



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS QUE MEDIAN  
LA POTENCIACION DE LA PROTECCION INDUCIDA  
POR EL PÉPTIDO GK1 COADMINISTRADO CON LA  
VACUNA ANTI-INFLUENZA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**RENÉ ALVARO SEGURA VELÁZQUEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDDA SCIUTTO CONDE**

**COMITÉ TUTOR: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALES;**

**DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO**

**MÉXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Posgrado en Ciencias Biológicas, por el apoyo brindado en la realización de mis estudios.

Al CONACyT por el apoyo recibido en la otorgación de la beca (Registro de beca 129488) sin la cual, no hubiera sido posible realizar mis estudios.

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT número IN-221905. Con el nombre: Evaluación de la capacidad inmunopotenciadora de los péptidos que constituyen la S3PVac en modelos experimentales, infecciosos y tumorales e identificación de los mecanismos.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Edda Sciutto Conde, Dra Gladis del Carmen Fragoso Gonzales y Dr. Armando Isibasi Araujo, por las revisiones, consejos y tiempo destinado para la elaboración de este trabajo

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico con especial cariño y agradecimiento a mi esposa Jacquelynne por todo el amor y felicidad que me regala en cada momento de mi vida y me motiva a mejorar día a día. A mis papas Silvia y Alejandro por guiarme hasta este momento y enseñarme lo hermosa que es la vida y a Valeria, el principal motivo de ahora en adelante

## INDICE

RESUMEN	1
Abstract	2
INTRODUCCIÓN	3
Influenza	3
Ciclo de replicación del virus de influenza	5
La respuesta inmune asociada a la protección contra la enfermedad	9
Células T CD8 <sup>+</sup> en una infección por influenza	23
Estrategias para aumentar la eficiencia de la vacuna contra influenza	25
PRIMER MODELO EXPERIMENTAL. Transferencia adoptiva de células Tg TCR/HA	
Antecedentes	26
Justificación	29
Hipótesis	29
Objetivos	29
Estrategia Experimental	30
Materiales y Métodos	31
Resultados	34
Conclusiones	39
SEGUNDO MODELO EXPERIMENTAL. Evaluación del efecto de GK1 en células dendríticas y en la activación linfocitaria	
Antecedentes	40
Justificación	42
Hipótesis	42
Objetivos	42
Materiales y Métodos	43
Resultados	46
Conclusiones	53

TERCER MODELO EXPERIMENTAL. Evaluación del efecto de GK1 en células dendríticas y en la proliferación linfocitaria	
Hipótesis	54
Objetivos	54
Materiales y Métodos	55
Resultados	58
Conclusiones	61
CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXO 1	85
ANEXO 2	88
ANEXO 3	91

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Células TCR/HA Thy 1.1 específicas transferidas a ratones receptores Thy1.2	34
Tabla 2. Presencia de células Tg TCR/HA Thy 1.1 presentes en ratones receptores Thy 1.2 después de ser inmunizados con vacuna de influenza y vacuna de influenza+GK1	35
Tabla 3. Presencia y porcentaje de proliferación de células TCR/HA del total de células CD4 <sup>+</sup> obtenidas de los ratones inmunizados con vacuna de influenza y vacuna de influenza+GK1	36
Tabla 4. Presencia y porcentaje de células T CD4 Tg TCR/HA en proliferación presentes en ratones inmunizados con los antígenos vacunales y con el péptido control específico para estas células en presencia o no de GK1	38
Tabla 5. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas o no estimuladas previamente con LPS	46
Tabla 6. Efecto de GK1 en la concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas no estimuladas con LPS	47
Tabla 7. Efecto de la presencia de GK1 en la concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas previamente estimuladas con LPS	48
Tabla 8. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas solo con GK1	49
Tabla 9. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS con y sin GK1	50
Tabla 10. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas solo con GK1 libre de LPS.	51
Tabla 11. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS y con GK1 libre de LPS	52
Tabla 12. Concentración de $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS y con GK1 libre de LPS	52

Tabla 13. Porcentaje de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> TCR/HA que presentan el marcaje completo con CFSE después de ser puestos en presencia de Células Dendríticas estimuladas con GK1 libre de LPS y con LPS+GK1	58
Figura 1. Niveles de IgG séricas específicas en ratones jóvenes y viejos	26b
Figura 2. Cambios morfológicos en los pulmones de ratones inmunizados con vacuna de influenza con y sin GK1 antes y después del desafío con la cepa de virus de influenza A/johanesburg/159/97. HE×40 (HE×10)	27b
Figura 3. Células TCR/HA Thy 1.1 transferidas y detectadas en ratones receptores Thy 1.2. Datos de un experimento representativo de los reportados en la Tabla 1	33b
Figura 4. Detección de células TCR/HA Thy 1.1 que expresan el receptor específico del epítipo HA 111-119. Datos de un experimento representativo de los reportados en la Tabla 2	34b
Figura 5. Detección de células TCR/HA en ratones receptores inmunizados con vacuna de influenza y vacuna de influenza+GK1 que marcados con CFSE	35b
Figura 6a. Detección de células T CD4 Tg TCR/HA y su estado proliferativo en ratones inmunizados con vacuna de influenza y con el péptido HA <sub>111-119</sub> en presencia o no de GK1	37b
Figura 6b. Detección de células T CD4 Tg TCR/HA y su estado proliferativo en ratones inmunizados con vacuna de influenza y con el péptido HA <sub>111-119</sub> en presencia o no de GK1	38b
Figura 6c. Detección de células T CD4 Tg TCR/HA y su estado proliferativo en ratones inmunizados con vacuna de influenza y con el péptido HA <sub>111-119</sub> en presencia o no de GK1	39b
Figura 6d. Detección de células T CD4 Tg TCR/HA y su estado proliferativo en ratones inmunizados con vacuna de influenza y con el péptido HA <sub>111-119</sub> en presencia o no de GK1	40b
Figura 6e. Detección de células T CD4 Tg TCR/HA y su estado proliferativo en ratones inmunizados con vacuna de influenza y con el péptido HA <sub>111-119</sub> en presencia o no de GK1	41b
Figura 7. Detección de proliferación en células T CD4 TCR/HA después de ser puestas en presencia de células dendríticas previamente estimuladas con LPS con y sin GK1. Datos de un experimento representativo de los reportados en la Tabla 13	57b
Figura 8. Cantidad de citocinas presentes en los sobrenadantes de células linfoides puestas en contacto con DC's previamente estimuladas con LPS con y sin GK1	58b

Figura 9. Moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y MHC Clase II en la superficie de las células dendríticas sobre-reguladas por GK1

---

---

## RESUMEN

El péptido sintético llamado GK1, derivado del cisticerco de *Taenia crassiceps*, tiene capacidad adyuvante. Diversos estudios realizados han demostrado que la co-inmunización de GK1 con la vacuna de influenza de uso humano (FLUZONE<sup>R</sup>) incrementa, en ratones de diferentes edades, los niveles de anticuerpos anti-influenza y mejora la capacidad protectora esperada. Para comenzar a entender los mecanismos inmunológicos involucrados en la capacidad adyuvante de GK1 se desarrolló una serie de pruebas *in vivo* e *in vitro* utilizando ratones transgénicos cuyas células T expresan un receptor específico para una región altamente conservada de la hemaglutinina (HA) del virus de influenza PR8 (epítotope 111-119 de la HA). Demostramos que la utilización del péptido GK1 incrementa en 90% la respuesta proliferativa *in vivo* de las células T CD4 HA<sub>111-119</sub> cuando es co-inmunizado con el epítotope de la HA. Por otra parte, generamos cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón; estas células dendríticas fueron tratadas *in vitro* con GK1 y posteriormente puestas en contacto con las células T transgénicas en presencia del epítotope HA como fuente de antígeno, y encontramos que las células dendríticas estimuladas con GK1 son capaces de potenciar la activación y proliferación de las células T hasta en 50% más que la inducida sin el estímulo con GK1. En sinergia con LPS, GK1 potencia la expresión de MHC Clase II (hasta 100% de incremento) y moléculas co-estimuladoras de células dendríticas (en 25% CD80 y en 125% CD86), promueve la secreción de las citocinas pro-inflamatorias, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  y la quimiocina CCL2, producto de su interacción con linfocitos T. *In vitro*, GK1 aumenta la activación de células linfoides NFAT (contienen insertado en el gen de la IL-2 el gen reportero LacZ que produce  $\beta$ -galactosidasa) que expresan el TCR específico para el epítotope de HA<sub>111-119</sub> inducida por el HA<sub>111-119</sub> presentado en células dendríticas derivadas de médula ósea

Los datos reportados en esta tesis constituyen las primeras evidencias de los fenómenos en los que subyace la capacidad inmunopotenciadora de GK1. Adicionalmente, los modelos experimentales desarrollados podrían ser de interés para evaluar el potencial adyuvante de otros potenciadores.

---

---

## ABSTRACT

GK1 synthetic peptide, first derived from *Taenia crassiceps* cysticerci, has showed capabilities as immune adjuvant. Several studies have demonstrated that co-immunization with GK1 and human influenza vaccine (Fluzone®) increases anti-influenza antibody levels, and improves the expected protecting capacity in mice from different age groups. Aimed to understand the immune mechanisms underlying GK1 adjuvant capability, a series of in vitro and in vivo tests was performed, using transgenic mice with T cells expressing a specific receptor for a highly conserved region in hemagglutinin (HA) from PR8 influenza virus (111-119 HA epitope). Our studies have shown that GK1 increases by 90% the T CD4 HA<sub>111-119</sub> proliferative response in vivo when co-immunized with HA epitope. On the other hand, we have cultured dendritic cells from mice bone marrow. These dendritic cells were treated in vitro with GK1, and then brought into contact with transgenic T cells, in the presence of HA epitope as antigen source. We have found that GK1-stimulated dendritic cells are able to increase T cells activation and proliferation up to 50% over that induced without the GK1 stimulus. Acting synergistically with LPS, GK1 enhances the MHC Class II expression (up to 100% increase) and dendritic cells co-stimulating molecules (25% CD80 and 125% CD86); additionally, it promotes the secretion of TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  pro-inflammatory cytokines, and CCL2 chemokine, as a result of their interaction with lymphocytes. In vitro, GK1 increases the activation of NFAT lymphoid cells (containing  $\beta$ -galactosidase-producer LacZ reporter gene inserted in IL-2 gene) expressing the specific TCR for HA<sub>111-119</sub> epitope, induced by HA<sub>111-119</sub> presented to bone-marrow dendritic cells.

The data herein reported offer one of the first evidences of the phenomena underlying the GK1 immunity-enhancer capability. Additionally, the experimental models herein developed could be appropriate to assess the adjuvant potential of other immunity-enhancers.

---

---

## INTRODUCCION

### Influenza

El virus influenza es un *Orthomixovirus* que infecta células epiteliales del tracto respiratorio del humano y de otros animales causando la influenza, la cual es una enfermedad altamente contagiosa de gran impacto tanto social como económico que anualmente causa epidemias de enfermedades respiratorias a nivel mundial en personas de todas las edades y puede ser considerada como la causa más importante de atención de enfermedades respiratorias agudas [Glezenet et al., 1991]. La influenza es una enfermedad estacional que se estima afecta del 10 al 20% del total de la población [A.D.M.E. 2000]. Los niños y los adultos mayores de 65 años son considerados las poblaciones de mayor riesgo siendo los adultos mayores el grupo de edad que más muertes registra por influenza [Heller et.al., 1998]. Sin embargo el mayor número de hospitalizaciones por influenza también incluye a los grupos conformados por niños y mujeres embarazadas [Monto, 2008]. Se estima que en Estados Unidos se registran alrededor de 30 mil muertes anualmente atribuidas a influenza [Simonsen et. al., 2000; Thompson et.al., 2003].

En contraste con el sarampión, la viruela y la poliomielitis, la influenza es causada por virus que sufren cambios antigénicos continuos y que poseen reservorios en la fauna silvestre. En la actualidad se conocen 3 tipos de virus de influenza; el A, B y el C; los cuales se diferencian entre sí por sus genomas y los productos generados de los mismos. Los genomas de los virus de influenza A y B están formados por ocho segmentos de polaridad o sentido negativo, de RNA viral de cadena única (vRNA) mientras que el virus de influenza C tiene un genoma que consiste en siete de estos segmentos (ver Tabla 1 del Anexo 1).

El virus de influenza A se ha caracterizado considerando el subtipo de sus glicoproteínas de superficie: la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA). Variaciones genéticas en estas proteínas han permitido generar diversos subtipos (16 de HA y 9 NA), 3 de HA (H1, H2 y H3) y 2 de NA (N1 y N2) que han causado epidemias en la población humana [Palese and Shaw, 2007]. Los dos subtipos de virus de influenza A humana actualmente en circulación (H3N2 y H1N1) así como el virus de influenza B producen enfermedad con características clínicas relativamente similares, aunque esta última genera menos complicaciones que la tipo A. Sin embargo, en niños mayores así como en

---

---

adultos sanos, se ha observado que es el virus A H3N2 el que se encuentra asociado con las enfermedades más severas, el virus A H1N1 con las enfermedades más leves, y el virus tipo B se asocia a una patogenicidad intermedia, considerando el tiempo total de duración de la sintomatología [Chin et. al., 1960]. En las poblaciones consideradas de mayor riesgo, el virus A H3N2 es el que más frecuentemente se asocia a complicaciones que requieren hospitalización y pueden causar hasta la muerte [Lui and Kendal, 1987].

La frecuencia de infección con los diferentes tipos y subtipos de virus están relacionados con la edad [Monto et al., 1985]. Los niños presentan mayor tasa de infección que cae conforme aumenta la edad, más rápidamente para la cepa A H1N1 y para el virus tipo B que para el virus tipo A H3N2. Este fenómeno se atribuye a un más rápido “drift” (mutaciones puntuales que generalmente se resultan en el cambio o sustitución de un reducido número de aminoácidos en la estructura de la HA) y/o “shift” antigénico (mutaciones más extensas que resultan en el cambio de segmentos completos en la secuencia de la HA). Los individuos ancianos son más frecuentemente infectados por la cepa H3N2 que por otra cepa de virus de influenza [Monto, 2008].

Influenza fue identificada como causa de muerte aún antes de que el virus que la causa se hubiera identificado [Monto, 2008]. Entre numerosas estimaciones de la prevalencia de influenza en el mundo, se reporta, por ejemplo, que en los Estados Unidos aproximadamente 36 mil personas mueren anualmente por influenza, de las cuales los individuos mayores de 65 años son los más afectados, seguidos por aquellos mayores a 50 años. Estos datos sustentan la propuesta de vacunar personas de más de 50 años.

En el éxito epidemiológico de la influenza participan los constantes cambios antigénicos que sufre el virus en las dos proteínas claves para su antigenicidad, que se insertan en la envoltura lipídica de los viriones: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Tanto la HA como la NA en el virus de influenza A se encuentran bajo dos constantes tipos de variación genética; el “drift” (tendencia) antigénico y “shift” (cambio) antigénico [Murphy, 1988], mientras que el virus de influenza B solo muestra drift antigénico. Las magnitud de las variaciones virales resultan en re-infecciones, epidemias o pandemias de influenza como las ocurridas en los años 1918, 1957, 1968 y más recientemente en el 2009.

El virus de influenza se caracteriza por poseer un genoma segmentado de RNA de polaridad negativa, su RNA es dependiente de una RNA polimerasa de origen viral para su replicación [Nicol, 2008]. Está cubierto de HA y NA, en una relación aproximada de 4 a 1, proyectados a partir de una membrana lipídica derivada de la célula hospedadora

---

---

[Palese and Shaw, 2007]. De manera similar canales de iones de la matrix (M2) atraviesan la membrana lipídica, con una relación M2: HA de un canal M2 por 101 a 102 moléculas de HA [Zebedee and Lamb, 1988]. La envoltura y sus tres proteínas integrales de su membrana (HA, NA y M3), cubren a la proteína de matrix M1, que encierra al core del virion. Interna a la proteína de matrix M1 se encuentra la proteína de exportación nuclear (NEP; proteína no estructural 2 o NS2) y el complejo de ribonucleoproteínas (RNP), constituido por segmentos de RNA viral recubierto con nucleoproteínas (NP) y la heterotrimérica RNA polimerasa dependiente de RNA compuesta de dos subunidades de polimerasa básica y una polimerasa ácida (PB1, PB2 y PA). La organización del virión de influenza B es similar, con cuatro proteínas en la envoltura: HA, NA y en vez de M2, la NB y la BM2.

Los viriones de influenza C son estructuralmente diferentes a los del virus de influenza A y B; en la superficie de células infectadas, pueden formar largas estructuras en el orden de los 500 nm. Sin embargo, los viriones de influenza C tienen una composición muy similar, con una glicoproteína situada en la envoltura lipídica alrededor de la proteína de matrix y el complejo RNP. El virus de influenza C tiene solo una gran glicoproteína en la superficie, la proteína hemaglutinina esterasa de fusión (HEF), que funcionalmente corresponde a la HA y NA de los virus de influenza A y B, y una pequeña proteína de envoltura, la CM2 [Palese and Shaw, 2007].

### **Ciclo de replicación del virus de influenza**

#### *Adhesión del virus.*

El virus de influenza reconoce al ácido N-acetilneuramínico (siálico) en la superficie de la célula hospedadora. El ácido siálico consta de nueve monosacáridos ácidos comúnmente encontrados en la porción terminal de muchos glicoconjugados. Se encuentran en muchos tipos celulares y muchas especies animales. El carbono 2 del ácido siálico terminal puede unirse al carbono 3 o al carbono 6 de la galactosa, formando la unión a -2,3 o la unión a -2,6; estas diferentes uniones resultan en una configuración estequiométrica única del ácido siálico terminal. La fracción de ácido siálico es reconocida y se une a la HA de la superficie del virus de influenza, específica para las uniones a -2,3 o a la unión a -2,6. En células epiteliales de la tráquea en humanos, es predominante la unión a -2,6, mientras que la unión a -2,3 es más común en el epitelio intestinal de aves acuáticas. En humanos el ácido siálico con uniones terminales a -2,3; que en general son menos abundantes, también está presente en epitelios respiratorios de las vías

---

---

respiratorias bajas (bronquiolos y alveolos), aunque es menos abundante que las uniones a -2,6 [Matrosovich et. al., 2004]. Como consecuencia, los humanos y otros primates pueden ser infectados por virus de influenza que infectan a aves, aunque en general, con menos eficiencia que los virus humanos [Beare and Webster, 1991]. Los pulmones de humanos no son tan accesibles a las partículas virales en suspensión que se encuentran en el aire en el tracto respiratorio superior (nasofaringe, senos paranasales, tráquea y bronquios), por lo que las infecciones con virus aviares son raros en humanos. Sin embargo, cuando cepas aviares llegan a infectar pulmones humanos, el resultado es una severa y rápida progresiva neumonía, con tasas de mortalidad de hasta el 60% [Gambotto et. al., 2008].

La estructura de la molécula de HA está conformada por un trímero con dos regiones estructuralmente distintas, un tallo compuesto de una triple espiral de  $\alpha$ -hélices, y una cabeza globular láminas  $\beta$  antiparalelas, posicionadas sobre el tallo [Wilson et al., 1981]. La cabeza contiene el receptor de ácido siálico que es el sitio de unión, que se encuentra rodeado por los determinantes antigénicos predichos, denominados A, B, C y D en el subtipo H3 [Webster et. al., 1983], y Sa, Sb, Ca1, Ca2 y Cb en el subtipo H1 [Palese and Shaw, 2007].

Durante la replicación del virus, la HA es escindida por la serina proteasa en HA1 y HA2; esta modificación es necesaria para la infectividad del virus. Se cree que la porción HA2 media la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, mientras que la porción HA1 contiene el receptor que se une a los sitios antigénicos [Steinhauer, 1999]. Los anticuerpos dirigidos a HA neutralizan la infectividad del virus. Aunque los virus frecuentemente cambian los aminoácidos de los sitios antigénicos; la configuración de la cabeza del tallo de la molécula de HA se mantiene conservada entre las cepas y subtipos. Estos cambios, relativamente menores, se acumulan dando lugar al "drift" antigénico. Eventualmente, mutaciones en múltiples sitios antigénicos resulta en una cepa viral la cual no es neutralizada de manera efectiva por los anticuerpos del hospedero como lo son con el virus original, y de esta manera el hospedero llega a ser susceptible a una infección producida por la cepa que sufrió el "drift".

#### *Entrada del virus*

Una vez la HA del virus de influenza (o la proteína HEF del virus de influenza C) se adhieren al ácido siálico, el virus es endocitado. La acidificación del compartimento endosomal es crucial para desnudar al virus de influenza. Primero, el bajo pH dirige el

---

---

cambio conformacional en la HA, exponiendo el péptido fusión que media la fusión de la envoltura viral con membrana endosomal, abriendo así el poro a través del cual la ribonucleoproteína viral (RNPs) será liberada al interior del citoplasma de la célula hospedadora [Sieczkarski and Whittaker, 2005]. Posteriormente, los protones del endosoma son bombeados al interior de la partícula viral vía el canal de iones M2. La proteína M2, un canal de iones transmembranal encontrado únicamente en el virus de influenza A, tiene una porción externa a la envoltura viral como la HA y la NA. La proteína M2 de las drogas anti-influenza del tipo de las amantadina, bloquean la actividad de los canales de iones y previenen que se desnude el virus [Wharton et. al., 1994]. La acidificación interna del virus de influenza vía los canales M2 desorganiza las interacciones internas proteína-proteína, permitiendo que la RNPs viral sea liberada de la matrix viral al interior de la membrana citoplasmática [Martin and Helenius, 1991].

#### *Síntesis del RNA viral*

Una vez liberado del virión, la RNPs trafica al núcleo celular de la célula hospedadora por medio de proteínas virales de localización nuclear (NLSs), que importan las RNPs y otras proteínas virales al interior del núcleo de la célula hospedadora [Cros and Palese, 2003]. En el núcleo se sintetiza el RNA viral, tanto el "capping" como la poliadenilación del RNA mensajero que actúa como template para la transcripción de las proteínas virales por parte de la célula hospedadora, y la segmentación del vRNA que forma el genoma de los nuevos virus creados. La RNA polimerasa viral dependiente de RNA, un componente de la RNPs importada al núcleo, usa el vRNA de sentido negativo como template para la síntesis de dos especies de RNA de sentido positivo: el template de mRNA para la síntesis de las proteínas virales y el RNA complementario (cRNA) intermediario del que la RNA polimerasa subsecuentemente transcribe más copias en sentido negativo, el vRNA genómico [Nicole et. al., 2008].

A diferencia del mRNA de la célula hospedadora, que es poliadenilado por una polimerasa poli (A) específica, el tallo de poly (A) del mRNA del virus de influenza es codificado en vRNA de sentido negativo, como un tramo de 5 a 7 residuos de uracilo, que la polimerasa viral transcribe en sentido positivo como una cadena de adenosinas que forman un tallo de poly (A) [Li X and Palese, 1994]. El "capping" del mRNA ocurre de una manera similarmente única, en la que las proteínas PB1 y PB2 hurtan los primers 5' "capping" de los transcritos del pre-mRNA del hospedero para iniciar la síntesis del mRNA viral, proceso conocido como "cap snatching" (robo de cap) [Krug, 1981].

---

---

Una vez polimerizado y "capping", el mRNA de origen viral puede ser exportado y traducido como el mRNA del hospedero. Sin embargo la exportación nuclear de los segmentos del vRNA es mediado por las proteínas virales M1 y NEP/NS2 [Cros and Palese, 2003]. M1 interactúa tanto con el vRNA y la NP, y es así que se cree que estos dos componentes juntos dentro del complejo RNP, además que M1 también se asocia con las proteínas de exportación nuclear NEP, que media la exportación M1-RNP vía nucleoproteínas al citoplasma.

#### *Síntesis de proteínas virales*

Las proteínas de envoltura HA, NA y M2 son sintetizadas a partir mRNA de origen viral en ribosomas de unión a membrana dentro del retículo endoplásmico, donde son plegadas y viajan al aparato de Golgi para su modificación post-transcripcional. Las tres proteínas tienen una señal de localización apical que se dirigen directamente a la membrana celular para ensamblar al virión.

#### *Empaquetamiento del RNA y ensamble del virus*

El virus de influenza no es completamente infeccioso a menos que su virión contenga un genoma completo de 8 segmentos (o siete segmentos para el caso del virus de influenza C). Antes el empaquetamiento del vRNA se consideraba un proceso completamente aleatorio, en que los segmentos de vRNA eran incorporados aleatoriamente en la gemación de las partículas virales, y solo aquellas que terminaban con un genoma completo llegaban a ser infecciosos. Ahora nuevas evidencias sugieren que el empaquetamiento es un proceso más selectivo, en el que unas discretas señales de empaquetamiento en los segmentos de vRNA aseguran que el genoma completo sea incorporado a la mayoría de las partículas virales [Bancroft and Parslow, 2002].

