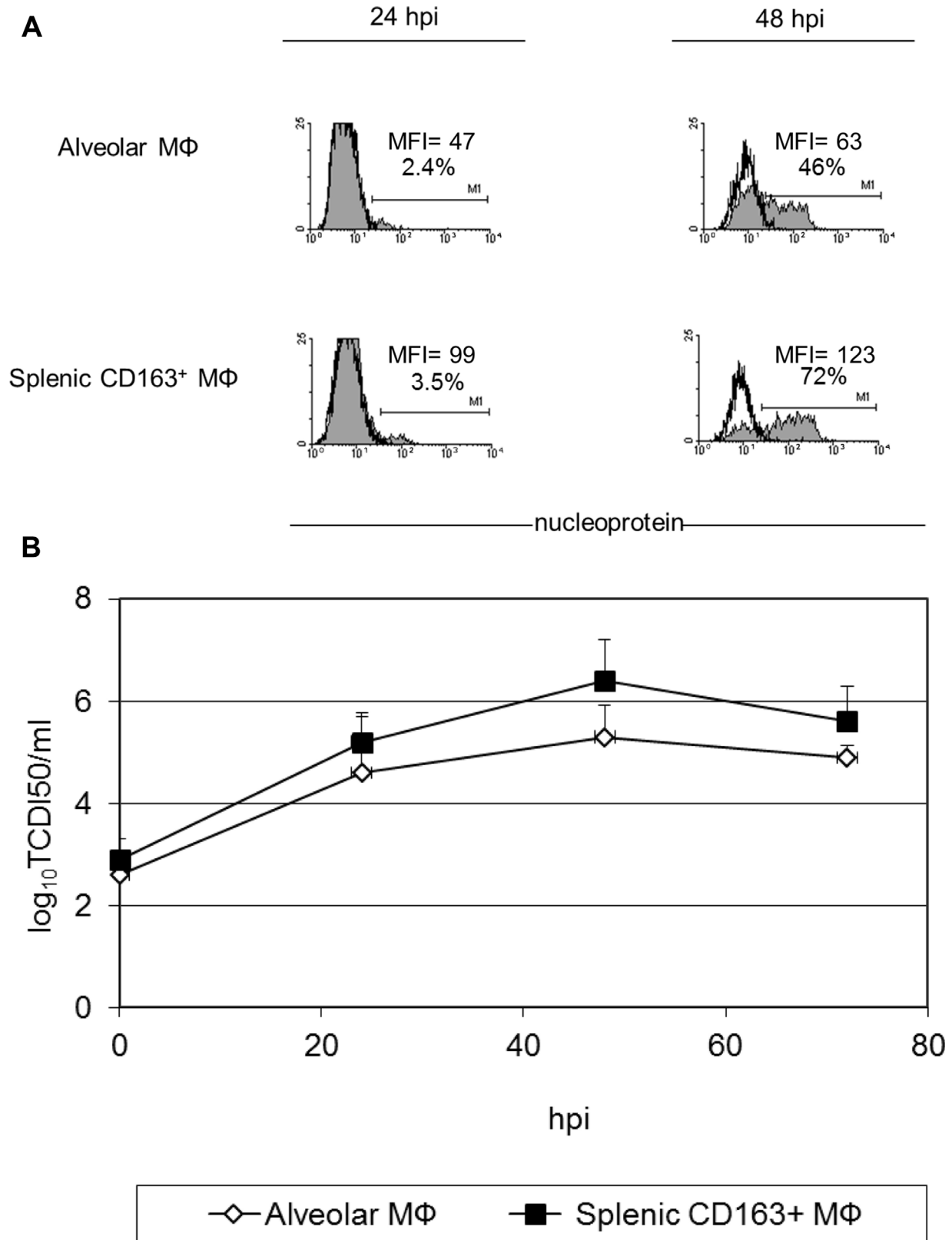
Cell suspensions from spleen were incubated 30 min with mAb 2A10/11, washed 3 times with PBS containing 5% FCS and 2 mM EDTA and incubated with microbeads conjugated to goat F(ab')<sub>2</sub> fragments anti-mouse IgG (H + L) (Miltenyi Biotec, USA) for 15 min. Then, they were washed once and passed through the AutoMACS cell sorter (Miltenyi Biotec, USA) to collect magnetically labelled CD163<sup>+</sup> macrophages. All incubations were performed at 4 °C. Isolated cells showed a purity ≥85% when analysed by flow cytometry.

### 2.4. Virus

PRRS virus Type 1 isolate 5710 was grown in swine alveolar macrophages as previously reported (Suárez et al., 1994). After three cycles of freezing and thawing, cell debris was removed by centrifugation at 600g for 15 min at 4 °C and the supernatant containing virus was frozen and stored at –80 °C. Virus titrations were performed on porcine alveolar macrophages from two different animals and titres were calculated and expressed as TCID<sub>50</sub>/ml. For labelling with biotin, virus was grown in MARC-145 cells, purified by ultracentrifugation and labelled with biotin following the protocol described by Duan et al. (1998) and Delputte and Nauwynck (2004).

### 2.5. Virus inoculation and cell collection

Alveolar and spleen CD163<sup>+</sup> macrophages were cultured 18 h at 5 × 10<sup>5</sup> cells in 500 µl of complete medium in 48 well plates. Then, medium was removed and cells were inoculated with PRRS virus at an m.o.i. of 0.5 for 1.5 h at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, virus was removed and cells were washed with complete medium and further incubated with 500 µl of this



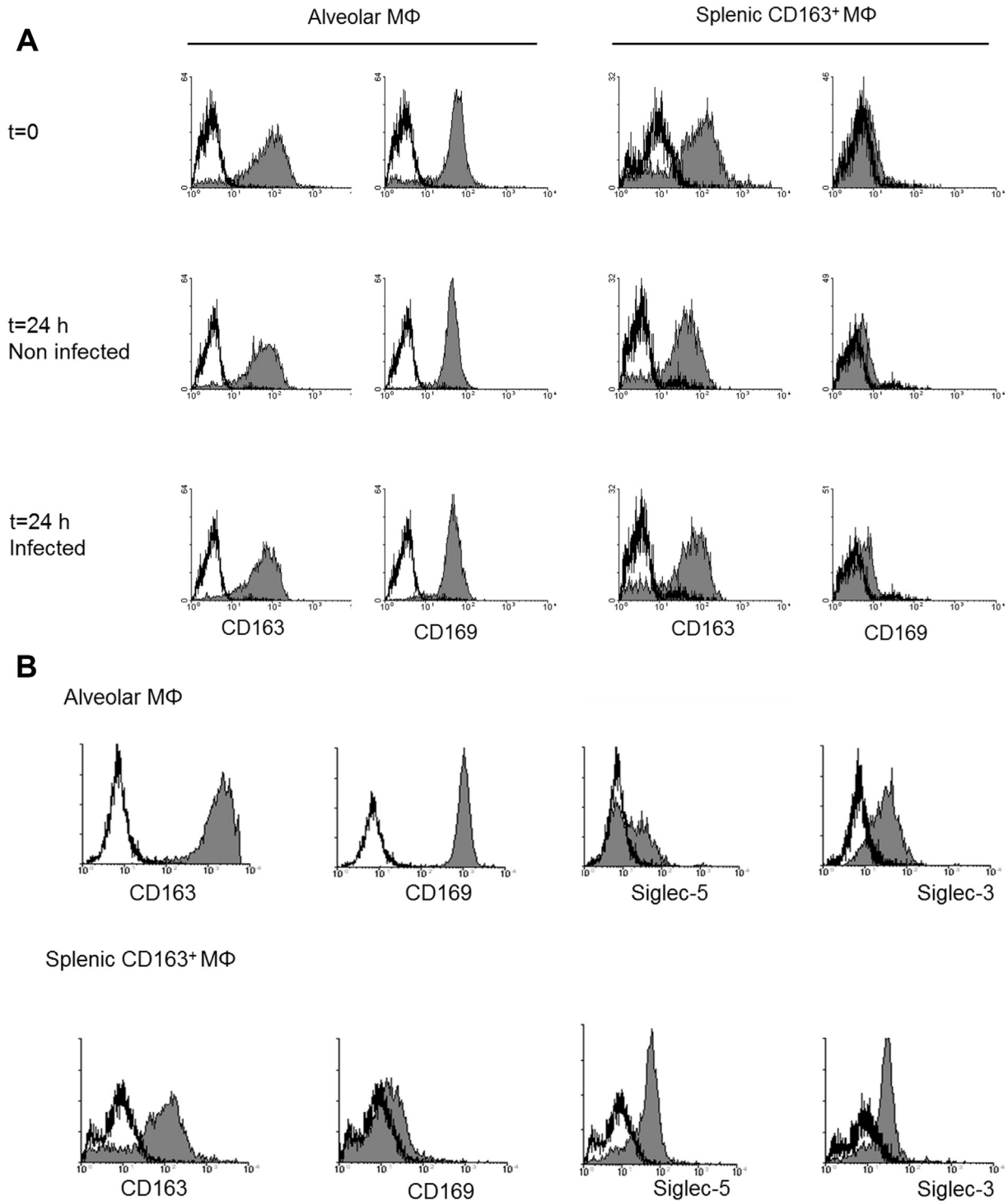
**Fig. 1.** (A) Detection by flow cytometry of PRRS virus nucleoprotein in alveolar macrophages and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages. Cells were infected and stained with Alexa488-labelled 1CH5 mAb for detection of the virus nucleoprotein. Grey histograms correspond to virus infected cells and open histograms to mock infected cells. Results shown are representative of at least three independent experiments. (B) Time course of PRRS virus replication in alveolar macrophages and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages. Cells were inoculated and virus titres determined at 0, 24, 48 and 72 hpi on alveolar macrophages obtained from two different animals, as described in Materials and Methods. Results shown are representative of three independent experiments.

medium. For flow cytometric analysis, cells were harvested at 0, 24, and 48 hpi. Mock infected cells were used as controls.

### 2.6. Flow cytometric analysis

For single-color staining, cells were incubated with hybridoma supernatants for 20 min at 4 °C. After two washes with PBS

containing 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide (fluorescence buffer), cells were incubated with PE-conjugated rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse Ig (Dako, Denmark). Subsequently, cells were washed twice and fixed in 0.1% formaldehyde prior to analysis in the cytometer. Irrelevant isotype-matched mAbs were used as controls.



**Fig. 2.** (A) Analysis of the expression of CD163 and CD169 in alveolar macrophages and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages at different times throughout the infection with PRRS virus. Cells were cultured overnight before adding the virus (t = 0). Virus was added at an m.o.i. of 0.5, and cells harvested at 24 hpi. Then, they were stained with anti-CD163, anti-CD169 or an irrelevant control mAb. These results are representative of four independent experiments. (B) Alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages show different patterns of expression of CD169, Siglec-5 and Siglec-3. Cells were incubated with anti-CD163, anti-CD169, anti-Siglec-5, anti-Siglec-3 (grey histograms) or an irrelevant control mAbs (open histograms). Results are representative of at least four independent experiments.

For detection of the viral nucleoprotein, cells were permeabilized with methanol for 15 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  and washed with fluorescence buffer. Then, they were incubated with the anti-PRRS virus nucleoprotein 1CH5 mAb labelled with Alexa 488 at  $4^{\circ}\text{C}$ . Finally, cells were washed and analysed in the cytometer. An irrelevant isotype-matched mAb labelled with Alexa 488 was used as control.

For two-colour staining, cells were incubated with anti-CD163 or anti-CD169 mAbs for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . They were washed twice with fluorescence buffer followed by APC-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> or IgG<sub>2a</sub> antibodies respectively (Southern Biotech, USA). After two washes, normal mouse serum was added and incubated for 15 min at room temperature. Cells were washed once and permeabilized with methanol for 15 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Afterwards, they were washed and incubated with the anti-PRRS virus nucleoprotein 1CH5 mAb labelled with Alexa 488. Cells were analysed in the cytometer. Irrelevant isotype matched mAbs unlabelled or labelled with Alexa 488 were used as controls.

### 2.7. Detection of PRRS virus binding to Siglec-3 and -5 by ELISA

Polysorp microtiter plates (Nunc-Thermo Scientific), coated with goat anti-human Fc IgG (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), were incubated with different concentrations of Siglec-3-Fc, Siglec-5-Fc or a recombinant protein consisting in the four N-terminal domains of sialoadhesin (Sn4D) fused to the Fc portion of human IgG<sub>1</sub> (Alvarez et al., 2015; Escalona et al., 2014). Human IgG was used as control (Invitrogen, USA). After washing, plates were incubated with biotinylated PRRS virus (1  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) followed by streptavidin-peroxidase (BioRad, USA). 1,2 O-phenylen-diamine (Sigma Biotech, USA) was used as peroxidase substrate. Colour was measured at 492 nm.

### 2.8. Antibody blocking assays

To analyse the role of Siglec-3 and Siglec-5 in the binding of PRRS virus to macrophages, cells ( $10^5$ ) were preincubated 30 min

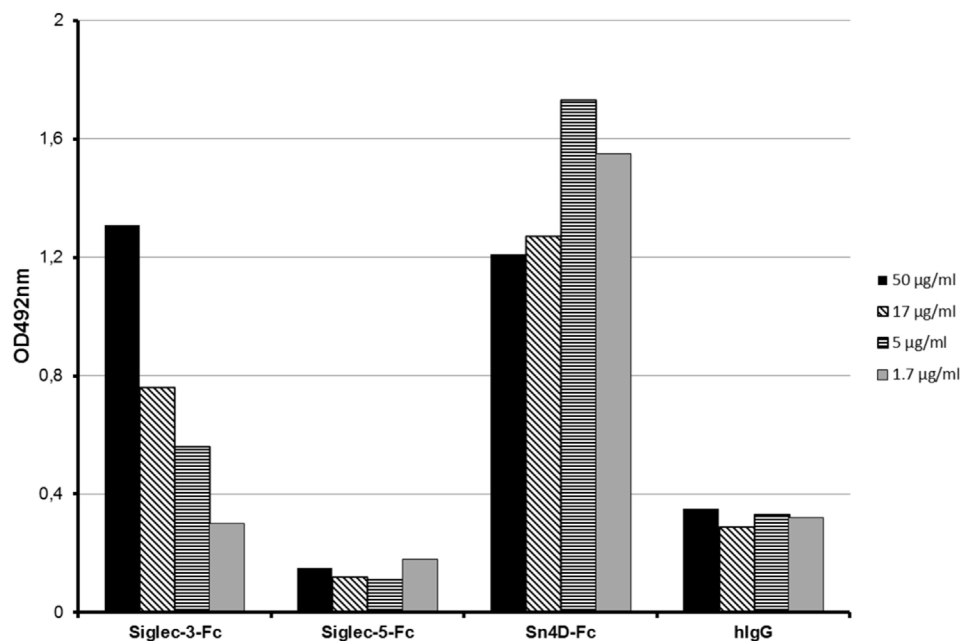
at  $4^{\circ}\text{C}$  with 50  $\mu\text{l}$  of mAbs to CD169, Siglec-3 or Siglec-5 at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or with 50  $\mu\text{l}$  of a 1/50 dilution of polyclonal antibodies to Siglec-3 or Siglec-5. Thereafter, without washing, biotinylated PRRS virus (1  $\mu\text{g}$ ) was added and incubated for 1 h. After washing, cells were incubated with streptavidin-PE, washed and analysed by flow cytometry. Isotype matched irrelevant mAbs or normal rabbit serum were used as negative controls.

In other set of experiments alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages ( $3 \times 10^5$ ) were plated on cover slides and preincubated 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with 150  $\mu\text{l}$  of mAb to CD169, Siglec-3, Siglec-5 at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or with 150  $\mu\text{l}$  of a 1/50 dilution of polyclonal antibodies to Siglec-3 or Siglec-5. Thereafter, cells were inoculated with PRRS virus at an m.o.i. of 0.03. After 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  cells were washed to remove unbound virus and incubated 18 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Then, in order to determine the percentage of infected cells, they were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% TritonX-100 and stained with anti-PRRS virus nucleoprotein SDOW-17A mAb, followed by Alexa488-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> (Southern Biotech, USA). Isotype matched irrelevant mAbs or normal rabbit serum were used as negative controls. Nuclei were stained with DAPI (Supplementary figure 2). At least 1000 cells were counted. Data are expressed as number of infected cells per 1000 cells counted.

