



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de α -galactosilceramida y la proteína VPH18-E1 en
el ambiente de citocinas involucradas en la
generación de linfocitos T CD8⁺ de
memoria, en un modelo murino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:
ANA DANIELA GONZALEZ TELONA

TUTOR PRINCIPAL:
MARCELA LIZANO SOBERÓN
COTUTOR:
ALFREDO AMADOR MOLINA



Ciudad Universitaria, CDMX, 2020



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

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Nacional de Cancerología/Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología (017/001/IBI) y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-INN221810).

Se agradece el apoyo recibido por parte del Instituto Nacional de Cancerología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, así como de la Universidad Nacional Autónoma de México. Quiero además agradecer el apoyo recibido por parte de mi tutora, la Dra. Marcela Lizano Soberón y de mi cotutor, el Dr. Alfredo Amador Molina, así como al Dr. Joaquín Manzo Merino, al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez y al Dr. Marco Alonso Andonegui Elguera, por aceptar formar parte de mi jurado. Agradezco a todo el personal del INcan, así como al personal de la Unidad de Citometría de flujo del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias (INER) por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Quiero agradecer a mis padres, mi hermana y mi esposo por el apoyo incondicional, el cual he recibido desde el inicio de mi carrera ya que siempre me han motivado a dar lo mejor de mí y siempre mantenerme positiva y confiar en mí sin importar los obstáculos. Les dedico este trabajo con todo el esfuerzo y amor del mundo. Los amo mucho.

Así como a una persona muy especial, la cual desde pequeña me enseñó la pasión por la ciencia, y me inculcó la curiosidad por ella. Cuando todo empezó con un “Mira abuelo, las arañas” al ver el microscopio. Te quiero mucho Abuelo, esto va para ti.

“Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited to all we now know and understand, while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know and understand”

— **Albert Einstein**

ÍNDICE

1. RESUMEN
2. ABSTRACT
3. INTRODUCCIÓN
 - 3.1 Cáncer cervicouterino
 - 3.2 Historia del Virus del Papiloma Humano y su asociación con CaCu
 - 3.3 Aspectos moleculares del Virus del Papiloma Humano
 - 3.4 Proteína temprana E1 del Virus del Papiloma Humano
 - 3.5 Historia Natural de la Infección por el Virus del Papiloma Humano
 - 3.6 Evasión del sistema inmune por VPH
 - 3.7 Linfocitos T como células clave para la eliminación de infecciones por VPH
 - 3.8 Vacunas y adyuvantes
 - 3.9 Citocinas involucradas en fenotipos de memoria inmunológica
4. ANTECEDENTES
5. JUSTIFICACIÓN
6. HIPÓTESIS
7. OBJETIVO GENERAL
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS
9. METODOLOGÍA
 - 9.1 Protocolo de inmunización
 - 9.2 Obtención de suero a partir de muestras de sangre periférica de ratones C57BL/6.
 - 9.3 Cuantificación de proteínas totales en suero
 - 9.4 Determinación del Perfil de citocinas por inmunoensayo
 - 9.5 Obtención de T CD8⁺ de bazo de ratones C57BL/6 inmunizados
 - 9.6 Determinación de T CD8⁺ de bazo de ratones C57BL/6 inmunizados mediante citometría de flujo
 - 9.7 Análisis estadístico
10. RESULTADOS
 - 10.1 Patrón diferencial de las citocinas IL-4, IL-7 e IL-15 en ratones inmunizados con α -GalCer + E1
 - 10.2 Evaluación de perfiles de linfocitos T CD8⁺ de memoria inmunológica
 - 10.3 Evaluación de la pureza de los linfocitos T CD8⁺ purificados de bazo
 - 10.4 Aumento de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria en ratones inmunizados
11. DISCUSIÓN
12. CONCLUSIONES
13. PERSPECTIVAS
14. REFERENCIAS
15. ANEXOS

1. RESUMEN

El Virus del Papiloma humano (VPH) es el agente etiológico del cáncer cervicouterino (CaCu). Durante la historia natural de la infección por este virus, la proteína viral E1 participa en la replicación de los episomas virales. La eliminación de la infección viral por el hospedero se lleva a cabo principalmente a través de una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD8+. Sin embargo, se estima que un 15% de las personas infectadas por algún tipo de VPH de alto riesgo no promueve una respuesta inmune efectiva contra éste llevando hacia una infección persistente, representando el factor de riesgo más importante para el desarrollo de CaCu. Actualmente, existen tres vacunas aprobadas por la FDA y COFEPRIS para la prevención de la infección por VPH: Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix; además de diversos trabajos de investigación enfocados a la generación de vacunas terapéuticas contra el VPH, así como inmunoestimuladores tópicos, los cuales podrían impedir el desarrollo de cáncer en mujeres infectadas. Sin embargo, el abordaje terapéutico aún presenta resultados limitados, por lo que se requiere de nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, se ha demostrado que el uso de inmunoterapias y adyuvantes pueden favorecer el establecimiento de una respuesta de linfocitos T CD8+, particularmente el adyuvante α -galactosilceramida (α -GalCer) promueve una respuesta de linfocitos T CD8+ antígeno específico y de memoria, por lo que podría ser un adyuvante útil para el diseño de inmunoterapias contra infecciones producidas por VPH.

La respuesta inmunológica de memoria juega un papel importante en la eliminación de células infectadas por diversos organismos, incluyendo el VPH. En el caso particular de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+, se han descrito dos fenotipos: memoria central y memoria efectora. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que la inmunización con la proteína E1 + α -GalCer aumenta las poblaciones de estos fenotipos de memoria en un modelo murino.

El objetivo del presente trabajo fue analizar las citocinas involucradas en la generación de memoria de linfocitos T CD8+ inducida por la inmunización con la proteína E1 del VPH 18 junto con α -GalCer, empleando el mismo modelo. La determinación de citocinas se realizó mediante inmunoensayos de ELISA a partir de muestras de suero de ratones inmunizados. Se determinó que los niveles séricos de las citocinas IL-4 e IL-7 están aumentados significativamente ($p < 0.0001$) en ratones inmunizados con la proteína E1 + α -GalCer, con respecto a los demás grupos de ratones inoculados con PBS, E1 o α -GalCer. Adicionalmente, se determinaron las poblaciones de memoria en cada uno de estos grupos de ratones observándose un aumento significativo, de hasta 60 veces, en la población de linfocitos T CD8+ de memoria central en ratones inmunizados con la proteína E1 + α -GalCer. De esta manera, estos datos sugieren que el adyuvante α -GalCer tiene un papel importante en la generación de un ambiente de citocinas ideal para la generación de los fenotipos de memoria de linfocitos T CD8+ en presencia de la proteína viral E1.

2. ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is the etiologic agent of cervical cancer (CaCu). During the natural history of infection, the viral protein E1 is involved in the replication of viral episomes. Elimination of viral host infection is primarily accomplished through a T CD8⁺ cell mediated immune response. However, it is estimated that 15% of people infected by any high-risk HPV do not promote an effective immune response leading to a persistent infection, which is the most important risk factor for the development of CaCu. Currently, there are three vaccines approved by the regulatory agencies (FDA & COFEPRIS) aimed for the prevention of HPV infection: Gardasil, Gardasil 9 and Cervarix. In addition, various research works have focused on the generation of therapeutic vaccines against HPV, as well as topical immunostimulators, which could prevent the development of cancer in infected women. Nevertheless, the therapeutic approach still presents limited results, which is why new therapeutic strategies are required. In this regard, the use of immunotherapies and adjuvants has been shown to promote the establishment of a T CD8⁺ lymphocyte response, particularly the adjuvant α -galactosylceramide (α -GalCer) promotes a specific and memory antigen T CD8⁺ response, therefore it could to be a useful adjuvant for the design of immunotherapies against HPV infections.

The memory immune response plays an important role in the elimination of infected cells, including those affected by HPV. In the particular case of the T CD8⁺ lymphocyte-mediated immune response, two phenotypes have been described: central memory and effector memory. Previous studies of our group showed that immunization with the HPV E1 protein along with α -GalCer increases the populations of these memory phenotypes in a murine model.

The objective of the present work was to analyse the cytokines phenotypes involved in the generation of memory T CD8⁺ lymphocytes, induced by the immunization with the HPV 18 E1 protein together with α -GalCer, using the same murine model. Cytokine assesment was performed by ELISA immunoassays from serum samples of immunized mice. Serum levels of IL-4 and IL-7 cytokines were determined to significantly increased ($p < 0.0001$) in mice inoculated with PBS, E1 or α -GalCer. Furthermore, a significant increase up to 60-fold in the population of central memory T CD8⁺ lymphocytes was detected in mice immunized with E1 + α -GalCer. Thus, these data indicate that the α -GalCer adjuvant plays an important role in generating an ideal cytokine environment for the generation of T CD8⁺ lymphocyte memory phenotypes in the presence of the viral protein E1.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer cervicouterino

A nivel mundial, se estima que el cáncer cervicouterino causa alrededor de 500,000 muertes anuales. En los últimos años ha habido una rápida declinación en la mortalidad sobretodo en países desarrollados, gracias al aumento de la disponibilidad de técnicas de tamizaje y a la implementación de las vacunas (Serman, 2002). El CaCu se desarrolla como consecuencia de la infección persistente por Virus del Papiloma humano de alto riesgo (VPH) en individuos cuya respuesta inmunitaria resulta insuficiente contra éste, permitiendo el escape de las células que se encuentran en proceso de transformación finalmente impactando en el desarrollo del cáncer (Vici, et al., 2014). La mayoría de las mujeres que desarrollan este tipo de cáncer se encuentran en un rango de edad que abarca los 40 a los 50 años; sin embargo, es cada vez más común entre las mujeres jóvenes quienes son diagnosticadas con CaCu entre los 20 y 30 años (Ferlay J., et al., 2004).

Así, la causa principal para el desarrollo de CaCu es el Virus del Papiloma humano o VPH, cuyo genoma se encuentra hasta en un 99.7% de los carcinomas cervicouterinos. Los tipos de VPH de alto riesgo 16 y 18 son los que se detectan con mayor frecuencia en CaCu (Lewis, 2004). Este virus se contrae principalmente por contacto sexual. La progresión gradual de esta enfermedad en diferentes etapas intraepiteliales preinvasoras se establece de acuerdo con la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido de acuerdo con la clasificación Bethesda (Serman, 2002; Lacruz Pelea, 2003).

Se ha demostrado que el VPH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. Las infecciones persistentes con VPH, son consideradas actualmente como una causa necesaria más no suficiente para el desarrollo de CaCu (zur Hausen et al., 1996). De esta manera, existen otros factores importantes en el desarrollo de cáncer cervicouterino, incluyendo múltiples parejas sexuales, el uso prolongados de anticonceptivos orales, el tabaquismo, edad temprana de inicio de vida sexual, la multiparidad, entre otros (Tindle RW 2002, Díaz-Benítez CE et al; 2009; Castellsagué et al., 2002; IARC report, 2019). También se ha evaluado la participación de agentes ambientales tales como el humo del tabaco, los anticonceptivos hormonales, el regimen alimentario y diversos microorganismos infecciosos como posibles cofactores del VPH en la carcinogénesis cervical (Daling, J. R., et al., 1996).

3.2 Historia del Virus del Papiloma Humano y su asociación con CaCu

La asociación entre las verrugas en humanos y el VPH fue documentada desde principios del siglo XX, por el italiano G. Ciuffo. El primer aislamiento del Virus del Papiloma fue en 1933 por Richard Shope, pero no fue hasta 1935 que este investigador junto con Rous demostraron que los papilomavirus pueden causar carcinoma de piel en un modelo de conejos de cola blanca (Santos-López et al., 2015). A principios de la década de 1970, el Dr. Harald Zur van Hausen propuso la relación etiológica entre el cáncer cervical en la mujer y la presencia de un agente viral, pero no fue hasta 1980, que se demostró la presencia de DNA de dos tipos de papiloma en biopsias de cáncer cervical mediante experimentos de hibridación, siendo estos el tipo 16 y el tipo 18 (Santos-López et al., 2015). En 1991, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyeron, con base en datos epidemiológicos y experimentales, que la infección por el Virus del Papiloma Humano se asocia efectivamente, con el desarrollo de este tipo de cáncer (Ferlay J., et al., 2004). Se ha demostrado que los tipos de VPH de alto riesgo (HR), precisamente los tipos 16 y 18, participan en el proceso de carcinogénesis cervical a través de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7.

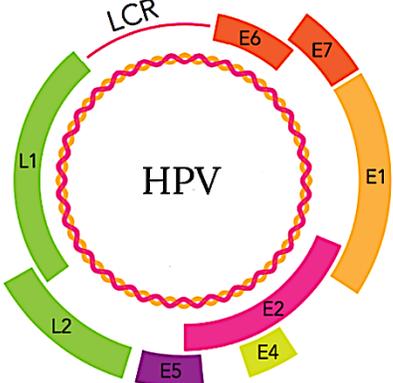
3.3 Aspectos moleculares del Virus del Papiloma Humano

Los Virus del Papiloma humano son virus capaces de infectar las células epiteliales y causar una variedad de lesiones que abarcan desde verrugas, neoplasias cervicales y cáncer. Se han identificado hasta la fecha más de 200 tipos diferentes, los cuales han sido clasificados como de bajo y alto riesgo de acuerdo con su potencial oncogénico (Bzhalava, D., et al., 2015). Los papilomavirus pertenecen a un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de DNA, que afectan exclusivamente a los vertebrados. Los tipos de alto riesgo se relacionan principalmente con el desarrollo de cáncer, mientras que los de bajo riesgo con condilomas acuminados (Vici, et al., 2014). Estos, comprenden un grupo de virus pequeños pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, sin envoltura, compuestos por un genoma de DNA de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases, con alto tropismo por el tejido epitelial (Doorbar, 2005).