#### *Gemación y Liberación viral*

La gemación del virus de influenza ocurre en la membrana celular, probablemente iniciado por una acumulación de la proteína de matrix M1 en el lado citoplásmico de la bicapa lipídica. Cuando la gemación es completa, los picos de HA unen al virión con el ácido siálico en la superficie de la célula hasta que las partículas virales son liberadas por la actividad de sialidasa de la proteína NA. La NA es un tetrámero en forma de hongo, anclada a la envoltura viral por un dominio transmembranal [Colman et. al., 1983]. Este proceso destruye la actividad de receptor, liberando los residuos de ácido siálico

---

---

terminales de las glicoproteínas de la superficie celular y gangliosidos para liberar la progenie del virus de la célula hospedadora. La NA también remueve los residuos de ácido siálico de la misma envoltura del virus, para prevenir la agregación de otras partículas virales y así potenciar su infectividad y también ayuda a la infectividad del virus mediante el rompimiento de mucinas en secreciones del tracto respiratorio permitiendo al virus penetrar a través del epitelio respiratorio, por lo que juega un rol en la entrada del virus al epitelio respiratorio [Matrosovich et. al., 2004].

La influenza se adquiere por contacto directo a partir de individuos infectados, el virus se multiplica rápidamente en las células epiteliales a lo largo del tracto respiratorio promoviendo una marcada descamación y degradación de éstas células. Es también característica una clara infiltración de neutrófilos en las vías aéreas, siendo las células pulmonares más susceptibles que las del tracto respiratorio superior [Kristien, 2000].

### **La respuesta inmune asociada a la protección contra la enfermedad**

La mucosa del tracto respiratorio no solo es el sitio de infección del virus de influenza sino también el sitio de defensa en contra de la infección. La mayor parte de los virus son inicialmente detectados y destruidos unas cuantas horas después de ingresar al organismo a través de mecanismos relacionados con la respuesta inmune innata que se desencadenan tan en forma casi inmediata [Murphy and Webster, 2007]. En esta primera barrera de defensa también participa el moco y células fagocíticas con producción de INF  $\alpha$  y  $\beta$  así como células NK y el sistema de complemento.

Cuando los virus de influenza logran escapar esta primera barrera se comienza a desarrollar una inmune adaptativa donde los linfocitos T y B producen de linfocitos citotóxicos y anticuerpos y producción de células de memoria antígeno-específico (células T y B) que pueden participar en la prevención de infecciones subsecuentes [Tamura and Kurata, 2004]. Entre los principales mecanismos de respuesta adaptativa Figuran:

*Anticuerpos IgA de secreción específicos, células dendríticas y linfocitos citotóxicos*

**Anticuerpos de secreción específicos IgA.** Se ha observado que la preexistencia de IgG y IgA en animales previamente inmunizados participan en la eliminación viral a través de la formación de complejos virus-anticuerpo inmediatamente después de la re-infección. Las evidencias experimentales indican que en ratones normales la IgA es más importante que la IgG en la protección del tracto respiratorio

---

---

superior mientras que la IgG es más importante que la IgA en la protección de los pulmones [Renegar et. al., 2004]. Por su naturaleza polimérica, la IgA, que es llevada a las mucosas a través del epitelio en su forma polimérica, y provee no solo de protección contra la infección de virus homólogos sino también de protección cruzada contra infección con virus que hayan sufrido "drift" antigénico. Las IgGs se encuentran ampliamente distribuidas a través de los epitelios y pueden proveer protección en contra de la infección por virus homólogos y prevenir la neumonía por influenza. En ausencia de Ac's en animales pre-inmunizados, la producción de Ac's IgA e IgG específicos por parte de las células B de memoria se ve acelerada después de la re-infección, y estos Ac's juegan un papel importante en la eliminación viral. En células epiteliales de animales infectados, la IgA dimérica específica que trafica a través de las células epiteliales puede estar involucrada en la prevención del ensamble viral uniéndose a nuevas proteínas virales sintetizadas. Las partículas virales que logran salvarse del efecto de los anticuerpos pueden infectar las células del tracto respiratorio y la efectividad con que sean destruidas dependerá críticamente de la capacidad del hospedero para generar una respuesta Th1 en contra del virus [Graham et. al., 1994]. Una óptima respuesta Th1 consiste en la presencia de células T CD4<sup>+</sup> virus-específicas secretoras de INF- $\gamma$  y de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas que lisen células infectadas por el virus [Moran et. al., 1999]. En animales pre-inmunizados, la producción de una respuesta CTL por células T de memoria es muy acelerada y estas células parece que participan en la destrucción de células hospedadoras infectadas con varios subtipos de virus (del mismo tipo) a partir del tercer día posterior a la re-infección. De la misma manera células Th1 de memoria que median una acelerada respuesta de hipersensibilidad tipo retardada se encuentran involucradas bloqueando la replicación viral mediante la secreción de INF- $\gamma$ . (Ver Anexo 2).

**Células dendríticas.** En la respuesta inmune contra de influenza participan importantemente las Células Dendríticas (DC's) como células presentadoras de antígeno, las cuales son capaces de iniciar una respuesta inmune primaria [Mellman and Steinman, 2001] siendo más eficientes que los Macrófagos en la generación de una respuesta de linfocitos T citotóxica contra influenza [Bender et. al., 1995]; censan el organismo y ante el contacto con bacterias o virus, maduran y migran a los órganos linfoides donde presentan los antígenos patógeno-específico a las células T [Cella et. al., 1997]. Las DC's se encuentran en la mayor parte de los tejidos periféricos y son capaces de monitorear de

---

---

una manera muy dinámica la superficie de las mucosas. Después de la activación, se movilizan hacia los órganos linfoides secundarios (nódulos linfoides) donde presentan el antígeno a las células T e inician la respuesta inmune adaptativa. Los cambios fenotípicos que ocurren durante la maduración (activación) incluyen la sobre regulación del MHC II y moléculas co-estimuladoras así como la liberación de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que potencian la habilidad de las DC's a estimular las células T, induciendo una respuesta inmune adaptativa específica en contra del patógeno en cuestión [Banchereau et. al., 2000]. En la actividad anti-viral del sistema inmune innato participan los INF  $\alpha/\beta$ . Además de la función primaria de iniciar la respuesta inmune adaptativa las DC's también son capaces de modular e incluso suprimir la respuesta inducida.

Se cree que todos los subtipos de DC's se desarrollan en la médula ósea y viajan a los tejidos periféricos en un estado inmaduro [Holt et. al., 1994]. Existen diferentes clasificaciones de las células dendríticas pero en general se mencionan 2 subtipos de estas: las convencionales y las plasmacitoides. Del subtipo convencional se pueden dividir en mieloides y linfoides dependiendo de los marcadores expresados en su superficie [Kelsall et. al., 2002]. Las DC's convencionales son las principales células presentadoras de antígeno en el cuerpo, mientras que las DC's plasmacitoides son las principales productoras de Interferon  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) (INF tipo I) y juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inmune iniciándola. Existen evidencias en ratones que indican que las DC's mieloides preferentemente sesgan la respuesta de células T hacia una respuesta Th2 y las DC's linfoides hacia una Th1; subsecuentes investigaciones demostraron que el sesgo de las células T es un evento más bien plástico y que cada sub-tipo de DC's es capaz de inducir una respuesta Th1 o Th2 [Lambrecht et. al., 2000; Dodge et. al., 2003]. Las DC's plasmacitoides son capaces de migrar a los nódulos linfoides pero carecen de la habilidad de presentar antígenos; por lo tanto, en los nódulos linfoides influyen a las DC's convencionales a sesgar la respuesta de células T vía su producción de INF- $\alpha$ .

Aunque la mayoría de los estudios se han realizados en DC's murinas, se asume que los conocimientos adquiridos son extrapolables a las DC's humanas. Así, el subtipo de DC's humanas CD1 son análogas a las DC's convencionales encontradas en ratón, mientras que el subtipo CD2 es análogo a las DC's plasmacitoides vistas en ratón.

**Células dendríticas en pulmón.** Se estiman entre 400 y 800 células dendríticas por milímetro cúbico en la superficie epitelial de las vías aéreas de las ratas [Stumbles et.

---

---

al., 2001]. Se estima que el 85% de las células DC's se recambian cada 36 a 48 hrs, con un rango de vida media de entre 1.5 a 2 días en las vías aéreas y de 3 a 4 días en la periferia. Esta corta vida media contrasta con la observada para células de la piel de entre 9 a 15 días [Holt et. al., 1994; Ghaznawie et. al., 1999]. Otra diferencia entre pulmón y piel es que en la piel las células de Langerhans (un especializado tipo de DC's de piel) son capaces de mantener su número por división celular, mientras que ninguna población de auto renovación de DC's de pulmón ha sido identificada [Merad et. al., 2002]. De hecho, el mantenimiento homeostático (reclutamiento y/o retención) del número de DC's en pulmón parece depender principalmente de la quimiocina CCL5 (RANTES) y otro agonista para el receptor de quimiocina CCR1 y CCR5 [Stumbles et. al., 2001].

La mayoría, sino es que todas las DC's convencionales en el pulmón, existen en estado inmaduro, el cual es definido como bajo nivel de expresión de moléculas MHC clase I y II y la carencia de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 [Stumbles et. al., 2001]. Las DC's murinas inmaduras expresan receptores específicos de quimiocinas (CCR1, CCR5 y CCR6), FC $\gamma$ R, FC $\epsilon$ R, y varios receptores patrón (como el receptor de manosa y TLRs) [Stumbles et. al., 2001; Luster, 2002; Cochand et. al., 1999]. Vía pinocitosis y sus receptores, las DC's muestrean su ambiente mediante la unión a distintos azúcares (manosa), complemento (vía CR3), lipopolisacárido (vía TLR4), ácidos nucleicos (vía TLR3, 7, 8 y 9) e inmunoglobulinas [Kelsall et. al., 2002]. De esta manera, las DC's inmaduras pueden virtualmente ingerir cualquier proteína o ácido nucleico que aparezca en el tejido. Las DC's están bien posicionadas en la superficie de la mucosa para captar proteínas y organismos invasores que puedan estar presentes. En el intestino las DC's están localizadas justo debajo de la superficie epitelial y son capaces de extender sus dendritas y proyectarlas entre las células epiteliales hasta alcanzar el interior del lumen permitiéndoles tener acceso a las proteínas en el intestino. Hasta el momento no se conoce que sea de manera similar lo que ocurre en los pulmones pero se asume que este sea el caso. Por otra parte, en el tracto respiratorio las DC's han mostrado ser capaces de migrar fuera del tejido al interior del espacio aéreo y regresar a través del parénquima [Mitchell et. al., 2006]. Esta actividad de centinela permite a las DC's estar constantemente informando al sistema inmune sobre lo que ocurre y estar pendientes de un posible daño.

Una vez que las DC's han captado el antígeno extraño, el programa de maduración comienza. Estos cambios provocan se transformen de una célula que capta antígenos en una célula presentadora de antígenos. Rápidamente son desregulados los

---

---

receptores de quimiocinas involucradas en el “homing” de las DC’s a los tejidos periféricos (principalmente CCR1, CCR5 y CCR6). [Luster, 2002]. Esto permite la maduración de la DC’s para escapar del tejido y entrar en el flujo linfoide. Asociado a este cambio se da la sobre-regulación de CCR7, que les permite migrar hacia un gradiente CCL19/CCL21. CCL19 y CCL20 son las quimiocinas que se encuentran las vénulas endoteliales altas de los nódulos linfoides drenantes. De esta manera las DC’s alcanzan la capacidad de enfilarse a los nódulos linfoides [Luster, 2002]. Una vez que entran a los nódulos linfoides, ocurren una serie de cambios fenotípicos. En particular se observa un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas de presentación de antígeno por ejemplo, se observa un incremento de CD80/CD86 (B7.1/B7.2), CD1, también aumenta la molécula de adhesión intracelular 1, se incrementa la expresión de moléculas MHC clase I y II [Shorman et. al., 2002; Kelsall et.al., 2002]. Junto con estas moléculas de presentación antigénica las DC’s sufren significantes cambios. Aunque las DC’s inmaduras (y aquellas que se encuentran en tránsito en el linfa drenante) son básicamente células redondas, las DC’s maduras tienen largas extensión (lo que da lugar al nombre de células dendríticas). Todos estos cambios hacen que la DC’s sea una mejor células presentadora de antígeno, y sus dendritas proveen una mayor superficie con que contactar a las células T.

Una vez que las DC’s han madurado y entrado al nódulo linfoide, estas presentan su antígeno a prácticamente cualquier célula T que vaya de paso. [Stoll et. al., 2002]. Durante este proceso, el receptor antígeno específico en la célula T (el TCR) censa las moléculas MHC presentes en las extensiones de las DC’s. Cuando una DC’s presenta el antígeno adecuado en el correcto contexto de MHC, puede asociarse al TCR. Esta asociación se conoce como la sinapsis inmunológica que se establece entre la célula T y la DC’s [Shaw and Dustin, 1997; Dustin and Shaw, 1999]. Esta sinapsis resulta en la estimulación de la célula T por más de 10 hrs en los que permanecen asociadas [Hurez et. al., 2003]. Después de este periodo, las células T se separan de la DC’s y comienza a proliferar, dándose así la expansión clonal que caracteriza a la respuesta inmune. Una vez que la respuesta antígeno-específica es generada, la DC’s entra en apoptosis.

Las DC’s no solo inician la respuesta inmune sino que también son importantes moduladores de esta. DC’s convencionales son capaces de dirigir el desarrollo de una respuesta de células T CD4 o CD8 mediante una selectiva producción de varias citocinas durante la presentación del antígeno. Por ejemplo, la producción de IL-12 puede sesgar el desarrollo de células T CD4 hacia un fenotipo Th1 mientras que la IL-4 la dirige hacia una

---

---

respuesta Th2. Interesantemente no hace mucho se ha mostrado que el factor de transcripción t-bet, que se sabe es selectivamente expresado en células Th1 CD4, requiere ser expresado en las DC's para generar una respuesta Th1 completamente funcional [Wang et. al., 2006]. En cambio, aunque distintos factores transcripcionales que promueven una respuesta Th2 han sido identificados (GATA-3 y FN-ATc1), hasta el momento su expresión en las DC's y su papel en la polarización de una respuesta tipo Th2 aun no han sido caracterizados [Yoshida et al., 1998]. Las DC's también expresan la enzima indoleamina-2-3-deoxigenasa (IDO), que cataboliza el triptofano, un aminoácido crítico para la proliferación de células T [Fallarino et. al., 2002]. Por lo tanto, mediante el incremento en la expresión de IDO, las DC's pueden detener el desarrollo de las células T y abolir por otra parte una respuesta inmune productiva. Las células dendríticas también pueden inducir el desarrollo de células T experimentando apoptosis vía la expresión de FAS ligando dependiente de IL-12p40 [Legge et. al., 2005]. También las convencionales DC's son unas de las principales fuentes de CCL17, una quimiocina que recluta de manera natural a las células T reguladoras (Tregs) [Iellem et. al., 2001]. Por lo tanto, la producción de esta quimiocina en los nódulos linfoides drenantes pueden llevar a la entrada de Tregs que ahoguen o corten el desarrollo de una respuesta inmune. Además, esto puede ser un importante mecanismo de protección en contra del desarrollo de enfermedades autoinmunes.

***Virus y células dendríticas en pulmón.*** Algunos virus (herpes simplex, virus de vaccina) son capaces de infectar células dendríticas y ser presentados en el contexto de moléculas MHC clase I, aunque la mayoría no las infecta directamente [Tortorella et. al., 2000]. Para presentar antígenos virales sin infectar células presentadoras como las DC's, estas expresan receptores que se unen al virus y lo internalizan. Entre ellos Figuran el virus del HIV, el cytomegalovirus, el del Ebola, Dengue y Hepatitis C, todos capaces de ser internalizados a través de la unión de la lectina tipo C, molécula de adhesión intracelular específica de DC's [Cambi et. al., 2004]. Esta molécula participa en la movilización de células en el endotelio y en la adhesión a las células T durante el proceso de presentación del antígeno. Otros virus no tienen receptores conocidos y no pueden infectar directamente las DC's, la célula debe ingerir células infectadas por virus y los propios virus del medio extracelular donde se sintetizan y procesan proteínas virales en el contexto de MHC. La respuesta antiviral involucra frecuentemente CD8 presentados en MHC clase I. La asociación con antígenos de MHC clase I puede también inducir

---

---

fenómenos de tolerancia a la respuesta antiviral [Belz et. al., 2002]. La presentación de péptidos de un ambiente extracelular en el contexto MHC Clase I ha sido llamada presentación cruzada (cross-presentation) [Fonteneau et. al., 2003]. Una manera en que antígenos exógenos pueden ser presentados por moléculas MHC Clase I a través del procesamiento vía endosomal de material apoptótico o necrótico ingerido por las DC's. En el endosoma tardío, la proteasa aspartica cathepsina D puede inducir la liberación de la proteína endosomal contenida al citosol [Mitchell and Grayson, 2006]. Una vez que la proteína parcialmente procesada ha sido liberada al citosol, puede ser degradada por el proteosoma en el péptido apropiado. De esta forma, el péptido es exportado al Retículo Endoplasmico (RE) por los transportadores. Una vez en el RE, el péptido puede ser cargado en la molécula MHC Clase I para ser transportado a la superficie de la célula. Otro mecanismo de presentación cruzada reportado involucra el reciclamiento de moléculas MHC Clase I que encuentran péptidos antigénicos en el compartimiento endosomal. En este caso, el péptido estabiliza la molécula MHC Clase I, que luego es capaz de volver a la superficie y mostrar el péptido antigénico [Mitchell and Grayson, 2006]. Al parecer, la "cross-presentation" es un evento que ocurre regularmente en las DC's y principalmente inicia la tolerancia en ausencia de activación de DC's [Melief, 2003; Ohashi and De Franco, 2002]. Sin embargo, en una infección viral la respuesta inflamatoria rápidamente lleva a la activación de las células dendríticas y la vía de cross-presentation conduce a una respuesta inmune productiva.

La activación, maduración y migración de las DC's pulmonares, resulta en la inducción de una respuesta inmune adaptativa. Después de algunos días, las células T antígeno-específicas (CD8 y CD4) arriban a los pulmones. El virus puede ser eliminado y controlada la respuesta inflamatoria. Las DC's maduras pueden encontrarse en el pulmón durante la fase de resolución de la infección, lo que se podrían estas DC's maduras controlar la respuesta inducida, mediante la activación de Tregs [Mitchell and Grayson 2006].

**Células T.** Los precursores naive de las células T se someten a diferentes etapas de división y diferenciación antes de adquirir la función efectora necesaria para mantener sus actividades regulatorias [Swain et. al., 2003]. Algunas de sus actividades regulatorias consisten en ayudar a las células B a promover el switching de isotipo de estas células, a su mutación somática y a su diferenciación en los centros germinales en células plasmáticas y células de memoria [McHeyzer-Williams et. al., 2005]. Otra de las

---

---

actividades reguladoras clave por parte de las células T, en especial de las CD4<sup>+</sup>, involucra ayudar a las células T CD8<sup>+</sup> naive a promover su óptima diferenciación en células efectoras citotóxicas y de memoria y a soportar su mantenimiento [Janssen et. al., 2003]. Además hay una gran cantidad de efectos reguladores por parte de las CD4<sup>+</sup> en macrófagos así como en otras células presentadoras de antígenos (APCs). Estas funciones de las células T CD4<sup>+</sup> están mediadas por co-receptores de superficie, incluyendo a CD40L, CD28, antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos etc., que interactúan con receptores en las células B, células dendríticas, macrófagos u otras APCs, y por potentes citocinas secretadas por las CD4<sup>+</sup> efectoras bajo reconocimiento de antígeno en APCs.

Las células T CD4<sup>+</sup> efectoras se dividen en diferentes subgrupos caracterizados en parte por su habilidad para producir diferentes patrones de citocinas. Los 2 subtipos mejor caracterizados son los llamados T helper 1 (Th1), productores de Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y Th2, productores de IL-4, IL-5 e IL-13 como citocinas señal. Recientemente, se ha reportado un tercer subtipo de células (Th-17) productoras de IL-17 [Wynn, 2005]. El pertenecer a cada uno de los subgrupos se define considerando el perfil de citocinas que produce. Los linfocitos Th1 se promueven por IL-12 e INF- $\gamma$  e inhiben por IL-4 [Swain, 1991], los Th2 se promueven por IL-4 e inhiben por INF- $\gamma$ . El desarrollo de células Th-17 es dependiente de IL-23 e inhibido por IL-4 e INF- $\gamma$  [Wynn, 2005].

Los diferentes subgrupos de células T CD4<sup>+</sup> se asocian con diferentes actividades. Las células efectoras Th1 regulan la respuesta contra patógenos intracelulares, las efectoras Th2 son esenciales para la eliminación de ciertos patógenos [Mossman and Coffman, 1989] y las Th-17 han sido implicadas en patogénesis de autoinmunidad [Park et. al., 2005]. Las células efectoras una vez generadas, tienen la capacidad de llevar múltiples acciones al reencontrarse con el péptido antígeno/APC [Dubey et. al., 1996]. Tienen el potencial de desarrollarse en Células T CD4<sup>+</sup> de memoria de larga vida que pueden responder más rápida y vigorosamente cuando se re-encuentran con el antígeno [Dutton et. al., 1999]. Esta respuesta secundaria es uno de los factores claves en la protección en contra de patógenos después de una infección primaria o de la vacunación.

Si bien las células T CD4<sup>+</sup> son un importante componente de la respuesta anti-viral contra infecciones locales y sistémicas, existen estudios discordantes al respecto de su participación en la respuesta contra influenza. Utilizando ratones carentes de células T CD4<sup>+</sup> se han obtenido evidencias de que estas células parecen no ser requeridas en la respuesta primaria anti-vira. Otros reportes señalan que los linfocitos CD4<sup>+</sup> son necesarios

---

---

para inducir una respuesta citotóxica secundaria, contribuyen con la respuesta inmune en el sitio de infección a través de la secreción de citocinas [Tripp et. al., 1995]. Por otra parte se ha observado que un gran número de linfocitos CD4<sup>+</sup> efectores virus de influenza-específicos que se acumulan en el pulmón antes de la completa eliminación del virus secretan INF- $\gamma$  [Roman et. al., 2002], lo que sugiere su posible relevancia en la resolución de la enfermedad. La participación de linfocitos CD4<sup>+</sup> es aparente en ausencia de linfocitos B y T cooperadores (Th) en estos ratones tratados con anticuerpos anti-CD4. Los ratones depletados de estas poblaciones celulares no pueden eliminar el virus y presentan una alta mortalidad a la cepa virulenta PR8 [Mozdanowska et. al., 2000]. Estas evidencias son compatibles con que los linfocitos CD4<sup>+</sup> por si mismos no pueden eliminar el virus de manera efectiva y apuntan a su relevancia promover la producción de anticuerpos [Topham and Doherty, 1998]. Estas observaciones nos llevan a considerar la posibilidad que las células T CD4<sup>+</sup> efectoras y de memoria contribuyen a la inmunidad contra influenza a través de promover la generación de una respuesta CD8<sup>+</sup> citotóxica influenza-específica y la producción de anticuerpos; y también la posibilidad de que células T CD4<sup>+</sup> efectoras en el pulmón puedan directamente mediar la eliminación viral por mecanismos independientes de INF- $\gamma$  y/o por efectos citolíticos directos de células infectadas [Deborah M. et al., 2004]. Otros estudios señalan la relevancia de la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) virus específicos en Influenza en el control de la infección [Ennis et. al., 1978; Bot et. al., 1996] a través de la eliminación del virus de pulmones infectados [Taylor and Askonas, 1986]. Sin embargo, en ratones deficientes de  $\beta_2$  microglobulina ( $\beta_2^{-/-}$ ) que carecen de CTL's CD8<sup>+</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> pueden eliminar el virus de influenza A de los pulmones de ratones infectados, en forma independiente de MHC Clase II en células epiteliales del pulmón [Topham et. al., 1996], aunque un número significativo de CTL's CD4<sup>+</sup> restringidos a MHC clase II fueron recuperados de los pulmones de ratones  $\beta_2^{-/-}$  infectados con virus de influenza. Estas observaciones señalan la posible participación de diferentes mecanismos en el control de influenza.

***Células T CD4<sup>+</sup> efectoras en una infección por influenza.*** Las células T reconocen péptidos generados después de la infección replicación y captura por parte de las APC; de antígenos virales provenientes de virus que pueden infectar y replicarse antes de que las células T respondan. Una vez preparadas, las células T de memoria podrían, en principio, rápidamente secretar citocinas después del re-estímulo [Roman et. al., 2002]. Sin embargo, existen estudios que sugieren que las células T CD4<sup>+</sup> toman de 2 a 3 días

---

---

para convertirse en efectoras que eficientemente migren a sitios no linfoides como el pulmón [Swain et. al., 2002]. De esta forma la inmunidad mediada por células T en descanso o de memoria central pueden ser retardada comparada con la inmunidad mediada por células de memoria efectoras en el pulmón [Sallusto et. al., 2004]. Después de unos pocos días la respuesta retardada podría proteger contra efectos letales de una infección por influenza si esta fuera suficientemente robusta.