## 3. Results

### 3.1. Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages are susceptible to PRRS virus infection and support efficiently the replication of the virus

We compared the susceptibility of alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages to PRRS virus infection (Fig. 1A). Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages were isolated by magnetic sorter and infected along with alveolar macrophages from the same individuals with the isolate 5710 at an m.o.i. 0.5. The infection was monitored by analysing the expression of the PRRS virus nucleoprotein by flow cytometry at 0, 24 and 48 hpi. At 24 hpi, the virus nucleoprotein was already detected in a low number (2%–6%) of alveolar and



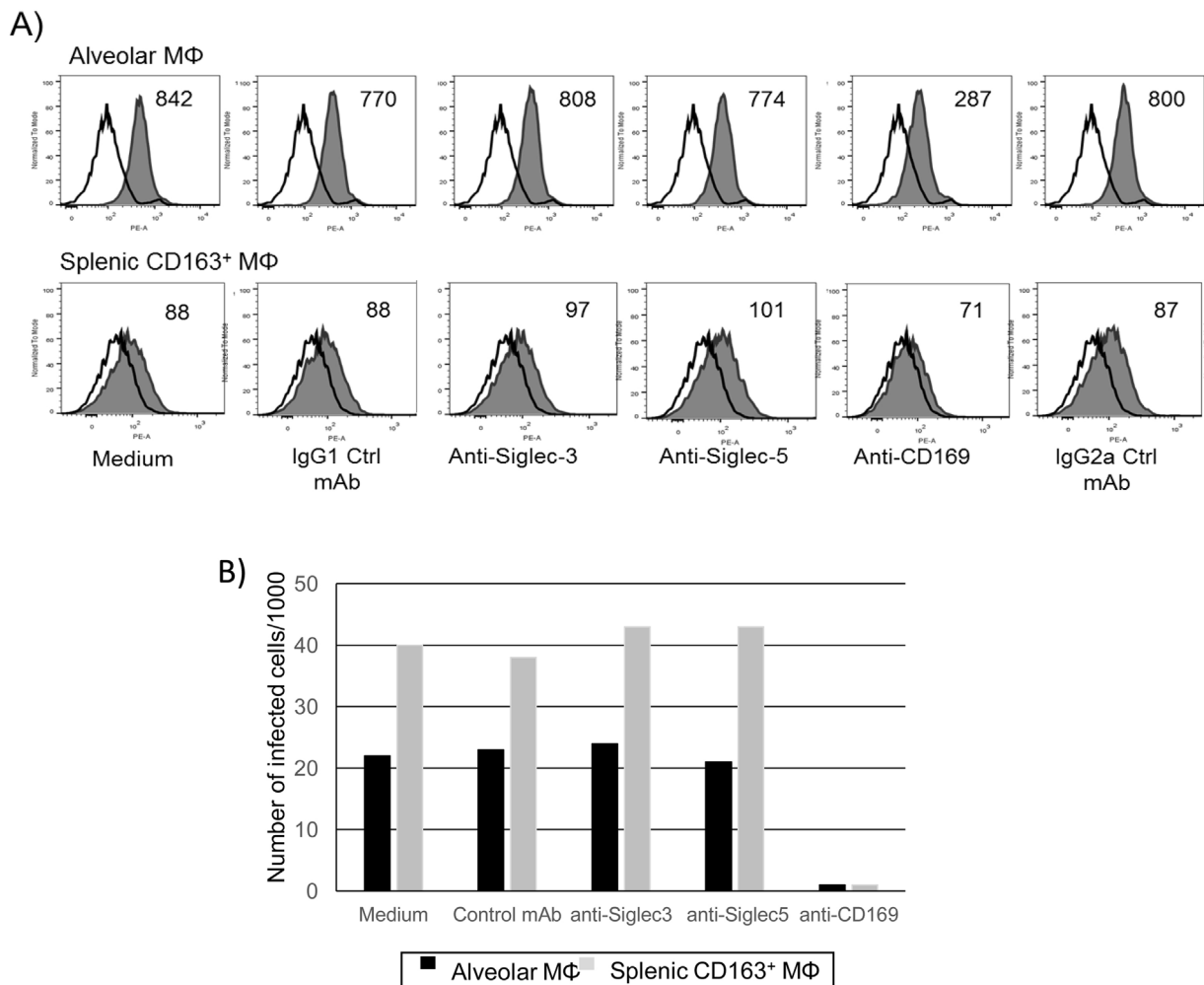
**Fig. 3.** Binding of PRRS virus to Siglec-3 and Siglec-5. ELISA plates, coated with goat anti-human Fc IgG, were incubated with different concentrations of recombinant proteins consisting in the extracellular regions of porcine Siglec-3, Siglec-5 or the four N-terminal domains of sialoadhesin (Sn4D) fused to the Fc portion of human IgG<sub>1</sub>. Human IgG was used as control. After washing, plates were incubated with biotinylated PRRS virus followed by streptavidin-peroxidase. Colour was measured at 492 nm. Results of a representative experiment of at least three independently performed are shown.

CD163<sup>+</sup> macrophages. Between 45% and 80% of these cells were positive for the presence of this protein at 48 hpi, being the percentage of CD163<sup>+</sup> macrophages expressing the viral nucleoprotein usually higher than that of alveolar macrophages. In addition, the degree of virus replication in both alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages was determined. At 0, 24, 48 and 72 hpi cell lysates and supernatants from infected cells were mixed and titrated on alveolar macrophages from two different animals (Fig. 1B). At all times analysed, a trend to slightly higher titres in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages than in alveolar macrophages was observed although the differences did not reach statistical significance. At 48 hpi, samples from infected CD163<sup>+</sup> macrophages showed maximum virus titres ( $\approx 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), while virus replication in alveolar macrophages reached titres of  $\approx 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Confirming above results, overt cytopathic effect was observed at 48 hpi in CD163<sup>+</sup> macrophages while in alveolar macrophages it was not seen before 72 hpi (data not shown).

In summary, splenic CD163<sup>+</sup> macrophages are permissive to PRRS virus infection, supporting efficiently the replication of the virus and yielding higher titres than alveolar macrophages.

### 3.2. Expression of CD169, Siglec-3 and Siglec-5 in alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages

Since splenic CD163<sup>+</sup> macrophages are susceptible to PRRS virus infection although they express almost undetectable levels of CD169, we compared the level of CD169 expression before adding the virus and at 24 hpi, to exclude that there was an increase of CD169 expression during culture of cells. As shown in Fig. 2A, no relevant changes in the expression of CD163 or CD169 in alveolar or in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages following the culture or infection of cells were observed. Along the study alveolar macrophages were clearly positive for CD163 and CD169 while splenic CD163<sup>+</sup> macrophages maintained their low expression of CD169.



**Fig. 4.** Effect of mAbs to Siglec-3 and Siglec-5 on PRRS virus binding and infection of alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages. (A) Cells were preincubated with mAbs to CD169, Siglec-3 or Siglec-5 or isotype matched irrelevant mAbs before incubation with biotinylated PRRS virus. After washing, cells were incubated with streptavidin-PE and analysed by flow cytometry. Open histogram corresponds to binding of streptavidin-PE to cells without virus. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured by flow cytometry. Results of a representative experiment of at least three independently performed are shown. (B) Alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages were plated on cover slides and treated with mAbs to CD169, Siglec-3, Siglec-5 or with an irrelevant control mAb. Cells were incubated with PRRS virus at an m.o.i. of 0.03. After 1 h cells were washed to remove unbound virus and cultured for 18 h. Then, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-PRRS virus nucleoprotein mAb SDOW-17A. Nuclei were stained with DAPI. At least 1000 cells were counted. The number of infected cells per 1000 cells counted is represented. Data shown are from a representative experiment out of three performed.

The expression of Siglec-3 and Siglec-5 was also analysed in both alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages. As shown in Fig. 2B alveolar macrophages were Siglec-5<sup>-low</sup>Siglec-3<sup>+</sup> while splenic CD163<sup>+</sup> macrophages clearly expressed both receptors.

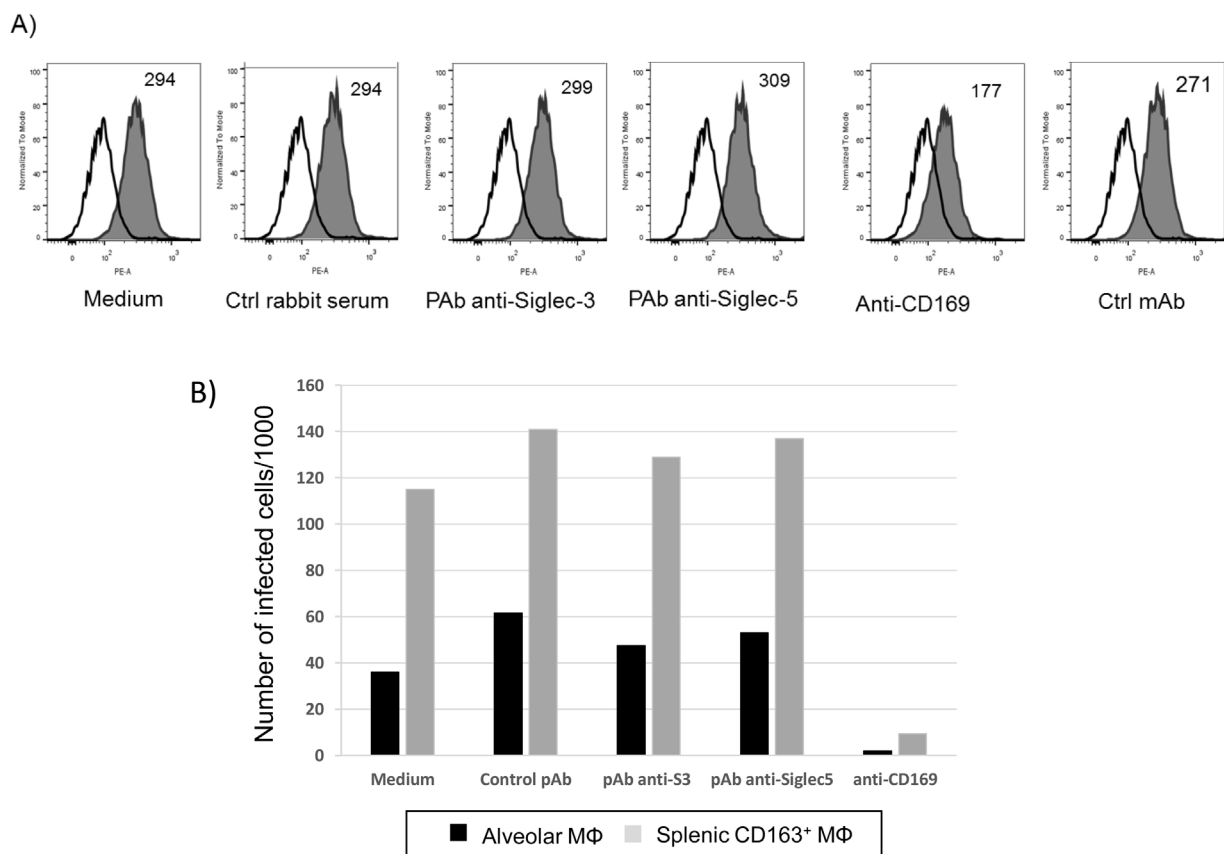
### 3.3. PRRS virus binding to Siglec-3 and Siglec-5

Since splenic CD163<sup>+</sup> macrophages express higher amounts of Siglec-3 and Siglec-5 than of CD169, we evaluated the capacity of these receptors to bind PRRS virus. To this end, we set up a solid phase assay by using soluble recombinant proteins containing the extracellular regions of porcine Siglec-3, Siglec-5 or the four N-terminal domains of CD169 (Sn4D) fused to the Fc portion of human IgG<sub>1</sub> and biotinylated PRRS virus. Human IgG (hIgG) was used as negative control.

The virus bound to both Sn4D and Siglec-3, although the binding to Siglec-3 was less efficient than to Sn4D (Fig. 3). Thus, at 5 µg/ml of Sn4D the amount of virus attached was higher than at 50 µg/ml of Siglec-3. The binding of the virus to Sn4D showed a plateau between 50 and 1.7 µg/ml while in the case of Siglec-3 decreased in a dose-dependent manner, being negative at 1.7 µg/ml. Binding to Siglec-5 was negative in some experiments (as shown in Fig. 3), but some binding could be detected in others (data not shown).

### 3.4. Effect of Siglec-3 and Siglec-5 specific antibodies on PRRS virus binding and infection of macrophages

To test the role of Siglec-3 and Siglec-5 on virus attachment to alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages, these cells were incubated with mAbs to CD169, Siglec-3 and –5 or with isotype control Igs for 30 min at 4 °C, before adding the biotinylated PRRS virus for 1 h at 4 °C. After washing the cells, bound virus was revealed by adding streptavidin-PE and the binding of the virus determined by the mean fluorescence intensity (MFI) associated to cells. A clear reduction in virus binding was observed in alveolar macrophages treated with mAb to CD169 compared to those incubated with control mAb. This reduction was smaller but noticeable in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages. On the contrary, mAbs to Siglec-3 or Siglec-5 did not show any effect on the virus binding to these cells (Fig. 4A). We also analysed if mAbs to Siglec-3 and –5 were able to block macrophage infection by PRRS virus. Alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages were plated on cover slides and incubated 30 min at 37 °C with mAbs to CD169, Siglec-3, or Siglec-5 prior to adding the virus. After 1 h at 37 °C cells were washed to remove unbound virus, cultured for 18 h at 37 °C, and stained with anti-PRRS virus nucleoprotein mAb. As shown in Fig. 4B, whereas mAb to CD169 was able to block the infection of alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages no reduction in the number of infected cells was observed after the treatment with mAbs to Siglec-3 and Siglec-5.



**Fig. 5.** Effect of polyclonal rabbit antibodies (PAb) to Siglec-3 and Siglec-5 on PRRS virus binding and infection of alveolar macrophages. (A) Alveolar macrophages were preincubated with PABs to Siglec-3 or Siglec-5 or with an anti-CD169 mAb before 1 h incubation with biotinylated PRRS virus, followed by streptavidin-PE. Normal rabbit serum and an irrelevant control mAb were used as negative controls. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured by flow cytometry. Open histogram correspond to cells incubated with streptavidin-PE alone. Results are representative of two independent experiments. (B) Alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages were plated on cover slides and preincubated with a control rabbit serum, with PABs to Siglec-3, Siglec-5, or with an anti-CD169 mAb. Thereafter, cells were inoculated with PRRS virus at an m.o.i. of 0.03. After 1 h cells were washed to remove unbound virus and incubated 18 h. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-PRRS virus nucleoprotein mAb SDOW-17A. Nuclei were stained with DAPI. At least 1000 cells were counted. Data represent the number of infected cells per 1000 cells counted. Results are representative of two independent experiments.

These data suggest that Siglec-3 and Siglec-5 do not contribute to the process of attachment and replication of PRRS virus into these macrophages. To exclude that the failure of mAbs to Siglec-3 and Siglec-5 to block PRRS virus infection may be due to that they did not recognize the epitopes involved in virus binding, additional experiments were carried out with rabbit polyclonal antibodies to Siglec-3 and Siglec-5 (Fig. 5). As previously observed, mAb to CD169 inhibited the binding of virus to alveolar macrophages when compared to control mAb. By contrast, polyclonal antibodies to Siglec-3 and Siglec-5 did not show any effect on the binding (Fig. 5A). Likewise, while mAb to CD169 strongly blocked the infection of alveolar and splenic CD163<sup>+</sup> macrophages polyclonal antibodies to Siglec-3 and Siglec-5 did not show any appreciable effect (Fig. 5B).

#### 4. Discussion

In addition to alveolar macrophages, their primary targets, PRRS virus also infects macrophages in several lymphoid organs. However data on the characteristics of macrophage populations infected by the virus in these organs are scarce. Viral replication in spleen during PRRS virus acute infection has been proved both by virus isolation and viral RNA detection (Xiao et al., 2004; Martínez-Lobo et al., 2011). In the present study we show that splenic CD163<sup>+</sup> macrophages efficiently support PRRS virus replication, yielding titres even higher than alveolar macrophages. As these cells have been shown to phagocytose microparticles and process and present antigen to CD4<sup>+</sup> T cells in a secondary *in vitro* response (Poderoso et al., 2011), their infection could contribute to the delayed cellular immune response found in the animals infected by the PRRS virus (López-Fuertes et al., 2000; Xiao et al., 2004). Besides, the replication of PRRS virus in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages may also facilitate virus spreading to other tissues, as it has been reported for other viruses which infect spleen red pulp macrophages such as dengue virus (Prestwood et al., 2012).

Sialic acids on the virion surface are crucial for PRRS virus attachment to and infection of alveolar macrophages “*in vitro*”. Using broad specificity and more linkage-specific sialidases and lectins, Delputte and Nauwynck showed that  $\alpha$ 2-3 and, at lesser extent,  $\alpha$ 2-6 linked sialic acids are important for infection. Several *in vitro* studies have shown that CD169 play a major role in PRRS virus binding and internalization into alveolar macrophages, which depends on its sialic acid binding activity (Delputte and Nauwynck, 2004). However, *in vivo* studies with CD169 gene knock-out pigs indicated that this receptor is not essential for PRRS virus infection (Prather et al., 2013). This raises the possibility that other sialic acid binding receptors expressed on macrophages may have a role in the binding of virus. Although siglecs show an overlapping in the recognition of sialosides, each one has a characteristic specificity profile. In humans CD169 mainly recognizes  $\alpha$ 2-3 linked sialic acids, whereas Siglec-3 and Siglec-5 bind preferentially sialic acid residues containing  $\alpha$ 2-6 linkages, although they differ in their fine specificities for the underlying glycans (Macauley et al., 2014). This makes their porcine orthologues potential candidates for PRRS virus binding. In fact, preferential binding for  $\alpha$ 2-6 linked sialic acids has also been shown for porcine Siglec-3 while the specificity of porcine Siglec-5 remains to be determined (Escalona et al., 2014; Alvarez et al., 2015).