Los principales géneros de VPH son el alfa y el beta, de los cuales el segundo grupo está asociado principalmente con infecciones cutáneas inaparentes en humanos; el grupo más grande de VPH comprende a los papilomavirus alfa, los cuales engloban los tipos de VPH afines a mucosas de genitales, así como ciertos virus causantes de las verrugas comunes. Cerca de 40 diferentes tipos de VPH infectan el epitelio cervical, dentro de los cuales un subconjunto de estos está asociado con lesiones que pueden progresar hacia el cáncer (Doorbar, 2005).

La cápside de estos virus se compone de capsómeros constituidos por 5 moléculas de la proteína L1 y una molécula de L2 en el centro del pentamero de L1. El genoma del VPH se divide funcionalmente en tres regiones: 1) la región de genes que se expresan tempranamente (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), b) región de genes que se expresan tardíamente (L1 y L2) y 3) la región larga de control no codificante o LCR que regula la expresión de los genes virales. Los genes tempranos son responsables de la replicación del DNA, la regulación transcripcional y la transformación celular, mientras que los genes tardíos codifican proteínas involucradas en la generación de la cápside viral. Dentro de los genes tempranos, se codifican oncoproteínas responsables de suprimir la actividad de los productos génicos celulares supresores de tumor como p53 y pRb, produciendo un descontrol en la proliferación celular (Serman, 2002). Además, en la región larga de control o LCR se encuentran elementos de respuesta para factores de transcripción celulares, tales como AP1 y SP1, entre otros, así como para las proteínas virales E1 y E2 (Kurg R., 2011). En la Tabla 1 se muestran las principales funciones de las proteínas y de la LCR del VPH.

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas del Virus del Papiloma humano.

	Gen	Función
	L1	Estructural, proteína mayoritaria de la cápside (IARC, 2007)
	L2	Estructural, proteína minoritaria de la cápside (IARC, 2007).
	E1	Proteína con actividad de ATPasa y helicasa de DNA. Mediadora de la replicación del DNA episomal (número de copias) (IARC, 2007; Lentz, M. R., et al., 2006).
	E2	Factor de transcripción. Regula la replicación viral (IARC, 2007).
	E4	Facilita la liberación de viriones mediante la interacción con citoqueratinas y filamentos intermedios, induce el arresto en G ₂ (Dalianis, 2014; IARC, 2007).
	E5	Estimula la proliferación celular mediante la sobreexpresión de EGFR (Dalianis, 2014). Regula negativamente la expresión de los MHC I en la superficie celular (IARC, 2007).
	E6	Promueve la transformación celular mediante su interacción con la proteína supresora de tumores p53 y proteínas con dominio PDZ, favoreciendo su degradación (IARC, 2007; Yoshimatsu Y., et al., 2017).
	E7	Mantiene a las células activas en su ciclo celular mediante la inactivación de pRB. Induce a la transformación maligna junto con E6 (IARC, 2007).
	LCR	Segmento genómico que no contiene ningún marco de lectura y que gobierna la expresión génica y la replicación viral. En ella se ubican: un enhancer, un origen de replicación, así como un promotor temprano (Sheila V. Graham. 2017).

3.4 Proteína temprana E1 del Virus del Papiloma Humano

La proteína E1 forma parte del grupo de las proteínas de expresión temprana del VPH. Se trata de una fosfoproteína nuclear involucrada en la iniciación de la replicación del DNA mediante su actividad de helicasa ATP-dependiente. Esta proteína se une con muy poca afinidad al DNA,

contrariamente a lo que sucede con la proteína temprana E2, la cual se ha visto interactúa con gran afinidad en diversos sitios de unión dentro de las regiones reguladoras o región larga de control de los papilomavirus. En el caso del VPH18, se han descrito tres sitios de unión específicos para E2. La interacción entre E1 y E2, así como la gran afinidad por los sitios blanco de E2 en el origen de replicación, reflejan el papel fundamental de E2 en la replicación como potenciador de la capacidad de unión de E1 en el origen de replicación (Sverdrup & Khan, 1993).

La proteína viral E1 es codificada por el gen que porta el mismo nombre, correspondiendo a la proteína más grande y conservada dentro de todos los papilomavirus. Esta proteína, de aproximadamente 67.5 a 76.2 kDa, se trata de una helicasa hexamérica dependiente de ATP involucrada en la replicación del DNA viral y se caracteriza por ser la única con actividad enzimática. Esta proteína se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica rica en A y T ubicada en la región larga de control (Enemark et al., 2000). E1 se divide en tres regiones: el dominio amino terminal, el cual contiene señales de localización nuclear; una región espaciadora de longitud variable o DBD, la cual corresponde a la región de unión al DNA y se caracteriza por ser monomérica con capacidad de dimerizar una vez que se une al DNA cuya función importante consiste en el reconocimiento y marcaje del ori, también juega un papel importante en la fusión del DNA de doble cadena y formación de la helicasa replicativa hexamérica (Bergvall, Melendy and Archambault, 2013). Finalmente, una región carboxilo terminal de mayor tamaño, la cual posee la función de ATPasa y helicasa, cuya conformación genética es la más altamente conservada de la proteína (Bergvall M., et al. 2013).

E1 es capaz de interactuar directamente con la DNA polimerasa α . La unión de ésta depende de su acoplamiento con la proteína E2, aumentando su especificidad. En cuanto a su rol en la transcripción, se ha observado que el dominio DBD, es capaz de estimular la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1. Se ha descrito además la interacción con proteínas asociadas a procesos epigenéticos, tales como la histona H1, promoviendo la descondensación de la cromatina facilitando el proceso de replicación del genome viral (Enemark et al., 2000). Así, la proteína viral E1 es un factor de replicación esencial que sirve como proteína de reconocimiento inicial. Posee el ORF más largo y es la proteína de expresión temprana más conservada entre los papilomavirus (Bergvall M., et al. 2013). De manera interesante, esta proteína es expresada a lo largo de la historia natural de la enfermedad, alcanzando sus niveles más altos en cáncer en comparación con lesiones premalignas indicando su posible participación en la carcinogénesis cervical (Baedyananda, Chaiwongkot & Bhattarakosol, 2017).

3.5 Historia Natural de la Infección por el Virus del Papiloma Humano

El ciclo replicativo del VPH está ligado a la diferenciación de la célula huésped infectada. Las infecciones genitales por VPH son transmitidas principalmente por contacto sexual, mediante el ingreso de las partículas virales a través de microlesiones del epitelio, exponiendo las células de la capa basal (Doorbar, 2005). Esta infección conduce a la activación de la expresión en cascada de los genes virales, lo cual provoca una producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosomales del DNA viral por cada célula (Álvarez-Aldana, et al., 2012).