La relevancia de la inmunidad específica mediada por CD4<sup>+</sup> en la protección contra infecciones letales de influenza ha sido extensamente explorada. En experimentos de transferencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> influenza-específicas Th1, generados *in vitro*, entre ratones singénicos [Roman et. al., 2002] desafiados con dosis letales de PR8 (cepa de influenza relativamente patogénica), se logró suprimir la pérdida de peso esperada después de la primera semana de infección [Brown et. al., 2006] y aumentar la sobrevivencia a desafíos virales letales respecto a los que los que recibieron células naive influenza-específicas [Swain et. al., 2006]. Otros datos apoyan la relevancia de CD4<sup>+</sup> sensibilizadas (primed) en la protección: CD4<sup>+</sup> efectores fueron efectivas en prevenir mortalidad transferidas a ratones nu/nu deficientes de células T, independientemente de la producción de INF- $\gamma$  (los mismos efectos se obtuvieron transfiriendo células de ratones enteros o “knock out” en INF- $\gamma$  [Brown et. al., 2004]. Las células efectoras generadas *in vitro* fueron capaces de eliminar específicamente blancos pulsados con péptidos mediante mecanismos dependientes de perforina, y en cambio, los efectores deficientes de perforina fueron poco eficientes en revertir la pérdida de peso y promover la supervivencia. Esto sugiere que algunos componentes de las células T CD4<sup>+</sup> sensibilizadas (primed) pueden mediar un ataque citotóxico de células epiteliales del huésped viralmente infectadas [Topham et. al., 1996]. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> efectoras no transfieren protección introducidas en ratones JhD deficientes en células B desafiados con influenza, en los que se observa la pérdida de peso en la primera semana de infección y eventual muerte. Es factible que las células transferidas a ratones deficientes de células B actúen produciendo anticuerpos directamente responsables de la protección. La observación de que los niveles de anticuerpos en los huéspedes adoptivos que recibieron CD4<sup>+</sup>, aumentaron más rápidamente en respuesta a la infección por influenza, que los no transferidos apoya esta posibilidad [Brown et. al., 2004]. Para evaluar esta hipótesis, Swain y colaboradores introdujeron pequeñas cantidades de suero que contenía anticuerpos una semana después de transferir células efectoras T CD4<sup>+</sup> y llevar a cabo la infección letal con virus. Aquellos ratones que recibieron suero influenza-específico, pero

---

---

no los controles que únicamente recibieron suero, protegieron a los huéspedes deficientes en células B reconstituidos con CD4<sup>+</sup> pero no a aquellos sin transferir. Los ratones que solo recibieron suero no específico no sobrevivieron. Estas observaciones sustentan la posibilidad de múltiples funciones asociadas a CD4<sup>+</sup>. Independientemente de la factible versatilidad de CD4<sup>+</sup> estos resultados proporcionan evidencias de que tanto las células T CD4<sup>+</sup> sensibilizadas (primed) en presencia de células B del huésped proveen una efectiva protección en contra de la influenza.

Linfocitos monoclonales específicos CD4<sup>+</sup> efectores generados *in vitro* aumentan la supervivencia ante una infección letal con influenza, ahora la pregunta es ¿en qué medida las células T CD4<sup>+</sup> producidas específicamente por una infección subletal de influenza pueden proteger en contra de una infección letal? Las células generadas *in situ* es muy probable que incluyan algunas que puedan reaccionar en contra de nuevas cepas de influenza que no comparten determinantes de HA o NA pero pueden compartir heterosubtipos. Para evaluar esta posibilidad se desafiaron ratones con una dosis subletal de virus de influenza PR8 y se aisló tejido de pulmón y bazo. Los autores demostraron la capacidad de transferencia de protección contra la dosis subletal a través de la transferencia de CD4<sup>+</sup> efectoras provenientes de pulmón y bazo. Los ratones knockout de INF- $\gamma$  no generaron células T CD4<sup>+</sup> efectoras protectoras. Este resultado sugiere que el INF- $\gamma$  producido por las células efectoras *in vivo* también puede contribuir a la protección [Swain et. al., 2006].

Todos estos datos siguen soportando el concepto de que las células T CD4<sup>+</sup> tienen múltiples funciones que contribuyen a su habilidad para proteger de una infección letal por influenza. Los mecanismos utilizados por las células efectoras para mediar la ayuda a las células B pueden ser diferentes de aquellos mecanismos que median otras funciones de las células T CD4<sup>+</sup>, como la actividad citotóxica detectada por las células efectoras polarizadas a Th1 generadas *in vitro*.

Después de estas observaciones, Swain y colaboradores examinaron el impacto de la deficiencia de la proteína asociada a SLAM (SAP) (proteína que participa en la diferenciación celular que conduce a producción de patrones específicos de citocinas) en la función de las células T helper. En respuesta a una infección por influenza, células T CD4<sup>+</sup> SAP deficientes se expanden de manera normal, desarrollándose en células Th1 efectoras y manteniéndose largo tiempo en números normales después de la infección por influenza; siendo efectivas en su habilidad de dirigir la respuesta de células B. Estos ratones desarrollaron una “casi” normal respuesta de anticuerpos IgM anti-influenza, pero

---

---

la expansión primaria de células B y células plasmáticas de todos los otros isotipos fue dramáticamente reducida, dejando a los ratones con aproximadamente 100 veces menos cantidad de anticuerpos IgG antivirales en circulación. Sin embargo, la respuesta IgA fue más independiente de la expresión de SAP. Ratones SAP deficientes pueden controlar una infección subletal de influenza. Sin embargo, cuando los ratones desafiados con una dosis subletal de influenza reciben un segundo desafío, los ratones “wild type” y no así los ratones SAP deficientes controlan la infección. Además, el suero inmune procedentes de ratones “wild type” transferido en ratones naive permite la supervivencia a dosis de influenza que resultan letales para ratones que no habían recibido ningún contacto previo. Aunque células CD4<sup>+</sup> SAP deficientes tienen un defecto en la producción de citocinas Th2, este defecto no se ha visto como responsable de su inhabilidad de promover una respuesta de células B porque la polarización de las células CD4<sup>+</sup> SAP deficientes hacia Th2 *in vitro* restaura la producción de citocinas pero no restaura la ayuda a las células B en una transferencia pasiva. Estos resultados nos sugieren que la ayuda a las células B para la generación de una respuesta madura de anticuerpos es mediada por funciones de CD4 SAP dependientes que son distintas de otras funciones CD4<sup>+</sup> que son SAP independientes. Esto soporta la hipótesis de que las CD4<sup>+</sup> efectoras que ayudan a las células B usan diferentes mecanismos que aquellas que actúan directamente en el pulmón para eliminar al virus.

A diferencia de los muchos pasos involucrados y los factores requeridos en la generación de células T efectoras altamente diferenciadas, la transición de células efectoras a células de memoria es más simple. Cuando las células efectoras generadas *in vitro* o *in vivo* son transferidas a huéspedes adoptivos, se desarrollan en células de memoria [Swain, 1994; Hu et. al., 2001]. Gran cantidad de atributos funcionales de las células efectoras son conservados por las células de memoria a las que dieron origen entre los que se encuentran: rápida producción de citocinas después de la re-estimulación [Stockinger et. al., 2004]; polarización de la producción de citocinas [Swain, 1994] incluyendo IL-2 [Rogers et. al., 1998], responden a una relativamente baja dosis de antígeno [Carter and Swain, 1998], e independencia de la mayoría de los requerimientos co-estimulatorios [Croft and Dubey, 1997]. Las células de memoria también contienen la expresión de altos niveles de algunas moléculas de adhesión que incluyen CD44, CD 49d y CD11a/CD18, que permiten a las células de memoria interactuar de una manera mucho más efectiva con las APCs y células estromales que proveen factores de supervivencia [Swain, 2003].

---

---

**Células T CD8<sup>+</sup> en una infección por influenza.** Las células T CD8<sup>+</sup> de memoria participan en la respuesta a una infección secundaria por virus, incrementando su número y potenciando la respuesta en contra del antígeno desafiante (reduciendo el requerimiento de moléculas co-estimuladoras y el alto estatus de activación de las células). Las CD8<sup>+</sup> de memoria pueden ser clasificadas en dos subpoblaciones conocidas como células de memoria central y células de memoria efectoras. Las células de memoria central expresan altos niveles de CD62L y CCR7 y se acumulan en órganos linfoides secundarios así como en la médula ósea mientras que las células T de memoria efectoras expresan bajos niveles de CD62L y CCR7 y se acumulan en tejidos y órganos periféricos [Becker et. al., 2005]. Existen datos que sugieren que las células T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora y las células T CD8<sup>+</sup> de memoria central juegan diferentes papeles en respuesta a una infección por influenza. En general, la respuesta se puede dividir en 3 etapas diferentes y temporales [Hikoto et. al., 2006]. La respuesta inicial a la infección (podemos llamarla fase I) involucra a las células T CD8<sup>+</sup> de memoria efectoras que ya se encuentran presentes en vías aéreas y pulmón. Estas se encuentran óptimamente situadas lo que logra un rápido encuentro con el patógeno en pulmón y la iniciación de una inmediata respuesta anti-viral. La segunda fase involucra a las CD8<sup>+</sup> de memoria efectoras que no proliferan y que son directamente reclutadas al pulmón procedentes de la circulación [Hikoto et. al., 2006]. Finalmente la tercera fase involucra tanto a las CD8<sup>+</sup> de memoria efectoras como a las de memoria central que proliferan en los nódulos linfoides drenantes en respuesta al antígeno y que son reclutadas a los pulmones como células T efectoras completamente activadas [Cauley et. al., 2003]. Las tres fases operan para generar una rápida y sostenida respuesta a la infección. Cabe remarcar que una protección óptima depende de la fuerza de las primeras fases (fase 1 y 2) de la respuesta que se producen durante los primeros días después de la infección. Los estudios de transferencia de células por vía intra-traqueal han demostrado que las células de memoria presentes en las vías respiratorias del pulmón son capaces de reducir la carga viral [Hogan et. al., 2001].

Después de una infección intranasal, el contacto, activación y expansión de las células T CD8<sup>+</sup> naive ocurren en los nódulos linfoides drenantes medisetales entre los 3-4 días después de la infección [Lawrence et. al., 2004]. La capacidad antiviral de estas CD8<sup>+</sup> influenza-específicas depende de su habilidad de migrar a los pulmones y epitelios aéreos infectados [Cerwenka et. al., 1999], donde aparecen de 5 a 7 días después de la infección [Lawrence et. al., 2005]. Debido a que la replicación viral se lleva a cabo en las

---

---

células del epitelio respiratorio [Walker et. al., 1994], las células T CD8<sup>+</sup> ejercen su función efectora en este sitio, produciendo citocinas antivirales y lisando las células blanco que presentan los determinantes virales. La lisis de las células epiteliales infectadas es mediada por la exocitosis de gránulos que contienen perforina y granzimas [Topham et. al., 1997]. La liberación de perforina y granzimas por parte de las células T citotóxicas influenza-específicas es constantemente regulada, ocurriendo muy pronto después de la activación o cerca del punto de contacto entre las células T citotóxicas y las células blanco infectadas [Prendergast et. al., 1992].

Las células T CD8<sup>+</sup> influenza-específicas reconocen múltiples antígenos virales en las células blanco y en las células presentadoras de antígeno; por ejemplo, las cepas HKx31 y PR8 comparten 6 genes derivados de PR8 que son procesados para generar péptidos reconocidos por células T CD8<sup>+</sup> influenza-específicas. La respuesta primaria a cualquier cepa es dominada por células T CD8<sup>+</sup> que reconocen dos determinantes, la nucleoproteína (NP<sub>366-374</sub>, H2D<sup>b</sup>) [Townsend et. al., 1986] y la polimerasa ácida (PA<sup>224-233</sup>, H2D<sup>b</sup>) [Belz et. al., 2000]. Una baja proporción de similares células T CD8<sup>+</sup> reconocen otros 4 determinantes: la subunidad 1 de la polimerasa básica (PB1<sub>703-711</sub>, H2K<sup>b</sup>), la proteína no estructural 2 (NS<sub>114-121</sub>, H2K<sup>d</sup>), la proteína de matriz 1 (M1<sub>128-135</sub>, H2K<sup>b</sup>), y la proteína derivada de un alternativo marco de lectura abierto en el gen PBI (PBI-F2<sub>62-70</sub>, H2D<sup>b</sup>) [Chen et. al., 2001]. Las subsecuentes poblaciones de memoria parecen ser estables, las células T CD8<sup>+</sup> D<sup>b</sup>NP<sub>366-374</sub> y D<sup>b</sup>PA<sub>224-233</sub> de memoria son aun detectables hasta al menos o más de 570 días posteriores a la infección inicial [Kedzierska et. al., 2007].

La respuesta secundaria de CTL influenza específica surge aproximadamente 2 días más rápido que la respuesta primaria, con un incremento de nivel y actividad. La reducción de las células T CD8<sup>+</sup> reduce la capacidad de los ratones para responder a la infección por influenza, lo que nos señala la relevancia de las CD8<sup>+</sup> en la respuesta protectora secundaria. El desafío experimental puede ser realizado con HKx31 y PR/8 ya que todos los epítopes reconocidos provienen de sus proteínas internas. Las cepas HKx31 y PR/8 expresan diferentes HA y NA así como proteínas de superficie. A pesar de una similar magnitud en la respuesta primaria hacia D<sup>b</sup>PA<sub>224-233</sub>, las CD8<sup>+</sup> D<sup>b</sup>NP<sub>366-374</sub> específicas dominan la respuesta secundaria ante el desafío HKx31 ---- PR/8, representado hasta con el 80% de las CD8<sup>+</sup> influenza específica. Este dominio se mantiene en la población de células de memoria: el número de CD8<sup>+</sup> NP-específicas excede todas las otras poblaciones de CD8<sup>+</sup> influenza-específicas cuantificadas [Marshall

---

---

et. al., 2001]. A pesar del dominio NP, las células CD8<sup>+</sup> específicas para los otros 5 determinantes pueden ser aisladas después de un desafío secundario, aunque en menor frecuencia.

## **Vacunación contra influenza**

La principal estrategia utilizada para prepararse controlar influenza ha sido mediante a través del desarrollo de vacunas [Potter, 2001].

### *Vacunas de virus inactivado*

Las vacunas de influenza más comúnmente licenciadas son las preparadas con virus inactivados. Las tres formulaciones que han estado disponibles, se basan en la generación de anticuerpos neutralizantes contra la proteína HA y NA. Aunque la respuesta de anticuerpo es eficiente contra un desafío homólogo, su especificidad resulta en su ineffectividad contra variantes de la misma cepa o contra nuevos subtipos virales. Estudios clínicos han demostrado que las vacunas inactivadas tienen una eficiencia de hasta el 70%, medida por la reducción serológica de influenza, en el grupo de etario de 14 a 60 años [Demicheli et. al., 2002]. Anticuerpos IgA secretores anti-influenza pueden prevenir significativamente la infección [Treanor et. al., 2005] Sin embargo su eficiencia es baja tanto en los niños como en los ancianos [Jefferson et. al., 2005]. La primer vacuna inactivada fue utilizando el virion entero, cuyo uso experimental data desde los años 1940s. La segunda en aparecer fue con el virión fragmentado con detergentes y finalmente se desarrolló la conocida como subunidad viral, que es preparada por enriquecimiento de proteínas virales de superficie, la HA y la NA después de la ruptura de las partículas virales. Aunque las vacunas preparada con virus inactivado completo son más inmunogénicas [Gross et. al., 1977], los efectos colaterales asociados a la vacunación, particularmente en infantes y niños, condujo al desarrollo de vacunas basadas en viriones fragmentados alrededor de las años 60s [Mostow et. al., 1969]. Tanto la vacuna de virion fragmentado como la formulada por sub unidades virales han demostrado ser seguras y han sido aplicadas a millones de personas por todo el mundo [Brenson et. al., 2006]. Debido a la limitada inmunogenicidad de las vacunas fragmentadas estas deben de administrarse en dos dosis para generar protección en individuos que nos han sido previamente inmunizados [Atmar et. al., 2006], lo que representa un problema de logística [Ellebedy and Webby, 2009] en casos de epidemia.

---

---

Otra dificultad que limita la efectividad de las vacunas inactivadas radica en la dependencia de su sistema de producción dependiente de huevos embrionados de pollo y el tiempo que requiere su preparación que incluye la selección de cepas de la vacuna [Fedson, 2006; Gerdi,. 2003].

#### *Vacunas de virus vivos atenuados*

A diferencia de las vacunas inactivadas, las vacunas de virus vivos atenuados (LAIVs) son administradas por la inoculación intranasal de los virus competentes. En estas vacunas la HA y la NA son introducidas dentro de un virus atenuado adaptado en frío [Wareing and Tannock, 2001]. El virus resultante tiene de fenotipo antigénico de la cepa deseada (en este caso la cepa que se requiere para esta temporada) pero el fenotipo atenuado de la cepa maestra. Cabe mencionar que se están explorando otras estrategias para desarrollar vacunas de virus vivos atenuados, dirigiendo la expresión de otros segmentos de gen del virus de influenza como la proteína M2, PB2 y NS1 [Watanabe et. al., 2001]. Las vacunas de virus vivos atenuados presentan la ventaja de inducir respuesta local de anticuerpos neutralizantes y una respuesta mediada por células dirigida a las proteínas virales mas conservadas [Thomas et. al., 2006]. Esta inmunidad podría proteger entre las diferentes cepas de virus de influenza. En la práctica, al comparar las vacunas de virus vivos atenuados con las vacunas inactivadas en temporada de influenza, la teórica ventaja de la inmunidad inducida por las vacunas de virus vivos atenuados es mínima [Ohmit et.al., 2006]. A pesar de sus supuestas ventajas, las vacunas hechas a base de virus vivos atenuados sufren de las mismas desventajas que padecen sus contrapartes inactivadas., requieren de una segunda dosis para generar una respuesta inmune adecuada y su tiempo de degeneración no es substancialmente diferente al de las vacunas inactivadas. Además, el virus vacunal puede infectar el tracto respiratorio superior del humano [Shinya et. al., 2006].

Si bien la eficiencia de vacunación es baja en los grupos considerados de alto riesgo (niños y ancianos principalmente), las vacunas actualmente disponibles reducen los índices de morbilidad y mortalidad en estas poblaciones, lo que sustenta la recomendación de su aplicación [Jacqueline et. al., 2000]. Así, en ancianos, la tasa de neumonía y muerte provocada por influenza ha disminuido como consecuencia de la aplicación de las vacunas comerciales actualmente existentes [Phair et. al., 1978].

En humanos, la vacuna de virus vivo atenuado intranasal estimula la producción tanto de IgA como de IgG en mucosas y de IgG en plasma, mientras que la vacuna

---

---

inactivada intramuscular estimula la producción de IgG sistémica pero no la producción de anticuerpos IgA en mucosa [Clements et. al., 1986; Wagner et. al., 1987].

### **Estrategias para aumentar la eficiencia de la vacuna contra influenza**

En los Estados Unidos las vacunas de influenza inactivadas han estado disponibles por más de 30 años y desde el 2003 ha salido al mercado una vacuna de influenza viva atenuada [Nichol and Bouviera, 2008]. Sin embargo, la insuficiente eficiencia de la vacuna de influenza para su prevención, en particular en la población de mayor riesgo de morbi/mortalidad aunada a las indicaciones de posibles nuevas pandemias ha desencadenado importantes esfuerzos mundiales para su potenciación. Para este fin se están utilizando diferentes estrategias para la generación de nuevas propuestas para combatir a la influenza, algunas de estas se basan en la generación de nuevas y más efectivas vacunas así como la utilización de nuevos adyuvantes o estrategias de presentación de antígeno. La utilización de plásmidos basados en sistemas genéticos reversos [Hoffmann et. al., 2000] es una de las nuevas posibilidades; otra es la utilización de lo que han llamado vacunas de nano-partículas, las cuales incorporan componentes antigénicos de influenza y en su caso de otros virus como el Virus sincitial respiratorio y la parainfluenza tipo 3 [Adair, 2009]. También se ha trabajado en la generación de vacunas de DNA [Kodihalli et. al., 2000], así como también la propuesta de usar nuevos adyuvantes [Lindblad, 2004; Bernstein et. al., 2008]. La vacuna de influenza virosomal es otra propuesta que se ha considerado [Herzog et. al., 2009]. Con la pandemia en fase 6 en el 2009 para el virus de influenza humana tipo A, se han realizado esfuerzos significativos para desarrollar vacunas de influenza a mayor velocidad en sistemas que sustituyan al actualmente en uso, utilizando la expresión de la vacuna en cultivos celulares. Para este propósito se han utilizado 3 diferentes líneas celulares (Madin-Darby Canine Kidney, Vero and PER.C6) y en la actualidad la evaluación de estas vacunas se encuentran en ensayos clínicos [Genzal and Reichl, 2009].

La estrategia de identificar inmunopotenciadores para aumentar la eficiencia vacunal se ha explorado utilizando modelos murinos de influenza. El parámetro que más extensamente se ha evaluado con este propósito ha sido la producción de anticuerpos específicos in situ y en circulación contra antígenos de influenza, considerando la clara asociación entre la protección y la respuesta inmune humoral específica. La

---

---

determinación de los efectos de posibles inmunopotenciadores en la respuesta celular específica ha sido menos explorada. [Lamb et. al., 1982].

## **ANTECEDENTES**

En los últimos años comenzamos a evaluar la capacidad inmunopotenciadora del péptido sintético inflamatorio de 18 aminoácidos denominado GK1 como alternativa para incrementar la inmunogenicidad de la vacuna de influenza. Este fue identificado a partir de un antígeno recombinante de *Taenia crassiceps* llamado KETc7 que ha demostrado ser efectivo como vacuna contra la cisticercosis experimental murina. Basados en la deducción de la secuencia de aminoácidos de este polipéptido rico en prolina, se sintetizaron químicamente 3 fragmentos llamados: GK-1, GK-2 y GK-3; de los cuales, únicamente GK1 incluye epítopes protectores contra cisticercosis murina. GK1 es una secuencia de 18 aminoácidos (G-Y-Y-Y-P-S-D-P-N-T-F-Y-A-P-P-Y-S-A) que ha demostrado tener la habilidad de inducir una respuesta de anticuerpos. GK1 también es capaz de estimular la proliferación de células CD8<sup>+</sup> y en un menor grado de células CD4<sup>+</sup>. También se ha observado que el sobrenadante de células estimuladas contiene altos niveles de IFN- $\gamma$  y bajos niveles de IL-4. Resultados similares se obtuvieron cuando se midió la producción de citocinas en células T por citometría de flujo. Los altos niveles de esta citocina inflamatoria promovida por la inmunización con GK1, señalan su potencial capacidad de inducir un proceso inflamatorio [Toledo et. al., 1999].

La promoción de un fenómeno inflamatorio podría aumentar la efectividad en el fenómeno de presentación de antígenos vacunales y de esta manera obtener una respuesta inmune más efectiva con la vacuna de influenza. Esta posibilidad se evaluó recientemente en forma experimental estableciendo un modelo murino de influenza que nos permitió comenzar a evaluar las propiedades inmunoestimuladoras del péptido sintético GK1 [Segura-Velázquez et. al., 2006].

El efecto de la co-administración de GK1 con la vacuna de influenza humana se determinó en base a dos criterios: los niveles de anticuerpos en suero específicos contra antígenos vacunales de tipo IgG y el aspecto histológico de los tejidos pulmonares antes y después de la vacunación y del desafío viral. La determinación de los niveles de anticuerpos específicos inducidos resulta pertinente considerando que se ha establecido extensamente que los anticuerpos participan críticamente en la capacidad protectora en contra de esta infección viral [Clemens et. al., 1986; Clemens and Murphy, 1986] En este

---

---

modelo de influenza que montamos utilizamos ratones de dos diferentes edades (jóvenes de 8 a 10 semanas de nacidos y viejos mayores de 18 meses de nacidos) y observamos inmunopotenciación en la respuesta inducida por la vacuna de influenza cuando esta es coadministrada con GK1. En ratones jóvenes la co-inmunización de la vacuna de influenza con GK1 no aumentó de manera estadísticamente significativa los niveles de anticuerpos IgG séricos mientras que un aumento de anticuerpos se observó en los ratones viejos antes y después de la infección (>18 meses de nacidos) (Figura 1). Lo que nos demuestra que GK1 es capaz de sobre-estimular la respuesta inmune en ratones que por edad se encuentran inmunocomprometidos.

Hallazgos interesantes se encontraron cuando los ratones fueron desafiados con virus de influenza cepa A subtipo H1N1. Tanto en ratones jóvenes como en ratones viejos el grupo que recibió la vacuna co-administrada con GK1 presentó la menor carga viral en extractos de pulmón. Las evidencias más claras al respecto de la capacidad inmunopotenciadora de GK1 se establecieron en la evaluación histológica de los pulmones. En esta fase es clara la potenciación del efecto de la vacunación utilizando GK1 antes como después de la infección. Es aparente que se promueve la llegada de células de aspecto linfoide más tempranamente y el daño pulmonar se resuelve más eficientemente en los ratones que son inmunizados con la vacuna de influenza coadministrada con GK1 (Figura 2). Cuando los pulmones de los ratones que recibieron los distintos tratamientos fueron evaluados histológicamente observamos un patrón similar independientemente de la edad de los ratones evaluados: Antes del desafío la sola inmunización con la vacuna contra influenza induce una congestión pulmonar que se manifiesta en el engrosamiento de las paredes alveolares y reducción de los respectivos espacios aéreos (Figura 2B). Esta congestión no se observó en los ratones co-inmunizados con la vacuna + GK1, que de manera sobresaliente presentaron un infiltrado aparentemente de tipo linfoide (Figura 2C). Esta aparente inflamación temprana se asoció con una evolución favorable de la inflamación resolviéndose casi completamente a los 9 días posteriores a la infección (Figura 2F); mientras tanto, en el grupo de ratones que solo recibió la vacuna se observó un patrón similar pero retrasado en el tiempo (Figura 2E). El infiltrado inflamatorio se detectó a partir de los 6 días de infección permaneciendo, aún a los 9 días, signos de inflamación sin resolverse.