Splenic CD163<sup>+</sup> macrophages express almost undetectable CD169 amounts and higher levels of Siglec-3 and Siglec-5, and therefore we considered they could be a suitable population for evaluating the role of these siglecs in macrophage infection. In fact, binding of PRRS virus to Siglec-3 but not to Siglec-5 could be detected in a solid-phase assay although it appears to be of lower affinity compared to CD169.

In agreement with previous studies, results from blocking experiments in alveolar macrophages with specific antibodies against these siglecs show a major role of CD169 in the binding and internalization of PRRS virus, with an almost complete inhibition of the infection (Delputte et al., 2004). Surprisingly, a similar effect was found in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages, indicating a prevailing role of CD169 in the entry of virus into these cells even when it is expressed at very low levels. On the other hand, no reduction either in binding or infection was observed after the treatment with antibodies to Siglec-3 and Siglec-5 excluding an involvement of these siglecs in these processes, at least in the presence of CD169.

The failure to detect binding of PRRS virus to Siglec-3 in the macrophage surface, in contrast to that seen in solid-phase assays, could be due to the masking of Siglec-3 by *cis* interactions with sialoglycoconjugates expressed on the same cell (Pillai et al., 2012). In this regard, treatment of alveolar macrophages with sialidase, eliminating *cis* interactions, has been shown to improve PRRS virus infection (Delputte and Nauwynck, 2004). On the other hand, the stronger binding of CD169 to the virus observed in solid-phase assays as well as its larger size (17 Ig-like domains vs 2 Ig-like domains in Siglec-3), that allows it to extend its sialic acid binding domain away from the surface glycoalkal avoiding interactions with *cis* ligands may contribute to its prevailing role.

In conclusion, we have demonstrated that PRRS virus replicates efficiently in splenic CD163<sup>+</sup> macrophages, yielding even higher titres than in alveolar macrophages. Our results also show that very low levels of CD169 expression are enough to support the attachment and internalization of this virus into macrophages, whereas Siglec-3 and Siglec-5 do not seem to contribute to the virus entry in these cells.

#### Acknowledgements

We thank Elena Ramos and Paloma Martínez de la Riva for technical assistance. Teresa Fernández-Caballero was supported by an FPI doctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain. This work was supported by grants RTA2011-00012-00-00 and AGL2012-31556 from INIA and Ministry of Economy and Competitiveness of Spain, respectively.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.004>.

#### References

- Alvarez, B., Martínez, P., Yuste, M., Poderoso, T., Alonso, F., Domínguez, J., Ezquerro, A., Revilla, C., 2014. Phenotypic and functional heterogeneity of CD169<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages from porcine lymph nodes and spleen. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 44–49.
- Alvarez, B., Escalona, Z., Uenishi, H., Toki, D., Revilla, C., Yuste, M., Del Moral, M.G., Alonso, F., Ezquerro, A., Domínguez, J., 2015. Molecular and functional characterization of porcine Siglec-3/CD33 and analysis of its expression in blood and tissues. *Dev. Comp. Immunol.* 51, 238–250.
- An, T.Q., Tian, Z.J., He, Y.X., Xiao, Y., Jiang, Y.F., Peng, J.M., Zhou, Y.J., Liu, D., Tong, G.Z., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment is mediated by the N-terminal domain of the sialoadhesin receptor. *Vet. Microbiol.* 143, 371–378.
- Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E., Wege, H., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J. Vet. Med.* 47, 9–25.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 81, 7371–7379.
- Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.* 142, 629–633.
- Chang, H.C., Peng, Y.T., Chang, H.L., Chaung, H.C., Chung, W.B., 2007. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 129, 281–293.

- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J. Virol.* 84, 1731–1740.
- Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2004. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J. Virol.* 78, 8094–8101.
- Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory virus in primary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 179–188.
- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Barbé, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2007a. IFN- $\alpha$  treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 757–766.
- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R., Nauwynck, H.J., 2007b. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic-acid binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J. Virol.* 81, 9546–9550.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9–19.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 72, 4520–4523.
- Escalona, Z., Alvarez, B., Uenishi, H., Toki, D., Yuste, M., Revilla, C., Gómez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerro, A., Domínguez, J., 2014. Molecular characterization and expression of porcine Siglec-5. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 206–2016.
- Ezquerro, A., Revilla, C., Alvarez, B., Pérez, C., Alonso, F., Domínguez, J., 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 284–298.
- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Resendiz, M., Osorio, F.A., Hernández, J., 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 720–725.
- Kim, J.K., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477–483 ç.
- López-Fuertes, L., Campos, E., Doménech, N., Ezquerro, A., Castro, J.M., Domínguez, J., Alonso, F., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- $\alpha$  production in infected macrophages. *Virus Res.* 69, 41–46.
- Macauley, M.S., Crocker, P.R., Paulson, J.C., 2014. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 653–666.
- Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2011. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS* 6, e16320.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C., 2011. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet. Microbiol.* 154, 58–68.
- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 385–392.
- Pillai, S., Netravali, I.A., Cariappa, A., Mattoo, H., 2012. Siglecs and immune regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 357–392.
- Poderoso, T., Martínez, P., Alvarez, B., Handler, A., Moreno, S., Alonso, F., Ezquerro, A., Domínguez, J., Revilla, C., 2011. Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. *Vaccine* 29, 4813–4820.
- Prather, R.S., Rowland, R.R., Ewen, C., Tribble, B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J.M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Egen, T., Green, J.A., 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Virol.* 87, 9538–9546.
- Prestwood, T.R., May, M.M., Plummer, E.M., Morar, M.M., Yauch, L.E., Shresta, S., 2012. Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets of dengue virus in mice. *J. Virol.* 86, 12138–12147.
- Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persisting infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* 96, 219–235.
- Sánchez, C., Doménech, N., Vázquez, J., Alonso, F., Ezquerro, A., Domínguez, J., 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J. Immunol.* 162, 5230–5237.
- Suárez, P., Zardoya, R., Prieto, C., Solana, A., Tabarés, E., Bautista, J.M., Castro, J.M., 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135, 89–99.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2943–2953.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207–8215.
- Wang, X., Wei, R., Li, Q., Liu, H., Huang, B., Gao, J., Mu, Y., Wang, C., Hsu, W.H., Hiscox, J.A., Zhou, E.M., 2013. PK-15 cells transfected with porcine CD163 by PiggyBac transposon system are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Meth.* 139, 383–390.
- Whitworth, K.M., Rowland, R.R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuma, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G., Milehan, A.J., Wells, K.D., Prather, R.S., 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.* 34, 20–22.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923–5933.





## Phenotypic and functional characterization of porcine bone marrow monocyte subsets

Teresa Fernández-Caballero <sup>a</sup>, Belén Álvarez <sup>a</sup>, Concepción Revilla <sup>a</sup>, Sara Zaldívar-López <sup>b</sup>, Fernando Alonso <sup>a</sup>, Juan J. Garrido <sup>b</sup>, Ángel Ezquerro <sup>a</sup>, Javier Domínguez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Grupo de Genómica y Mejora Animal, Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 September 2017

Received in revised form

21 November 2017

Accepted 21 November 2017

Available online 23 November 2017

#### Keywords:

Swine

Monocytes

Bone marrow

CD163

### ABSTRACT

Monocytes comprise several subsets with distinct phenotypes and functional capacities. Based on CD163 expression, two major monocyte subsets can be discriminated in the porcine bone marrow. The CD163<sup>+</sup> cells expressed higher levels of SLA-DR, Siglec-1, CD11R1 and CD16 when compared to CD163<sup>-</sup> monocytes, whereas no remarkable differences were observed in the expression of other markers analyzed. Gene expression analysis showed differential expression of several chemokine receptor and TLR genes. Both subsets phagocytosed microspheres with similar efficiency. However, CD163<sup>-</sup> cells tended to produce higher levels of ROS in response to PMA, whereas CD163<sup>+</sup> cells were more efficient in endocytosing and processing antigens (DQ-OVA). CD163<sup>-</sup> monocytes produced higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 than CD163<sup>+</sup> cells when stimulated with LPS or Imiquimod. Both subsets produced similar amounts of IL-8 in response to LPS; however, CD163<sup>+</sup> cells produced more IL-8 after Imiquimod stimulation. Whether these subsets represent different developmental stages, and how are they related remain to be investigated.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Monocytes play important roles in the response to infection, acting as immune sentinels, triggering inflammatory responses and killing a broad variety of microbial pathogens, as well as contributing to the development of adaptive immune responses by picking up antigens in peripheral tissues and transporting them to secondary lymphoid organs (Jakubzick et al., 2013; Leiriao et al., 2012; Serbina et al., 2008). In addition, they can differentiate under certain conditions, i.e. inflammation, into macrophages or DCs (Epelman et al., 2014; Vu Manh et al., 2015).

Blood monocytes comprise several subsets with distinct phenotypes and functional capacities. In humans, two monocyte populations were initially identified based on the expression of CD14 and CD16: a major population with high CD14 but no CD16 expression (CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>-</sup>), called 'classical' monocytes, and a

minor population of CD16-positive monocytes, which has been further subdivided into CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>+</sup> intermediate monocytes and CD14<sup>lo</sup> CD16<sup>+</sup> non-classical monocytes (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). In mice, classical monocytes have been defined as Ly6C<sup>hi</sup> CD43<sup>lo</sup>, intermediate monocytes as Ly6C<sup>hi</sup> CD43<sup>hi</sup> and non-classical monocytes as Ly6C<sup>lo</sup> CD43<sup>hi</sup>. Human and mouse subsets share similarities in their functional features suggesting evolutionary conservation of monocyte heterogeneity. In both species, classical monocytes, express high levels of CCR2 and low levels of CX3CR1 and are CD62L<sup>+</sup>, whereas non-classical monocytes express low levels of CCR2 and high levels of CX3CR1, and are CD62L<sup>-</sup> (Geissmann et al., 2003; Palframan et al., 2001; Tacke and Randolph, 2006). Classical monocytes are rapidly recruited to sites of inflammation and sites of tissue remodeling, where, following extravasation, they can differentiate into macrophages or DCs (Ginhoux and Jung, 2014). Non-classical monocytes survey the integrity of vasculature, clearing damaged endothelial cells (Auffray et al., 2007), and can respond to viral stimulation through TLR7/TLR8 receptors, producing inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) (Cros et al., 2010).

Monocytes are continuously generated in the bone marrow (BM) from hematopoietic stem cells through a series of developmental stages, under the influence of M-CSF and GM-CSF growth

Abbreviations: BM, bone marrow; cMoP, committed monocyte progenitor; DQ-OVA, DQ<sup>TA</sup>-ovalbumin; DCF, 2' 7' dichlorofluorescein; MFI, median fluorescence intensity; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ROS, reactive oxygen species.

\* Corresponding author. Dpto. de Biotecnología, INIA, Ctra. de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: [juncal@inia.es](mailto:juncal@inia.es) (J. Domínguez).

factors, the latter particularly under inflammatory conditions (Ginhoux and Jung, 2014; Lenzo et al., 2012). In the mouse, these stages include the common myeloid progenitor, the granulocyte-macrophage progenitor, the common macrophage dendritic cell progenitor and finally the committed monocyte progenitor (cMoP) (Hettinger et al., 2013). Adoptive transfer experiments have shown that cMoP can give rise to both Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo</sup> monocytes, although with distinct kinetics (Hettinger et al., 2013). According to this and other studies a developmental model has been proposed in which Ly6C<sup>hi</sup> monocytes differentiate, under steady-state conditions, into Ly6C<sup>lo</sup> monocytes (Ginhoux and Jung, 2014; Sunderkotter et al., 2004; Yona et al., 2013). However, whether Ly6C<sup>lo</sup> blood monocytes differentiate from Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in circulation or derive from BM Ly6C<sup>lo</sup> monocytes is not yet clear. Both subsets are found in the BM. While egress of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from the BM has been shown to be dependent on CCR2 (Serbina and Pamer, 2006), that of Ly6C<sup>lo</sup> monocytes is still poorly defined.

In the swine we, and others, have characterized two major blood monocyte populations, which display features that resemble those of human and mouse subpopulations, based on the expression of CD163. According to the expression of chemokine receptors and other surface markers, the pattern of cytokine production, the accessory cell capacity, etc; the porcine CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> monocytes appear to correspond to human CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>-</sup> and CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes, respectively (Chamorro et al., 2005; Fairbairn et al., 2013; Moreno et al., 2010; Ondrackova et al., 2013a; Sanchez et al., 1999).

Two major monocyte subpopulations, CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup>, have also been identified in porcine BM (Ezquerria et al., 2009). Although these subsets have been shown to change after infections with *Salmonella enteritidis* or *Actinobacillus pleuropneumoniae*, with an increase of the CD163<sup>+</sup> population (Ondrackova et al., 2013a, 2013b), data on their phenotype and function are scarce. In the present study we have carried out a comparative analysis of phenotype and functional capacities of porcine CD163<sup>+</sup> and CD163<sup>-</sup> BM monocyte populations.

## 2. Material & methods

### 2.1. Animals and cells

Tissue samples were obtained from 15 healthy, conventionally reared, 3 to 6-week-old Large-White pigs that had been anesthetized with sodium pentobarbital (0.3 gr/Kg), and euthanized by exsanguination.

BM cells were isolated from femurs and tibias by flushing with PBS containing 2 mM EDTA, 2%FCS and 150 µg/ml gentamicin, using a 20 ml syringe with an 18-g needle. These cells were washed twice and resuspended in 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.3 for 5 min with gentle shaking to lyse red blood cells. When required, mature granulocytes were removed by centrifugation over a discontinuous 53% Percoll gradient. Remaining cells were then resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol and 50 µg/ml gentamicin (complete medium).

Alveolar macrophages were collected by bronchoalveolar lavage and used as controls in phagocytosis, oxidative burst and antigen processing assays. Briefly, the bronchoalveolar space was lavaged three times with 100 ml of PBS containing 2 mM EDTA, 0.1% glucose and 150 µg/ml gentamicin. Cells were washed twice in the same buffer and resuspended in complete medium.

The reported experiments have been executed in full compliance with guidelines by the ethical and animal welfare committees of the Institute.

### 2.2. Antibodies

The mAbs used in this study are listed in Table 1. Isotype-matched mAbs raised against irrelevant (non-porcine) antigens were used as negative controls. The mAbs 2A10/11 to CD163, and 74-22-15a to CD172a, as well as the corresponding isotype-matched control antibodies, were purified by affinity chromatography on protein G–Sepharose CL4B (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and labeled with biotin or Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR), respectively, using standard protocols.

### 2.3. Flow cytometry

BM cells were stained with Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (TermoFisher, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's protocol. After a washing step with PBS, cells (5 × 10<sup>5</sup>) were incubated with mAbs to different surface antigens for 30 min at 4 °C. After two washes in fluorescence buffer (PBS containing 0.1% BSA and 0.01% sodium azide), cells were incubated for 30 min at 4 °C with APC-conjugated goat anti-mouse Igs (Dako, Glostrup, Denmark). Cells were washed and free binding sites were blocked with 10% normal mouse serum for 10 min. Then, anti-CD163 mAb labeled with Alexa 488, and anti-CD172a mAb (BA1C11, IgG1) labeled with biotin were added and incubated for 30 min. After three washes, the biotinylated antibodies were detected using streptavidin–PercP (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Cells were washed twice and fixed in 0.1% formaldehyde prior to analysis in a FASCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Data of at least 130,000 cells were acquired. Doublets were excluded using FSC-A versus FSC-H plots. Data were analyzed using FlowJo software. Irrelevant isotype-matched mAbs, unlabeled and labeled with biotin or Alexa 488, were used as negative controls.