La expresión de los oncogenes E6 y E7 sucede cuando el queratinocito infectado entra al compartimiento de diferenciación, saliendo así del ciclo celular, donde se activa una regulación positiva de la expresión de estos genes virales promoviendo la replicación del DNA viral (Longworth M., 2004). Consecuentemente, el número de copias virales aumenta hasta, al menos, 1000 copias por célula (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012). La expresión de altos niveles de proteínas virales y ensamblaje de la partícula viral ocurre únicamente en las capas superiores, ya sea en el estrato espinoso y/o en el estrato granuloso del epitelio escamoso (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012) (Figura 1).

La replicación viral es totalmente dependiente de la maquinaria de síntesis del DNA celular (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012). Las proteínas virales de expresión temprana inhiben la apoptosis y retardan la diferenciación de los queratinocitos infectados, permitiendo que se lleve a cabo la replicación del DNA viral. Todo este proceso lleva a la producción de partículas infecciosas y no a la transformación celular. Es una infección persistente la que se asocia al desarrollo de cáncer (Lizano-Soberón M., et al., 2009). La expresión continua de los oncogenes E6 y E7 en los cánceres relacionados con VPH se atribuye principalmente a la integración del genoma viral en el genoma celular, lo cual es un evento clave en la carcinogénesis, aunque no es un requerimiento para la transformación celular (Chaiwongkot A., et al., 2013; Vinokurova S., et al., 2008). La causa precisa de este evento es desconocida, pero se especula que los altos niveles de estrés oxidante inducidos por proteínas virales promueven inestabilidad genómica durante la infección persistente, lo que eventualmente puede incrementar la ruptura del DNA, tanto viral como celular, promoviendo la integración, donde comunmente se rompe el marco abierto de lectura del gen E2, causando la expresión desregulada de los oncogenes E6 y E7 (Hu, Z., 2015; Chen Y., et al., 2014).

Las células que tienen integrado algún tipo de VPH de alto riesgo adquieren una ventaja de crecimiento sobre las células que contienen solamente episomas, aumentando también la inestabilidad genómica.

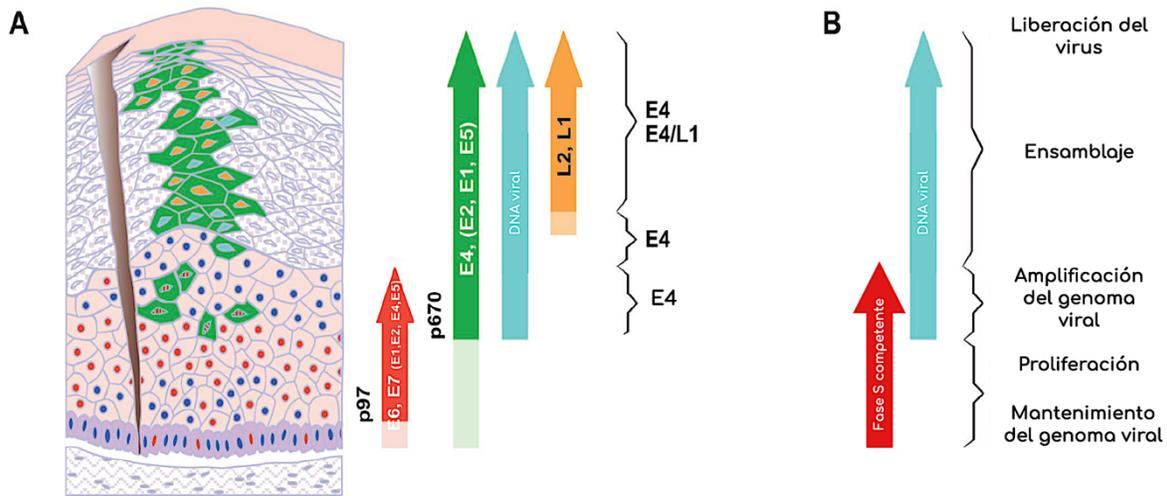


Figura 1. **Expresión de proteínas virales durante la infección productiva del Virus del Papiloma Humano.** A) El VPH accede a la capa basal del epitelio cervical a través de microlesiones. Las flechas de colores indican el patrón de expresión de los genes del VPH en los distintos niveles de estratificación epitelial. B) se esquematizan las distintas etapas del ciclo replicativo del virus indicando las fases donde incrementa la amplificación del genoma viral (Modificado de Middleton et al., 2003).

3.6 Evasión del sistema inmune por VPH

Alrededor del 90% de las infecciones por VPH se eliminan espontáneamente dentro de los 3 primeros años, mientras que un 10% persiste y menos del 1% culmina en cáncer cervical (Sasagawa, et al., 2012). El ciclo infeccioso del VPH por sí mismo, es considerado un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya que debido a su patogenicidad exclusivamente intraepitelial, no existe viremia ni citolisis durante el ciclo replicativo, el cual ocurre siguiendo el propio programa de diferenciación del queratinocito, conllevando a que sólo una muy pequeña cantidad del virus quede expuesta a las defensas del huésped y evitando que se incite la respuesta inflamatoria, disimulando la infección a nivel de microambiente local (del Toro-Arreola, et al., 2018).

Las oncoproteínas de los VPH de alto riesgo E6 y E7, poseen mecanismos que inhiben la síntesis de interferón y las vías de señalización intracelular, inhibiendo la actividad antiviral, antiproliferativa y antiangiogénica de éstas. Así, estas oncoproteínas desregulan la expresión de interferones de tipo I o IFNs en las células hospederas. Al no reconocer un proceso inflamatorio importante en el epitelio cervical, la muerte celular se reconoce como una “causa natural”, resultando en una infección

crónica persistente (del Toro-Arreola, et al., 2018). La ausencia de señales coestimuladoras inducidas por las citocinas, como estos IFNs, durante el reconocimiento del antígeno, puede provocar una tolerancia inmunológica en lugar de propiciar una respuesta apropiada (Sasagawa, et al., 2012). Además de que la expresión de las principales citocinas, moléculas de adhesión, receptores y quimiocinas se encuentra desreguladas negativamente a nivel del epitelio infectado, conllevando a una pobre infiltración en el epitelio por parte de los linfocitos T citotóxicos específicos contra el VPH, dando paso a las células T reguladoras de dominar en el ambiente infectado, suprimiendo la respuesta efectora asesina y desregulando la activación y migración de las células presentadoras de antígenos o APC a la zona infectada (Mora-García and Monroy-García, 2018).