La reducción de la patogénesis del virus inducida por la co-inmunización de la vacuna de influenza y GK1 señala la relevancia de estudiar posibles factores y mecanismos mediante los cuales este péptido genera una respuesta inmune más

---

---

eficiente en contra del virus de influenza. Algunos de estos factores o mecanismos pueden estar mediados por poblaciones celulares virus de influenza-específicas, que intervienen en la respuesta inmune anti-influenza, resultando sumamente relevante el observar su comportamiento ante la inmunización con GK1. Específicamente, nos centramos en determinar el efecto ejercido sobre las células T CD4 inducido por la utilización de GK1; células en las que está ampliamente discutida su función que resulta fundamental en la protección en contra de infecciones por influenza, ya sea por la protección inducida con su presencia dirigiendo una respuesta citotóxica o por la ayuda que brindan en la generación de anticuerpos por parte de las células B, que resultan fundamentales en controlar una infección por influenza; y en las células dendríticas que son cruciales para la inducción y regulación de la respuesta inducida por las células T. Para esto, desarrollamos modelos experimentales que nos permitieron observar el papel que desempeña el péptido GK1 en la activación y proliferación de células linfoides involucradas directamente en la generación de una respuesta inmune en contra del virus de influenza; tomando en cuenta que para determinar el papel funcional de las células T CD4<sup>+</sup> en contra de una infección por influenza surgen una serie de dificultades como por ejemplo: se ha demostrado que al utilizar clonas de células T CD4<sup>+</sup> sus propiedades *in vitro* e *in vivo* pueden llegar a cambiar con el tiempo al tenerlas en cultivo [Taylor et. al., 1990], No solo existe variación entre diferentes clonas, sino que una misma clona puede variar estando en cultivo con respecto a la producción de citocinas inducidas por el antígeno, su actividad citolítica y la función efectora inducida *in vivo* [Taylor et. al., 1990]. Por lo que los resultados sugeridos en un experimento *in vitro* pueden estar diferir de los acontecimientos llevados a cabo *in vivo*.

---

---

## **JUSTIFICACIÓN**

El péptido GK1 potencia la respuesta contra la vacuna de influenza aumentando los niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación y promueve la resolución más eficiente de la infección. El efecto adyuvante encontrado justifica la búsqueda de los mecanismos que lo median.

## **HIPÓTESIS**

GK1 co-inmunizado con la vacuna de influenza o sus componentes promueve un fenómeno inflamatorio optimizando la presentación antigénica y potenciando la respuesta inmune adquirida.

## **OBJETIVO**

Identificar los mecanismos que subyacen en la capacidad adyuvante de GK1.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Evaluar el efecto de GK1 sobre células presentadoras de antígeno.
2. Evaluar el efecto de GK1 en potenciar la respuesta inmune celular.

---

---

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 1.- Desarrollo de un modelo para evaluar la capacidad inmunopotenciadora del péptido GK1 en la respuesta inmune celular

Considerando la relevancia de las células CD4<sup>+</sup> en la inducción de la respuesta protectora contra influenza desarrollamos el siguiente modelo murino para estudiar el efecto de GK1 sobre esta población celular.

Células de CD4<sup>+</sup> naive Thy 1.1<sup>+</sup> de un ratón TCR transgénico con un receptor específico para un epítipo altamente conservado de la Hemaglutinina (HA) (donados por la Dra Adelaida Sarukhan) se transfirieron a ratones BALB/c.Thy1.2<sup>+</sup>. Posteriormente se verificó la instalación de las células Thy 1.1<sup>+</sup> en los ratones receptores por citometría de flujo (FACS). Adicionalmente, se evaluó la capacidad funcional de las células transferidas midiendo su capacidad proliferativa *in vivo* por FACS después de inmunizar los ratones receptores.

#### Modelo experimental

Los ratones transgénicos (Tg) TCR-HA expresan un TCR que reconoce específicamente el péptido<sub>111-119</sub> de la hemaglutinina (HA) del virus de influenza PR8, que se presenta en el contexto de molécula clase II IE<sup>d</sup>. En esta cepa de ratones, el TCR transgénico es expresado en la subpoblación de células CD4<sup>+</sup> y los linfocitos expresan el antígeno Thy 1.1. Adicionalmente disponemos en nuestro bioterio de ratones BALB/cAnN que expresan en la superficie de sus células linfoideas el antígeno Thy 1.2. En este modelo proponemos entonces transferir células CD4<sup>+</sup> de los ratones transgénicos a un ratón receptor Thy 1.2 para poder diferenciar las células transferidas de las células CD4<sup>+</sup> del ratón receptor. Este procedimiento nos permitiría evaluar *in vivo* el efecto de diferentes protocolos de inmunización en la capacidad proliferativa de la subpoblación celular específica para un epítipo de influenza.

---

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Transferencia de células TCR/HA a los ratones receptores**

#### **1. Obtención de células transgénicas T CD4<sup>+</sup> TCR/HA de ratones Thy 1.2, o Thy 1.1 según sea el caso**

Se obtuvieron las células de diferentes ganglios linfáticos y bazo de ratones transgénicos (Tg) TCR/HA Thy 1.1 para ser transferidas a los ratones receptores Thy 1.2. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical para posteriormente extirpar los diferentes ganglios linfáticos, los cuales se colocaron en una caja petri p60 con 5ml medio (DMEM suplementado con Hepes al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, Piruvato de sodio al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.1%); posteriormente los ganglios fueron macerados entre filtros de nylon y se obtuvieron los sobrenadantes que contenían las diferentes células linfoides, el sobrenadante se colocó en tubos de 15 ml para ser centrifugados durante 5 min a 1200 rpm, se tiro el sobrenadante y el pellet resultante se re suspendió en 2 a 3 ml de medio. De este conjunto de células se realizó una selección negativa eliminando células B y células T CD8, para llevar a cabo esto al pellet resultante se le colocó directamente anti-B220 y anti-CD8 (BD Biosciences), marcadores propios de estas células para ser separadas a través de una columna magnética. Para esto, primero se prepararon las Dynabeads,, colocando 50 $\mu$ l de Dynabeads (anti-rat) en 2 ml de medio DMEM, se colocaron en el magneto, se tiró el sobrenadante (quedando las Dynabeads adheridas a la pared del tubo que se encuentra del lado del magneto) se quitó el tubo que contenía las Dynabeads del magneto y estas se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM. Una vez hecho el lavado de las Dynabeads, se procedió a colocarlas con el pellet de células previamente obtenido, agregando los 2 o 3 ml del medio en que se resuspendieron las células al mililitro de medio en el cual se resuspendieron las Dynabeads, se pusieron a girar entre 15 y 20 min a 4°C, transcurrido el tiempo, la suspensión que contenía las células y las Dynabeads fueron colocas en el magneto, se recupero el sobrenadante el cual se colocó en un tubo de 15 ml y se centrifugo durante 5 min a 1200 rpm (en las Dynabeads se quedan adheridas las células que desean ser eliminadas). A través de este procedimiento se obtuvieron células enriquecidas en LT CD4. Esta suspensión de células fue incubada con un anticuerpo específico para el TCR transgénico (6.5) acoplado a la biotina y luego con las esferas magnéticas acopladas a estreptoavidina (Mitenyi Biotech). Después de un extensivo

---

---

lavado, las células fueron pasadas a través de una columna magnética. La fracción positiva corresponde a las células T CD4<sup>+</sup> 6.5<sup>+</sup>, con una pureza que varía entre el 90% y el 95% de acuerdo a análisis por citometría de flujo. La selección positiva mediante la utilización de anticuerpos clonotípicos no resultó en la activación de las células, ya que el procedimiento completo se desarrolló a 4°C; antes de ser transferidas, las células fueron marcadas con 5µM de Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (Molecular Probes), para esto, el stock de CFSE se diluyó en 1/200 de PBS, posteriormente se agregaron de 20 a 30µl del CFSE ya diluido directamente en el pellet y se incubaron a 37°C durante 10 min (procurando agitar ligeramente los tubos cada 3 min para resuspender el pellet), transcurridos los 10 min, se detuvo la reacción con medio DMEM frío que contiene 5% de suero fetal bovino, se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, se tiró el sobrenadante y las células ya marcadas con CFSE se resuspendieron en 2 ml de medio para posteriormente ser contadas.

## **2.- Transferencia de células**

Una vez obtenidas las células Tg, se transfirieron 1 x 10<sup>6</sup> células por ratón a los ratones receptores a través de la vena del ojo del ratón. Para esto los ratones fueron previamente anestesiados con ketamina (100µg/kg).

## **3.- Inmunización**

Tres días posteriores a la transferencia celular los ratones fueron inmunizados con los distintos tratamientos en la base de la cola. Los tratamientos consistieron en: 1 µg de vacuna de influenza (FLUZONE<sup>R</sup> Temporada 2005-2006), o bien con 1 µg del péptido HA<sub>111-119</sub>, el cual fue sintetizado (Genosys) con 4 aminoácidos para incrementar su afinidad de unión al MHC (SVSSFERFEIFPK). Ambos tratamientos (vacuna o péptido) fueron administrados con o sin 10.0µg por ratón del péptido sintético GK1 (GYYYPSDPNTFYAPPYSA adquirido en AnaSpec. Inc.), lo cual formó 5 grupos distintos tomando en cuenta el grupo control. Este grupo de ratones control fueron inyectados únicamente con PBS.

## **4.- Obtención de células transferidas**

Tres días posteriores a la inmunización se obtuvieron las células de diferentes ganglios linfáticos que drenen el sitio de inmunización (ganglio popíteos y axilares). Para llevar a cabo esto, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, después de extirpar

---

---

los ganglios se colocaron sobre hielo en el interior de una caja petri p60 con 5ml medio (DMEM suplementado con Hepes al 1%, Antibiótico al 1%, a.a. no esenciales al 1%, Piruvato de sodio al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.1%); para ser macerados entre filtros de nylon y se obtuvieron los sobrenadantes que contenían las células linfoides, el sobrenadante se colocó en tubos de 15 ml para ser centrifugados durante 5 min a 1200 rpm, se tiro el sobrenadante y el pellet resultante se re suspendió en 2 ml de medio.

#### **5.- Evaluación de la capacidad proliferativa por citometría de flujo (FACS)**

Las células se marcaron con el anticuerpo específico para las células Tg TCR/HA.6.5 [Lanoue A. et. al. 1997] acoplado a ficoeritrina (PE) y con anticuerpos específicos para Thy 1.1-Fitc y CD4-Cycrome (BD Biosciences) para analizarse por citometría de flujo (FACS). Del total de células vivas, se seleccionó el porcentaje total de células T CD4 que son positivas para el anticuerpo 6.5 (y por lo tanto que expresan el TCR/HA). Simultáneamente, de estas células seleccionadas, se determinó el porcentaje de ellas que proliferaron utilizando la técnica de marcado de CFSE, el cual se diluye a la mitad a cada ciclo de proliferación celular. La adquisición de las células se realizó en el citómetro FACScalibur (BD Biosciences).

En cada experimento, se utilizaron 3 ratones por cada grupo de inmunización y se desarrollaron tres experimentos independientes.

---

---

## RESULTADOS

### 1.- TRANSFERENCIA DE CELULAS TCR/HA DE RATONES Thy1.1 A Thy1.2

El primer experimento consistió en determinar la factibilidad de distinguir entre las células propias del ratón receptor (Thy 1.2) de las células transgénicas transferidas al ratón receptor que expresan el antígeno Thy 1.1.

**Tabla 1. Células TCR/HA Thy 1.1 específicas transferidas a ratones receptores Thy1.2**

	No transferido	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4
Drenantes	<b>0.0</b>	<b>0.15*</b>	<b>0.07</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07</b>
No drenantes	<b>0.0</b>	<b>0.15</b>	<b>0.10</b>	<b>0.06</b>	<b>0.08</b>

\*Porcentaje de células Tg TCR/HA del total de células T CD4.

Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 3, se detectaron células Tg TCR/HA Thy 1.1 tres días después de realizar la transferencia. Aunque el porcentaje de estas células Tg es menor al 1% del total de células T CD4<sup>+</sup> del ratón receptor, la población de células T CD4<sup>+</sup> Tg se distingue claramente del resto de las células CD4<sup>+</sup> del ratón receptor, lo cual nos hace posible ver su desarrollo tras un estímulo. Estos resultados nos validaron el uso de este modelo de transferencia celular para evaluar su posible funcionalidad ante un desafío antigénico.

Con el propósito de comprobar la funcionalidad de las células transferidas, se determinó su capacidad proliferativa inmunizando los ratones una vez que se encontraran instaladas las células transferidas; para que de esta manera, se determinara el porcentaje de células detectadas y comprobar su estado proliferativo tres días después de una inmunización.

**Tabla 2. Presencia de células Tg TCR/HA Thy 1.1 presentes en ratones receptores Thy 1.2 después de ser inmunizados con vacuna de influenza y vacuna de influenza+GK1**

	Control	Vacuna	Vacuna + GK1
Drenantes	<b>0.15*</b>	<b>0.48</b>	<b>0.47</b>
No Drenantes	<b>0.15</b>	<b>0.45</b>	<b>0.96</b>

\* Porcentaje de células Tg TCR/HA Thy 1.1 del total de células T CD4 Thy 1.2

\*\* Experimento representativo de 3 ensayos realizados en las mismas condiciones experimentales

Como se observa en la Tabla 2 y en la Figura 4, tres días después de transferir las células Tg TCR-HA al ratón receptor y tres días posteriores de realizada la inmunización, las células transferidas responden al estímulo de la vacuna de influenza con y sin GK1. En los grupos de ratones inmunizados con vacuna y con vacuna + GK1 se obtiene una mayor cantidad de células Tg TCR/HA relativo a la cantidad de células Tg recuperadas en los controles, lo que nos indica que las células proliferaron en mayor cantidad después de haber recibido el estímulo con el antígeno de la vacuna. Además, el porcentaje de células Tg TCR/HA recuperadas en ganglios no drenantes se duplicó en los ratones en que la vacuna de influenza fue co-administrada con el péptido GK1.

Los resultados señalan que la coadministración de GK1 con la vacuna de influenza promueven la proliferación de las células Tg T CD4<sup>+</sup> TCR/HA. Estos resultados indicaron el interés de evaluar el fenómeno proliferativo de las células transgénicas utilizando el marcador de proliferación carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE). Esta molécula se incorpora al citosol de la célula y en cada ciclo de división celular, se reduce a la mitad, parámetro que indica el número de veces que las células marcadas se dividen.

**Tabla 3. Presencia y porcentaje de proliferación de células TCR/HA del total de células CD4<sup>+</sup> obtenidas de los ratones inmunizados con vacuna de influenza y vacuna de influenza+GK1**

	Control	Vacuna	Vacuna + GK1
Drenantes	<b>0.07*</b>	<b>0.56</b>	<b>1.23</b>
	6.67**	95.15	94.7
No Drenantes	<b>0.10</b>	<b>0.60</b>	<b>0.82</b>
	13.41	94.77	91.74

\* Porcentaje de células Tg TCR/HA Thy 1.2 del total de células T CD4 Thy 1.1

\*\* Porcentaje de células Tg TCR/HA en proliferación asumida por la pérdida de la cantidad de marcaje con CFSE.

Experimento representativo de tres ensayos similares

Como se aprecia en la Tabla 3 (Figura 5), de la misma forma que en los experimentos anteriores, las células Tg T CD4<sup>+</sup> TCR/HA se encuentran en mayor cantidad en aquellos ratones que han sido inmunizados con vacuna de influenza (8 veces más cantidad de células en órganos linfoides drenantes y 6 veces más en los no drenantes) en comparación a la cantidad de células encontradas en ratones no inmunizados. También se observó un mayor porcentaje de células Tg T CD4<sup>+</sup> TCR/HA en división en los ratones que fueron inmunizados tanto con vacuna de influenza sola como en los co-inmunizados con vacuna de influenza+GK1, comparándolas con las células encontradas en proliferación en los ratones no inmunizados.

También se puede observar las células transferidas que presentan en su superficie el antígeno Thy 1.2 se encuentran en mayor cantidad en los grupos que recibieron estímulo con el antígeno de la vacuna de influenza. Sin embargo, las células que expresan el antígeno Thy 1.2 provenientes de ratones inmunizados con vacuna de influenza y GK1 se presentan en mayor cantidad (119% más en órganos drenantes y 32% más en los no drenantes) que las células similares provenientes de ratones únicamente inmunizados con vacuna de influenza.

---

---

Al revisar el porcentaje de proliferación de las células Tg mediante la medición de la pérdida de marcaje con CFSE obtuvimos que, del total de las células Tg TCR/HA provenientes de los ratones inmunizados con solución salina (grupo control) únicamente proliferaron del 6.67% al 13.41% de ellas. Sin embargo, cuando observamos esta misma población de células provenientes de ratones inmunizados con vacuna de influenza obtenemos que proliferan entre el 95.15 y el 95.77% del total de las células TCR/HA específicas. De igual forma, las células provenientes de ratones inmunizados con vacuna de influenza+GK1 proliferan entre un 94.7 y un 91.74% tras el estímulo (Figura 5). Estos resultados hacen evidente el papel de GK1 promoviendo la proliferación las células Tg, ya que en los ratones que fueron inmunizados con GK1 se encuentra una mayor cantidad de células TCR específicas y casi en su totalidad en proliferación.

Este modelo nos ha permitido determinar que en los grupos que han sido inmunizados con GK1 se observa una mayor cantidad de células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA y se encuentran en mayor proliferación, esto cuando lo comparamos con los grupos que no recibieron inmunización con GK1. Para evidenciar aun más el efecto potenciador de GK1, coinmunizamos tanto la vacuna de influenza como del epítotope HA<sub>111-119</sub> con y sin el péptido GK1. Para esto se determinó el porcentaje de células Tg TCR/HA Thy 1.1 en ratones Thy 1.2 presentes 6 días después de realizada la transferencia mediante el siguiente protocolo: tres días después de realizada la transferencia de células los ratones fueron inmunizados con solución salina (como grupo control) o con los diferentes tratamientos, los cuales son mencionados en la Tabla 4; tres días después de realizada la inmunización se obtuvieron las células transgénicas y en el citómetro de flujo (FACS) se observaron los siguientes resultados.

**Tabla 4. Presencia y porcentaje de células T CD4 Tg TCR/HA en proliferación presentes en ratones inmunizados con los antígenos vacunales y con el péptido control específico para estas células en presencia o no de GK1**

	Control	Vacuna	Vacuna + GK1	HA	HA + GK1
Drenantes	<b>0.05*</b> ±0.00	<b>0.42</b> ±0.12	<b>0.37</b> ±0.05	<b>0.07</b> ±0.01	<b>0.19</b> ±0.03
No Drenantes	9.19**	96.18	5.42	46.2	86.58
Drenantes	<b>0.07</b> ±0.01	<b>0.45</b> ±0.14	<b>0.46</b> ±0.23	<b>0.10</b> +0.05	<b>0.38</b> ±0.32
No Drenantes	7.55	96.22	96.32	51.58	88.02

\* Porcentaje de células T CD4 TCR/HA presentes en los ratones receptores.

\*\* Porcentaje de células Tg TCR/HA en proliferación.

\*\*\* Los resultados corresponden al promedio obtenido de 3 ratones por grupo, los valores individuales se observan en la Figura 6.

Mientras que en los ratones control solo se detectaron alrededor de 0.5% de células transgénicas de las cuales entraron en proliferación alrededor del 10% de ellas (Figura 6A); en los ratones que únicamente fueron inmunizados con vacuna de influenza (Figura 6B) o vacuna de influenza+GK1 (Figura 6C) la presencia de las células Transgénicas aumento 80 veces en proporción a las detectadas de los ratones controles y más del 95% de las células Transgénicas se detectaron en proliferación. En este experimento no se observaron diferencias asociadas a GK1 en los ratones inmunizados con la vacuna de influenza.

En contraste, inmunizando con el epítipo de la HA región <sub>111-119</sub> (Figura 6D) que es altamente conservada, y que representa uno del conjunto de epítipes incluidos en la vacuna de influenza, observamos que la coadministración de GK1 con HA<sub>111-119</sub> potencia la proliferación y activación de estas células CD4 (Figura 6E). Como se ilustra en la Tabla 4 el porcentaje de células TCR/HA obtenidas del total de células T CD4 es mucho mayor en los ratones que fueron inmunizados con HA+GK1 en comparación con las obtenidas de los ratones que recibieron únicamente HA, además el porcentaje de estas células que presentan marcaje con CFSE es menor en el grupo de ratones coinmunizados con GK1 (Tabla 4 y Figura 6). Este resultado indica que GK1 incrementa la proliferación de estas células TCR/HA Tg.

---

---

## CONCLUSIONES

Este primer modelo desarrollado nos permitió evaluar el efecto de GK1 en la capacidad proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> *in vivo* y observamos que GK1 promueve *in vivo* la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específico cuando los ratones son co-inmunizados con el epítotope HA<sub>111-119</sub> de la hemaglutinina de influenza.

El aumento en la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específico podría mediar el incremento en la capacidad protectora de la vacuna de influenza inducido por la co-inmunización de la vacuna con GK1.

---

---

## 2. EVALUACION DEL EFECTO DE GK1 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EN LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA

### ANTECEDENTES

Algunos daños locales al tejido ocurren después de una infección o de una inmunización y resulta en la liberación de mediadores de la respuesta inmune exógena [Gallucci and Matzinger, 2001] que interactúan con monocitos, DC's y células mastoides en el sitio de la lesión o depósito de la vacuna, lo que resulta en la producción de mediadores endógenos que promueven el sistema de defensa inmune reclutado a través de una reacción local inmune inflamatoria. Los fagocitos mononucleares (Macrófagos y Monocitos) y los neutrófilos son centrales en la reacción inflamatoria aguda de la defensa inmune innata efectora. Las DC's que son reclutadas al sitio en el cual se encuentra presente el antígeno, son involucradas principalmente en el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos antígeno-específicos (son consideradas las principales células presentadoras de antígeno) [Steinman et. al., 1999]. Las DC's inmaduras migran de la sangre al sitio de inflamación, donde desempeñan un papel importante uniendo la respuesta inmune adaptativa con la innata, capturan el antígeno y migran del sitio de captura del antígeno a los órganos linfoides y tejidos que interactúan con los linfocitos antígeno-específicos [Gunn, 2003; Randolph, 2001]. Una vez en los órganos linfoides, las DC's entran a los folículos para entregar el antígeno a los linfocitos B y para presentar el antígeno procesado en asociación con moléculas del MHC a los linfocitos T [Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau et. al., 2000]. Como resultado de este proceso, se induce la respuesta inmune específica. Las DC's son una heterogénea población de células [Summerfield et. al., 2003], sin embargo, un elemento consistente es la maduración de las DC's durante el procesamiento y presentación del antígeno, las DC's son compartimentalizadas en DC's inmaduras y DC's maduras [Romani et. al., 1989]. Un buen ejemplo de DC's inmaduras son las células de Langerhans, que buscan material antigénico externo por endocitosis para procesarlo y presentarlo. Una vez que las DC's inmaduras endocitan y comienzan el proceso de carga antigénica, llegan a ser maduras [Banchereau et. al., 2000; Pulendran et. al., 2001]. Señales de daño inflamatorio, incluyendo citocinas pro-inflamatorias y factores liberados durante el daño a tejidos (por ejemplo ácido úrico) promueven su maduración [Shi et. al., 2003].

---

---

Una vez que el material es internalizado, se degrada en fragmentos peptídicos dentro del sistema endosomal por un proceso que involucra moléculas MHC clase II, o es transferido al citosol para procesarlo involucra moléculas MHC clase I [Guermonprez et al., 2002; Steinman et. al., 1999; Théry and Amigorena, 2001]. La presentación del antígeno dependiente de MHC clase II es esencial para el estímulo de Linfocitos T cooperadores. Un eficiente procesamiento y presentación resulta en una estable expresión de la molécula MHC clase II cargada con el péptido en la superficie de las DC's maduras. Esta estabilidad de expresión es crítica debido a que facilita la presentación de las moléculas al TCR en los Linfocitos Th CD4<sup>+</sup>.

Los linfocitos Th CD4<sup>+</sup> son esenciales para la eficiente ejecución de la mayoría de las respuestas inmunes específicas, incluyendo la producción de anticuerpos por linfocitos B antígeno activados [McHeyzer-Williams et. al., 2000] y la función citotóxica efectora de los Linfocitos T antígeno- específicos [Mescher, 1995]. Una consideración importante es que no todos los Linfocitos Th reconocen el mismo péptido, solo clonas distintivas de linfocitos Th reconocen secuencias peptídicas particulares. Esta especificidad se debe al procesamiento del antígeno por las Células Presentadoras de Antígeno, que resulta en diversos péptidos que son capaces de estimular los linfocitos Th para los que ellos son específicos [Blum et. al., 1997; Van den Eynde and Morel, 2001; Watts et. al., 2003]. Estos péptidos son referidos como epítopes de células T. Una vez estimulados, los linfocitos Th proveen su "ayuda" por interacciones celulares y la liberación de señales mediadoras solubles. Las citocinas son responsables de dirigir a los linfocitos B y linfocitos T citotóxicos antígeno estimulados para llegar a ser células productoras de anticuerpos o células efectoras respectivamente.