### 2.4. Sorting of monocyte subsets

BM cells were incubated with anti-CD172a mAb 74-22-15a (IgG2b) and anti-CD163 mAb 2A10 (IgG1) for 20 min at 4 °C. After washing, cells were incubated with PE-conjugated goat anti-mouse IgG2b and APC-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), for 20 min at 4 °C. After a final wash, cells were filtered through a 70 µm nylon strainer (Thermofisher, USA) for removal of cell clumps, prior to sorting. Dead cell were

**Table 1**  
mAbs used in this study.

Specificity	Clone	Isotype	Source
CD8α	76-2-11	IgG2a	J. Lunney, ARS, USDA
CD11a	BL2F1	IgG2b	In house, INIA
CD11R1	MIL-4	IgG1	K. Haverson, Univ Bristol, UK
CD11R3	2F4/11	IgG1	In house, INIA
CD14	MIL-2	IgG2b	AbD-Serotec, UK
CD16	G7	IgG1	AbD-Serotec, UK
CD18	BA3H2	IgG1	In house, INIA
CD115	ROS8G11	IgG2a	AbD-Serotec, UK
CD163	2A10/11	IgG1	In house, INIA
CD172a	BA1C11	IgG1	In house, INIA
CD172a	74-22-15a	IgG2b	J. Lunney, ARS, USDA
CD203a	PM18-7	IgG1	AbD-Serotec, UK
SWC8	MIL-3	IgM	K. Haverson, Univ Bristol, UK
TLR2	1H11	IgG1	In house, INIA
TLR4	3H3	IgM	In house, INIA
Siglec-1/CD169	1F1	IgG2a	In house, INIA
Siglec-3/CD33	5D5	IgG1	In house, INIA
Siglec-5	4F7	IgG1	In house, INIA
Siglec-10	2E9	IgG1	In house, INIA
SLA-DR	1F12	IgG2b	In house, INIA
Neutrophil	6D10	IgG2a	In house, INIA

excluded with SYTOX blue dead cell stain (Life Technologies) and non-specific binding was evaluated using isotype-matched control mAbs. Granulocytes were excluded based on characteristic FSC and SSC profiles. SSC<sup>lo</sup> CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> cells were sorted simultaneously using a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA) and collected in complete medium containing 20% FCS and 2 mM EDTA. Purity of the separated populations was higher than 95%.

### 2.5. Morphological analysis

Sorted CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> cells were centrifuged on microscope slides (Superfrost, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) at 80 × g during 4 min using a Shandon centrifuge (Cytospin 3). Cytospin preparations were fixed by treatment with cold methanol for 10 min, and then stained with May-Grünwald-Giemsa dye. Slides were examined on a Leica DMLB microscope (Germany), using a 40x objective.

### 2.6. Phagocytosis and DQ<sup>TM</sup> ovalbumin processing assays

The ability of monocytes and macrophages to ingest particulate antigens was analyzed using 0.02 μm Crimson fluorescent carboxylate-modified polystyrene microspheres (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), whereas their capacity to take up and process soluble antigens was analyzed with DQ<sup>TM</sup> Ovalbumin (DQ-OVA) (ThermoFisher, USA). Briefly, 5 × 10<sup>5</sup> cells were suspended in 200 μl of RPMI in 96 Microwell plates (Nunc, Denmark), and placed on ice for 10 min prior to adding 10<sup>5</sup> microspheres/cell or 1 μg/ml DQ-OVA. Controls were incubated on ice and samples at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, for 1 h. Then, cells were washed 3 times with cold PBS and stained with mAbs to CD172a and CD163 as described for sorting assays. Afterwards, incubation with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG2b and PE-conjugated goat anti-mouse IgG1 in phagocytosis assays was performed; whereas for DQ-OVA assays, PE-Cy7-conjugated goat anti-mouse IgG2b and APC-conjugated goat anti-mouse IgG1 were used. In some experiments controls to check the absence of granulocytes in the monocyte-gated regions were done, incubating some tubes with anti-SWC8 mAb MIL3 (IgM), followed by PerCP-conjugated goat anti-mouse IgM. Phagocytosis and protein processing capacities were determined by the median fluorescence intensity (MFI) of gated monocyte subsets (n = 4 animals for phagocytosis experiments, and n = 5 for DQ-OVA assays).

### 2.7. Oxidative burst

Oxidative burst of cells was determined by flow cytometry using dihydrodichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) as described previously (Perez et al., 2007). Briefly, cells (5 × 10<sup>5</sup>) were first labeled with anti-CD172 mAb 74-22-15 (IgG2b) and anti-CD163 mAb 2A10 (IgG1) followed by PE-Cy7-conjugated goat anti-mouse IgG2b and APC-conjugated goat anti-mouse IgG1, using fluorescence buffer without azide, and then incubated with 1 μM DCF in HEPES-buffered saline (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.3) for 5 min at 37 °C. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, MO, USA) was next added at 10 ng/ml and cells were further incubated for 7 min at 37 °C. The green fluorescence of oxidized DCF (2', 7'-dichlorofluorescein) was analyzed in the BD FACSCanto<sup>TM</sup> II cytometer (Becton Dickinson, CA, USA). The relative amount of generated reactive oxygen species (ROS) was determined by the median fluorescence intensity of gated monocyte subsets (n = 4 animals).

### 2.8. Cytokine production

Sorted monocytes were plated at a concentration of 6.25 × 10<sup>5</sup>/ml in 48-well plates, and stimulated with different TLR agonists: LPS (1 μg/mL, E. Coli O55:B5, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), CpG/ODN2216 (10 μg/mL, InvivoGen, Toulouse, France) or Imiquimod (10 μg/mL, InvivoGen). Other wells with no stimulus (only complete medium) were used as negative controls. After 21 h, supernatants were collected, centrifuged to remove cell debris, and frozen at -80 °C until assessment of cytokine production. Supernatants were analyzed for IL-8, IL-10 and TNF-α cytokine content by using commercial ELISA kits from Invitrogen following manufacturer's instructions. ELISA for IFN-α was performed using monoclonal antibodies K9 and F17 from PBL Interferon Source, as previously described (Borrego et al., 2015).

### 2.9. RNA isolation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

After sorting, BM CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup> monocytes were pelleted, resuspended in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, USA) and stored at -80 °C until processing. RNA extraction was performed using a chloroform phase separation step, to ensure the complete removal of genomic DNA, followed by a Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MicroPrep kit (Zymo Research, Irvine CA, USA) procedure, according to manufacturer's instructions. The quality and quantity of RNA obtained was assessed using a NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). RNA (300 ng) of the sorted monocytes from five different pigs was reverse transcribed to cDNA using the qScript cDNA Synthesis kit (Quanta Biosciences; Beverly, MA, USA) in a total volume of 20 μl cDNA solutions were diluted in 1:3 ratio in water and stored at -20 °C. The qPCR assays were performed with a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher). All expression analyses were performed according to the standardized guidelines for qPCR publication of results, including technical replicates, negative controls and inter-plate calibrators (Bustin et al., 2009). Fifteen microliters of qPCR reactions were prepared using 2 μl of cDNA template and PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (Cultek, Madrid, Spain). The final concentration of primers in the PCR reactions was 0.5 μM. The sets of primers used are shown in Table 2 (Martins et al., 2013; Ondrackova et al., 2013a). The qPCR conditions were: 50 °C for 2 min, 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s. After amplification, a melting curve was run to ensure correct amplification of the expected amplicons. Amplification data were analyzed using the GenEx software. After inter-plate calibration and efficiency correction, a set of potential reference genes was evaluated using the Genorm and NormFinder softwares (Andersen et al., 2004; Mestdagh et al., 2009) and cyclophilin (PPIA), β-2 microglobulin (B2M), L4 Ribosomal Protein (RPL4) and Hypoxanthine-guaninephosphoribosyltransferase (HPRT) were selected as reference genes for data normalization.

### 2.10. Statistical analysis

The differences in mRNA expression among groups (normalized Ct values) were assessed by the Student's paired *t*-test using SigmaPlot v10.0 (Systat Software Inc., CA, USA). Statistical analyses of data from other experiments were performed with the Mann-Whitney rank test, using GraphPad Prism 4 software (La Jolla, CA, USA). All experiments were performed independently at least three times using cells isolated from different pigs unless stated otherwise. *P* < 0.05 was considered statistically significant. Symbols used \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01; \*\*\*, *p* < 0.001; ns = not significant.

**Table 2**

Primer pairs used in qRT-PCR. Sequences of primers labeled with \* were described in [Martins et al. \(2013\)](#), and those labeled with # in [Ondrackova et al. \(2013a\)](#).

Gene Symbol	Product Length	Optimal Annealing Temp	Efficiency (%)	Forward primer	Reverse primer
<i>PP1A</i> *	69	57	100	CCTGAACATACGGGTCCTG	AACTGGGAACCGTTGTGTG
<i>B2M</i> *	57	58	101	TCCGCCCAGATTGAAATT	TGCTCCGGTTCATCTTCT
<i>RPL4</i> *	144	60	93	CAGGCCAGGAATCACAAAAT	TTTAAACGCCAACAGCCTTCT
<i>HPRT</i> *	135	60	97	TGGTAGGCTATGCCCTTGAC	GGGACTCCAGATGTTCCAA
<i>TLR-1</i> *	102	57	112	TGCTGGATGCTAACGGATGTC	AAGTGGTTCAATGTTGTTCAAAGTC
<i>TLR-2</i> *	162	57	97	TCACTTGTCTAACTTATCATCTCTTG	TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC
<i>TLR-3</i> *	110	57	98	AGTAAATGAATCACCTGCCTAGCA	GCCGTTGACAAAACACATAAGGACT
<i>TLR-4</i> *	108	57	99	GCCATCGCTGCTAACATCATC	CTCATACTCAAAGATACACCATCGG
<i>TLR-5</i> *	122	57–60	98	CAGCGACAAAACAGATTGA	TGCTCACCAGACAGACAACC
<i>TLR-6</i> *	95	57	123	AACCTACTGTCTAAGCCCTTCATTC	GTCTACCAAAAATTCACCTTCTTCAG
<i>TLR-7</i> *	105	57–60	99	TCAGTCAACCCGAAGTTCTG	GATGGATCTGTAGGGGAGCA
<i>TLR-8</i> *	105	57	108	AAGACCACCACCACTTAGCC	GACCCTCAGATTCTCATCCATCC
<i>TLR-9</i> *	122	57	105	CACGACAGCCGAATAGCAC	GGGAACAGGGAGCAGAGC
<i>TLR-10</i> *	106	57	98	CCTGTCCAACCTGCCTCATTG	CTAAGTGTCTAAGGATGTGTTCTG
<i>CCR2</i> #	100	58	≥95	TGCCACTTGGGAAGCAACAGACCG	CAGAGAGTGAGATGTGGGACAGC
<i>CX3CR1</i> #	88	58	≥95	CCAGTCACCTGCTGCCAACCTACC	GGAGCTGTTTTGGGCTCTGGCTC
<i>CCR5</i> #	86	58	≥95	TGGTCAGAGGAGCTGAGACA	AGAAGGGACTCGTCGTTTGA
<i>CXCR4</i> #	108	58	≥95	TACCATGGACCGGTTCCGTATATTCACCTCAG	GCATTTTCCTCCCGAAACAGGGTTCC
<i>CD62L</i> #	132	58	≥95	AGTCTTGTGACCCAGGTCATGC	CCCAGAGGCTCACACTGAGTCACGAAC

### 3. Results

#### 3.1. Phenotypic characterization of bone marrow monocyte subsets

Porcine BM monocytes were identified based on the expression of the pan-myelomonocytic antigen CD172a and their light scatter features. A representative light scatter profile of bone marrow cells, with the FSC-SSC region used for acquisition of monocyte data is shown in [Fig. 1A](#). Within this region, CD172a<sup>hi</sup> cells were negative for granulocyte markers SWC8 and 6D10, CD8 $\alpha$ , a marker for T and NK cells, and Siglec-10, a marker of B cells ([Fig. 1D](#) and data not shown). CD163 expression in this population ranged from negative to intermediate in a continuum of cells, in which two major subpopulations (CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup>) were defined. CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup> cells display a slightly higher forward light scatter (FSC) but similar SSC compared to CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> cells ([Fig. 1B](#)). By May-Grunwald-Giemsa staining, after sorting, both populations display the typical monocyte morphology of round cells, with a bean-shape nucleus and a cytoplasm containing few granules, and have similar sizes ([Fig. 1C](#)).

When we compared the expression of different cell surface antigens between these two subsets, the CD163<sup>+</sup> cells expressed higher levels of CD11R1, CD16, Siglec-1/CD169 and SLA-DR molecules than the CD163<sup>-</sup> cells, whereas no or less remarkable differences were observed in the expression of CD11a, CD11R3, CD18, Siglec-3, Siglec-5, CD14 and CD115 ([Fig. 1D](#)). Only a minor proportion of CD163<sup>-</sup> cells expressed SLA-DR. Both subsets were negative for CD203a, a marker associated with macrophage maturation.

#### 3.2. TLR and chemokine receptor expression by bone marrow monocyte subsets

Monocyte subsets have been shown to differ in their response to TLR ligands ([Cros et al., 2010](#); [Chamorro et al., 2005](#); [Sanchez et al., 1999](#); [Ziegler-Heitbrock et al., 1992](#)). So, we next compared the gene expression by RTqPCR of TLRs (TLR1 to 10) in FACS-sorted CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup> BM monocytes. TLR4 showed the highest expression in both subsets followed by TLR2, TLR8, TLR7 and TLR3 ([Fig. 2A](#)). TLR3 and TLR7 mRNA levels were higher on CD163<sup>+</sup> cells than on CD163<sup>-</sup> cells, whereas TLR2 appeared to be more expressed in CD163<sup>-</sup> cells. In addition, the expression of TLR2 and TLR4 at the protein level was assessed by flow cytometry using specific mAbs ([Fig. 2B](#)), however, in this case

no remarkable differences in the expression were observed between the monocyte subsets.

Monocyte subsets can be distinguished by the pattern of expression of chemokine receptors, especially differential expression of CCR2 and CX3CR1, and adhesion molecules such as CD62L that they use to exit bone marrow and to migrate to tissues ([Shi and Pamer, 2011](#)). So, we analyzed the expression of CCR2, CX3CR1, CCR5, CXCR4 and CD62L genes in CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> BM monocytes by RT-qPCR ([Fig. 3](#)). CD163<sup>+</sup> BM monocytes expressed significantly higher levels of CX3CR1 and CCR5 and lower levels of CXCR4 and CD62L compared to CD163<sup>-</sup> BM monocytes. No differences were observed for CCR2 which was expressed at high levels in both subsets.

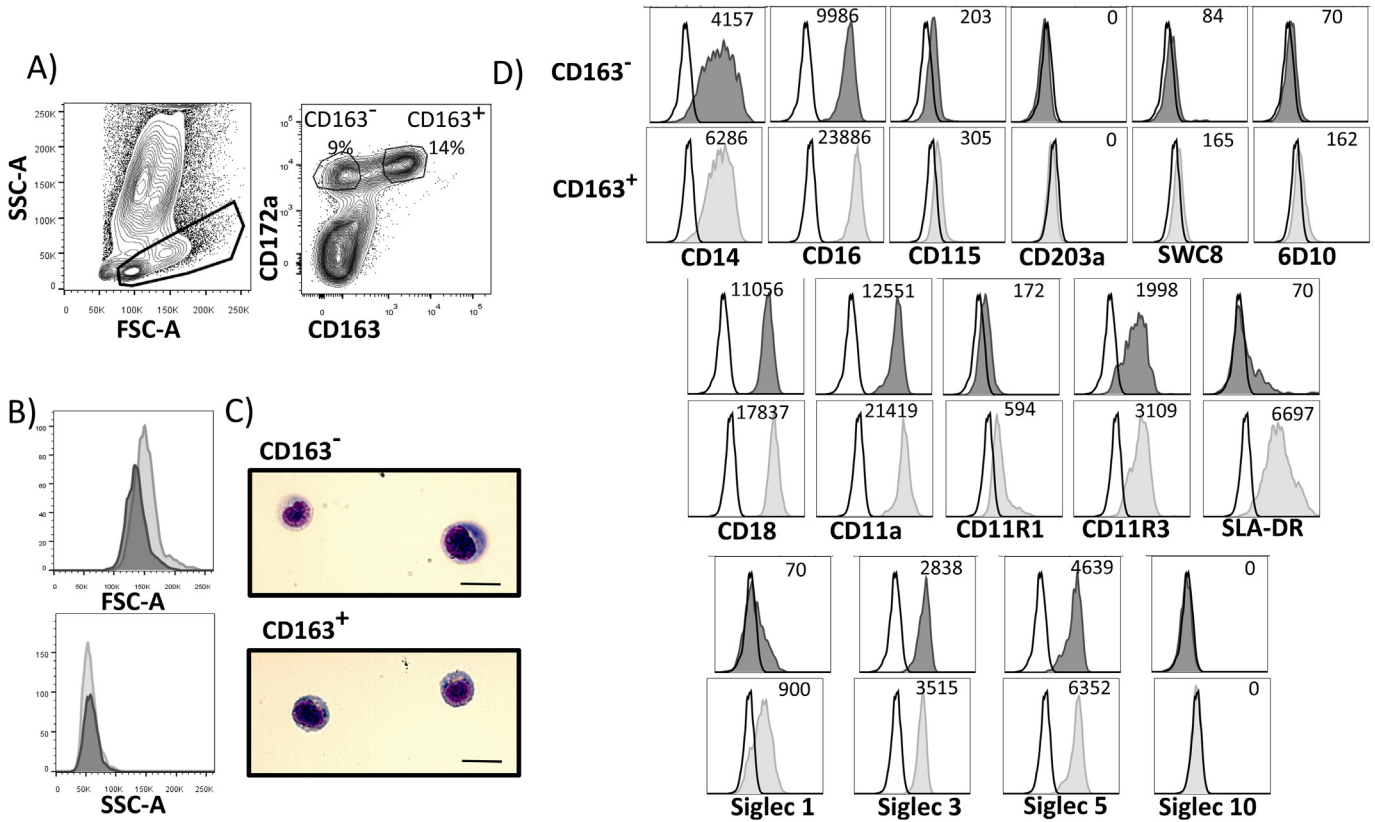
#### 3.3. Cytokine production by bone marrow monocyte subsets

We next investigated whether these monocyte subsets differ in the pattern of cytokines they produce. Sorted CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup> BM monocytes were stimulated for 21 h with different TLR ligands and the amount of TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 and IFN- $\alpha$  secreted in the supernatants determined by ELISA ([Fig. 4](#)). No detectable levels of cytokine production were observed in non-stimulated cells. Compared to CD163<sup>+</sup> cells, CD163<sup>-</sup> BM monocytes produced higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 in response to LPS or imiquimod. Both subsets produced similar amounts of IL-8 in response to LPS; however, CD163<sup>+</sup> cells secreted significantly more in response to imiquimod. Class A CpG-ODN2216 failed to induce any significant increase in the production of any of these cytokines. No secretion of IFN- $\alpha$  was detected in the supernatants of CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> BM cells stimulated with any of the TLR ligands tested (data not shown).