La respuesta inmune contra este virus involucra a las células de Langerhans o células LCs, células presentadoras de antígeno (APC) que capturan a las proteínas del VPH y las procesan en péptidos, después las LCs se traslocan a los nódulos linfáticos en donde, mediante las proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II en la superficie celular, presentan a los antígenos virales transmitiendo una señal a las células T CD4+ “naïve”, permitiéndoles diferenciarse en linfocitos T helper activando de esta manera la respuesta adaptativa (Rincón, O., et al., 2007; Anaya et al., 2013).

Simultáneamente, las células dendríticas (DCs) o macrófagos se activan mediante su unión a componentes virales, tales como DNA, motivos CpG o a través de su interacción con TLRs. Por otro lado, las células T CD8+ vírgenes o “naïve” reconocen a todo aquel antígeno presentado por los MHC de clase I mediante presentación cruzada de la misma célula dendrítica que presentó al antígeno por MHC II, permitiendo que se lleve a cabo la diferenciación de los T CD8+ a CTL o linfocitos T citotóxicos. En la presencia de citocinas Th1, como lo es la IL-2 o IFN- γ los CTL son activados y se convierten en células T efectoras, capaces de matar células positivas para los antígenos VPH o bien células tumorales positivas a VPH (Sasagawa, et al., 2012). Las células de Langerhans, al estar expuestas a la proteína estructural L1 fallan en montar una respuesta inmune e inducen tolerancia inmunogénica. Además de este problema, la mayoría de los VPHs son capaces de reducir la expresión de E-caderina en la superficie celular epidermal, lo que disminuye la localización de las LCs en la epidermis (Sasagawa, et al., 2012).

Los macrófagos son células del sistema inmune activadas mediante citocinas, las cuales son capaces de eliminar a las células infectadas por VPH mediante la secreción del factor de necrosis tumoral α

o mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpos. La proteína conocida como proteína quimioatrayente de monocitos 1 o MCP-1 es una quimiocina capaz de atraer a los macrófagos al sitio de la infección viral. Los queratinocitos sanos liberan MCP-1 en presencia de TNF- α , tipo de secreción regulada a la baja por la oncoproteína E6 del VPH. Por otro lado, la proteína MIP-3 α o proteína inflamatoria de macrófagos es otro tipo de quimiocina dirigida a los monocitos que se encuentra desregulada en los queratinocitos de pacientes cuyas células expresan a las proteínas E6 y E7. Así, se puede asumir que estas últimas proteínas inhiben la traslocación de los macrófagos al sitio de infección (Sasagawa, et al., 2012). Las células infectadas con algún tipo de virus liberan de manera autocrina o paracrina interferones de tipo 1 (IFNs), como los son el IFN- α e INF- β . Sin embargo, se sabe que las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH16 y 18, regulan negativamente la transcripción de este tipo de citocinas en las células hospederas, inhibiendo la respuesta inmune innata mediada por interferones (Sasagawa, et al., 2012). Por otra parte, la proteína E1 del VPH disminuye la expresión de INFbeta e IFNlambda aún después de un estímulo semejante a infección viral (presencia de RNA), indicando que el VPH es capaz de regular diversos procesos del sistema inmune gracias a sus proteínas (Castro-Muñoz et al., 2019).

Por otro lado, se sabe que los queratinocitos no expresan moléculas del MHC clase II, por lo que no tienen la capacidad de presentar antígenos exógenos como lo hacen las células presentadoras de antígenos. Aunque se ha demostrado la presencia de éstos de manera transitoria, confiriéndoles la capacidad de presentar antígenos a las células T CD4+ que infiltran la lesión. Sin embargo, se ha estudiado sobretodo a las moléculas MHC de clase I, las cuales sí están presentes en los queratinocitos y de las cuales se sabe que una pérdida en su expresión se relaciona con CaCu (del Toro-Arreola, et al., 2018). Cuando estas moléculas están ausentes, por ejemplo por acción de la oncoproteína E7, se facilita la presencia del VPH y la progresión de las lesiones a etapas más avanzadas, al promover el escape al ataque citotóxico mediado por los linfocitos T CD8+, los cuales son el tipo principal celular en la defensa contra infecciones virales y el control del crecimiento tumoral (del Toro-Arreola, et al., 2018). Se sabe además, que la proteína E5 del VPH16 desregula la expresión de MHC clase I y facilita la evasión del ataque por parte de los CTL (Sasagawa, et al., 2012). Existiendo este mecanismo del sistema inmune para eliminar la infección, el Virus del Papiloma humano, posee sus propios mecanismos de evasión. Un ejemplo de esto es la capacidad de la proteína E5 de desregular las moléculas MHC clase I, las cuales trabajan como moléculas presentadoras de los péptidos virales. Las células que carecen de estos antígenos virales son entonces capaces de evadir el ataque por parte de las CTLs. Por otro lado, se ha visto que la baja expresión del receptor de células NK y la baja actividad citotóxica de estas, son características en

casos de cáncer cervical así como en lesiones precursoras (del Toro-Arreola, et al., 2018; Garcia-Iglesias et al., 2009).

Además de las moléculas del MHC de clase I y de clase II, el grupo de diferenciación 1 o CD1 representa una tercera clase de proteínas presentes en las células presentadoras de antígenos (APC) responsables de la unión y presentación de los antígenos a las células T (Berkers & Ovaa, 2005). De este modo, las células NKT o células “natural killer” están restringidas al reconocimiento de CD1d mediante su receptor con mismo nombre y sirven como puente de activación entre la inmunidad innata y la adaptativa. Así como las moléculas MHC de clase II, los complejos CD1 se cargan con antígenos en los compartimientos celulares endocíticos. Por otro lado, los complejos CD1 están relacionados estructuralmente con los complejos MHC de clase I. Sin embargo, mientras que los MHC de clase I y II se unen a pequeños polipéptidos, los complejos CD1 presentan antígenos lipídicos (Berkers & Ovaa, 2005). En los humanos se expresan todos los miembros de esta familia, a diferencia de los roedores, en los cuales sólo se expresan las moléculas CD1d (Berkers & Ovaa, 2005). Uno de los mecanismos de evasión que se conoce es la regulación negativa del receptor CD1d en la superficie de las células infectadas por VPH por acción de la proteína E5 (Sasagawa, et al., 2012).

3. 7 Linfocitos T como células clave para la eliminación de infecciones por VPH

Los linfocitos T son un conjunto de células que son parte de la inmunidad adaptativa, están dotados con la capacidad de reconocer antígenos específicos y ejecutar funciones efectoras (Reinherz & Schossman, 1980). Estas células migran hacia tejidos y órganos linfoides y expresan receptores conocidos como receptores de célula T o TCR, que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, cuando estas se encuentran unidas a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad presentes sobre la célula presentadora de antígenos. Los TCR están conformados por dos cadenas ancladas en membrana celular, denominadas TCR α y TCR β o bien TCR γ y TCR δ . Las interacciones de TCR y la comunicación celular se estabilizan con otras moléculas de superficie que son CD3, CD4 y CD8, las cuales se pueden asociar de manera no covalente a estas subunidades del receptor de linfocitos T (Mach B., et al., 2010).