Una efectiva sensibilización ("priming") de las células T naive resulta en su expansión clonal y diferenciación en células efectoras secretoras de citocinas y células de memoria. La respuesta de células T resultante depende de muchos factores, incluyendo la concentración de antígeno en la DC, la afinidad del receptor de células T por el complejo péptido-MHC, la duración de la interacción DC-célula T, el estado de maduración de la DC y el tipo de estímulo de maduración de la DC [Gett et. al., 2003]. El estímulo de la célula T por parte de las DC's es requerido para una supervivencia prolongada de las células T y su diferenciación en células T efectoras y de memoria, ya que la proliferación de las células T después del estímulo por parte de las DC's es corta.

---

---

## **JUSTIFICACIÓN**

En la primera fase de esta tesis demostramos que GK1 aumenta la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> anti-HA<sub>111-119</sub> cuando los ratones se co-inmunizan con el respectivo epítotope. Esta observación justifica la identificación de los factores que participan en el efecto de GK1 sobre la capacidad proliferativa linfocitaria.

## **HIPÓTESIS**

El péptido GK1 promueve la activación de células dendríticas que resulta en un aumento en la proliferación linfocitaria de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específico.

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto de GK1 en la activación de células dendríticas y en su capacidad de presentación antigénica a células linfoides.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Evaluar in vitro el efecto de GK1 en células dendríticas derivadas de médula ósea.
2. Evaluar el efecto de células dendríticas tratadas con GK1 en la activación de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específico en co-cultivos de células linfoides y células dendríticas derivadas de médula ósea.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr el objetivo planteado se estimularon Células Dendríticas (DC's) con diferentes tratamientos (LPS con y sin GK1), y colocaron en presencia de la línea de células linfoides NFAT. Esta línea de linfocitos expresa en su superficie el receptor específico para el epítotope de HA<sub>111-119</sub> y además contiene un gen reportero (LacZ insertado en el gen de IL-2). Estas células al ser activadas producen  $\beta$ -galactosidasa, de tal forma que entre mayor sea el estímulo de activación las células producen una mayor concentración de  $\beta$ -galactosidasa la cual posteriormente puede ser cuantificada.

### ***Células Dendríticas***

#### *1- Obtención de células pluripotenciales de médula ósea y diferenciación a células dendríticas*

Se obtuvieron ambos fémures y tibias de las patas traseras de ratones BALB/cAnN, en hielo se hicieron lavados con medio completo para obtener la médula de ambos huesos, el cual estaba constituido con DMEM (GIBCO) suplementado con glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), streptomina (100 $\mu$ g/ml),  $\beta$ -mercaptoetanol (500 $\mu$ M) y 10 % de Suero Fetal Bovino libre de endotoxinas. El sobrenadante que se utilizo para recuperar la médula ósea fue centrifugado durante 5 min a 1200 rpm, se desecho el sobrenadante y al paquete celular resultante (pellet) se le agregaron 2 ml de solución de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos, transcurrido el tiempo, se le adiciono 2 ml de medio completo y se centrifugo de nuevo 5 min a 1200rpm. El nuevo paquete celular fue resuspendido en Medio para Células Dendríticas el cual estaba constituido por RPMI-1640 con 10% de Suero Fetal Bovino y 5 o 10% del sobrenadante de células que expresan GM-CSF (el porcentaje dependió de la calidad del sobrenadante), se colocaron en cajas de cultivo y se incubaron a 37°. El haber colocado las células en este medio nos permito diferenciarlas a Células Dendríticas.

Tres días después, las células fueron transferidas a nuevas cajas de cultivo, para esto, se recupero el sobrenadante de cada caja y el fondo de las cajas se lavo rigurosamente con 3 a 5 ml de PBS estéril con la finalidad de recuperar la mayor parte de células remanentes, para recuperar las células adheridas al fondo de la placa, se cubrió el fondo de la misma con 2 ml de Trypsina y se incubo por 3 minutos a 37°, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción colocando la misma cantidad del medio previamente

---

---

recuperado y se realizaron rigurosos lavados del fondo de la placa, se recupero el sobrenadante y se centrifugo durante 5 min a 1200rpm..

El paquete celular fue resuspendido en medio para Células Dendríticas (constituido como antes fue descrito) y se coloco en nuevas cajas de cultivo (7ml por caja) para ser incubadas de nuevo a 37°.

## 2.- Activación de las Células Dendríticas

### 2.1 Estimulo con LPS

Tres días después de la segunda incubación de las células, se comprobó el fenotipo y el porcentaje que corresponde a Células Dendríticas; en cajas separadas, la mitad de las Células Dendríticas recibieron estímulo de 100 ng/ml de LPS (procedente de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 comprado en Sigma-Aldrich) y la otra mitad no recibió estímulo alguno.

### 2.2 Estímulo con LPS y GK1

Tres días después de la segunda incubación de las Células, se comprobó el fenotipo y el porcentaje que corresponde a Células Dendríticas; en cajas separadas, las Células Dendríticas fueron estimulas con 100 ng/ml LPS y 0.1µg y 1.0µg GK1

## 3.- Activación de las células linfoides

Doce horas posteriores al estímulo de las Células Dendríticas, estas fueron colocadas en presencia de las células linfoides (células T de la línea 6.5-NFAT que expresan un TCR aβ específico para el péptido HA<sub>111-119</sub> y el gene reportero (LacZ) bajo el control del promotor de la IL2 [Sarukhan A. et. Al. 2001]), y se les coloco como fuente de antígeno el péptido que es la fracción de la hemaglutinina para la cual estas células linfoides presentan un receptor específico, asumiendo que este péptido va a ser captado y presentado por las Células Dendríticas a las células linfoides y de esta forma activarlas. Aquellas Células Dendríticas que únicamente fueron estimulas con LPS, a este tiempo, también se les colocaron diferentes concentraciones de GK1 (0.1µg y 1.0µg) con la finalidad de ver si GK1 interviene directamente en la presentación antigénica por parte de las Células Dendríticas.

---

---

#### 4.- *Determinación del grado de activación de las células linfoides*

Después de obtener y colocar a las Células Dendríticas en presencia de las células linfoides, se midió el grado de expresión de  $\beta$ -galactosidasa por parte de las células linfoides, de tal forma que, entre mayor es el grado de presentación de antígeno por parte de las Células Dendríticas, mayor es el estímulo a las células linfoides y por ende, mayor es la producción de  $\beta$ -galactosidasa por parte de estas. Para medir la producción de  $\beta$ -galactosidasa DC's derivadas de médula ósea fueron colocadas toda la noche en presencia o no de LPS sin o con GK1 (0.1 $\mu$ g y 1.0 $\mu$ g) y fueron puestas en incubación en placas de 96 pozos con 2.5x10<sup>4</sup> células por pozo. 24h después 5x10<sup>4</sup> células NFAT fueron adicionadas a cada pozo que contenía a las DC's junto con el péptido HA; 4 a 5 horas después, la densidad óptica (595nm) es medida para cuantificar la expresión de  $\beta$ -galactosidasa por parte de las células NFAT mediante la lisis de estas células con buffer que contiene detergente NP40 y el sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa, Clorogenol Rojo-b-D-galactopiranosida (CRPG) (FLUKA, Germany).

---

---

## RESULTADOS

### 2. PRESENTACION DE ANTIGENO Y ACTIVACION DE CELULAS LINFOIDES

El primer paso consistió en evaluar el efecto inducido al estimular las Células Dendríticas (DC's) con LPS, para observar si la presencia del LPS aumentaba la activación de las células linfoides.

**Tabla 5. Concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas o no estimuladas previamente con LPS**

[HA]	Experimento (#)	Concentración del LPS					
		0.0 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
sin LPS	1	<b>0.223</b>	<b>0.223</b>	<b>0.356</b>	<b>0.780</b>	<b>1.063</b>	<b>1.279</b>
	2	0.058	0.035	0.040	0.044	0.155	0.334
con LPS	1	<b>0.212</b>	<b>0.324</b>	<b>0.421</b>	<b>0.927</b>	<b>1.058</b>	<b>1.324</b>
	2	0.055	0.095	0.076	0.138	0.282	0.525

\* D.O.595nm

\*\* La Tabla muestra 2 experimentos independientes

Como se muestra en la Tabla 5 a medida que se aumenta la concentración de LPS que es colocado en el co-cultivo de DC's con células NFAT, aumenta la concentración de  $\beta$ -galactosidasa detectada que las células linfoides producen, lo que nos indica que el modelo tiene el funcionamiento esperado.

También podemos observar que las DC's que son estimuladas con LPS aparentemente activan a las células linfoides de una manera más eficiente que las DC's que no recibieron el estímulo. Esta observación se hace evidente en el experimento número 1 cuyos resultados se encuentran en la Tabla 5, en el que se nota un aumento entre el 18 y 45% en la concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por las células linfoides que fueron puestas en presencia de las DC's previamente estimuladas con LPS (al normalizar los datos la diferencia es de 1.1). También en el experimento número 2 de la misma Tabla 5, se observa desde un 57% hasta un 213% de mayor concentración de

$\beta$ -galactosidasa producida por las células linfoides puestas en presencia con las DC's previamente estimuladas con LPS (en datos normalizados la diferencia es de 1.65).

Una vez que comprobamos el correcto funcionamiento de modelo y que la previa activación de las DC's con LPS trae como consecuencia activen de manera más eficiente a las células linfoides, el siguiente paso a seguir fue determinar los niveles de producción de  $\beta$ -galactosidasa por parte de las células linfoides cuando éstas además del antígeno se les coloca GK1, previamente activadas o no con LPS (GK1 y el antígeno HA se colocan 12 hrs. después que las DC's fueron o no estimuladas).

En un primer ensayo se decidió no estimular previamente a las células dendríticas con LPS para poder observar un posible efecto del péptido GK1 al ser colocado en conjunto con el antígeno, obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla 6. Efecto de GK1 en la concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas no estimuladas con LPS**

		Concentración de HA					
[HA]		0.0 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
Sin GK1		<b>0.223*</b>	<b>0.223</b>	<b>0.356</b>	<b>0.780</b>	<b>1.063</b>	<b>1.279</b>
GK1 (0.1 $\mu$ g)		<b>0.175</b>	<b>0.208</b>	<b>0.349</b>	<b>0.772</b>	<b>0.980</b>	<b>1.260</b>
GK1 (1.0 $\mu$ g)		<b>0.181</b>	<b>0.226</b>	<b>0.325</b>	<b>0.748</b>	<b>0.922</b>	<b>1.163</b>

\* Concentración de  $\beta$  galactosidasa, D.O.595nm

De la misma forma que en los experimentos previamente mostrados, en la Tabla 6 nuevamente obtenemos que entre mayor es la concentración de HA que se le coloca al sistema, mayor es la concentración de  $\beta$ -galactosidasa que las células linfoides producen. Estas células no fueron previamente estimuladas con LPS y al observar los resultados estos nos indican que GK1 no induce ningún tipo de efecto al ser colocado al mismo tiempo que se coloca el antígeno HA en el co-cultivo. En la Tabla no se observa diferencia significativa en la concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida cuando además de antígeno se le colocan diferentes dosis del péptido sintético GK1.

El siguiente procedimiento fue estimular a las DC's con LPS, y 12 hrs posteriores al estímulo, se coloca en el co-cultivo de células dendríticas y células linfoides productoras de  $\beta$ -galactosidasa, diferentes concentraciones de HA como fuente de antígeno y dos concentraciones diferentes de GK1 (1 y 10  $\mu$ g), esto con la finalidad de observar si existe algún efecto atribuido a la presencia del péptido GK1 en la generación de  $\beta$ -galactosidasa por parte de las células linfoides NFAT.

**Tabla 7. Efecto de la presencia de GK1 en la concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas previamente estimuladas con LPS**

[HA]	0.0 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
Sin GK1	<b>0.212</b>	<b>0.324</b>	<b>0.421</b>	<b>0.927</b>	<b>1.058</b>	<b>1.224</b>
GK1 (0.1 $\mu$ g)	<b>0.214</b>	<b>0.305</b>	<b>0.518</b>	<b>0.974</b>	<b>1.125</b>	<b>1.380</b>
GK1 (1.0 $\mu$ g)	<b>0.194</b>	<b>0.282</b>	<b>0.360</b>	<b>0.786</b>	<b>1.147</b>	<b>1.178</b>

\* Concentración de  $\beta$  galactosidasa, D.O.595nm.

Al igual que en todos los ensayos anteriores, entre mayor es la concentración de HA, mayor es la concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por las células linfoides. Por otra parte, las DC's que únicamente fueron estimuladas con LPS se observa que inducen a las células linfoides a producir una mayor concentración de  $\beta$ -galactosidasa, que en las células que no recibieron dicho estímulo (resultados mostrados en la Tabla 5). Sin embargo, cuando las DC's son previamente estimuladas con LPS, para que después de 12 horas sean puestas en presencia de las células linfoides y se les agrega las diferentes dosis del antígeno y las 2 diferentes concentraciones de GK1, se observa como la menor dosis de GK1 (0.1 $\mu$ g) provoca que las células linfoides produzcan una concentración ligeramente mayor de  $\beta$ -galactosidasa (entre el 5% y el 23% de aumento según sea la concentración de HA) en comparación de la concentración que se produjo cuando las células dendríticas únicamente fueron estimuladas con LPS, sin embargo esto no se hace consistente cuando se modifica la concentración de HA.

Posteriormente, se decidió en vez de colocar el GK1 al momento de adicionar las diferentes concentraciones de HA al co-cultivo de DC's y células linfoides, se colocaron dos diferentes dosis de GK1(1.0µg y 10.0µg) al momento de estimular las DC's con LPS, de esta manera, podríamos observar directamente el efecto que tiene GK1 en la activación de las DC's y como consecuencia el efecto generado en la activación de las células linfoides al ponerlas en presencia de las DC's previamente estimuladas con LPS con y sin GK1.

El primer ensayo de esta modificación del diseño experimental consistió en observar el efecto inducido en las células linfoides cuando las DC's eran previamente estimuladas con GK1 solo sin estimular con LPS.

**Tabla 8. Concentración de β-galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas solo con GK1**

[HA]	0.0µg	0.5 µg	1.0 µg	5.0 µg	10.0 µg	50.0 µg
Sin GK1	<b>0.058*</b>	<b>0.035</b>	<b>0.040</b>	<b>0.044</b>	<b>0.155</b>	<b>0.334</b>
GK1 (1.0µg)	<b>0.087</b>	<b>0.095</b>	<b>0.068</b>	<b>0.105</b>	<b>0.155</b>	<b>0.582</b>
GK1 (10µg)	<b>0.065</b>	<b>0.055</b>	<b>0.080</b>	<b>0.116</b>	<b>0.236</b>	<b>0.529</b>

\* Concentración de β galactosidasa, D.O.595nm.

Al analizar los resultados mostrados en la Tabla 8, observamos que al estimular a las DC's con GK1 (en lugar de estimular con LPS como en los ensayos anteriores) 12 hrs antes de colocarlas con las células linfoides NFAT y la fuente de antígeno, estas DC's también activan de manera más eficiente a las células linfoides (de la misma forma que lo hacían cuando el estímulo era hecho con LPS), lo cual se ve reflejado en el aumento en la concentración de β-galactosidasa producida por estas células que claramente es mayor cuando son puestas en presencia de las DC's que previamente han sido estimuladas con GK1; así tenemos que cuando las DC's son previamente estimuladas con 1.0µg del péptido sintético GK1 obtenemos porcentajes de aumento en la producción de β-galactosidasa que van desde un 70% hasta un 171% con respecto a la producción de β-galactosidasa que se obtiene cuando las DC's no reciben previo estímulo. Ahora bien,

cuando las DC's son estimuladas con 10.0µg de GK1 el porcentaje de aumento en la producción de β-galactosidasa oscila entre el 52% y el 163% con respecto a la que se produce si las DC's no han sido previamente estimuladas.

Es evidente que el previo estímulo de las DC's con el péptido sintético GK1 favorece la activación de las células linfoides por parte de las DC's, fenómenos similar al que previamente se había observado cuando las DC's eran estimuladas con LPS. Sin embargo es más notorio que los porcentajes en el aumento de la producción de β-galactosidasa son mayores cuando las DC's son pre-estimuladas con GK1 en comparación a los porcentajes de aumento en la producción de β-galactosidasa conseguidos con el pre-estímulo de las DC's con LPS.

Después de realizadas estas observaciones, el siguiente paso fue evaluar el efecto producido cuando las DC's son previamente estimuladas con LPS solo y con las dos dosis de GK1.

**Tabla 9. Concentración de β-galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS con y sin GK1**

[HA]	0.0µg	0.5 µg	1.0 µg	5.0 µg	10.0 µg	50.0 µg
Sin GK1	0.155*	0.095	0.076	0.138	0.282	0.525
GK1 (1.0µg)	0.061	0.042	0.058	0.137	0.227	0.602
GK1 (10µg)	0.123	0.152	0.155	0.206	0.355	0.667

\* Concentración de β galactosidasa, D.O.595nm

Después de este ensayo cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 9, podemos establecer que después de estimular a las DC's con LPS solo y con GK1, éstas mejoran la activación de las células linfoides, lo que se ve reflejado en una mayor concentración de β-galactosidasa. Aun más notorio es que al estimular las DC's con GK1 y LPS juntos se obtiene una mayor activación de las células linfoides (sobre todo cuando se utiliza la dosis de 10µg de GK1 en donde el aumento en los porcentajes de producción de β-galactosidasa van desde un 25% hasta un 103%) en comparación a cuando las DC's

son activadas únicamente con LPS, lo cual nos indica que GK1 potencia la acción del LPS que inicialmente fue observada.

Cabe mencionar que hasta este momento en todos los ensayos utilizábamos GK1 altamente purificado pero que podía contener LPS. Para eliminar la posibilidad de que el efecto observado al utilizar GK1 se debiera al LPS contenido en el GK1, decidimos repetir esta misma prueba con la variante que ahora estaríamos utilizando GK1 completamente libre de LPS y los resultados fueron los siguientes.

**Tabla 10. Concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas solo con GK1 libre de LPS**

[HA]	0.0 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
Sin GK1	0.053*	0.057	0.065	0.116	0.209
GK1 (1.0 $\mu$ g)	0.057	0.068	0.079	0.122	0.252
GK1 (10 $\mu$ g)	0.070	0.082	0.115	0.129	0.283

\* Concentración de  $\beta$  galactosidasa, D.O.595nm.

Como se observa en la Tabla 10, al estimular las DC's con GK1 libre de LPS, estas activan a las células linfoides de una manera más eficiente que las DC's que no recibieron ningún estímulo, ya que la concentración de  $\beta$ -galactosidasa inducida es mayor en los grupos de DC's que recibieron estímulo en comparación que la concentración inducida por las DC's que no recibieron estímulo alguno. Los porcentajes de aumento de  $\beta$ -galactosidasa cuando se utilizó 1.0 $\mu$ g de GK1 fue de alrededor del 20% y en cambio, cuando se utilizaron 10.0 $\mu$ g de GK1 estos porcentajes de aumento en la producción de  $\beta$ -galactosidasa van desde un 11% hasta un 79%. Cabe señalar que el estímulo con la presentación de GK1 libre de LPS fue considerablemente menor que la observada con LPS (Tablas 9 y 10).

Para finalizar las observaciones en esta etapa del proyecto decidimos observar el efecto inducido al probar este GK1 libre de LPS, adicionándole además LPS de la misma manera que se hizo anteriormente.

**Tabla 11. Concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS y con GK1 libre de LPS**

[HA]	0.0 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
Sin GK1	0.126	0.117	0.121	0.177	0.345
GK1 (1.0 $\mu$ g)	0.101	0.080	0.087	0.177	0.377
GK1 (10 $\mu$ g)	0.220	0.201	0.211	0.278	0.455

\* Concentración de  $\beta$  galactosidasa, D.O.595nm.

Igual que el ensayo en el que no se utilizó GK1 libre de LPS (Tabla 9), al estimular a las DC's con LPS y adicionarle GK1 libre de LPS, se consigue que las DC's mejoren la activación de las células linfoides cuando previamente han sido estimuladas con GK1 y LPS, es decir, el efecto inducido por el LPS se ve potencializado cuando además se le agrega GK1 a las DC's (ya sea utilizando GK1 libre o no de LPS); este fenómeno se hace notorio en los resultados ilustrados en la Tabla 11 en donde se hace más evidente cuando la concentración de GK1 libre de LPS utilizada es de 10.0 $\mu$ g, ya que los porcentajes de aumento en la producción de  $\beta$ -galactosidasa van desde el 31% hasta un 137%. Un segundo ensayo similar nos confirmó estos resultados.

**Tabla 12. Concentración de  $\beta$ -galactosidasa producida por células linfoides activadas por Células Dendríticas estimuladas con LPS y con GK1 libre de LPS**

[HA]	0.0 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	5.0 $\mu$ g	10.0 $\mu$ g	50.0 $\mu$ g
Sin GK1	0.085	0.126	0.232	0.358	0.459
GK1 (1.0 $\mu$ g)	0.175	0.164	0.281	0.375	0.554
GK1 (10 $\mu$ g)	0.142	0.140	0.281	0.373	0.555

\* Concentración de  $\beta$  galactosidasa, D.O.595nm

---

---

Los resultados obtenidos de este ensayo e ilustrados en la Tabla 12 son similares a los resultados del ensayo anterior aunque los porcentajes de aumento de  $\beta$ -galactosidasa son menores, ya que en este ensayo observamos que el aumento inducido es desde un 4% hasta un 21%, que son menores a los obtenidos en el ensayo anterior. Aun así, podemos asumir que GK1 potencia el efecto inducido por el LPS

## **CONCLUSIONES**

Se desarrolló un ensayo *in vitro* que nos permitió identificar el efecto de GK1 en Células Dendríticas.

Este ensayo nos permitió demostrar que el péptido GK1 aumenta la activación de células dendríticas promoviendo la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos.

GK1 potencia el efecto de activación de células dendríticas inducido por LPS resultando en un aumento la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos.

---

---

### **3 EVALUACION DEL EFECTO DE GK1 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EN LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA**

Para determinar si el efecto sinérgico observado en las Células Dendríticas (DC's) inducido tras la utilización de LPS y GK1 repercute en la activación más eficiente de las DC's y a su vez provoca una mayor proliferación de células linfoides, se desarrollo el siguiente modelo *in vitro* que nos permitirá observar el grado de activación de las DC's previamente estimuladas (visto mediante la expresión de marcadores de activación en la superficie de las DC's) y la proliferación que induce en las células linfoides puestas en su presencia.

#### **HIPOTESIS**

La activación de las Células Dendríticas estimuladas con GK1 resulta en un aumento de la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4+ antígeno específicos.

#### **OBJETIVOS**

Evaluar el efecto del tratamiento con GK1 en células dendríticas y su efecto en la proliferación de linfocitos T CD4+ antígeno específicos.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Células Dendríticas derivadas de médula ósea fueron tratadas con LPS con y sin GK1 y determinado su grado de activación midiendo marcadores de activación de su superficie y las citocinas producidas al medio.

Las células dendríticas tratadas fueron posteriormente incubadas con células linfoides TCR/HA específicas marcadas con CFSE para medir la proliferación linfoide *in vitro* por citometría de flujo (FACS).

### 1- *Obtención de células pluripotenciales de médula ósea y diferenciación a células dendríticas*

Se obtuvieron ambos fémures y tibias de las patas traseras de ratones BALB/cAnN, en hielo se hicieron lavados con medio completo para obtener la médula de ambos huesos, el cual está constituido con DMEM (GIBCO) suplementado con glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), streptomycin (100µg/ml), β-mercaptoetanol (500µM) y 10 % de Suero Fetal Bovino libre de endotoxinas. El sobrenadante que se utilizó para recuperar la médula ósea fue centrifugado durante 5 min a 1200 rpm, se desechó el sobrenadante y al paquete celular resultante (pellet) se le agregaron 2 ml de solución de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos, transcurrido el tiempo, se le adicionó 2 ml de medio completo y se centrifugó de nuevo 5 min a 1200rpm, el nuevo paquete celular fue resuspendido en Medio para Células Dendríticas el cual estaba constituido por RPMI-1640 con 10% de Suero Fetal Bovino y 5 o 10% del sobrenadante de células que expresan el Factor estimulador de la colonia granulocítica-macrofágica (GM-CSF) (el porcentaje dependió de la calidad del sobrenadante), se colocaron en cajas de cultivo y se incubaron a 37°. El colocar las células en este medio nos permitió diferenciarlas a Células Dendríticas.