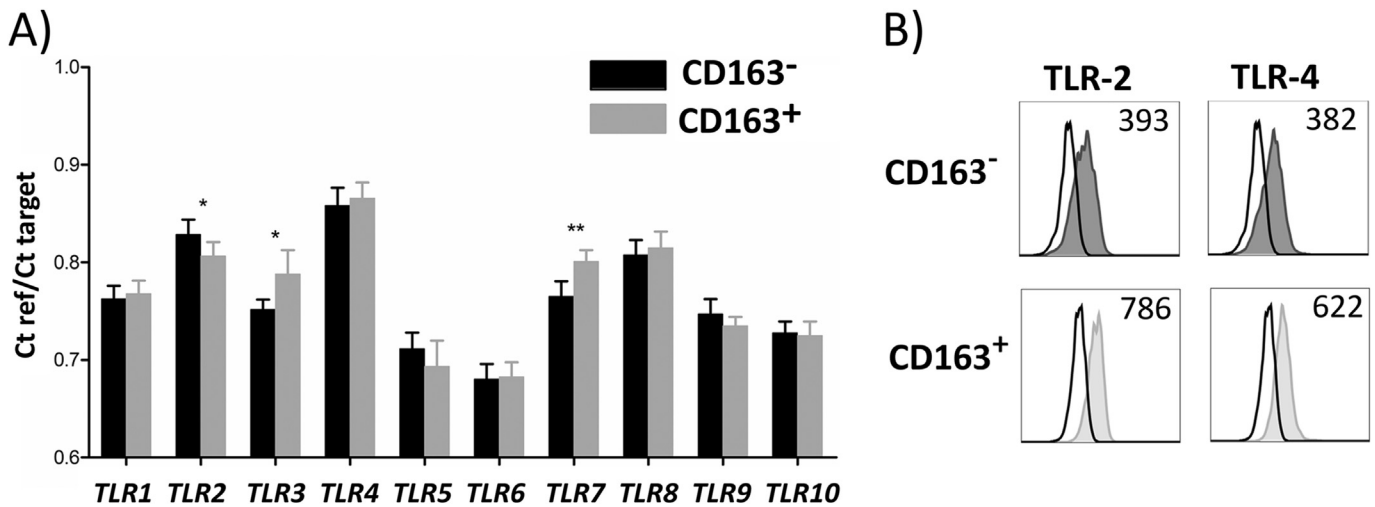
#### 3.4. Functional characteristics of BM monocyte subsets

The phagocytic capacity of CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>+</sup> BM monocyte subsets was evaluated using fluorescent polystyrene microspheres. Both subsets were able to phagocytose polystyrene microspheres, with similar efficiency, but at significant lower levels than alveolar macrophages, used as a positive control ([Fig. 5](#)).

CD163<sup>-</sup> and, at lesser extent, CD163<sup>+</sup> monocytes produced high levels of ROS in response to PMA, although differences between them were not statistically significant, whereas ROS production in



**Fig. 1.** Characterization of bone marrow monocyte subsets by flow cytometry. Cells from 3 to 6-week-old piglets were stained with Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit and a combination of mAbs to CD172a, CD163 and one of the antigens indicated in the figure. After doublet and dead cell exclusion, mononuclear cells were gated for analysis based on their light scatter properties. Two major subpopulations of CD172a<sup>hi</sup> monocytic cells were defined based on CD163 expression (A). (B) Forward and side light scatter profiles of CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>-</sup> (dark grey histograms) and CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>+</sup> (light grey histograms) cells. (C) Morphology of FACS-sorted CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>+</sup> cells stained with May-Grünwald-Giemsa. The scale bar represents 20  $\mu$ m. (D) Expression of relevant surface markers on the subpopulations defined in A. Specific staining is represented by dark or light grey histograms, whereas open histograms are isotype controls. Numbers in each histogram represent the median fluorescence intensity (MFI) of specific staining minus isotype control. Representative data from 3 independent animals.

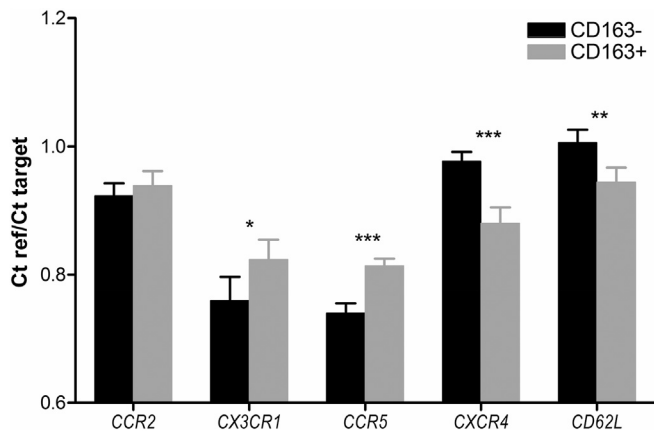


**Fig. 2.** TLR expression in bone marrow monocyte subsets. (A) Expression of TLR 1 to 10 genes was assessed using qRT-PCR and it is expressed as mean of the ratio of Ct values of reference genes to target genes + SD, in CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> monocytes from 5 different animals. Statistically significant differences were assessed by the Student's paired *t*-test. (\*) *p* = 0.05; (\*\*) *p* = 0.01. (B) Surface expression of TLR2 and TLR4 in monocyte subsets was assessed by three-color cytometry as described in Fig. 1. Numbers in each histogram represent the MFI of specific staining minus isotype control. Representative data from 3 independent animals.

alveolar macrophages was barely detectable (Fig. 6).

We also tested the capacity of these BM monocytes subsets to endocytose and process antigens. BM cells were incubated with

DQ-OVA, a self-quenched conjugate of ovalbumin which becomes fluorescent after proteolytic degradation. At 37 °C, DQ-OVA was more efficiently cleaved by alveolar macrophages, followed by



**Fig. 3.** Expression of chemokine receptors and CD62L genes in bone marrow monocyte subsets. Expression was assessed using qRT-PCR and it is expressed as mean of the ratio of Ct values of reference genes to target genes + SD, in CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> monocytes from 5 different animals. Statistically significant differences were assessed by the Student's paired *t*-test. (\*) *p* = 0.05; (\*\*) *p* = 0.01; (\*\*\*) *p* = 0.005.

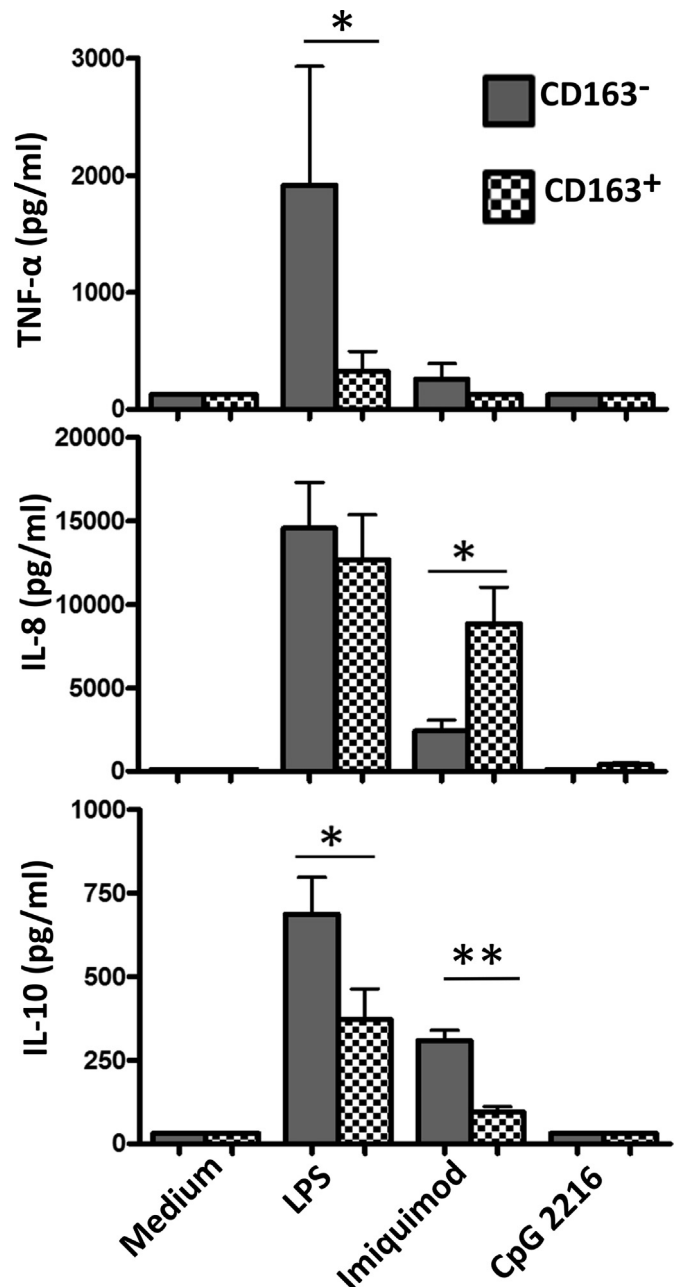
CD163<sup>+</sup> monocytes, although the differences of these with the CD163<sup>-</sup> monocytes were not statistically significant. Data of a representative experiment is shown in Fig. 7. No fluorescence was detected in any of the analyzed populations when samples were incubated at 4 °C (negative controls), attesting that this is a biologically active process.

#### 4. Discussion

Previous studies from our group and others (Chamorro et al., 2000, 2005; Fairbairn et al., 2011; Ondrackova et al., 2010) showed that two major blood monocyte subsets can be distinguished in swine on the basis of CD163 expression. Studies on bone marrow monocyte precursors also revealed the existence of subsets differing in the expression of CD163 (Ezquerria et al., 2009; Ondrackova et al., 2010). However, data about their developmental relationship and functional characteristics are scarce. The aim of the present study was to further investigate the phenotypic and functional heterogeneity of porcine bone marrow monocytes.

The maturation of porcine monocytes in bone marrow has been shown to be accompanied by a gradual increase in the expression of CD172a, with a CD172a<sup>lo</sup> SWC8<sup>-</sup> FSC<sup>hi</sup> population comprising some c-Kit/CD117<sup>+</sup> cells and early monocyte precursors, and a CD172a<sup>hi</sup> SWC8<sup>-</sup> FSC<sup>lo</sup> population corresponding to a more mature stage (Ezquerria et al., 2009; Ondrackova et al., 2010; Summerfield and McCullough, 1997). CD163 expression is restricted to the latter population, displaying a continuous pattern. Therefore, for comparative purposes, two discrete subsets were selected in the extremes of this continuum, and the expression in them of different myeloid markers, chemokine receptors and TLRs, as well as their functional activities were analyzed.

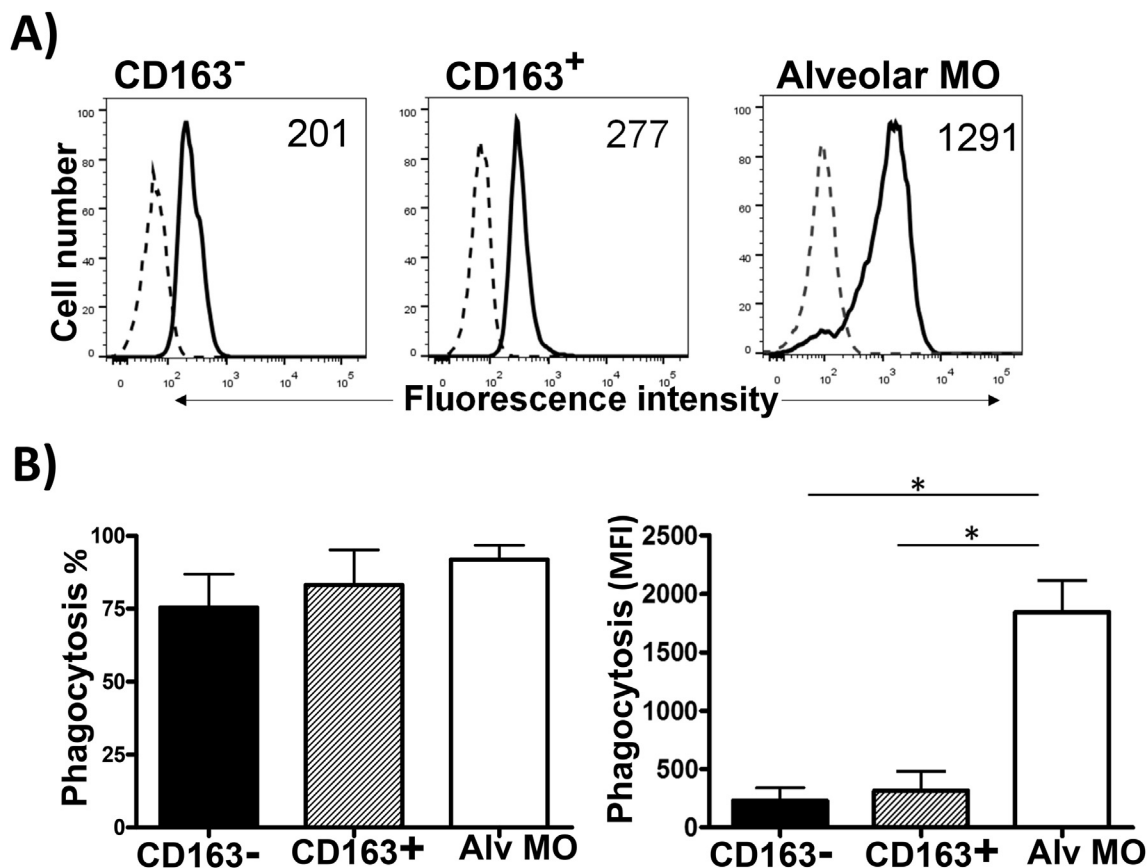
Like their blood counterparts, CD163<sup>-</sup> BM monocytes are mostly SLA-DR negative, while the majority of CD163<sup>+</sup> BM monocytes express high levels of SLA-DR. CD11R1 is also preferentially expressed, although at low levels, on CD163<sup>+</sup> monocytes both in BM and blood. However, CD163<sup>+</sup> BM differ with blood monocytes in the expression of Siglec-1 which is only expressed in BM monocytes (Delputte et al., 2007; Revilla et al., 2009). This difference in the expression of Siglec-1 could be related to a BM-specific function of these cells, thus, Siglec-1 has been implicated in cell-cell interactions and might contribute to positioning these cells in appropriate microenvironments within the bone marrow (Crocker



**Fig. 4.** Cytokine production. FACS-sorted BM CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>-</sup> and CD172a<sup>hi</sup>CD163<sup>+</sup> monocytes from 4 to 6-week old pigs were stimulated with LPS (1 µg/ml), Imiquimod (10 µg/ml) or Class A CpG ODN2216 (10 µg/ml) for 21 h. Afterwards, supernatants were harvested and concentrations of different cytokines were determined by ELISA. Results show the mean production in pg/ml + SEM from 6 different animals. Statistically significant differences were assessed using the Mann-Whitney *U* test. (\*) *p* = 0.05; (\*\*) *p* = 0.01.

et al., 1995). Nevertheless, other causes could also contribute to the expression of Siglec-1 in BM cells analyzed in this work, like the presence of IFN-α, a good inducer of Siglec-1 expression (Delputte et al., 2007; Revilla et al., 2009), that has been shown to be released in response to weaning stress (Razuoli et al., 2011).