El contacto del antígeno específico con los linfocitos induce en estas células un estado de activación que implica una expansión en número, así como la adquisición de funciones efectoras tales como citotoxicidad y secreción de mediadores de la respuesta inmune, conocidas como citocinas (Palomo González, 2002). Los linfocitos T protegen contra patógenos intracelulares o extracelulares, su TCR

reconoce péptidos antigénicos proteolíticamente procesados unidos a moléculas del MHC de clase I y clase II, presentes en las APC (Owen, et al., 2014). Además de las poblaciones ya mencionadas, existen subpoblaciones conocidas como células T colaboradoras o Th, células T citotóxicas o Tc y las células T reguladoras o Treg. Dentro de esta clasificación se pueden a su vez, identificar las poblaciones de células T dependiendo de sus glucoproteínas membranales, ya sean las CD4 o CD8. El primer grupo T CD4+, generalmente funcionan como linfocitos Th, mientras que las T CD8+ como linfocitos citotóxicos (Owen, et al., 2014). Para que se pueda llevar a cabo la maduración de los linfocitos T es necesario un microambiente tímico que permita la diferenciación de las poblaciones de células T (Figura 2). Las células precursoras de la médula ósea, también llamados protimocitos migran hacia el timo en donde van a convertirse en células funcionalmente competentes y de donde posteriormente van a ser enviadas a los compartimentos linfoides periféricos (Reinherz & Schossman, 1980).

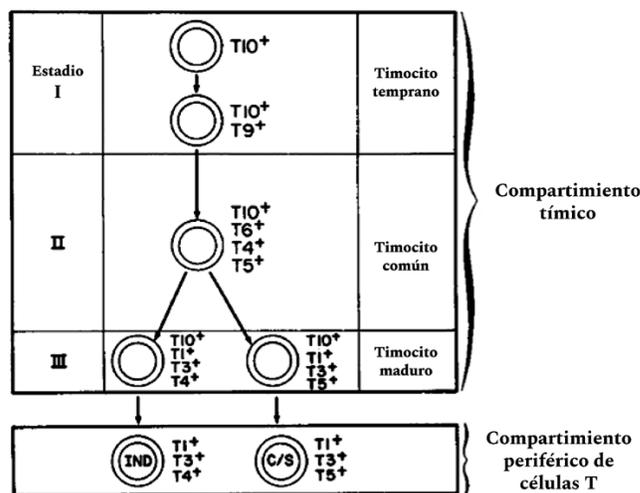


Figura 2. **Esquema de los diferentes estadios de diferenciación de las células T en humanos** A partir de los protimocitos el desarrollo de los linfocitos se lleva a cabo en 3 etapas de diferenciación; I) Timocitos tempranos o $T9^+/T10^+$; II) Timocitos comunes o $T4^+/T5^+/T6^+/T10^+$; y III) Timocitos maduros o $T1^+/T3^+/T4^{\pm}/T5^{\pm}/T10^+$, etapa en donde sucede la competencia inmunológica. Los timocitos terminan de madurar fuera del timo (modificado de Reinherz & Schlossman, 1980).

Se reconocen tres estadios de la diferenciación tímica, las cuales se caracterizan con base en la reactividad a anticuerpos monoclonales, los cuales reflejan la presencia de aquellos antígenos de superficie celular que definen las distintas etapas de la ontogenia de las células T. Las poblaciones de timocitos en estados de mayor maduración (estadio III) dan lugar a las células T inductoras periféricas y al grupo de células citotóxicas/supresoras o C/S (Figura. 2).

Los linfocitos T con TCRs $\alpha\beta$ son capaces de reconocer fragmentos peptídicos presentados en asociación con moléculas MHC o fragmentos glicolipídicos presentados en asociación con moléculas CD1, en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales. La mayoría de estos linfocitos, son linfocitos MHC restringidos que expresan el co-receptor CD4 o CD8 (Palomo González, 2002).

Las células T CD8⁺ juegan un papel crucial en la inmunidad contra los virus y tumores. Una de las características principales de la respuesta antiviral de estas células es la inmunodominancia, es decir, de los miles de péptidos potenciales como blanco, solo unos pocos generan respuestas detectables (Yewdell & Del Val, 2004). Las citocinas derivadas de células T CD8⁺ son críticas en la resistencia a los virus, existiendo una evidencia cada vez mayor que respalda el potencial de tales mecanismos no líticos para contribuir a la resolución de la infección viral (Harty, et al., 2000). Estas células liberan factores citotóxicos, eliminando así la célula y por ende al virus, tienen capacidades líticas y también participan en el reconocimiento y la eliminación de células propias anormales. Los CTL son CD8⁺, de donde deriva su nombre T CD8⁺, por lo que están restringidos a interactuar con las moléculas MHC de clase I. Estos son capaces de reconocer y eliminar prácticamente cualquier célula del cuerpo, mientras que éstas exhiban al antígeno específico y sea reconocido por el CTL a través de los MHC de clase I. Inicialmente, las células TC “naïve” son activadas y se diferencian en CTL efectores funcionales, para posteriormente, poder reconocer complejos antígeno-MHC clase I en las células blanco y así destruirlas. Esta activación celular se lleva a cabo cuando se lleva a cabo el reconocimiento del antígeno en una APC (Owen, et al., 2014). Dado que las moléculas MHC de clase I se expresan en esencialmente todas las células nucleadas, las células T efectoras CD8⁺ pueden responder contra los patógenos intracelulares en la mayoría de los tejidos eliminando la infección (Harty, et al., 2000).

Cuando las células T CD8⁺ encuentran antígeno y se diferencian en CTL efectores de corta duración, pierden la capacidad de albergarse en ganglios linfáticos, pero obtienen acceso a tejidos periféricos y sitios de inflamación (Weninger, et al., 2002). Poseen una extraordinaria capacidad de reaccionar a patógenos mediante expansión masiva y

diferenciación a células efectoras citotóxicas que migran hacia el sitio de infección. Durante una infección, las células T CD8+ “naïve” son activadas mediante su interacción con células APC en los órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos y el bazo (Zhang & Bevan, 2011). Las células citotóxicas también pueden sintetizar y liberar citocinas, capaces de generar señales tanto en los linfocitos como en las células infectadas u otras vecinas, incrementando así los mecanismos de destrucción (Harty, et al., 2000).