Tres días después, las células fueron transferidas a nuevas cajas de cultivo, para esto, se recuperó el sobrenadante de cada caja y el fondo de las cajas se lavó rigurosamente con 3 a 5 ml de PBS estéril para tratar de recuperar la mayor parte de células remanentes, para recuperar las células adheridas al fondo de la placa, se cubrió el fondo de la misma con 2 ml de Trypsina y se incubó por 3 minutos a 37°, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción colocando la misma cantidad del medio previamente recuperado y se realizaron rigurosos lavados del fondo de la placa, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó durante 5 min a 1200rpm.

---

---

El paquete celular fue resuspendido en medio para Células Dendríticas (constituido como antes fue descrito) y se colocó en nuevas cajas de cultivo (7ml por caja) para ser incubadas de nuevo a 37°.

## 2.- Proliferación de las células TCR/HA específicas

Doce horas después que las Células Dendríticas fueron activas con LPS Y GK1, se obtuvieron células de diferentes ganglios linfáticos de ratones transgénicos (Tg) TCR/HA. De este conjunto de células se realizó una selección negativa eliminando macrófagos, células B y células T CD8<sup>+</sup>, utilizando anticuerpos específicos para marcadores propios de estas células y separándolas a través de una columna magnética. A través de este procedimiento se obtuvieron células enriquecidas en LT CD4. Esta suspensión de células fue incubada con esferas magnéticas acopladas a estreptoavidina (Mitenyi Biotech). Después de un extensivo lavado, las células fueron pasadas a través de una columna magnética. La fracción positiva correspondió a las células T CD4<sup>+</sup> 6.5<sup>+</sup>, con una pureza que variaba entre el 90% y el 95% de acuerdo a análisis por citometría de flujo. La selección positiva mediante la utilización de anticuerpos clonotípicos no resultó en la activación de las células, ya que el procedimiento completo se desarrolló a 4° C. antes de ser puestas en co-cultivo con las DC's, posteriormente las células fueron marcadas con 5μM de Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (Molecular Probes), de acuerdo a las instrucciones recomendadas por los fabricantes, y extensivamente lavadas para que posteriormente se pudiera medir su proliferación *in vitro* al ser colocadas en presencia de las Células Dendríticas (procedimiento que es ampliamente descrito en el modelo transferencia de células TCR/HA).

## 3.- Medición de la proliferación de las células T CD4+ y perfil de citocinas inducidas

Tres días después de haber puesto las Células Dendríticas en presencia de las células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA (co-cultivo de células dendríticas con células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA) y colocada la fuente de antígeno (HA), se recuperaron las células T CD4<sup>+</sup> y por citometría de flujo se observó el porcentaje de células T CD4 que habían perdido su marcaje con CFSE, lo cual nos indicó el grado de proliferación de estas células. Para realizar el análisis por citometría de flujo (FACS), la suspensión de células fue marcada a 4°C utilizando los siguientes anticuerpos: CD4-Cychrome, Thy 1.2-PE. El anticuerpo clonotípico 6.5 que ha sido previamente descrito [Lanoue A. et. al. 1997] fue producido y acoplado a biotina en nuestro laboratorio. El sobrenadante presente en los co-cultivos fue

---

---

recuperado para medir el perfil de citocinas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1)) presente en el mismo a través de citometría de flujo, esto mediante la utilización de un kit inflamatorio citométrico a base de perlas (BD Biosciences). La adquisición de las células así como la medición de citocinas se realizó en el citómetro FACScalibur (BD Biosciences).

#### *4.- Evaluación de la expresión de marcadores de activación en la superficie de las Células Dendríticas por FACS*

Después de la obtención de las Células Dendríticas derivadas de medula ósea (mediante el proceso previamente descrito) y doce horas posteriores al estímulo con LPS y LPS con GK1, las DC's fueron recuperadas para medir el grado de expresión de marcadores de activación en su superficie. Para realizar el análisis por citometría de flujo (FACS), las células fueron marcadas a 4°C utilizando los siguientes anticuerpos: Pharmingen (BD Biosciences): CD40-FITC, CD-80-FITC, Ia/Ie-Biotin, La adquisición de las células se realizó en el citómetro FACScalibur (BD Biosciences).

---

---

## RESULTADOS

### 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVADAS EN LA PROLIFERACION DE CELULAS LINFOIDES

Con la finalidad de evaluar el efecto de la activación de las Células Dendríticas por GK1 en la proliferación de las células linfoides se realizó el siguiente experimento:

**Tabla 13. Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> TCR/HA que presentan el marcaje completo con CFSE después de ser puestos en presencia de Células Dendríticas estimuladas con GK1 libre de LPS y con LPS+GK1**

[HA]	Sin LPS			Con LPS		
	Sin GK1	GK1 1µg	GK1 10µg	Sin GK1	GK1 1µg	GK1 10µg
0µg	95	Nd	89	91	nd	88
0.1µg	59	51	37	44	39	17
1.0µg	31	17	11	18	13	4
10µg	28	15	8	11	12	3

\* Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA que presentan el marcaje completo con CFSE.

Como se puede observar en la Tabla 13 (Figura 7), a medida que se aumenta la concentración de HA en el sistema, el marcaje completo de CFSE presente en las células T CD4<sup>+</sup> se observa con menor intensidad, lo cual nos indica que las células T CD4<sup>+</sup> sufrieron un mayor número de divisiones celulares y por lo tanto en cada división pierden el marcaje con CFSE. Este fenómeno se observa tanto en las células T que fueron puestas en contacto con DC's sin previo estímulo con LPS o GK1 como en las células T puestas en contacto con DC's previamente estimuladas tanto con LPS, GK1 o ambos (esta primera observación nos permite verificar el correcto funcionamiento de nuestro modelo). Cuando observamos el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA que presentan el marcaje completo con CFSE y que fueron puestas previamente en contacto con DC's estimuladas únicamente con LPS, se nota que es mayor el porcentaje de éstas células T que presentan el marcaje completo con CFSE en comparación al número de células T que presentan el marcaje completo pero que fueron puestas en contacto con DC's

---

---

previamente estimulas con LPS y GK1; lo cual nos indica que es menor el porcentaje de células T en proliferación cuando son activadas por células dendríticas que previamente fueron estimuladas únicamente con LPS. Dicho de otra manera, podemos asegurar que las células T CD4<sup>+</sup> TCR/HA proliferan en mayor cantidad cuando estas son activadas por DC's previamente estimuladas con LPS+GK1. El efecto anteriormente descrito nos indica que el péptido GK1 potencia la acción del LPS sobre las células dendríticas que induce proliferación de los linfocitos y corrobora nuestras observaciones anteriores.

Este último experimento tuvo dos repeticiones mas dando como resultado el mismo efecto observado en la Tabla 13.

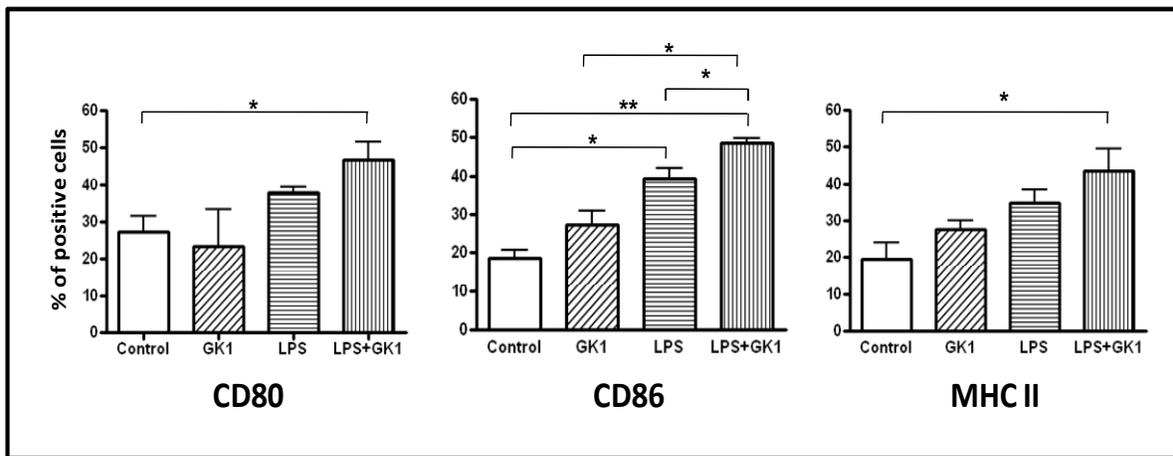
Posteriormente, para determinar si el efecto sinérgico del LPS y el GK1 en la activación y proliferación de las células T que ha sido anteriormente descrito también afecta la producción de citocinas pro-inflamatorias, los niveles de citocinas en los sobrenadantes de estos co-cultivos fueron determinados, obteniendo los siguientes resultados.

En la Figura 8 se pueden observar los niveles del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon gama (INF- $\gamma$ ), y la quimiocina pro-inflamatoria CCL2 (MCP-1) determinados mediante citometría de flujo que se encuentran presentes en los sobrenadantes de los co-cultivos hechos con células dendríticas previamente estimuladas con LPS con y sin GK1 y las células T CD4 TCR/HA. Al observar los resultados ilustrados en la Figura 8 el efecto de GK1 fue sorprendente, bajo las condiciones experimentales de este estudio, solo la adición de GK1 estimulo la producción de citocinas pro-inflamatorias INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (P<0.0001) así como de la quimiocina MCP-1 (P<0.0001), resultados que son dependientes de la concentración de GK1 utilizada. Además los niveles en la producción de INF- $\gamma$  claramente se ven incrementados con la dosis de HA, indicando que la producción de la citocina fue dependiente de la magnitud de la respuesta de células T antígeno específica. TNF- $\alpha$  y particularmente MCP-1 fueron fácilmente detectadas incluso sin la adición del péptido HA, lo que no indica que GK1 en combinación con LPS pueden estar induciendo la secreción de TNF- $\alpha$  y CCL-2 directamente por parte de las DC's independientemente de la activación de las células T. Los resultados observados en la Figura 8 representan la media de dos experimentos independientes.

Como bien se sabe el LPS bacteriano es el prototipo clásico de PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) reconocido por el TLR4, el cual activa una gran variedad de células incluidas las DC's provocando la sobrerregulación de moléculas co-estimuladoras y la eficiente activación de la respuesta de células T.

Una vez que se ha establecido que el GK1 interviene indirectamente en la proliferación de las células linfoides al ser puestas en contacto con DC's previamente estimulas con el péptido, y que además se genera una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos, el siguiente paso fue evaluar la acción directa de GK1 en la activación de las células dendríticas, observando los niveles de expresión por citometría de flujo de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y MHC clase II después de la incubación con GK1, LPS o ambos.

**Figura 9. Moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y MHC Clase II en la superficie de las células dendríticas sobre-reguladas por GK1.**



Como se puede observar en la Figura 9, GK1 induce en las DC's la sobre-regulación de las moléculas CD86 y MHC clase II, aunque las diferencias observadas no son estadísticamente significativas y los niveles de esta sobre-regulación son menores que los inducidos por el LPS solo. Sin embargo, los máximos niveles de sobre-regulación son observados cuando las DC's son tratadas con LPS y GK1 juntos. Estos resultados muestran que GK1 por si solo puede potenciar parcialmente la sobre-regulación de CD86 y MHC clase II en las DC's, lo cual puede explicar el efecto adyuvante visto previamente cuando el péptido HA fue utilizado como inmunógeno (Tabla 4 y Figura 6E). Sin embargo la sobre-regulación de moléculas co-estimuladoras es mucho más eficiente cuando GK1 actúa en sinergia con el LPS.

---

---

## CONCLUSIONES

GK1 aumenta la expresión de los marcadores de activación CD86 y MHC Clase II en la superficie de células dendríticas. GK1 sinergiza la activación de células dendríticas mediada por LPS.

Las células dendríticas tratadas con GK1 producen in vitro las citocinas pro-inflamatorias  $TNF\alpha$  y  $INF\gamma$  y la quimiocina CCL-2. Este efecto es potenciado en presencia de LPS.

Las células dendríticas estimuladas con GK1 promueven la proliferación de linfocitos T CD4+ específicos.

Estas conclusiones nos permiten proponer que GK1 tiene capacidad de activar células dendríticas optimizando el proceso de presentación antigénica que resulta en una mayor respuesta proliferativa linfocitaria específica.

---

---

## DISCUSIÓN

En un trabajo previo demostramos que GK1 es un inmunopotenciador de la vacuna de influenza en el ratón (Segura-Velázquez et. al., 2006) y promueve la producción de anticuerpos específicos y la resolución de la infección. Este trabajo de tesis fue diseñado para identificar los posibles fenómenos que subyacen la capacidad inmunopotenciadora del péptido GK1.

La respuesta inmune en contra de infecciones virales involucra una compleja orquestación entre señales innatas y respuesta adaptativa de células T y B específicas. En el caso de influenza se ha demostrado que en la respuesta inmune en contra de esta enfermedad participan de manera muy importantemente las Células Dendríticas (DC's) como células presentadoras de antígeno, las cuales son capaces de iniciar una respuesta inmune primaria en contra de esta infección [Mellman and Steinman. 2001], siendo más eficientes que los Macrófagos en la generación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos contra influenza [Bender et. al. 1995]. Por otra parte, las células antivirales T CD4 pueden dirigir la respuesta de células T CD8 por medio de la secreción de diferentes citocinas como el INF- $\gamma$ , la IL-2 y el TNF- $\alpha$ , y pueden dirigir la producción de IgG2a por parte de las células B que producen anticuerpos capaces de neutralizar efectivamente partículas virales infectivas. También, se ha demostrado que las células T CD4<sup>+</sup> son necesarias para mantener la respuesta de memoria de células T CD8<sup>+</sup> [Brown et. al. 2004]. Estas observaciones subrayan la importancia de estas dos poblaciones celulares en la inducción de una respuesta protectora en contra de influenza.

Considerando la posibilidad de que GK1 activara células presentadoras de antígeno se decidió evaluar su efecto en las principales células presentadoras, las células dendríticas. Considerando que GK1 promueve la producción de anticuerpos y que la información existente en la literatura señala la relevancia de las células CD4<sup>+</sup> antígeno específico en la protección, decidimos diseñar los ensayos necesarios para determinar el efecto de GK1 en células CD4<sup>+</sup> y células dendríticas.

En este trabajo demostramos que GK1 actúa sobre Células Dendríticas aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras. Su efecto es aún más evidente cuando GK1 es usado en combinación con el LPS, lo que indica un efecto sinérgico de GK1 y LPS. La activación de células dendríticas implica la producción de productos pro-inflamatorios. Entre ellos destaca la quimiocina CCL2, también conocida como MCP-1 [Proteína quimiotáctica de monocitos-1]. CCL2 es una quimiocina pro-inflamatoria que

---

---

actúa atrayendo monocitos, células NK (que se ha demostrado juegan un papel fundamental en la respuesta del huésped contra una infección por influenza [Gazit R. et. al. 2006]), células dendríticas inmaduras. CCL1 activa además células T en los nódulos linfoides drenantes al sitio de inmunización [Serbina et. al., 2008]. Está demostrado que el reclutamiento de células hacia los tejidos infectados es crucial para la eliminación de virus respiratorios. En experimentos *in vitro* utilizando monocitos humanos o líneas celulares epiteliales, Kaufmann y colaboradores demuestran que la infección por influenza induce la generación de quimiocinas que reclutan monocitos, células NK, B y T [Kaufmann et. al., 2001]. Se sabe que ante cualquier infección por virus respiratorios se induce la expresión de quimiocinas que participan en el reclutamiento de células necesarias para la eliminación del virus; de hecho la activación diferencial de factores transcripcionales por diferentes virus respiratorios ha demostrado estar asociada con diferente expresión de genes de quimiocinas. En el caso de influenza, el virus induce la secreción de MCP-1 y MCP-3 en macrófagos humanos, quimiocinas no inducidas, por ejemplo, por el virus de Sendai [Matikainen et. al., 2000]. El incremento de MCP-1 inducido por GK1, implica la posibilidad de aumentar el reclutamiento celular incluyendo macrófagos alveolares con mayores probabilidades de aumentar la recuperación por infección de virus de influenza [Narasaraju et. al., 2010].

El tratamiento de Células Dendríticas con GK1 resulta también en la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . El TNF- $\alpha$  es una de las citocinas incrementadas que resulta de gran importancia en el control de infecciones bacterianas secundarias a la infección por virus de influenza. Small y colaboradores destacan que la producción, en particular de TNF- $\alpha$ , juega un papel muy importante en la inmunidad antibacteriana mediada por células NK en los pulmones en tiempos posteriores a una infección por influenza [Small et al., 2010]. Además, el TNF- $\alpha$  participa en la regulación de la respuesta inmune, juega un papel fundamental en la inducción de células T CD8<sup>+</sup> de memoria que ejercerán eventualmente su papel, especialmente en la inducción de apoptosis de las células infectadas. Así, esta citocina participa en la regulación de la fase efectora y en la magnitud de la respuesta de memoria de células T CD8<sup>+</sup> [Singh and Suresh, 2007]. También, el TNF- $\alpha$  puede proteger a las células dendríticas de la muerte por parte de las células T CD8<sup>+</sup> efectoras [Watchmaker et. al., 2008]. Cuando las células T CD8<sup>+</sup> de memoria secretan TNF- $\alpha$ , la proteinasa inhibidora 9 de la gramzima B inhibidora, es secretada por las células dendríticas en las primeras 2 hrs, por lo tanto limitan la citólisis mediada por células T permitiendo mayor duración de la función de las células

---

---

dendríticas. Todas estas acciones del TNF- $\alpha$  nos señalan la importancia de su presencia en los estados tempranos de la respuesta inmune para mantener funcionales a las células dendríticas y en la respuesta tardía para regular la población de células T CD8<sup>+</sup> efectoras y minimizar la prolongada inmunopatología, características que hacen sumamente relevante el papel que desempeña GK1 interviniendo directamente en la inducción de la producción de esta citocina. Por otra parte, la mayoría de las células T CD8 citotóxicas además de TNF generan INF- $\gamma$ , citocina que tiene la capacidad de inhibir directamente la replicación viral, además de inducir el incremento de la expresión de moléculas MHC clase I en células infectadas. Por otra parte, el INF- $\gamma$  también tiene la capacidad de activar macrófagos, que migran a los sitios de infección tanto como células efectoras o como células presentadoras de antígeno que actúan en sinergia con TNF  $\alpha$  o TNF- $\beta$ , pudiendo potenciar la activación de macrófagos y generar la eliminación de células infectadas a través de su interacción con TNFR-1. La presencia del INF- $\gamma$  es sumamente importante para la polarización de la respuesta inmune adquirida. En conjunto con la IL-12 dirigen a las células T CD4 a generar una respuesta tipo Th1 [Swain et. al., 1991] inhibiendo la generación de una respuesta Th2. En el caso de infecciones por virus de influenza, se ha observado que un gran número de linfocitos CD4<sup>+</sup> efectoras virus de influenza-específicos que se acumulan en el pulmón antes de la completa eliminación del virus secretan INF- $\gamma$  [Roman et. al., 2002], lo que sugiere la relevancia de esta citocina en la resolución de la enfermedad y acentúa la importancia del efecto inducido por la utilización de GK1 que, como aquí demostramos, genera una mayor cantidad de INF- $\gamma$  en sobrenadantes de células estimuladas con GK1. En el caso de infecciones experimentales con virus de influenza, Swain y colaboradores demostraron que los ratones knockout de INF- $\gamma$  no generaron células T CD4<sup>+</sup> efectoras protectoras. Este resultado sugiere que el INF- $\gamma$  producido por las células T CD4<sup>+</sup> efectoras *in vivo* también puede contribuir a la protección [Swain et. al., 2006], y además, nos señala que su ausencia puede disminuir la efectividad de la respuesta inmune inducida contra influenza, probabilidad que se ve disminuida con la utilización de GK1 ya que su efecto genera mayor cantidad de células T CD4<sup>+</sup> activadas y mayor concentración de INF- $\gamma$  producido.

En este trabajo demostramos que GK1 aumenta la expresión y funcionalidad de las células dendríticas presentadoras de antígenos, fenómeno que como demostramos *in vivo* e *in vitro*, puede resultar en un incremento de células T CD4<sup>+</sup> antígeno específicas. En efecto, en este trabajo demostramos que el péptido GK1 potencia la activación y

---

---

proliferación de células T CD4<sup>+</sup> antígeno específicas *in vivo* e *in vitro*, proceso clave para determinar la calidad y cantidad de las células efectoras y células de memoria generadas [Swain et. al. 2006]. El diseño experimental utilizado nos permitió determinar que el efecto de GK1 sobre células dendríticas media el aumento inducido en la activación y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos. El efecto sobre esta población celular resulta de relevancia en términos de protección contra la infección, considerando las múltiples participaciones de este tipo de células en la respuesta inmune contra influenza [Woodland et. al. 2001]. Una de las principales características funcionales atribuidas a estas células son las de tipo regulador en la cual, a su vez, una de estas funciones reguladoras consisten en ayudar a las células B a promover el switching de isotipo de las inmunoglobulinas secretadas por estas células, y promueve los fenómenos de mutación somática y la diferenciación en los centros germinales hacia células plasmáticas y células de memoria [McHeyzer-Williams et. al., 2005]. Estos fenómenos podrían participar en la potenciación mediada por GK1 que promueve un aumento en la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas, que podría resultar en que las células B aumenten la producción de anticuerpos influenza-específicos (Segura-Velázquez et. al., 2006). Otra de las actividades reguladoras clave de las células T CD4<sup>+</sup> es ayudar a las células T CD8<sup>+</sup> naive a promover su óptima diferenciación en células efectoras citotóxicas y de memoria y promover su mantenimiento [Janssen et. al., 2003]. Estas observaciones sustentan la posibilidad de que la activación y mayor proliferación de células T CD4<sup>+</sup> inducidas como consecuencia del estímulo con GK1 observadas en este estudio, resulten en promover una respuesta citotóxica más efectiva en contra del virus de influenza, generando una mejor y más rápida recuperación en el pulmón ante el desafío, como se observa en el modelo murino de influenza previamente realizado. Por otra parte, las células T CD4<sup>+</sup> también tienen efectos reguladores en las células presentadoras de antígeno, efectos que se encuentran mediados por co-receptores de superficie que interactúan con receptores de diferentes células y por diferentes citocinas secretadas [Janssen et. al., 2003]. Además de los efectos reguladores que pueden tener las células T CD4<sup>+</sup>, estas células tienen el potencial de desarrollarse en células T CD4<sup>+</sup> de memoria de larga vida que pueden responder más rápida y vigorosamente cuando se re-encuentran con el antígeno [Dutton et. al., 1999]. Las células T CD4<sup>+</sup> de memoria son rápidamente bajo re-estimulación, pero la completa re-expresión de las características efectoras requiere de 2 a 3 días [Swain S. et. al 2006]. Esta respuesta secundaria es uno de los factores claves en la protección en contra de patógenos después de una infección

---

---

primaria o de la vacunación. Estas observaciones abren paso a considerar que la respuesta inducida por la inmunización con GK1 podría también traer como consecuencia la generación de células de memoria lo que hace sumamente necesario el comenzar a explorar la presencia de estas células tras el estímulo con GK1.

Si bien las células T CD4<sup>+</sup> son un importante componente de la respuesta anti-viral contra infecciones locales y sistémicas, en el caso de una infección por influenza se ha demostrado que son necesarias para inducir una respuesta citotóxica secundaria, contribuyendo con la respuesta inmune en el sitio de infección a través de la secreción de citocinas [Tripp et. al., 1995]. Por otra parte se ha observado que un gran número de linfocitos CD4<sup>+</sup> efectores específicos para el virus de influenza que se acumulan en el pulmón antes de la completa eliminación del virus secretan INF- $\gamma$  [Roman et. al., 2002], lo que sugiere su relevancia en la resolución de la enfermedad. Estas observaciones ponen de manifiesto la importancia del efecto inducido por GK1 en las células T CD4<sup>+</sup>, ya que como se demuestra en este trabajo, su utilización trae como consecuencia una mayor presencia de estas células. Estas observaciones nos llevan a considerar la posibilidad que el efecto inducido por GK1 en las células T CD4<sup>+</sup> efectoras y de memoria contribuye a la generación de una inmunidad más efectiva contra influenza que podría estar promoviendo la generación de una respuesta CD8<sup>+</sup> citotóxica influenza-específica y la mayor producción de anticuerpos; y también la posibilidad de que células T CD4<sup>+</sup> efectoras en el pulmón puedan directamente mediar la eliminación viral por mecanismos independientes de INF- $\gamma$  y/o por efectos citolíticos directos de células infectadas, fenómenos que suceden como se ha demostrado [Deborah et al., 2004]. También existen evidencias de que en ausencia de linfocitos citotóxicos, las células T CD4<sup>+</sup> son capaces de eliminar al virus de influenza mediante un ataque citotóxico por parte de células epiteliales del huésped viralmente infectado [Topham et. al., 1996]. Estas observaciones señalan la posible participación de diferentes mecanismos en el control de la influenza por parte de las células T CD4<sup>+</sup>, soportando hipótesis como aquellas que sugieren que las células T CD4<sup>+</sup> efectoras que ayudan a las células B usan diferentes mecanismos a los que utilizan aquellas que actúan directamente en el pulmón para eliminar al virus [Swain et. al., 2006].