Migration of monocyte subsets from BM to blood and from there to tissues is regulated by different combinations of chemokines and chemokine receptors. In the mouse, CCR2 and their ligands CCL2/CCL7 have been shown to mediate the egress of Ly6Chi monocytes from the BM as well as the recruitment of these cells to sites of



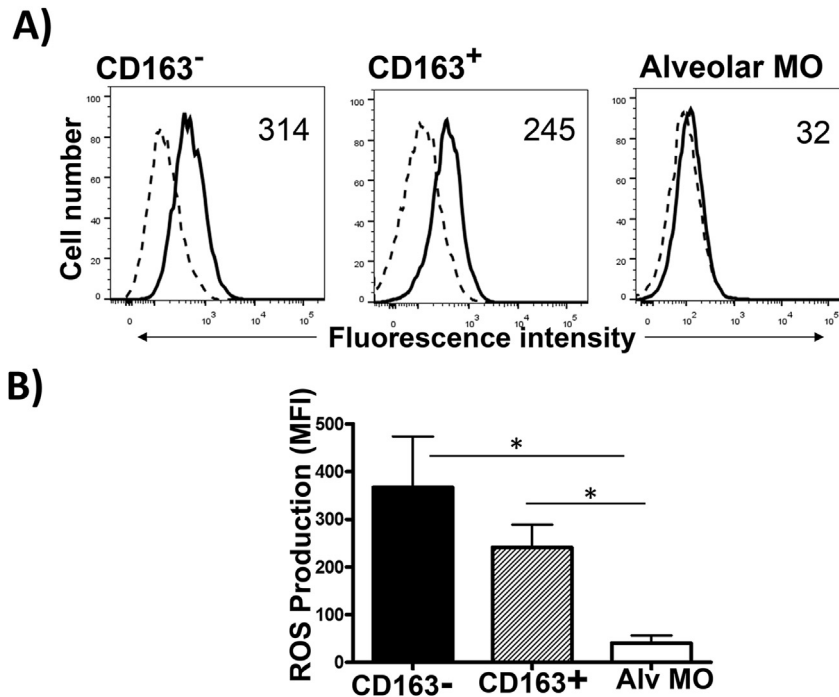
**Fig. 5.** Phagocytic capacity. Cells were incubated with Crimson fluorescent carboxylate-modified microspheres (0.02  $\mu\text{m}$ ) for 1 h at 37 $^{\circ}$  C, stained with mAbs to CD172a and CD163 and analyzed by flow cytometry. Negative controls were incubated on ice. (A) Histograms showing fluorescence incorporated in each subset or Alveolar macrophages (solid line) and negative controls (dotted-line). (B) Graphs show mean + SEM of the percentage of cells that have fluorescence intensity above the control and the MFI in 4 animals. Statistically significant differences between groups were calculated using the Mann-Whitney  $U$  test. (\*)  $p = 0.05$ .

inflammation (Fujimura et al., 2015; Jia et al., 2008), whereas CXCR4 and CX3CR1 appear to favor their retention in the BM (Jacquelin et al., 2013; Jung et al., 2015). In a previous study, we showed that porcine blood CD163 $^{-}$  monocytes express higher levels of CXCR4 and CCR2 than CD163 $^{+}$  monocytes, which in turn display higher levels of CX3CR1, a pattern which resembles that of human classical and non-classical monocyte subsets, respectively (Moreno et al., 2010). More recently, Ondrackova et al. (2013a) have reported a relatively high expression of CX3CR1 and CXCR4, and a low expression of CCR2 and CCR5 by both BM and blood CD163 $^{+}$  monocytes, although no comparative analysis with CD163 $^{-}$  cells was carried out. In this study CD62L, an adhesion molecule involved in monocyte migration (Shi and Pamer, 2011), was also expressed at low levels on CD163 $^{+}$  BM and blood monocytes. In the present study, CD163 $^{+}$  BM monocytes, like their blood counterparts, showed higher CX3CR1 and lower CXCR4 expression than CD163 $^{-}$  BM monocytes. They also expressed lower levels of CD62L. However, no differences were observed in the expression of CCR2 between both subsets. Moreover, in contrast with data from Ondrackova et al. (2013a), CCR2 was expressed at relatively high levels, apparently higher than those of CX3CR1, by both subsets. Therefore, in principle both subsets would be able to migrate to periphery in response to CCL2 or other CCR2 ligands. The differences in the expression of CXCR4 and CX3CR1 may implicate differences in the mechanisms used by these subsets for their exit from BM. At present, we do not have a clear explanation for the discrepancies among our results and those from Ondrackova et al. Whether differences in age or breed of animals, or other

uncontrolled circumstances, may have some influence on discrepancies in the expression of chemokine receptor by different subsets of BM or blood monocytes would require additional analysis. Expression of CCR2, in CD163 $^{+}$  BM monocytes, also contrasts with our previous data on blood monocytes, where no expression of CCR2 was found in blood CD163 $^{+}$  monocytes, this discrepancy could be just other differential feature between CD163 $^{+}$  BM and blood monocytes indicating no developmental relation between them, or be caused by a modulation of CCR2 expression during or upon migration from BM to blood.

Since a developmental relationship between monocyte subsets have been suggested in several species and CD163 $^{+}$  cells appear to derive from CD163 $^{-}$  cells (Chamorro et al., 2005), it would be possible that CD163 $^{+}$  BM cells could correspond to a different maturation stage than blood CD163 $^{+}$  monocytes, so they have not yet reduced the expression of CCR2 while have increased that of CX3CR1. In line with this, Ondrackova et al. (2013a) found an increased expression of CX3CR1 in blood CD163 $^{+}$  monocytes compared to those from bone marrow. Likewise, in humans, Mandl et al. (2014), comparing bone marrow and blood monocyte subsets, have also suggested that these monocyte subsets acquire their differential chemokine receptor signature during or after recruitment to the periphery. Alternatively, the CD163 $^{+}$  cells that develop in the BM may constitute a population distinct of the CD163 $^{+}$  blood monocytes, the latter arising from CD163 $^{-}$  monocytes that differentiate in the circulation, like it has been proposed by Yona et al. for mouse non-classical Ly6C $^{-}$  monocytes (Yona et al., 2013).

CD163 $^{-}$  and CD163 $^{+}$  BM monocytes differ in their capacity to



**Fig. 6.** ROS-production capacity. Cells were first labeled with mAbs to CD172a and CD163, using fluorescence buffer without azide. Then they were incubated with 1 mM dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF) in Heps-buffered saline for 5 min at 37 °C. PMA was next added at 10 ng/ml and cells were further incubated for 7 min at 37 °C, and analyzed by flow cytometry. (A) Solid line histograms represent the green fluorescence of oxidized DCF detected in the indicated cell subsets after addition of PMA, while dotted-line histograms represent fluorescence prior to incubation with PMA. Data from one representative experiment is shown. (B) ROS generation was calculated as the MFI of gated monocyte subsets ( $n = 4$  animals) after subtracting the MFI of non-stimulated cells and presented as mean + SEM. Statistically significant differences between groups were calculated using the Mann-Whitney  $U$  test. (\*)  $p = 0.05$ .

produce cytokines in response to TLR ligands. The higher production of IL-8 by CD163<sup>+</sup> cells in response to imiquimod could be related to the higher expression of TLR7 gene by these cells. However, CD163<sup>-</sup> cells produced significant higher amounts of TNF- $\alpha$  and IL-10 than CD163<sup>+</sup> cells when they were stimulated with LPS, even though both subsets express similar levels of CD14 and TLR4. Therefore, other mechanisms besides differences in the expression of surface receptors appear to contribute to the different production of cytokines by these subsets. In this regard, the engagement of the same TLR may lead to activation of different signaling pathways in different monocyte subsets, as has been reported in humans (Cros et al., 2010).

Whereas the higher production of IL-10 by CD163<sup>-</sup> BM cells in response to LPS was coincident with previous studies performed in blood monocytes (Sanchez et al., 1999), the low production of TNF- $\alpha$  by CD163<sup>+</sup> BM cells contrasts with the fact that CD163<sup>+</sup> blood monocytes were found, using flow cytometry, to be the major TNF- $\alpha$  producers in response to LPS (Chamorro et al., 2005). A possible explanation for this difference is that CD163<sup>+</sup> monocytes acquire their inflammatory potential after migrating to blood, or that CD163<sup>+</sup> BM and blood monocytes represent different and independent compartments, as pointed above.

Both CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> BM monocytes display similar phagocytic capacity; however, CD163<sup>-</sup> cells appear to be more efficient producing ROS, like the human CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> monocyte subset (Cros et al., 2010), in all animals tested, although these differences were not statistically significant. This, together with the high production of TNF- $\alpha$  and IL-8 in response to LPS, may indicate an important role of the CD163<sup>-</sup> subset in inflammatory responses. On the other hand, the CD163<sup>+</sup> cells tend to display a higher capacity for antigen processing, which together with their higher expression of SLA-II molecules could reflect a superior ability for

stimulation of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, as has been described in humans for the intermediate subset of CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes in blood (Zawada et al., 2011).

In conclusion, we have characterized two phenotypically and functionally distinct monocyte subsets in porcine bone marrow, based on the expression of CD163. This information may contribute to a better understanding of the differentiation pathways and functional specialization of monocyte subsets in pigs and their role in pathogenesis of inflammatory and infectious diseases.

#### Conflicts of interest

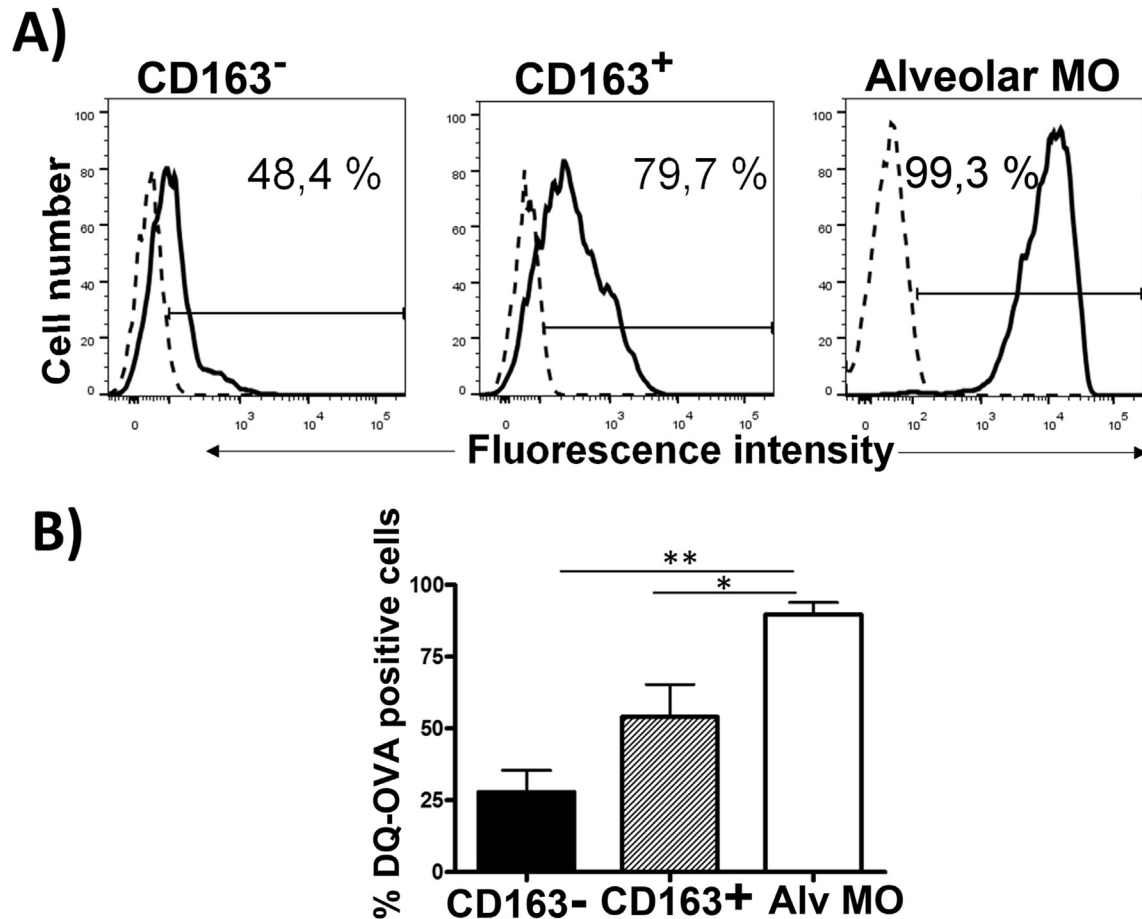
The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

TFC, CR, AE and JD designed the study. TFC, BA, CR and FA participated in the collection and processing of the samples, performed flow cytometric and ELISA experiments and contributed to the analysis of results. TFC, SZL and JGP performed RT-qPCR analysis. TFC, AE and JD wrote the manuscript. All authors have seen and finally approved the version submitted for publication.

#### Funding

This work was supported by grants AGL2012-31556 and AGL2015-66187-P from Ministry of Economy, Industry and Competitiveness of Spain. Teresa Fernández-Caballero was supported by an FPI doctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (BES-2013-066193).



**Fig. 7.** Internalization and degradation of exogenous antigen. BM cells or alveolar macrophages (used as a control) were incubated with self-quenched fluorescent DQ-OVA for 1 h at 4 °C or 37 °C. Cells were stained with antibodies to CD163 and CD172a to identify monocyte subsets. (A) Solid line histograms show fluorescence of cleaved DQ-OVA by different cell populations from one animal. Dotted-line histograms correspond to fluorescence of cells incubated at 4 °C. As an additional negative control, cells incubated only with medium were also run in parallel (not shown). (B) Calculation of DQ-OVA degradation efficiency by 5 different pigs was performed by subtracting fluorescence at 4 °C from that at 37 °C. Statistically significant differences between groups were calculated using the Mann-Whitney *U* test. (\*) *p* = 0.05; (\*\*) *p* = 0.01.

## Acknowledgements

We thank Elena Ramos and Paloma Martínez de la Riva for technical support and Carmen Hernandez (Centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid) for assistance in flow cytometric sorting.

## References

- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–670.
- Borrego, B., Rodríguez-Pulido, M., Revilla, C., Alvarez, B., Sobrino, F., Dominguez, J., Saiz, M., 2015. Synthetic RNAs mimicking structural domains in the foot-and-mouth disease virus genome elicit a broad innate immune response in porcine cells triggered by RIG-I and TLR activation. *Viruses* 7, 3954–3973.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Crocker, P.R., Freeman, S., Gordon, S., Kelm, S., 1995. Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage. *J. Clin. Invest.* 95, 635–643.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.P., D’Cruz, D., Casanova, J.L., Trouillet, C., Geissmann, F., 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386.
- Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2005. Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology* 114, 63–71.
- Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2000. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology* 202, 82–93.
- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Barbe, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2007. IFN- $\alpha$  treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 757–766.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J., 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
- Ezquerro, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., Dominguez, J., 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 284–298.
- Fairbairn, L., Kapetanovic, R., Beraldi, D., Sester, D.P., Tuggle, C.K., Archibald, A.L., Hume, D.A., 2013. Comparative analysis of monocyte subsets in the pig. *J. Immunol.* 190, 6389–6396.
- Fairbairn, L., Kapetanovic, R., Sester, D.P., Hume, D.A., 2011. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J. Leukoc. Biol.* 89, 855–871.
- Fujimura, N., Xu, B., Dalman, J., Deng, H., Aoyama, K., Dalman, R.L., 2015. CCR2 inhibition sequesters multiple subsets of leukocytes in the bone marrow. *Sci. Rep.* 5, 11664.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.
- Ginhoux, F., Jung, S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsvelde, J., Feuerer, M., 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.
- Jacquelin, S., Licata, F., Dorgham, K., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Deterre, P.,

- Hume, D.A., Combadiere, C., Boissonnas, A., 2013. CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood* 122, 674–683.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J.R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D.W., Yokoyama, W.M., Ginhoux, F., Henson, P.M., Randolph, G.J., 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610.
- Jia, T., Serbina, N.V., Brandl, K., Zhong, M.X., Leiner, I.M., Charo, I.F., Pamer, E.G., 2008. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 180, 6846–6853.
- Jung, H., Mithal, D.S., Park, J.E., Miller, R.J., 2015. Localized CCR2 activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4. *PLoS One* 10, e0128387.
- Leiriao, P., del Fresno, C., Ardavin, C., 2012. Monocytes as effector cells: activated Ly-6C(high) mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-present antigens to CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 2042–2051.
- Lenzo, J.C., Turner, A.L., Cook, A.D., Vlahos, R., Anderson, G.P., Reynolds, E.C., Hamilton, J.A., 2012. Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 90, 429–440.
- Mandl, M., Schmitz, S., Weber, C., Hristov, M., 2014. Characterization of the CD14++CD16+ monocyte population in human bone marrow. *PLoS One* 9, e112140.
- Martins, R.P., Collado-Romero, M., Arce, C., Lucena, C., Carvajal, A., Garrido, J.J., 2013. Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 149–160.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10, R64.
- Moreno, S., Alvarez, B., Poderoso, T., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F., Dominguez, J., 2010. Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2. *Vet. Res.* 41, 76.
- Ondrackova, P., Leva, L., Kucerova, Z., Vicenova, M., Mensikova, M., Faldyna, M., 2013a. Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. *Vet. Res.* 44, 98.
- Ondrackova, P., Matiasovic, J., Volf, J., Dominguez, J., Faldyna, M., 2013b. Phenotypic characterisation of the monocyte subpopulations in healthy adult pigs and *Salmonella*-infected piglets by seven-colour flow cytometry. *Res. Vet. Sci.* 94, 240–245.
- Ondrackova, P., Nechvatalova, K., Kucerova, Z., Leva, L., Dominguez, J., Faldyna, M., 2010. Porcine mononuclear phagocyte subpopulations in the lung, blood and bone marrow: dynamics during inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res.* 41, 64.
- Palfaman, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweierink, H., Rot, A., von Andrian, U.H., 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* 194, 1361–1373.
- Perez, C., Revilla, C., Alvarez, B., Chamorro, S., Correa, C., Domenech, N., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., 2007. Phenotypic and functional characterization of porcine granulocyte developmental stages using two new markers. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 296–306.
- Razzuoli, E., Villa, R., Sossi, E., Amadori, M., 2011. Characterization of the interferon-alpha response of pigs to the weaning stress. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 237–247.
- Revilla, C., Poderoso, T., Martinez, P., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., 2009. Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. *Vet. Res.* 40, 14.
- Sanchez, C., Domenech, N., Vazquez, J., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J. Immunol.* 162, 5230–5237.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohli, T.M., Pamer, E.G., 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.
- Serbina, N.V., Pamer, E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.
- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774.
- Summerfield, A., McCullough, K.C., 1997. Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *J. Leukoc. Biol.* 62, 176–185.
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., Leenen, P.J., 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* 172, 4410–4417.
- Tacke, F., Randolph, G.J., 2006. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211, 609–618.
- Vu Manh, T.P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Ruscanu, S., Jouneau, L., Bourge, M., Moroldo, M., Foucras, G., Salmon, H., Marty, H., Quere, P., Bertho, N., Boudinot, P., Dalod, M., Schwartz-Cornil, I., 2015. Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics. *Front. Immunol.* 6, 299.
- Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.R., Fliser, D., Heine, G.H., 2011. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–61.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G., 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79, 503–511.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–80.





Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Interaction of PRRS virus with bone marrow monocyte subsets

Teresa Fernández-Caballero<sup>a</sup>, Belén Álvarez<sup>a</sup>, Fernando Alonso<sup>a</sup>, Concepción Revilla<sup>a</sup>,  
Javier Martínez-Lobo<sup>b</sup>, Cinta Prieto<sup>b</sup>, Ángel Ezquerro<sup>a</sup>, Javier Domínguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040, Madrid, Spain



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Swine  
PRRS virus  
Bone marrow  
Monocytes  
CD163

### ABSTRACT

PRRSV can replicate for months in lymphoid organs leading to persistent host infections. Porcine bone marrow comprises two major monocyte subsets, one of which expresses CD163 and CD169, two receptors involved in the entry of PRRSV in macrophages. In this study, we investigate the permissiveness of these subsets to PRRSV infection. PRRSV replicates efficiently in BM CD163<sup>+</sup> monocytes reaching titers similar to those obtained in alveolar macrophages, but with a delayed kinetics. Infection of BM CD163<sup>-</sup> monocytes was variable and yielded lower titers. This may be related with the capacity of BM CD163<sup>-</sup> monocytes to differentiate into CD163<sup>+</sup> CD169<sup>+</sup> cells after culture in presence of M-CSF. Both subsets secreted IL-8 in response to virus but CD163<sup>+</sup> cells tended to produce higher amounts. The infection of BM monocytes by PRRSV may contribute to persistence of the virus in this compartment and to hematological disorders found in infected animals such as the reduction in the number of peripheral blood monocytes.

### 1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the etiological agent of an economically important infectious disease that affect the pig industry worldwide. It is characterized by severe reproductive disorders in sows and respiratory distress in young growing and finishing pigs, predisposing them to secondary infections associated with the porcine respiratory disease complex (Chand et al., 2012).

PRRSV is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus, which belongs to the Arteriviridae family in the order Nidovirales, and comprises two well defined genotypes: type 1 or European and type 2 or North American (Meng et al., 1995). Both genotypes cause similar clinical manifestations of reproductive failure and respiratory problems in pigs but share only about 60% of their identity of the nucleotide sequence and show differences in antigenicity. Recently, PRRSV type 1 and type 2 have been classified into two species within the genus Porartevirus: PRRSV-1 and PRRSV-2, respectively (Adams et al., 2016).

PRRSV shows a strong tropism for cells of monocyte-macrophage lineage (Duan et al., 1997b). The virus infects macrophages in lungs and several lymphoid organs, while freshly isolated blood monocytes are largely refractory. The different permissiveness to infection of these cells has been related to differences in the expression of receptors for the virus (Delputte et al., 2007; Duan et al., 1997a; Patton et al., 2009). CD169 (also named Siglec-1 or sialoadhesin) and CD163 have been

identified as the most important host receptors for the entry and replication of PRRSV into alveolar macrophages (Van Gorp et al., 2008), the latter being essential for infection (Wells et al., 2017). Blood monocytes express variable amounts of CD163 and are usually negative for CD169, however the expression of these receptors can be induced after different treatments (Delputte et al., 2007; Ezquerro et al., 2009; Patton et al., 2009).

Most studies on the interaction of PRRSV with bone marrow (BM) cells have been carried out on cells that have been differentiated *in vitro* into macrophages or DCs, under diverse culture conditions (Chang et al., 2008; Chaudhuri et al., 2016; Gimeno et al., 2011). However, data on the interaction of the virus with undifferentiated BM cells are scarce. Early studies have reported the existence of lesions in the BM of PRRSV-infected piglets (Feng et al., 2001). More recently, viral RNA has been detected in BM of animals infected with either type 1 or type 2 isolates, suggesting viral replication in BM cells (Amarilla et al., 2017; Wang et al., 2016). Whereas viral antigens were occasionally detected in BM tissue sections from animals infected with PRRSV type 1 isolates (Amarilla et al., 2017), Wang et al found a marked expression of PRRSV N protein in CD172a<sup>+</sup> SWC8<sup>-</sup> BM cells of animals infected with the highly pathogenic-PRRSV type 2 HuN4 strain (Wang et al., 2016).

We have recently characterized two subsets of BM monocytes, one of which expresses both CD163 and CD169. The aim of this study was to investigate the permissiveness of bone marrow monocytes to infection

Abbreviations: BM, bone marrow; rhM-CSF, recombinant human macrophage colony stimulating factor

\* Corresponding author at: Dpto. de Biotecnología, INIA, Ctra. de la Coruña Km 7.5, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: [juncal@inia.es](mailto:juncal@inia.es) (J. Domínguez).

by PRRSV type 1 isolate, and the effect of virus on cytokine production, as these cells may be an important target for PRRSV persistence *in vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, tissues and cells

Tissue samples were obtained from healthy, conventionally reared, 3 to 7-week-old Large-White pigs that had been anesthetized with sodium pentobarbital (0.3 g/Kg) by intraperitoneal route and euthanized by exsanguination. Alveolar macrophages were collected by bronchoalveolar lavage. BM cells were isolated from femurs, tibias and humeri by flushing with PBS containing 2 mM EDTA, 2% FCS and 150 µg/ml gentamicin, using a 20 ml syringe with an 18-g needle. These cells were washed twice and resuspended in 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.3 for 5 min with gentle shaking to lyse red blood cells. Afterwards, mature granulocytes were removed by centrifugation over a discontinuous 53% Percoll gradient. Remaining cells were then resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol and 50 µg/ml gentamicin (complete medium).

The reported experiments have been executed in full compliance with guidelines by the ethical and animal welfare committees of the Institute.

### 2.2. Antibodies and flow cytometry

Hybridoma producing monoclonal antibody (mAb) to CD172a (74-22-15a, IgG2b) was kindly provided by J. Lunney (ARS USDA, USA). MAbs to CD163 (2A10/11, IgG1), CD169 (1F1, IgG2a), CD172a (BA1C11, IgG1), and SLA-DR (1D2CR4, IgG2a) were produced in our laboratory. MAb to PRRSV N protein (1CH5, IgG2b) was purchased from Ingenasa (Madrid, Spain) and labelled with Alexa Fluor 488 dye following the manufacturer's protocol (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Irrelevant mAbs were used as negative controls.

For two-colour staining, cells were incubated with one mAb to CD163 (IgG1) and other to SLA-DR (IgG2a), CD169 (IgG2a) or CD172a (IgG2b) for 20 min at 4 °C. After two washes with PBS containing 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide (fluorescence buffer), cells were incubated with APC-conjugated goat anti-mouse IgG1 and PE-conjugated goat anti-mouse IgG2a or IgG2b antibodies respectively (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) for 20 min at 4 °C. Afterwards, cells were washed twice and Sytox blue cell stain (Life Technologies) added prior to their analysis in a FASCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) to exclude dead cells.

For detection of the viral nucleoprotein, cells were permeabilized with methanol for 10 min at -20 °C and washed with fluorescence buffer. Then, they were incubated with 1CH5 mAb labelled with Alexa 488 at 4 °C. Finally, cells were washed and analysed in the cytometer. Non-specific binding was evaluated using an irrelevant mAb labelled with Alexa 488.

Data were analyzed using FlowJo software. Doublets were excluded using FSC-A versus FSC-H plots.

### 2.3. Sorting of bone marrow monocyte subsets

BM monocyte subsets were sorted as described before (Fernández-Caballero et al., 2018). BM cells were incubated with mAbs anti-CD172a (74-22-15a) and anti-CD163 (2A10/11) for 20 min at 4 °C. After washing, cells were incubated with PE-conjugated goat anti-mouse IgG2b and APC-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Southern Biotech, USA), for 20 min at 4 °C. After a final wash, cells were filtered through a 70 µm nylon strainer (ThermoFisher Scientific, USA) for removal of cell clumps, prior to sorting. Dead cells were excluded with Sytox blue dead cell stain (Life Technologies, USA) and non-specific binding was evaluated using irrelevant control mAbs. Granulocytes

were excluded based on characteristic FSC and SSC profiles. SSC<sup>lo</sup> CD172a<sup>hi</sup> CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> cells were sorted simultaneously using a FACSaria III cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA) and collected in complete medium containing 20% FCS and 2 mM EDTA. Purity of the separated populations was higher than 95%.

### 2.4. *In vitro* maturation of monocytes

CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> sorted monocytes were cultured for 3 days in complete medium supplemented with 20 ng/ml of recombinant human (rh) M-CSF (Gibco Life Technologies, USA). At different times cells were harvested and analysed by flow cytometry with mAbs to CD163, CD169, CD172a or SLA DR.

### 2.5. PRRS virus infection and titration by qRT-PCR

PRRS virus type 1 isolate 5710, kindly provided by Dr. J.M. Castro, (Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, Spain), was used for all infections. Viral stocks were grown and titrated on porcine alveolar macrophages as previously reported (Yuste et al., 2017). Sorted monocytes or alveolar macrophages were infected with PRRSV at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.5. After 1 h of incubation at 37 °C, cells were washed twice to remove non-attached virus and cultured in 48-well plates (5 × 10<sup>5</sup> cells/well in 500 µl of complete medium). At different time-points post infection (p.i.), cells and supernatants were harvested for analysis of infection. After three cycles of freezing and thawing, cell debris was removed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 4 °C and virus samples were frozen and stored at -80 °C. Samples obtained at the time of plating, after 1 h of viral incubation, were considered time-zero samples. Virus content was determined by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). A QiAamp Viral RNA MiniKit (Qiagen, Manchester, UK) was used to extract RNA from 140 µl of virus samples. RNA was eluted into 60 µl of elution buffer and stored at -80 °C prior to RT-PCR analysis. PRRSV detection by qRT-PCR was performed using VetMax NA & EU PRRSV reagents for PRRSV N gene amplification (Thermo Fisher Scientific), adding 7 µl of RNA to 18 µl of the PCR master mix (containing specific forward/reverse primers and probe). qRT-PCRs were carried out using a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). PRRSV titers were determined by comparison of the obtained threshold cycle (CT) values to a standard curve generated by using 1/10 serial dilutions of a known amount of PRRSV and expressed as TCID<sub>50</sub>/ml.

### 2.6. Cytokine production

Sorted monocytes were plated at 5 × 10<sup>5</sup> cells/well in 0.5 ml of culture medium in 48-well plates, and incubated with PRRSV at an m.o.i. of 0.5, or stimulated with poly I:C (10 µg/ml) or LPS (1 µg/ml, E. Coli O55:B5), (both from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells incubated with supernatants from mock-infected PAM were used as negative controls. After 21 or 46 h, supernatants were collected, centrifuged to remove cell debris, and frozen at -80 °C until assessment of cytokine production. Supernatants were analyzed for IL-8, IL-10 and TNF-α cytokine content by using commercial ELISA kits from Invitrogen following manufacturer's instructions. ELISA for IFN-α was performed using monoclonal antibodies K9 and F17 from PBL Interferon Source, as previously described (Borrego et al., 2015). The amount of cytokines produced in response to virus was calculated by subtracting cytokine levels in mock-stimulated cultures.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analyses of data were performed with the Mann-Whitney rank test, using GraphPad Prism 4 software (La Jolla, CA, USA). All experiments were performed independently at least three times using cells isolated from different pigs, unless stated otherwise. Statistical

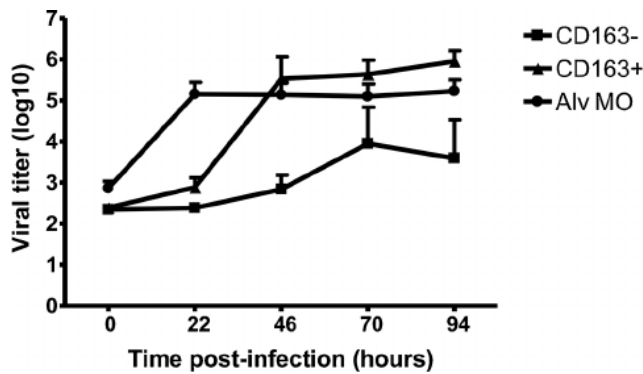


Fig. 1. Sorted BM CD163<sup>-</sup> or CD163<sup>+</sup> monocytes or alveolar macrophages were infected with PRRSV type 1 isolate 5710 at an m.o.i. of 0.5. At different times p.i., viral RNA was extracted from supernatant and cell lysates and a qRT-PCR was used to quantify PRRSV RNA. Values represent mean titres + SEM of at least 4 independent experiments. Differences between alveolar macrophages and CD163<sup>-</sup> or CD163<sup>+</sup> BM monocytes at 22 h p.i. ( $p = 0.0079$ , and  $p = 0.0159$ , respectively), and between alveolar macrophages or CD163<sup>+</sup> monocytes and CD163<sup>-</sup> monocytes at 46 h p.i. ( $p = 0.0079$ , and  $p = 0.0159$ , respectively) were statistically significant.

significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Permissiveness of BM monocyte subsets to PRRSV infection

CD169 and CD163 are two important receptors for the entry and replication of PRRSV in macrophages. Since CD172a<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> BM monocytes also express CD169, we investigated if these cells were permissive to PRRSV infection and how this infection compared to that of alveolar macrophages and CD172a<sup>+</sup> CD163<sup>-</sup> BM monocytes, the latter being also mostly CD169 negative (Fernández-Caballero et al., 2018).

Freshly sorted CD163<sup>+</sup> or CD163<sup>-</sup> BM monocytes, as well as alveolar macrophages from the same pigs used as positive controls, were infected and the amount of newly produced virus at different times p.i. was determined by qRT-PCR. Whereas PRRSV rapidly replicated in alveolar macrophages reaching maximal titers of  $\sim 10^{5.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml at 22 h p.i., viral replication in CD163<sup>+</sup> BM cells showed a slower kinetics. At 22 h p.i. virus titers remained low ( $< 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml), but by 46 h p.i. reached titers similar to those obtained in alveolar macrophages (Fig. 1). CD163<sup>-</sup> cells also became infected but with a wide variation among experiments. Compared to CD163<sup>+</sup> monocytes, viral replication in these cells was delayed, with a peak at 70 h p.i. ( $10^{3.94}$  TCID<sub>50</sub>/ml) and titers 10 to 50-fold lower than those obtained in alveolar macrophages or CD163<sup>+</sup> cells. In some experiments viral titrations were also performed by assessing the cytopathic effect in alveolar macrophage cultures, with results similar to those obtained by qRT-PCR (data not shown).

In agreement with these results, in one experiment in which the expression of viral N protein was also assessed by flow cytometry, a high proportion of CD163<sup>+</sup> cells (59%) stained positive for this protein at day 3 p.i., whereas only a small number of cells (11%) did in the CD163<sup>-</sup> cell preparation (Supplementary Fig. 1).