Las respuestas antígeno-específico por parte de las células T CD8+ requieren interacciones directas entre células T y las APC. Posterior a una infección y al procesamiento del antígeno por MHC de clase I, las células T CD8+ antígeno-específicas reciben múltiples señales extracelulares con el propósito de iniciar una rápida proliferación y diferenciación de CTL (Harty, et al., 2000). Como resultado de la expansión clonal, las células T CD8+ antígeno-específicas incrementan rápidamente, representando hasta un 1-2% de las T CD8+ de bazo, o hasta llegar a dominar con un 50% o más de los T CD8+ de bazo durante las respuestas primarias en ciertas infecciones virales (Harty, et al., 2000). Una vez estimuladas, las células efectoras resultantes interactúan con la célula presentadora de antígenos en tejidos periféricos (Weninger, et al., 2002). Los linfocitos T CD8+ que presenten un TCR antígeno-específico, posterior al encuentro con el patógeno, son seleccionadas para llevar a cabo su expansión clonal. La especificidad de esta selección se lleva a cabo mediante la interacción del TCR con péptidos cortos derivados de patógenos (de 8 a 10 aminoácidos), presentados por moléculas MHC de clase I en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales (Harty, et al., 2000). El reconocimiento de antígenos por las células T CD8+ “naïve” inicialmente induce la regulación positiva de las moléculas de activación y la expansión clonal, seguido de la adquisición de funciones efectoras como la secreción de citocinas y finalmente, la citotoxicidad (Weninger, et al., 2002).

Existen dos mecanismos de acción de las células T CD8+ para atacar a la célula blanco. La primera se lleva a cabo mediante la generación de poros por la acción de perforina, permitiendo el ingreso de la granzima a la célula blanco, promoviendo una cascada de reacciones que tienen como resultado la fragmentación del DNA de la célula, activando así

la vía apoptótica (Owen, et al., 2014). En algunos casos, los CTL no presentan perforina ni granzima, pero llevan a cabo su acción citotóxica mediante el ligando Fas (FasL). Este ligando se encuentra en la membrana de los linfocitos T citotóxicos y la interacción de FasL con el receptor de Fas en la célula infectada desencadena la apoptosis. El ligando Fas, las perforinas, las granzimas y proteasas de serina también llamadas fragmentinas, median la destrucción de la célula blanco mediante el linfocito T citotóxico (Owen, et al., 2014). La citólisis de células infectadas y la producción de citocinas, quimiocinas o moléculas microbicidas, se desarrollan con el tiempo después de que se lleve a cabo la estimulación inicial de las células T CD8+ «naïve» y se manifiesta en el encuentro posterior de las células T efectoras CD8+ con células infectadas (Harty, et al., 2000).

En una infección aguda, como las causadas por virus, las células T efectoras son capaces de eliminar el antígeno, después de lo cual se elimina la mayor parte de estas células para mantener la homeostasis en el número de células T (Weninger, et al., 2002). Sin embargo, una parte de estas células especializadas se mantiene, generando la memoria inmunológica, también conocida como respuesta secundaria o terciaria. Esto es uno de los resultados más importantes de la respuesta inmune adaptativa, la cual se traduce como la capacidad del sistema inmune para responder más rápida y eficazmente a patógenos que hayan infectado previamente al hospedero y refleja la preexistencia de una población clonal expandida de linfocitos antígeno-específicos (Castellanos Martínez, et al., 2000).

La generación de memoria inmunológica es el resultado final de una respuesta inmune productiva. Así, las células T de memoria se producen después de su encuentro inicial con el antígeno, fenómeno que sigue siendo estudiado hasta la fecha. Se ha hecho énfasis en el estudio de las citocinas como participantes importantes en la diferenciación de las células T CD8+ “naïve” a T CD8+ de memoria. Las citocinas IL-2, IL-7 e IL-15 tienen funciones integrales en la generación y el mantenimiento de la memoria de las células T CD8+ (Schluns & Lefrançois, 2003). Para que las células T CD8+ puedan desencadenar su expansión y diferenciación clonal, con un desarrollo eventual de memoria, es necesario tan sólo un breve encuentro con una célula presentadora de antígeno. Las células T CD8+ experimentan una diferenciación lineal, que requiere inicialmente de la célula T “naïve” para transitar a través de una etapa efectora antes de diferenciarse en una célula T de memoria. Asimismo, las células T CD8+ de memoria muestran la función efectora (Schluns & Lefrançois, 2003). La premisa de que las células de memoria tienen una vida muy larga surgió

como consecuencia directa de la observación de que las respuestas de memoria podrían invocarse meses o años después de un encuentro antigénico inicial (Gray, 1993).

Una célula T CD8⁺ de memoria se puede definir como una célula T CD8⁺ que ha respondido a un antígeno en específico y persiste a largo plazo. En comparación con las células “naïve” de la misma especificidad antigénica, las células T CD8⁺ de memoria persisten en mayor número; pueden poblar órganos periféricos; están preparados para proliferar inmediatamente, ejecutar funciones citotóxicas y secretar citocinas efectoras en el reencuentro con el antígeno (Martín & Badovinac, 2018). Las células T de memoria pueden ser independientes del antígeno, pero aún así se activan y mantienen debido a algún estímulo no específico que aún no ha sido aclarado por completo. Las respuestas aceleradas de células T observadas tras la re-exposición al antígeno se deben a aumentos en la frecuencia de células T específicas de antígeno (Ahmed and Gray, 1996). De esta manera, las células T de memoria continúan dividiéndose, aunque lentamente, en ausencia de antígeno. Estas células poseen altos niveles de CD44 y de la cadena β de receptor de IL-2 (IL-2R β), un polipéptido compartido con el receptor para IL-15 (Ku, 2000).

Las células T que reconocen un epítipo particular están presentes en números más altos dentro del conjunto de células T de memoria que sus precursores antes de la respuesta inmune primaria. Estas últimas tienen una mayor sensibilidad a la estimulación a través de su TCR y tienen requisitos menos estrictos para los factores coestimuladores secundarios que optimizan la activación. Finalmente, con la memoria de activación, las células T se dividen y diferencian en células efectoras más rápidamente que las células “naïve” (Marsden, et al., 2006). Todos estos factores contribuyen a las capacidades superiores de la respuesta secundaria de células T para combatir la infección en comparación con la respuesta inmune primaria. Además, la expresión de proteínas antiapoptóticas que incluyen Bcl-2 y Bcl-xL es mayor en las células T de memoria CD4⁺ y CD8⁺ que en sus contrapartes “naïve”, mientras que el factor de transcripción antiapoptótico LKLF también es más abundante en las células T de memoria CD8⁺ que en las células T CD8⁺ “naïve” (Marsden, et al., 2006). Se ha observado que la expresión de CD8 se reduce en gran medida a los 5-8 días después de la infección secundaria, lo que indica que existe una reducción transitoria en los niveles de CD8 independientemente de si las células que respondieron derivaron de una población de células T “naïve” o de un grupo de células T de memoria (Slifka and Whitton, 2000). La inmunidad a largo plazo de las células T a menudo se observa después de infecciones agudas. Paradójicamente, hay observaciones que sugieren que la memoria de las células T puede depender del antígeno durante las infecciones crónicas (Wherry et al., 2004). Existen cambios observados en

las células de memoria tardías, las cuales se extienden más allá del fenotipo y las funciones normalmente atribuidas a las células T de memoria central (TCM), incluida una mayor capacidad para regular la expresión de FasL, disminución de la expresión de receptores de citocinas y quimiocinas incluidos IL-10R e IL-12R y disminución de la capacidad de producir IFN- γ en respuesta a señales inflamatorias en ausencia de reconocimiento de antígeno relacionado (Martin & Badovinac, 2018). Se ha encontrado en análisis de sangre periférica de animales que las células de memoria CD8+, definidas por su alta expresión de CD44, constituyen aproximadamente 28% del total de células CD8+ (Weninger, et al., 2002).