Por otra parte, los mecanismos por los que GK1 activa células dendríticas así como su efecto sinérgico con el LPS, efecto que se demuestra se generan durante la elaboración de este trabajo, aún requieren ser completamente caracterizados. Falta por determinar si GK1 logra aumentar la capacidad de activación de células dendríticas pulmonares. Esto podría resultar en una mayor producción de interferones tipo I y II y por

---

---

ende una mejor protección en contra del virus, controlando su establecimiento en pulmón. La importancia del efecto que induce GK1 en las células dendríticas se hace evidente al conocer el papel que desempeñan estas células en la respuesta inmune contra influenza. Las células dendríticas son fundamentales en contra de infecciones respiratorias para poder montar una respuesta inmune efectiva tanto innata como adaptativa. Se encuentran presentes en niveles basales en los conductos respiratorios, formando una red con sus dendritas que pueden captar posibles fuentes de infección [White M. et. al. 2008]. Expresan muchos TLRs, permitiéndoles reaccionar a una amplia variedad de patógenos y sus productos; son altamente dinámicas y su número en pulmón se ve rápidamente incrementado después de una infección de tipo viral o de cualquier otro tipo. Existen dos subtipos de células dendríticas involucradas en una respuesta inmune innata contra influenza, las células dendríticas convencionales (cDC's) y las células dendríticas pulmonares (pDC's) las cuales se encuentran en un estado inmaduro previo a la infección, madurando y migrando hacia los nódulos linfoides drenantes después de la infección participando así en la presentación del antígeno [López et. al. 2004]. Su importancia se ve reflejada cuando el número de DC's presentes en los pulmones se ve incrementado después de la infección viral siendo estas células las principales productoras de INF tipo I; además, las cDC's y las pDC's producen *in vitro* sucesivas oleadas de citocinas después de una infección por influenza, incluyendo la producción temprana (de 2 a 4 hrs después de la infección) de citocinas y quimiocinas que reclutan células NK y neutrófilos para que, en tiempos posteriores, lleven a cabo la producción de citocinas y quimiocinas que atraen células T y células B [Piqueras et. al. 2006]. La infección de células dendríticas con virus de influenza resulta en la expresión de Hemaglutinina viral en la superficie de las células dendríticas, que compromete a los receptores de las células NK con estas, provocando la liberación de interferones tipo I y de IL-12, por parte de las células dendríticas, lo que conlleva la potenciación de la que trae como consecuencia potenciar la activación de las células NK [Piqueras et. al. 2006]. Ante esto, queda claramente establecido que las células dendríticas contribuyen a la coordinación de muchos aspectos de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa que se establecen en contra de una infección por virus de influenza. Todas estas observaciones evidencian la importancia que tienen los resultados de este trabajo en los que se demuestra que GK1 interviene directamente en la activación de las células dendríticas mejorando la activación y maduración de las mismas, trayendo como consecuencia el establecer una respuesta inmune más clara en contra del virus de

---

---

influenza, por lo que podemos sugerir que la utilización de GK1 mejora la respuesta inmune específica inducida en contra de una infección por influenza. Además, el que GK1 genere una mejor activación de las células dendríticas y que estas interactúen con virus de influenza, puede ser importante en controlar la virulencia del virus, ya que si GK1 logra activar más eficientemente a pCD's esto generara una mayor producción de interferones tipo I y por ende una mejor protección en contra del virus no permitiendo su establecimiento en pulmón.

Estudios realizados en nuestro grupo señalan la posibilidad de que GK1 active a los macrófagos a través de su interacción con TLR3 (Pablo, 2009). La posible acción sinérgica observada en este trabajo entre el GK1 y el LPS se puede considerar muy factible. Esto lo asumimos tomando en cuenta las siguientes consideraciones. Se ha reportado que NOD1 (un receptor de reconocimiento de patrones específicos de peptidoglicanos Gram-negativos) sinérgicamente incrementa la secreción de citocinas bajo la ligación de TLR4 [He et. al., 2003; Tada et al., 2005]. Como bien es sabido, el TLR4 es el receptor específico para el LPS de Gram-negativos y a su vez, NOD1, así como NOD2, son receptores para productos de síntesis y degradación de peptidoglicanos de bacterias Gram-negativas [Chamaillard et al., 2003; Masumoto et al., 2006; Park et al., 2007]. De esta forma, TLR4 y NOD1 son diferentes receptores para Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) de bacterias Gram-negativas. Diferentes grupos de investigación han demostrado que en poblaciones de leucocitos la activación únicamente del receptor NOD1 trae como resultado una ligera activación de los mismos, mientras que el co-estimulo de su TLR agonista resulta en el incremento de la respuesta [Chamaillard et al., 2003; Fritz et al. 2005; van Heel et al., 2005; Tada et al., 2005; Masumoto et al., 2006]. Estas observaciones demuestran que existe una comunicación cruzada entre las diferentes vías de patrones de reconocimiento que puede potenciar la respuesta inmune en contra de los microorganismos. Ante esto, podemos proponer que pueda estar sucediendo algo similar en la potenciación de la respuesta observada al utilizar al GK1 y al LPS juntos. Alternativamente, GK1 puede estar incrementando la detección del LPS o mediar la señalización del LPS en una manera más específica, por ejemplo, mediante la unión a la proteína MD2, proteína que es requerida para las señales de traducción del TLR4 [van Heel et. al. 2005]. Por otra parte, el que GK1 pueda inducir la activación de macrófagos y células dendríticas a través de TLR3 es muy importante, ya que se ha demostrado que el TLR3 en células epiteliales del tracto respiratorio juega un papel muy importante en el reconocimiento de RNA viral y reclutamiento de neutrófilos y otras

---

---

respuestas inflamatorias [Le Goffic et al., 2006]. Recientemente se ha demostrado que la infección de ratones con virus de influenza resulta en una reducción sostenida en la señalización de TLR2, TLR4 y TLR5 en macrófagos alveolares, resultando en la reducción de la producción de citocinas y reclutamiento de neutrófilos [Didierlaurent et. al. 2008]. Estos efectos se correlacionan con el incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas después de 6 semanas de una infección por influenza. Esta circunstancia inmunológica podría verse contrarrestada por la capacidad de GK1 de activar a las células a través de su interacción con TLR3, mediando así la producción de citocinas pro-inflamatorias que coadyuvan en una pronta y satisfactoria resolución de la infección.

En resumen, el presente trabajo de investigación nos permite concluir: 1) GK1 ejerce un efecto inmunopotenciador que está mediado por su actividad sobre las células dendríticas promoviendo la sobre expresión de moléculas co-estimuladoras que potencian la activación de células T tanto *in vivo* como *in vitro*. 2) el LPS y el GK1 tienen un efecto sinérgico en la inducción de la proliferación de las células T y más importantemente en la inducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Actualmente, nuestro grupo de trabajo se encuentra desarrollando una serie de estudios enfocados en investigar si GK1 puede actuar en sinergia con otros adyuvantes que hoy en día son utilizados con diferentes vacunas para uso veterinario y humano. GK1 es un péptido de solo 18 aminoácidos que puede ser rápidamente eliminado del organismo, característica que nos ofrece la posibilidad de no producir efectos colaterales no deseados.

Los resultados obtenidos en esta tesis y los estudios previamente realizados en nuestro grupo de investigación indican que GK1 puede ser considerado como un adyuvante para potenciar la respuesta contra infecciones virales y puede llegar a ser considerado un fuerte candidato para iniciar estudios enfocados en potenciar también la respuesta inmune contra infecciones bacterianas, en particular en condiciones de compromiso del sistema inmune por tratamientos o procesos inmunodepresores o por senescencia inmunológica.

---

---

## BIBLIOGRAFIA

Ada G., Jones P. The immune response to influenza infection. *Current topics in microbiology and immunology* 1986; 128: 1-54.

Adair B. Nanoparticles vaccines against respiratory viruses. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 2009; 1(4):405-14.

A.D.M.E. Osterhaus, J. C. de Jong, The control of influenza: antivirals as an adjunct to vaccines. *Vaccine* 2000; 18: 779-80.

Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2001; 2: 675-80.

Atmar R., Keitel W., Patel S., Katz J., She D., El Sahly H, et al. Safety and immunogenicity of nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/H9N2 vaccine preparations. *Clinical infectious diseases* 2006; 43(9):1135–42.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 2000; 18:767-811.

Banchereau J., Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.

Bancroft C., Parslow T. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *Journal of virology* 2002; 76(14):7133–9.

Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Archives of virology* 1991; 119(1-2):37-42.

Becker TC, Coley SM, Wherry EJ, Ahmed R. Bone Marrow Is a Preferred Site for Homeostatic Proliferation of Memory CD8 T Cells. *Journal of immunology* 2005; 174:1269–73.

Belz GT, Xie W, Altman JD, Doherty PC. A previously unrecognized H-2D(b)-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8(+) T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *Journal of virology* 2000; 74:3486–93.

Belz GT, Behrens GM, Smith CM, et al. The CD8 alpha dendritic cell is responsible for inducing peripheral selftolerance to tissue-associated antigens. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196: 1099–104.

Bender, A., L.K. Bui, M.A. Feldman, M. Larsson, and N. Bhardwaj. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD81 cytolytic T cell responses *The Journal of experimental medicine* 1995; 182:1663–71.

Bernstein D., Edwards K., Dekker C., Belshe R., Talbot H., Graham IL, et al. Effects of adjuvants on the safety and immunogenicity of an avian influenza H5N1 vaccine in adults. *The Journal of infectious diseases* 2008; 197(5):667–75.

---

---

Beare A., Webster R. Replication of avian influenza viruses in humans. *Archives of virology* 1991; 119(1/2):37–42.

Biron C., Nguyen K., Pien G., Cousens L., Salazar-Mather T. Natural Killer cell in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*; 17: 189-220.

Blum J., Ma C, Kovats S. Antigen-presenting cells and the selection of immunodominant epitopes. *Critical reviews in immunology* 1997; 17:411-7.

Bot A., Reichlin A., Isobe H., Bot S., Shulman J., Yokoyama W., and Bona C. Cellular mechanisms involved in protection and recovery from influenza virus infection in immunodeficient mice. *Journal of virology* 1996; 70(8):5668-72.

Bresson J., Perronne C., Launay O., Gerdil C., Saville M., Wood J., et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet* 2006; 367(9523):1657–64.

Brown D., Román E., Swain S. CD4T cell responses to influenza Infection. *Seminars in Immunology*. 2004; 16:171-7.

Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-IGN are portals for virus entry into dendritic cells. *The Journal of cell biology* 2004;164:145–55.

Cella M., Sallusto F., and Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology* 1997; 9:10–6.

Carter LL, Swain SL. From naive to memory. *Development and regulation of CD4+ T cell responses*. *Immunologic research* 1998; 18:1–13.

Cauley L, Cookenham T, Hogan R, Crowe S, Woodland D. Renewal of peripheral CD8 memory T cells during secondary viral infection of antibody sufficient mice. *Journal of immunology* 2003; 170:5597–606.

Cerwenka A, Morgan TM, Dutton RW. Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. *Journal of immunology* 1999; 163:5535–43.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L. *et al*. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology* 2003. 4: 702–7.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine* 2001; 7:1306–12.

Chin T., Foley J., Doto IL, Gravelle C., Weston J. Morbidity and mortality characteristics of Asian strain influenza. *Public health reports* 1960; 75:149–58.

---

---

Clemens M., Betts R., Tierney E., Murphy B.. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type. *Journal of clinical microbiology* 1986; 24:157- 60.

Clemens M., Murphy B.. Development and persistence of local and systemic antibody response in adults given attenuated or inactivated influenza A vaccine. *Journal of clinical microbiology* 1986; 23:66-72.

Cochand L, Isler P, Songeon F, Nicod LP. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1999; 21:547–54.

Colman P., Varghese J., Laver W. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; 303(5912):41–4.

Cook D. and Bottomly K. Innate Immune Control of Pulmonary Dendritic Cell Trafficking. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007; 4:234–9.

Croft M, Dubey C. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Critical reviews in immunology* 1997; 17:89–118.

Cros J., Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza Thogoto and Borna disease viruses. *Virus research* 2003; 95(1/2):3–12.

Deborah M., Román E., Susan L, Swain. CD4 cell responses to influenza infection. *Sem Immunol* 2004; 16: 171-77.

Demicheli V., Rivetti D., Deeks J., Jefferson T. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane database of systematic reviews* 2000; 2:CD001269.

Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205(2):323–9.

Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *Journal of immunology* 2003; 170:4457– 64.

Dubey C, Croft M, Swain SL. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *Journal of immunology* 1996; 157:3280–9.

Dustin ML, Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 1999; 283:649–50.

Dutton RW, Swain SL, Bradley LM. The generation and maintenance of memory T and B cells. *Immunology today* 1999; 20:291–3.

Ellebedy A. and Webby R. Influenza vaccines. *Vaccine* 2009; 27: D65-D68.

Ennis, F., Wells M., Butokko G., and Albert P. Evidence that cytotoxic T cells are part o the host's response to influenza pneumonia. *The Journal of experimental medicine* 1978; 148:1241.

---

---

Fallarino F, Vacca C, Orabona C, et al. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *International immunology* 2002; 14:65–8.

Fedson D. Vaccine development for an imminent pandemic: why we should worry, what we must do. *Human Vaccine* 2006; 2(1):38–42.

Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *European journal of immunology* 2005; 35:2459–70.

Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood*. 2003; 102: 4448–55.

Fujimoto I., Pan J. Takizawa T., Nakanishi Y. Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cell by macrophages. *Journal of virology* 74: 3399-403.

Gallucci S., Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current opinion in immunology* 2001; 13:114-9.

Gambotto A., Barratt-Boyes S., de Jong M., Neumann G., Kawaoka Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet* 2008; 371(9622):1464–75.

Gazit R, Gruda R, Elboim M, et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nature immunology* 2006; 7(5):517–23.

Ghaznawie M, Papadimitriou JM, Heenan PJ. The steady-state turnover of murine epidermal Langerhans cells. *The British journal of dermatology* 1999; 141:57– 61.

Genzel Y. Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert review of vaccines* 2009; 8(12):1681-92.

Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 2003; 21(16):1776–9.

Gett A., Sallusto F., Lanzavechia A., Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nature immunology* 2003; 4(4):355-60.

Glezen W., Keitel W., Taber L., Piedra P., Clover R., Couch R. Age distribution of patients with medically-attended illnesses caused by sequential variants of influenza A/H1N1: comparison to age-specific infection rates, 1978–1989. *American journal of epidemiology* 1991; 133(3):296-304.

Graham, M., Braciale V., Braciale T. Influenza virus-specific CD4 T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *The Journal of experimental medicine* 1994; 180:1273–82.

Gross P., Ennis F., Gaerlan P., Denson L., Denning C., Schiffman D. A controlled double-blind comparison of reactogenicity, immunogenicity, and protective efficacy of whole-virus

---

---

and split-product influenza vaccines in children. *The Journal of infectious diseases* 1977; 136(5):623–32.

Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 2002; 20:621-67.

Gunn M. Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function. *Seminars in immunology* 2003; 15:271-6.

Haller O., Frese, M., Kochs, G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Revue scientifique et technique* 1998; 17: 220–30.

He W., Casadevall A., Lee S., Goldman D. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. *Infection and immunity* 2003; 71(2):930–6.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. A Toll-like receptors recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 656-60.

Herzog C., Hartmann K., Künzi V., Kürsteiner O., Mischler R., Lazar H., Glücl R. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(33):4381-7.

Hikono H, Kohlmeier JE, Ely KH, Scott I, Roberts AD, Blackman MA, Woodland DL. T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunological reviews* 2006; 211:119– 32.

Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 9(11):6108–13.

Hogan RJ, Usherwood EJ, Zhong W, Roberts AD, Dutton RW, Harmsen AG, Woodland DL. Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *Journal of immunology* 2001a; 166:1813–22.

Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *Journal of immunology* 1994; 153:256–61.

Hu H, Huston G, Duso D, Lepak N, Roman E, Swain SL. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nature immunology* 2001; 2:705–10.

Hurez V, Saparov A, Tousson A, et al. Restricted clonal expression of IL-2 by naive T cells reflects differential dynamic interactions with dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2003; 198:123–32.

lellem A, Mariani M, Lang R, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(–)CD25(–) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194:847–53.

---

---

Jacqueline M., Xiuhua L., Charles W., Mark J. A nonionic block co-polymer adjuvant (CRL1005) enhances the immunogenicity and protective efficacy of inactivated influenza vaccine in young and aged mice. *Vaccine* 2000; 18:2177-87.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4<sup>+</sup> T cells are required for secondary expansion and memory in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nature* 2003; 421:852–6.

Jefferson T., Rivetti D., Rivetti A., Rudin M., Di Pietrantonj C., Demicheli V. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet* 2005; 366(9492):1165–74.

Johnson B., Costelloe E., Fitzpatrick D., Haanen J., Shumacher T., Brown L., Kelso A. Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8<sup>+</sup> T cells in influenza virus-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:2657-62.

Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et biophysica acta* 2002; 1589:1-13.

Kaufmann, A., Salentin, R., Meyer, R. G., Bussfeld, D., Pauligk, C., Fesq, H., Hofmann, P., Nain, M., Gemsa, D., Sprenger, H. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology* 2001; 204:603–13.

Kedzierska K, Stambas J, Jenkins MR, Keating R, Turner SJ, Doherty PC. Location rather than CD62L phenotype is critical in the early establishment of influenza-specific CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(23):9782-7.

Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nature immunology* 2002; 3:699–702.

Kodihalli S., Kobasa D. Webster R. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine* 2000; 18(23):2592–9.

Kopf M., Abel B., Gallimore A. Carroll M., Bachman M. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nature medicine* 2002; 8:373-8.

Kristien Van Reeth. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology* 2000; 74:109-16.

Krug R. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current topics in microbiology and immunology* 1981; 93:125–49.

Lamb JR, Eckels DD, Phelan M, Lake P, Woody JN. Antigen-specific human T lymphocyte clones: viral antigen specificity of influenza virus-immune clones. *Journal of immunology* 1982; 128:1428–32.

Lanoue A., Bona C., von Boehmer H., Sarukhan A. Conditions That Induce Tolerance in Mature CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of experimental medicine* 1997; 185(3):405–14.

---

---

Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2000; 106:551–59.

Lawrence CW, Braciale TJ. Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8+ T cells during pulmonary influenza virus infection. *Journal of immunology* 2004; 173:1209–18.

Lawrence CW, Ream RM, Braciale TJ. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. *Journal of immunology* 2005; 174:5332–40.

Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS pathogens* 2006; 2(6):e53.

Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *Journal of immunology* 2007; 178(6):3368–72.

Legge KL, Braciale TJ. Lymph node dendritic cells control CD8+ T cell responses through regulated FasL expression. *Immunity*. 2005; 23:649–59.

Lindblad E. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology and cell biology* 2004; 82(5):497–505.

Li X., Palese P. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of virology* 1994; 68(2):1245–9.

Lopez CB, Moltedo B, Alexopoulou L, et al. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *Journal of immunology* 2004; 173(11):6882–9.

Lui K., Kendal A. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1973 to May 1985. *American journal of public health* 1987; 77:712–6.

Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* 2002; 14:129–35.

Lyons C., Lipscomb M. Alveolar macrophages in pulmonary immune responses. I, Role in the initiation of primary immune responses and the selective recruitment of T lymphocytes to the lung. *Journal of immunology* 1983; 130:1113-9.

Martin K., Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *Journal of virology* 1991; 65(1):232–44.

Marshall DR, Turner SJ, Belz GT, Wingo S, Andreansky S, Sangster MY, et al. Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98:6313–8.

---

---

Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment *in vivo*. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203:203–13.

Matikainen, S., Pirhonen, J., Miettinen, M., Lehtonen, A., Govenius- Vintola, C., Sareneva, T., Julkunen, I. (2000) Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. *Virology*; 276:138–47.

Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T., Roberts N., Klenk H. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of virology* 2004; 78(22):12665–7.

Matsuo K., Yoshikawa T., Asanuma H., Iwasaki T. Hagiwara Y., Chen Z., Kadowaki S., Tsujimoto H., Kurata T., Tamura S. Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant cholera toxin). *Vaccine* 2000; 18:2713-22.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annual review of immunology* 2005; 23:487–513.

McHeyzer-Williams M., McHeyzer-Williams L., Fanelli Panus J., Bikah G., Pogue-Caley R., Driver D., Eisenbraun M. Antigen-specific immunity: Th cell-dependent B cell responses. *Immunologic research* 2000; 22:223-36.

Melief CJ. Mini-review: regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of crosspriming and direct priming? *European journal of immunology* 2003; 33:2645–54.

Mellman, I., Steinman R. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106:255–8.

Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature immunology* 2002; 3:1135–41.

Mescher M. Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes. *Immunological reviews* 1995; 146:177-210.

Mitchell H. and Grayson M. Lung dendritic cells and the inflammatory responses. *Ann Allergy Asthma and immunol.* 2006; 96:643-52.

Moldoveanu Z., Love-Homan L., Huang W., Krieg A. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosa immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16:1216-24.

Monteiro J. Harvey C., Trinchieri G. Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *Journal of immunology* 72: 4825-31.

Monto S., Koopman J., Longini I. Tecumseh study of illness. XIII. Influenza infection and disease 1976–1981. *American journal of epidemiology* 1985; 121:811-22.

Monto A. Epidemiology of influenza. *Vaccine* 2008; 26S:D45–D48.

---

---

Moran, T., Park H., Fernandez-Sesma A., Schulman J. Th2 responses to inactivated influenza virus can be converted to Th1 responses and facilitate recovery from heterosubtypic virus infection. *The Journal of infectious diseases* 1999; 180:579–85.

Mosmann TR., Coffman R. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in immunology* 1989; 46:111-47.

Mosmann TR. Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 1989;7:145–73.

Mostow S., Schoenbaum S., Dowdle W., Coleman M., Kaye H. Studies with inactivated influenza vaccines purified by zonal centrifugation. Adverse reactions and serological responses. *Bull World Health Org* 1969; 41(3):525–30.

Mozdanowska K., Maises K. Gerhard W. Th cell- deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-independent contribution by B cells to virus clearance. *Journal of immunology* 2000; 164: 2635-43.

Murphy B., Webster R. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, et al., *Fields Virology*. New York: Raven Press, 1998; 1397-447.

Narasaraju T, Ng HH, Phoon MC, Chow VT. MCP-1 antibody treatment enhances damage and impedes repair of the alveolar epithelium in influenza pneumonitis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2010; 42(6):732-43.

Ngueyen H., Boyaka P. Moldoveanu Z., Novak M., Kiyono H., McGhee J. Mestecky J. Influenza virus-infected epithelial cell present viral antigens to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 1998; 72:4534-6.

Nguyen H., van Ginkel F., Vu H., Novak M., McGhee J., Mestecky J. Gamma Interferon is not required for mucosal cytotoxic T lymphocytes responses or heterosubtypic immunity to influenza A virus infection in mice. *Journal of virology* 2000; 74:5495-501.

Nicole M., Bouviera P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26S: D49–D53.

Nichole Kristin. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine* 2008; 26S: D17-D22.

Ohashi PS, DeFranco AL. Making and breaking tolerance. *Current opinion in immunology* 2002; 14:744 –59.

Ohmit S., Victor J., Rotthoff J., Teich E., Truscon R., Baum L., et al. Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines. *The New England journal of medicine* 2006; 355(24):2513–22.

Palese P., Shaw M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2007.

---

---

Park H., Li Z., Yang XO, Chang S., Nurieva R., Wang Y., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 2005; 6(11):1133–41.

Park H, Kim YG, Shaw M, Kanneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K et al. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *Journal of immunology* 2007; 179: 514–21.

Phair J., Kauffman C., Bjorson A., Abams L., Linnemain C. Jr. Failure respond to influenza vaccine in the aged: correlation with B-cell number and function. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1978; 92:822-8.

Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 2006; 107(7):2613–8.

Potter C. A history of influenza. *Journal of applied microbiology* 2001; 91(4):572–9.

Prendergast JA, Helgason CD, Bleackley RC. A comparison of the flanking regions of the mouse cytotoxic cell proteinase genes. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1131:192–8.

Pulendran B., Palucka K., Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 2001; 293:253-6.

Randolph G. Dendritic cell migration to lymph nodes: Cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Seminars in immunology* 2001; 13:267-4.

Renegar K., Small P., Boykins L., Wright P. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *The Journal of Immunology* 2004; 173:1978-86.

Riberdy J., Christensen J., Branum H., Doherty P. Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8<sup>+</sup> T responses in CD4-depleted Ig<sup>-/-</sup> mice. *Journal of virology* 2000; 74:9762-5.

Rogers PR, Huston G, Swain SL. High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *Journal of immunology* 1998; 161:3844–52.

Román E, Miller E, Harmsen A, Wiley J, Von Andrian UH, Huston G, Swain SL. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196:957–68.

Romani N., Koide S., Crowley M., Witmer-Pack M., Livingstone A., Fathman C., Inaba K., Steinman R. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 1989; 169:1169-78.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 2004; 22:745–63.

---

---

Sarukhan A., Soudais C., Danos O., Jooss K. Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal Gene Medicine* 2001; 3(3):260-70.

Segura-Velázquez R., Pérez-Torres A., Rosas G., Toledo A., Restelli M., Acosta E. Corral R. Rosetti F., Fragoso G., Grinstein S., Sciutto E. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 2006; 24:1073–80.