The delay in replication of PRRSV in CD163<sup>+</sup> BM cells could be related with a lower expression of CD163 and CD169 compared to alveolar macrophages, particularly of CD169, which is considered to be the main receptor for attachment and internalization of the virus (Van Gorp et al., 2008), resulting in a lower efficiency of these processes. However, in a recent study with spleen CD163<sup>+</sup> macrophages we found that very low levels of expression of CD169 were sufficient for an efficient infection of the cells (Yuste et al., 2017). On the other hand, it

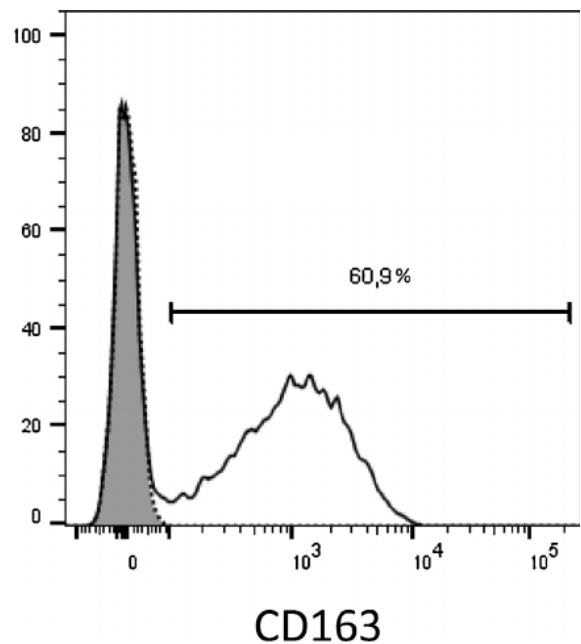
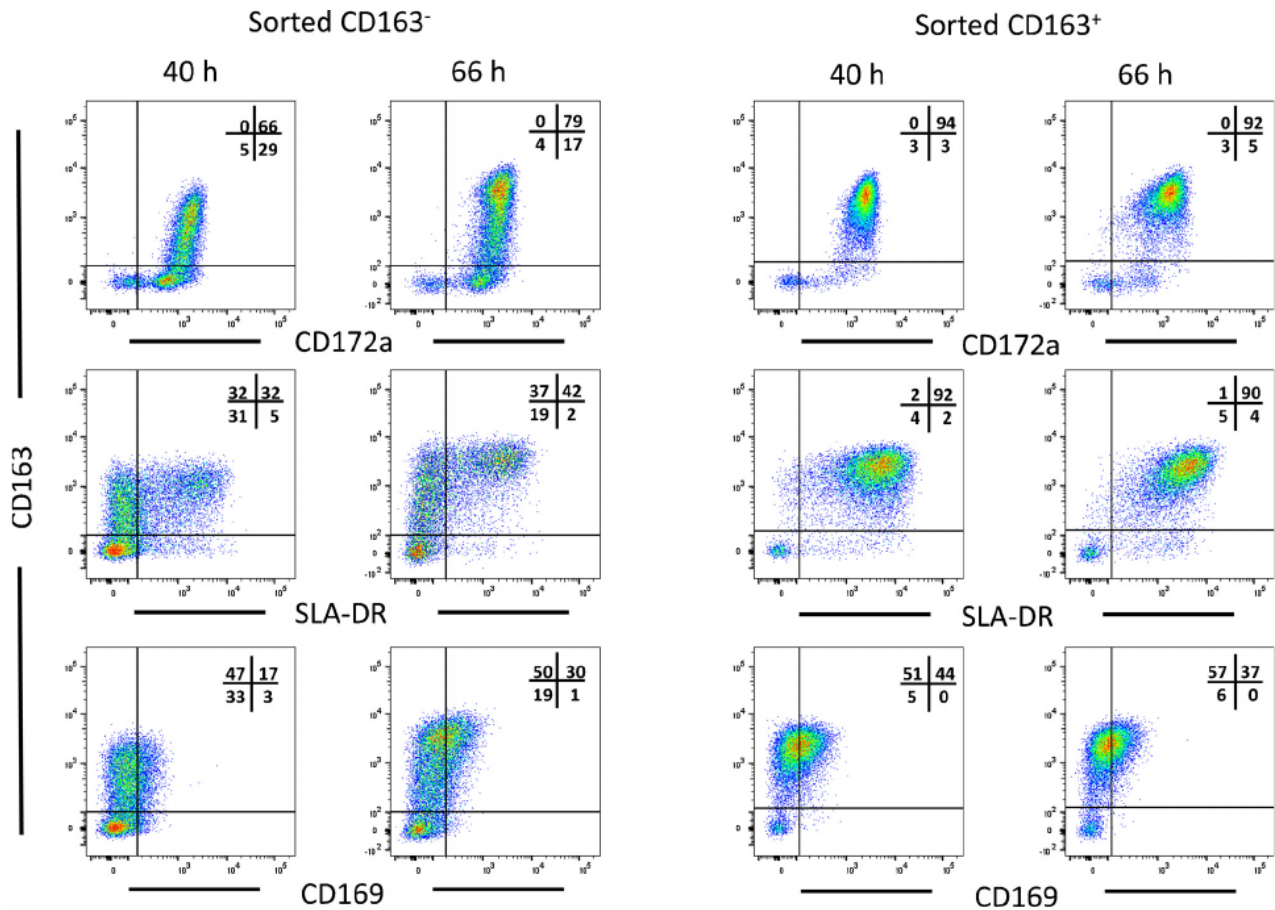


Fig. 2. Upregulation of CD163 expression after infection with PRRSV. Sorted CD163<sup>-</sup> BM monocytes were incubated with PRRSV at an m.o.i. of 1 for 1 h. After 40 h, cells were harvested and expression of CD163 (open histogram) analysed by flow cytometry. Grey histogram corresponds to background staining using an irrelevant isotype-matched antibody. Data are from one representative experiment out of two performed.

could indicate the requirement of additional factors which are acquired with the maturation of cells during culture.

The late infection of the CD163<sup>-</sup> cells could involve the use of alternative receptors not yet identified, as it has been suggested for monocyte-derived DCs (Singleton et al., 2016), but it may also be explained by a conversion into CD163<sup>+</sup> cells upon culture. These cells could become infected by residual virus that remained attached to cells until the expression of CD163 was induced during the culture. Indeed, a high proportion ( $> 60\%$ ) of CD163<sup>-</sup> cells which have been incubated with the virus, expressed this marker after 40 h of culture (Fig. 2).

Several studies in different species have evidenced the existence of a developmental relationship between monocyte subsets, so that classical monocytes can differentiate into non-classical monocytes (Ginhoux and Jung, 2014). Therefore, we also investigated whether CD163<sup>-</sup> BM monocytes, which resemble in some features classical monocytes, can acquire phenotypic characteristics of the CD163<sup>+</sup> BM monocytes after inducing their maturation with M-CSF, which regulates monocyte development under physiological conditions. As shown in Fig. 3, after 2 days in culture with rhM-CSF, a high proportion of sorted CD163<sup>-</sup> BM monocytes became positive for CD163. A fraction of these cells was also positive for CD169 and SLA-DR, displaying a phenotype similar to that of CD163<sup>+</sup> BM monocytes. A continuous differentiation of CD163<sup>-</sup> monocytes into CD163<sup>+</sup> monocytes in the BM may therefore provide new targets for PRRSV replication as the latter become infected. This conversion of CD163<sup>-</sup> BM monocytes into CD163<sup>+</sup> cells is consistent with previous data of our group with blood CD163<sup>-</sup> monocytes cultured with porcine serum (Chamorro et al., 2005). Our data show that a significant proportion of freshly obtained BM monocytes express CD163, and most of the sorted CD163<sup>+</sup> BM cells retain the expression of CD163, SLA-DR and CD169 after 3 days in culture with rhM-CSF. This is in contrast with data reported by Kapetanovic et al, which find very low CD163 expression in BM cells, both at the beginning and the end of the culture with rhM-CSF; nevertheless, it might be worth noting that they use thawed cells instead of freshly isolated cells (Kapetanovic et al., 2012).

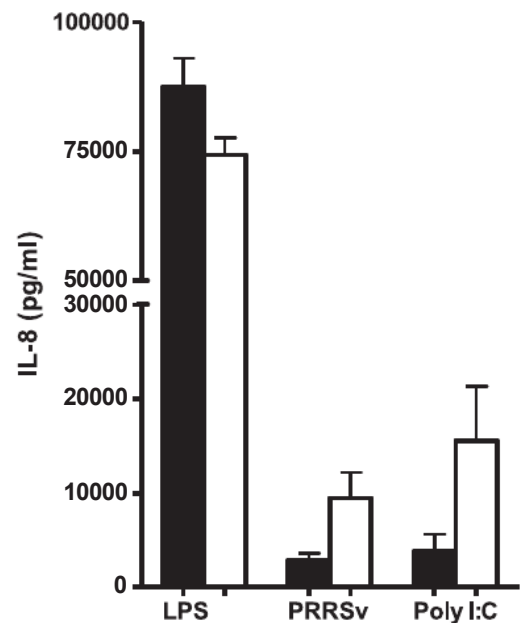


**Fig. 3.** Effect of maturation with rhM-CSF on phenotype of BM monocyte subsets. Sorted CD163<sup>-</sup> or CD163<sup>+</sup> BM monocytes were cultured in medium supplemented with rhM-CSF (20 ng/ml). At the times indicated (40 h, 66 h) cells were harvested and analysed by two-color flow cytometry after exclusion of doublet and dead cells. The expression of CD163 versus that of CD172a, SLA-DR and CD169 is shown. Data are from one representative experiment out of three performed.

**3.2. Cytokine production by CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> BM monocytes in response to PRRSV**

A local increase in the expression of pro-inflammatory cytokines has been observed in the BM of animals infected with PRRSV type 1 strains, which was associated with pathological changes in this compartment such as erythroid cell hypoplasia and myeloid hyperplasia (Amarilla et al., 2017). Therefore, we examined the production of cytokines by BM monocyte subsets in response to PRRSV. No secretion of TNF- $\alpha$ , IL-10 or IFN- $\alpha$  was detected in the supernatant of CD163<sup>-</sup> or CD163<sup>+</sup> BM cells incubated with PRRSV. However, both monocyte subsets produced IL-8 in response to virus, although this response was lower than that induced by LPS (Fig. 4). CD163<sup>+</sup> monocytes showed a tendency to produce higher amounts of IL8 than the CD163<sup>-</sup> monocytes, but no statistical significance was reached (p = 0.100). Whether the higher IL-8 production by CD163<sup>+</sup> BM monocytes is a consequence of their permissiveness to virus infection, or because of their higher expression of receptors such as TLR3 or TLR7 (Fernandez-Caballero et al., 2018), remains to be established. In this regard, CD163<sup>+</sup> BM monocytes were shown in a previous study to produce higher amounts of IL-8 than the CD163<sup>-</sup> monocytes in response to the TLR7 ligand imiquimod (Fernandez-Caballero et al., 2018), and in the present study they also produced higher amounts of this cytokine when stimulated with the TLR3 agonist poly I:C (Fig. 4).

In summary, BM CD163<sup>+</sup> cells can support replication of PRRSV. Since BM is a major source of leukocytes in post-natal life, the infection of these cells may affect their capacity to migrate to peripheral blood and contribute to the decrease in the number of peripheral blood



**Fig. 4.** Cytokine IL-8 production. Sorted CD163<sup>-</sup> (black bars) or CD163<sup>+</sup> (white bars) BM monocytes were incubated with PRRSV at a m.o.i. of 0.5 for 46 h, or stimulated with poly I:C (10  $\mu$ g/ml) or LPS (1  $\mu$ g/ml) for 21 h. Afterwards, supernatants were harvested and the concentration of IL-8 was determined by ELISA. Results show the mean production + SEM from 3 different animals.

monocytes and other hematological disorders observed during the course of PRRSV infection (Gomez-Laguna et al., 2009; Morgan et al., 2013).

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

T.F.C., B.A., F.A., C.R., J.M.L. and C.P., performed experiments; T.F.C., A.E. and J.D. analyzed results and made the figures; T.F.C., A.E. and J.D. designed the research and wrote the paper. All authors critically revised the article and approved the version submitted for publication.

### Funding

This work was supported by grants AGL2012-31556 and AGL2015-66187-P from Ministry of Economy, Industry and Competitiveness of Spain. Teresa Fernández-Caballero was supported by an FPI doctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (BES-2013-066193).

### Acknowledgements

We thank Elena Ramos and Paloma Martínez de la Riva for technical support and Carmen Hernández (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid) for assistance in flow cytometric sorting.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.027>.

### References

- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfacon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbin, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J., 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International committee on taxonomy of viruses (2016). *Arch. Virol.* 161, 2921–2949.
- Amarilla, S.P., Gomez-Laguna, J., Carrasco, L., Rodriguez-Gomez, I.M., Caridad, Y.O.J.M., Graham, S.P., Frossard, J.P., Steinbach, F., Salguero, F.J., 2017. Porcine reproductive and respiratory syndrome type 1 viruses induce hypoplasia of erythroid cells and myeloid cell hyperplasia in the bone marrow of experimentally infected piglets independently of the viral load and virulence. *Vet. Microbiol.* 201, 126–135.
- Borrego, B., Rodriguez-Pulido, M., Revilla, C., Alvarez, B., Sobrino, F., Dominguez, J., Saiz, M., 2015. Synthetic RNAs mimicking structural domains in the foot-and-mouth disease virus genome elicit a broad innate immune response in porcine cells triggered by RIG-I and TLR activation. *Viruses* 7, 3954–3973.
- Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2005. Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology* 114, 63–71.
- Chand, R.J., Tribble, B.R., Rowland, R.R., 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr. Opin. Virol.* 2, 256–263.
- Chang, H.C., Peng, Y.T., Chang, H.L., Chaung, H.C., Chung, W.B., 2008. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 129, 281–293.
- Chaudhuri, S., McKenna, N., Balce, D.R., Yates, R.M., 2016. Infection of porcine bone marrow-derived macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus impairs phagosomal maturation. *J. Gen. Virol.* 97, 669–679.
- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Barbe, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2007. IFN- $\alpha$  treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 757–766.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997a. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* 142, 2483–2497.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997b. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9–19.
- Ezquerro, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., Dominguez, J., 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 284–298.
- Feng, W., Laster, S.M., Tompkins, M., Brown, T., Xu, J.S., Altier, C., Gomez, W., Benfield, D., McCaw, M.B., 2001. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by streptococcus suis type II. *J. Virol.* 75, 4889–4895.
- Fernandez-Caballero, T., Alvarez, B., Revilla, C., Zaldivar-Lopez, S., Alonso, F., Garrido, J.J., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2018. Phenotypic and functional characterization of porcine bone marrow monocyte subsets. *Dev. Comp. Immunol.* 81, 95–104.
- Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martin, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42, 9.
- Ginhoux, F., Jung, S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Gomez-Laguna, J., Salguero, F.J., De Marco, M.F., Pallares, F.J., Bernabe, A., Carrasco, L., 2009. Changes in lymphocyte subsets and cytokines during European porcine reproductive and respiratory syndrome: increased expression of IL-12 and IL-10 and proliferation of CD4(-)CD8(high). *Viral Immunol.* 22, 261–271.
- Kapetanovic, R., Fairbairn, L., Beraldi, D., Sester, D.P., Archibald, A.L., Tuggle, C.K., Hume, D.A., 2012. Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 188, 3382–3394.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1995. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch. Virol.* 140, 745–755.
- Morgan, S.B., Graham, S.P., Salguero, F.J., Sanchez Cordón, P.J., Mokhtar, H., Rebel, J.M., Weesendorp, E., Bodman-Smith, K.B., Steinbach, F., Frossard, J.P., 2013. Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Vet. Microbiol.* 163, 13–22.
- Patton, J.B., Rowland, R.R., Yoo, D., Chang, K.O., 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res.* 140, 161–171.
- Singleton, H., Graham, S.P., Bodman-Smith, K.B., Frossard, J.P., Steinbach, F., 2016. Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Front. Microbiol.* 7, 832.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2943–2953.
- Wang, G., Li, L., Yu, Y., Tu, Y., Tong, J., Zhang, C., Liu, Y., Li, Y., Han, Z., Jiang, C., Wang, S., Zhou, E.M., He, X., Cai, X., 2016. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and induction of apoptosis in bone marrow cells of infected piglets. *J. Gen. Virol.* 97, 1356–1361.
- Wells, K.D., Bardot, R., Whitworth, K.M., Tribble, B.R., Fang, Y., Mileham, A., Kerrigan, M.A., Samuel, M.S., Prather, R.S., Rowland, R.R., 2017. Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 91 e01521–e01516.
- Yuste, M., Fernandez-Caballero, T., Prieto, C., Alvarez, B., Martinez-Lobo, J., Simarro, I., Castro, J.M., Alonso, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., Revilla, C., 2017. Splenic CD163+ macrophages as targets of porcine reproductive and respiratory virus: role of siglecs. *Vet. Microbiol.* 198, 72–80.