Serbina N., Jia V., Hohl T., Pamer E. Monocyte mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* 2008; 26:421–52.

Schulta-Cherry S., Dybdahl-Sissoko N. Neumann G., Kawaoka Y., Hinshaw V. Influenza virus NSI protein induce apoptosis in cultured cells. *Journal of virology* 2001; 75: 7857-81.

Shi Y., Evans J., Rock K. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425:516- 21.

Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440(7083):435–6.

Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*.1997;6: 361–9.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2: 151–61.

Sieczkarski SB, Whittaker GR. Characterization of the host cell entry of filamentous influenza virus. *Archives of virology* 2005; 150(9):1783-96.

Singh, A., and M. Suresh. 2007. A role for TNF in limiting the duration of CTL effector phase and magnitude of CD8 T cell memory. *Journal of leukocyte biology* 82:1201–11.

Simonsen L., Clarke M., Schonberger L., Arden N., Cox N., Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: A pattern of changing age distribution. *The Journal of infectious diseases* 1998; 178:53–60.

Small Ch., Shaler Ch., McCormick S., Jeyanathan M., Damjanovic D., Brown E., Arck P., Jordana M., Kaushic Ch., Ashkar A., Xing Z. Influenza Infection Leads to Increased Susceptibility to Subsequent Bacterial Superinfection by Impairing NK Cell Responses in the Lung. *The Journal of Immunology* 2010; 184: 2048–56.

Steinhauer D. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999; 258(1):1–20.

Steinman R., Inaba K., Turley S., Pierre P., Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: Recent cell biological studies. *Human immunology* 1999; 60:562-7.

Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. CD4 T-cell memory. *Seminars in immunology* 2004; 16:295–303

---

---

Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002; 296: 1873–6.

Stumbles PA, Strickland DH, Pimm CL, et al. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *Journal of immunology* 2001; 167:228 –34.

Summerfield A., Guzylack-Piriou L., Schaub A., Carrasco C., Horn M., Tâche V., Charley B., McCullough K. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon producing cells. *Immunology* 2003; 110:1-10.

Swain SL.. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunological reviews* 1991; 123:115–44.

Swain SL. Generation and *in vivo* persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity* 1994; 1:543–52.

Swain SL, Agrewala JN, Brown DM, Roman E. Regulation of memory CD4 T cells: generation, localization and persistence. *Advances in experimental medicine and biology* 2002; 512:113–20.

Swain SL. Regulation of the generation and maintenance of T-cell memory: a direct, default pathway from effectors to memory cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2003; 5:213–9.

Swain SL. Lymphocyte effector functions – lymphocyte heterogeneity – is it limitless? *Current opinion in immunology* 2003; 15:332–5.

Swain SL., Agrewala J., Brown D., Jelley-Gibbs D., Golech S., Huston G., Jones S., Kamperschroer S., Lee W., McKinstry K., Román E., Strutt T., Weng N. CD4+ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4+ T cells in protective immunity to influenza. *Immunological reviews* 2006; 211: 8–22.

Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with Toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infection and immunity* 2005; 73:7967–76.

Tamura S., Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Japan The Journal of infectious diseases* 2004; 57:236-47.

Taylor P., Askonas B. Influenza nucleoprotein-specific T cell clones are protective *in vivo*. *Immunology*. 1986; 58(3):417-20.

Théry C., Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* 2001; 13(1):45-51.

Thomas P., Keating R., Hulse-Post D., Doherty P.. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerging infectious diseases* 2006; 12(1):48–54.

---

---

Thompson W., Shay D., Weintraub E., Brammer L., Cox N., Anderson L., Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003; 289:179–86.

Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernández M., Acero G., Rosas G., Lopez-Casillas F., Kubli-Garfias C., Vazquez R., Terrazas X., E. Sciutto. Towards *Taenia solium* Cysticercosis vaccine: an epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and immunity* 1999; 67(5):2522-30.

Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *Journal of immunology* 1997; 159:5197–200.

Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annual review of immunology* 2000; 18:861–926.

Topham R., Tripp A., Sarawar S., Sangster M., Doherty P. Immune CD4<sup>+</sup> T cells promote the clearance of influenza virus from MHC class II<sup>-</sup> / <sup>-</sup> respiratory epithelium. *Journal of virology* 1996; 70(2):1288-91.

Topham D., Doherty P., Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells. *Journal of virology* 1998; 72(1):882-5.

Townsend AR, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. 1986; 44:959–68.

Treanor J, Nolan C, O'Brien D, Burt D, Lowell G, Linden J, Fries L. Intranasal administration of a proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects. *Vaccine* 2005; 24:254–62.

Tripp R., Sarawar S., Doherty P. Characteristic of the influenza virus-specific CD8+ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-21Ab gene. *Journal of immunology* 1995; 155:2955-9.

Van den Eynde B., Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Current opinion in immunology* 2001; 13:147-53.

Van Heel, D., S. Ghosh M., Butler K., Hunt B., Foxwell M., Mengin- Lecreulx D., Playford R. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *European. Journal of immunology* 2005; 35:2471–6.

Wagner D., Clements M., Reimer C., Snyder M., Nelson D., Murphy B. 1987. Analysis of immunoglobulin G antibody responses after administration of live and inactivated influenza A vaccine indicates that nasal wash immunoglobulin G is a transudate from serum. *Journal of clinical microbiology* 25(3):559-62.

Walker JA, Molloy SS, Thomas G, Sakaguchi T, Yoshida T, Chambers TM, et al. Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *Journal of virology* 1994; 68:1213–8.

---

---

Wang J, Fathman JW, Lugo-Villarino G, et al. Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells. *The Journal of clinical investigation* 2006; 116:414–21.

Wareing M., Tannock G. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* 2001; 19(25–26):3320–30

Watanabe T., Watanabe S., Ito H., Kida H., Kawaoka Y. Influenza. A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *Journal of virology* 2001; 75(12):5656–62.

Watts C., Moss C., Mazzeo D., West M., Matthews S., Li D., Manoury B. Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 987:9-14.

Watchmaker, P., J. A. Urban, E. Berk, Y. Nakamura, R. B. Mailliard, S. C. Watkins, S. Marieke van Ham, and P. Kalinski.. Memory CD8<sub>T</sub> cells protect dendritic cells from CTL killing. *Journal of immunology* 2008; 180:3857–65.

Wharton S., Belshe R., Skehel J., Hay A. Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. *The Journal of general virology* 1994; 75(Pt 4):945–8.

White M., Doss M., Boland P., Tecle T., Hartshorn K. Innate immunity to influenza virus: implications for future therapy. *Expert review of clinical immunology* 2008; 4(4): 497–514.

Webster R., Laver W., Air G.. Antigenic variation among type A influenza viruses. In: Palese P, Kingsbury DW, editors. *Genetics of influenza viruses*. Vienna: Springer-Verlag 1983. p.127–68.

Wilson I., Skehel J., Wiley D. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 1981; 289(5796):366–73.

Woodland DL, Hogan RJ, Zhong W. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunologic research* 2001; 24:53–67.

Wyde P. Wilson M. Cate R. Interferon production by leucocytes infiltrating the lungs of mice during primary influenza virus infection. *Infection and immunity*; 38:1249-55.

Wynn TA. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nature immunology* 2005; 6:1069–70.

Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, et al. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998; 8:115–24.

Yoshikawa T., Matsuo Ke., Matsuo Ka., Suzuki Y., Nomoto A., Tamura S., Kurata T., Sata T. Total viral genome copies and virus-Ig complex after infection with influenza virus in the nasal secretion of immunized mice. *The Journal of general virology* 2004; 58:2339-46.

---

---

Zebedee S., Lamb R. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of virology* 1988; 62(8):2762–72.

## EL VIRUS DE INFLUENZA

El virus de influenza se caracteriza por poseer un genoma segmentado de RNA de polaridad negativa, y su RNA es dependiente de una RNA polimerasa de origen viral para su replicación [Nicole M. Bouviera, Peter Palese 2008]. Existen tres tipos de virus de influenza que afectan a los humanos, los virus de influenza A, B y C, los cuales representan tres de los 5 géneros de la familia de Orthomyxoviridae, su secuenciación a confirmado que estos tres virus provienen de un ancestro común, sin embargo tienen divergencias genéticas como la recombinación (cambio de segmentos genéticos entre virus) que se ha reportado ocurre en cada género, pero no entre los diferentes tipos.

El virus de influenza A se ha caracterizado además por el subtipo de sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Los virus de influenza tienen una nomenclatura estándar que incluye tipo de virus, especie del que fue aislado (si no es humano); localización en el que fue aislado; nombre y año de aislamiento y, para el virus de influenza A únicamente, subtipo de HA y NA. Si bien se han encontrado muchos subtipos de virus de influenza A (16 HA y 9 NA) en circulación únicamente 3 subtipos de HA (H1, H2 y H3) y 2 de NA (N1 y N2) han causado epidemias en humanos [Palese P, Shaw ML 2007].

## ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL VIRION

Pueden ser de forma esférica o filamentosa, las formas esféricas se encuentran en el orden de los 100 nm de diámetro y las formas filamentosas a menudo exceden las 300 nm de largo.

El virión de influenza A está cubierto por estructuras en forma de picos de HA y NA, en una relación aproximada de 4 a 1, proyectados a partir de una membrana lipídica derivada de la célula huésped [Palese P, Shaw ML 2007]. De manera similar canales de iones de la matrix (M2) atraviesan la membrana lipídica, con una relación M2:HA de un canal M2 por 101 a 102 moléculas de HA [Zebedee, Lamb. 1988]. La envoltura y sus tres proteínas integrales de su membrana (HA, NA y M3), cubren a la proteína de Matrix M1, que encierra al core del virion. Interna a la proteína de Matrix M1 se encuentra la proteína de exportación nuclear (NEP; proteína no estructural 2 o NS2) y el complejo de ribonucleoproteínas (RNP), el cual está constituido por segmentos de RNA viral recubierto con nucleoproteínas (NP) y la heterotrimerica RNA polimerasa dependiente de RNA compuesta de dos subunidades de polimerasa básica y una polimerasa ácida (PB1, PB2 y PA).

La organización del virión de influenza B es similar, con cuatro proteínas en la envoltura: HA, NA y en vez de M2, NB y BM2.

Los viriones de influenza C son estructuralmente diferentes a los del virus de influenza A y B; en la superficie de células infectadas, pueden formar largas estructuras en el orden de los 500 nm. Sin embargo, los viriones de influenza C tienen una composición muy similar, con una glicoproteína situada en la envoltura lipídica alrededor de la proteína de matrix y el complejo RNP. El virus de influenza C tiene solo una gran glicoproteína en la superficie, la proteína hemaglutinina esterasa de fusión (HEF), que funcionalmente corresponde a la HA y NA de los virus de influenza A y B, y una pequeña proteína de envoltura, la CM2 [Palese P, Shaw ML 2007].

## ESTRUCTURA DEL GENOMA

Los genomas de los virus de influenza A y B constan de ocho segmentos de polaridad o sentido negativo, de RNA viral de cadena única (vRNA) (Tabla 1 de Anexo 1) mientras que el virus de influenza C tiene un genoma que consiste en siete de estos segmentos.

Tabla 1 Los segmentos genómicos del virus de influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) y sus proteínas codificantes.

Segmento	Longitud del segmento en nucleótidos	Proteína (s) que codifica	Longitud de la proteína en aminoácidos	Función de la proteína
1	2341	PB2	759	Subunidad de la Polimerasa; elongación del RNA , actividad de endonucleasa
2	2341	PB1 PB1-F2	757 87	Subunidad de la Polimerasa; elongación del RNA , actividad de endonucleasa Actividad Pro-apoptotica
3	2233	PA	716	Subunidad de la Polimerasa; actividad de proteasa
4	1778	HA	550	Glicoproteína de superficie; Principal antígeno, receptor con actividad de unión y fusión
5	1565	NP	498	Proteína de unión a RNA; regulación de la importación nuclear
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie; actividad de sialidasa, liberación viral
7	1027	M1 M2	252 97	Proteína Matrix; interacción con vRNP, regulación de la exportación del RNA nuclear, gemación viral Canal de iones; virus desrevestimiento y ensamble
8	890	NS1 NEP/NS2	230 121	Proteína antagonista al Interferon; regulación de la expresión genética del huésped Exportación nuclear de RNA

[Nicole M. Bouviera, Peter Palese 2008].

Los ocho segmentos de los virus de influenza A y B (y los siete segmentos del virus de influenza C) están numerados de forma descendiente según su longitud. En los virus de influenza A y B los segmentos 1, 3, 4 y 5 codifican únicamente para una proteína por segmento: las proteínas PB2, PA, HA y NP. Todos los virus de influenza codifican la subunidad de la polimerasa PB1 en el segmento 2; en algunas cepas del virus de

---

---

influenza A, este segmento también codifica para la proteína accesoria PB1-F2, una pequeña proteína de 87 aminoácidos con actividad pro-apoptótica, en un marco de lectura alternativo +1 [Chen W. et. al. 2001].

Por el contrario, el segmento 6 del virus de influenza A codifica únicamente para la proteína NA, mientras que el virus de influenza B codifica tanto para la NA y, en un marco de lectura alternativo -1, la proteína de matrix NB, que es una proteína integral de la membrana que corresponde a la proteína M2 del virus de influenza A [Hatta M, Kawaoka Y. 2003]. El segmento 7 tanto en el virus de influenza A como en el B codifican para la proteína de matrix M1. en el genoma del virus de influenza A, el canal de iones M2 es también expresado por el segmento 7 por splicing de RNA [Lamb RA. et al. 1981]; mientras que el virus de influenza B codifica su proteína de membrana BM2 en un marco de lectura alternativo +2 [Briedis DJ et. al, 1982; Horvath CM. et al. 1990]. Finalmente, los virus de influenza A y B poseen un segmento único de RNA, el segmento 8, del que expresan la proteína antagonista del INF, la proteína NS1 [Dauber B et al. 2004] y por splicing de mRNA, la NEP/NS2 [Briedis DJ et. al, 1982b] que esta involucrada en la exportación de la RNP del núcleo celular del huésped. La organización genómica del virus de influenza C generalmente es similar al de los virus de influenza A y B; sin embargo, la proteína HEF del virus de influenza C reemplaza a las proteínas HA y NA, y de esta manera el genoma del virus de influenza C tiene un segmento menos que los virus de influenza A o B.

El final de cada segmento de vRNA procedente de la horquilla helicoidal, esta unido por el complejo heterotrimetrico de RNA polimerasa, el resto de los segmentos se encuentran recubiertos con la NP rica en arginina, la red de cargas positivas de los que se unen los fosfatos negativamente cargados son la columna vertebral del vRNA [Baudin F et. Al. 1994].

Cada segmento de vRNA posee regiones no codificantes de diferentes longitudes tanto en los extremos 3' como 5'. Sin embargo, el extremo final de todos los segmentos es altamente conservado entre todos los segmentos de virus de influenza; estas parcialmente pares de bases terminales funcionan como promotores para la replicación del vRNA y su transcripción por parte del complejo de polimerasas virales. Las regiones no codificantes también incluyen la señal de poliadenilación del vRNA y parte de las señales de empaquetamiento para el ensamble del virus.

MECANISMOS DE DEFENSA EN CONTRA DE UNA INFECCION POR VIRUS DE INFLUENZA

La influenza es una enfermedad aguda altamente contagiosa causada por una infección por virus de influenza, que ataca la mucosa del tracto respiratorio del huésped. El virus de influenza ataca las células epiteliales del huésped uniéndose a receptores (ácido siálico) en la superficie de la célula a través de una de las principales glicoproteínas de su superficie, la HA. Los virus entonces se replican en las células infectadas del huésped. Horas después de la infección, los nuevos virus sintetizados son liberados de la célula infectada por acción de la otra gran glicoproteína de la superficie del virus, la NA. Para recuperarse o para prevenir una infección por influenza, tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa deben ser inducidas en la mucosa respiratoria después de la infección viral. Así, la mucosa del tracto respiratorio no es solo el sitio de infección por el virus de influenza sino que también es el sitio de defensa por parte del huésped.

La mayor parte del virus de influenza son detectados y destruidos en pocas horas por mecanismos de defensa innata, los cuales son antígeno no específicos y que no requieren de un prolongado periodo de inducción [Ada G. 1986]. Diferentes componentes como son el moco, los macrófagos, el INF a y b así como otras citocinas, fiebre, células NK así como el sistema de complemento se encuentran involucrados en el sistema inmune innato. En caso de que el virus escape a estos mecanismos de defensa tempranos, es detectado y eliminado por mecanismos inmunes adaptativos, en donde las células T y B así como sus productos funcionan como efectores antígeno-específicos (Linfocitos T citotóxicos (CTLs) y anticuerpos dirigidos contra el virus).

También las células de memoria antígeno específicas (células T y B) se encuentran involucradas en la prevención de una subsecuente infección viral. Las células efectoras y las moléculas involucradas en los mecanismos de defensa inducidos después de una infección por virus de influenza se muestran a continuación.

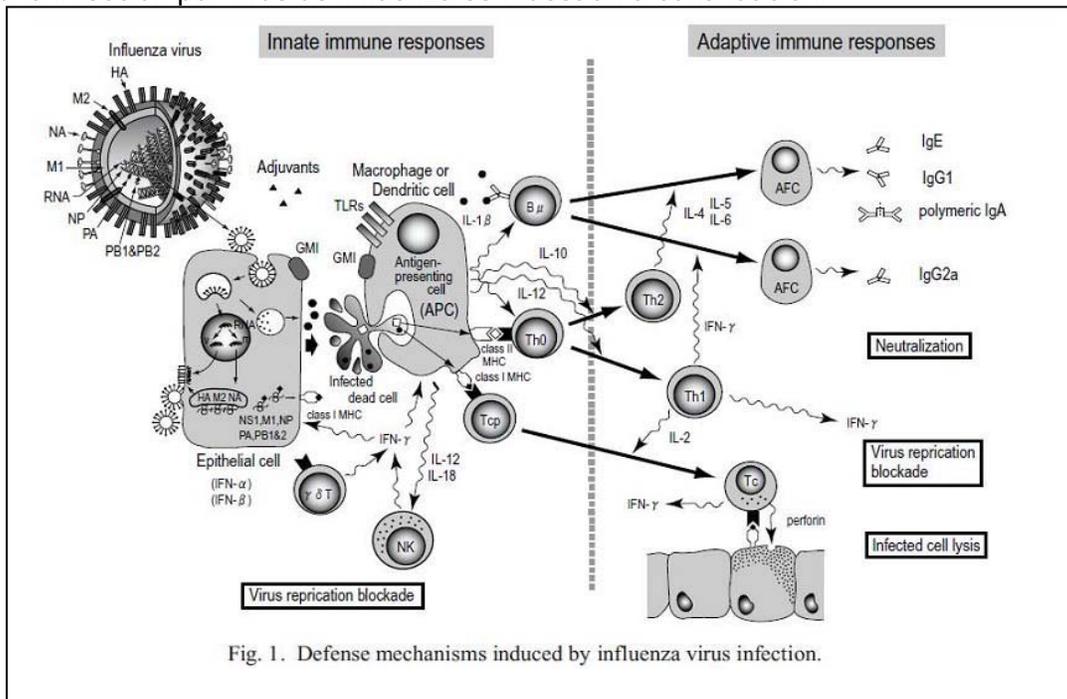


Fig. 1. Defense mechanisms induced by influenza virus infection.

---

---

## Inmunidad innata en contra de influenza.

La infección por virus de influenza dirige una respuesta inmune innata en donde las siguientes células efectoras, moléculas y factores se encuentran implicadas en la restricción de la diseminación viral.

Algunos de estos efectores entran en acción pocos días posteriores a la infección, no solo para ayudar a mantener la infección bajo control, sino también como comunicadores (células presentadoras de antígenos) o como activadores (citocinas) en la subsecuente respuesta inmune adaptativa. Algunas acciones de estos efectores se mencionan a continuación. A) factores inhibidores en la mucosa del tracto respiratorio, que son similares o idénticos a los receptores de la HA, lo cual reduce la habilidad del virus a replicarse [Ada G. 1986]. B) niveles nasales y pulmonares de  $INF\ \alpha$  y  $\beta$  producidos rápidamente después de la infección se correlaciona directamente con la disminución de la replicación viral en hurones, ratones y humanos [Ada G. 1986]. Macrófagos alveolares o linfocitos provenientes de pulmones infectados liberan Interferon *in vitro* [Wyde P. et. al. 1982]. C) Los macrófagos secretan IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 los cuales activan células NK [Monteiro J. et. al. 1998]. Macrófagos recuperados de pulmones infectados son mediadores de la lisis de células infectadas, probablemente a través de apoptosis dependientes de fagocitosis [Fujimoto I. et. al. 2000]. Además. Las citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6) producidos por los macrófagos, inducen fiebre y la magnitud de la respuesta febril se correlaciona fuertemente con el nivel de propagación del virus en humanos y animales [Ada G. 1986]. D) Las células NK que son detectadas en pulmón 48 hrs posteriores a una infección por virus de influenza producen  $INF\ \gamma$  limitando la propagación del virus y lisan las células infectadas por virus, lo cual es probablemente mediado por la formación de un poro en las células infectadas involucrando a la perforina [Biron C. et. al. 1999]. E) protección mediada por el complemento, el cual es sumamente relevante ya que se observa un incremento en la mortalidad de ratones deficientes de C5 infectados con dosis letal de virus de influenza [Kopf M. et. al. 2002].

Esforzarse en activar a los efectores involucrados en la respuesta inmune innata puede llevar al potenciamiento de la respuesta inmune adaptativa, debido a que algunos de los efectores actúan en ambas respuestas. Por ejemplo, la administración intranasal de toxina de cólera (CT) previo a una infección con virus de influenza activa macrófagos y células NK a través de la unión de la CT a los receptores en las células (gangliosido GM1) trayendo como resultado la reducción de la replicación no específica de los virus infectantes en el tracto respiratorio [Matsuo K. et. al. 2000]. La no específica activación de macrófagos (APCs) y el potenciamiento de la producción de citocinas por CT causa el subsecuente potenciamiento de la respuesta inmune adaptativa en contra del virus de influenza que resulta en una completa protección en contra de la infección. En casos como este en donde constituyentes de los patógenos son usados como pre-tratamiento pueden estar activando macrófagos y células dendríticas a través de los TLRs para inducir protección en contra de la infección [Hemmi H. et. al. 2000; Akira S. et.al. 2001]. Por ejemplo, administrar CpG intranasalmente puede potenciar la respuesta de anticuerpos en mucosas al co-administrarla con vacuna de influenza inactivada [Moldoveanu Z. et. al. 1998]. Así, varios constituyentes de los patógenos pueden ser utilizados para potenciar la respuesta inmune innata a través de varios receptores, como son los TLRs y el gangliosido GM1, tanto en macrófagos como en células dendríticas para aumentar la respuesta inmune en mucosas del tracto respiratorio [Kaisho T. 2002].

---

---

## **Inmunidad adaptativo en contra de influenza.**

Las células presentadoras de antígeno (APCs)(macrófagos y células dendríticas) son esenciales en la inducción de la respuesta inmune adaptativa [Akira S. et. al. 2001]. Antígenos virales exógenos, que comprenden partículas virales inactivadas, virus intactos y apoptóticos así como células infectadas son captados por las APCs mediante endocitosis proveyendo una potencial fuente de péptidos que pueden unirse a las moléculas MHC Clase I y II en las APCs [Nguyen H. et. al. 1998; Shultz-Cherry S. et. al. 2001]. Además, macrófagos infectados con influenza también pueden actuar como APCs [Lyons C. 1983], y las APCs secretan IL-12, que contribuye al desarrollo de células T helper tipo Th1 [Monteiro J et. al. 1998]. Las APCs también secretan IL-1b, una de las citocinas mas importantes en el puente entre sistema inmune innato y adaptativo [Matsuo K. et. al. 2000].

## **Papel de las células T y B en la inmunidad adaptativa.**

Precusores células T CD4<sup>+</sup> helper virus-específicas, de las cuales se producen las células tipo Th1 y Th2, y células T CD8<sup>+</sup> precursores de linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen péptidos presentados en el contexto MHC clase II y clase I en las APC respectivamente. Estas células son subsecuentemente activadas por citocinas producidas por APCs [Mosmann T 1989]. Células Th1 secretan INF- $\gamma$  e IL-2, y ayudan a la producción de anticuerpos IgG2a por parte de las células formadoras de anticuerpos (AFCs) en ratón. Mientras que las células Th2 secretan IL-4 e IL-5 ayudando a la producción de anticuerpos IgA, IgG1 e IgE por parte de las AFCs [Ada G. 1986]. Las células Th1 también potencian la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas por la producción de IL-2 [Riberdly M. et. al. 2000]. La producción de anticuerpos producidos durante esta respuesta contribuye a la neutralización viral (NT) por la unión con los antígenos virales [Yoshikawa T. et. al. 2004]. Además, CTLs el complejo péptido-MHC Clase I en células epiteliales infectadas con virus y destruyen las células infectadas con virus mediante la exocitosis de gránulos que contienen perforinas y granzimas [Jhonson B. et. al. 2003]. INF- $\gamma$  secretado por células NK y CD8<sup>+</sup> se ha visto que no son esenciales para la lisis de células blanco [Nguyen H. et. al. 2000].