En humanos, se pueden definir dos subconjuntos de linfocitos T CD8+ de memoria de acuerdo con los niveles de expresión de CCR7 y CD62L (Bouneaud et al., 2005), junto con un subconjunto diferenciado terminalmente que expresa CD45RA (TEMra). Las células T CD8+ comprenden al menos dos subpoblaciones funcionales; las células T no polarizadas de “memoria central”, las cuales expresan el receptor de quimioquinas CCR7 y el ligando CD62, exclusivos de órganos linfoides secundarios y las células polarizadas o de “memoria efectora”, las cuales han perdido la expresión del CCR7 y han adquirido la capacidad de migrar a tejidos no linfoides (Geninat, et al., 2001). Las células T de memoria central, también llamadas TCM recirculan a través de órganos linfoides y no muestran funciones efectoras inmediatas, mientras que las células CCR7- CD62L- o células T de memoria efectora (TEM) residen dentro o recirculan a través de los tejidos periféricos y tienen funciones efectoras inmediatas. Así, las células TCM o CD62L+CCR7+ se localizan en tejidos linfoides secundarios y tienen poca actividad citolítica. Se ha propuesto que poseen un potencial migratorio limitado. Las células TEM o CD62+/-CCR7- por lo contrario, residen en los tejidos no linfoides, son citolíticas y tienen un potencial circulatorio muy elevado (Schluns & Lefrançois, 2003). La expresión de CCR7 y CD62L en células TCM facilita el retorno a los órganos linfoides secundarios, mientras que las células TEM son más citolíticas y expresan las integrinas y los receptores de quimiocinas necesarios para la localización en los tejidos inflamados (Martin & Badovinac, 2018).

Por otro lado, las poblaciones de células T de memoria circulante en ratones se pueden dividir en dos poblaciones distintas, una L-selectina+ CCR7 + y la otra L-selectina- CCR7+. Por su fenotipo, estas dos poblaciones se parecen a las células de memoria central y efectora conocidas en el humano, respectivamente (Weninger, et al., 2002).

Los TCM son más efectivos en la protección contra infecciones sistémicas que requieren una proliferación significativa de células T CD8+ para un control adecuado. En contraste, los TEM son más efectivos para contribuir a la protección inmediatamente después de la reinfección debido a su ubicación en las superficies del cuerpo y la actividad lítica constitutiva (Masopust, et al., 2006). Como se muestra en la figura 3, el estallido proliferativo de las células T activadas por antígeno es seguido por una fase de contracción rápida, en la que muere el 85-95% de las células activadas. Las células T que sobreviven son las fundadoras del grupo de memoria (Marsden, et al., 2006). De manera general, los linfocitos T “naïve” deben pasar por una serie de señales que dicta su diferenciación a células T CD8+ de memoria. Las células T efectoras CD4+ y CD8+ son de corta duración y la mayoría se pierden rápidamente en una fase de contracción de la respuesta inmune. Sin embargo, las células antígeno-específicas que sobreviven a la fase de contracción tienen el potencial de diferenciarse aún más para convertirse en células T de memoria, que se mantienen durante un largo período en un individuo (Marsden, et al., 2006).

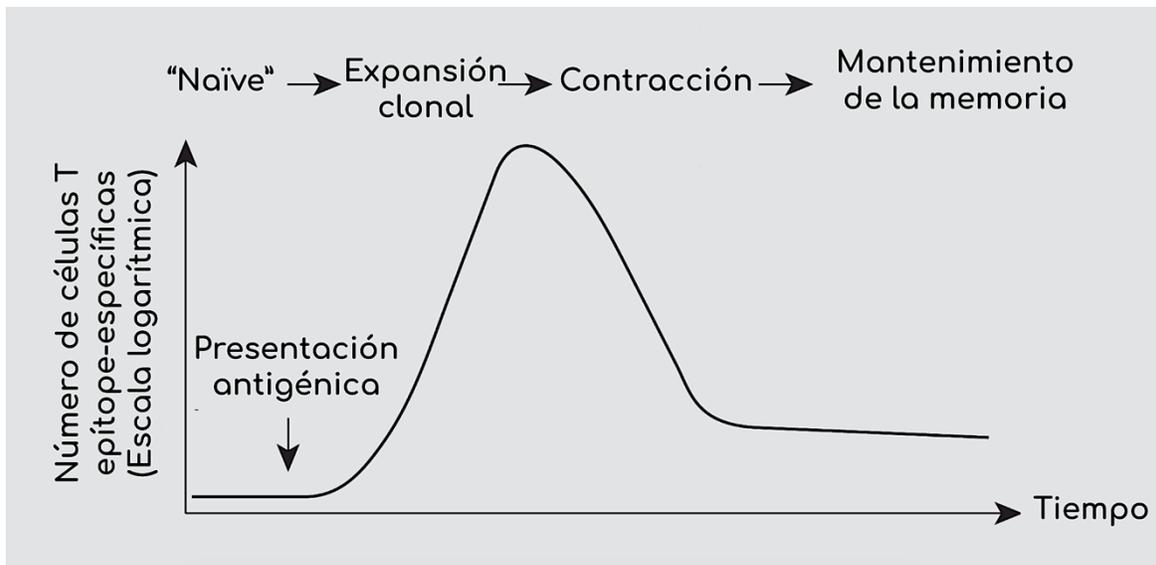


Figura 3. Esquema del proceso de generación y diferenciación de las poblaciones de linfocitos T antígeno-específicos de memoria (Modificado de Marsden, et al., 2006). Las células T que reconocen un antígeno particular, provocando su activación y expansión, dictada por 3 señales: la unión del TCR-MHC/péptido, coestimulación y liberación de citocinas proinflamatorias. Un 15-5% de las células efectoras persistirán después de la contracción para convertirse en células de memoria, viables hasta por 15 años en el humano.

La vía de diferenciación de los subconjuntos TCM y TEM sigue siendo controversial y surge una complejidad adicional con respecto a las capacidades de autorrenovación de ambos subconjuntos o la conversión de células de un subconjunto a otro en condiciones de estado estacionario a largo

plazo o tras la reestimulación. El reconocimiento reciente de que el grupo de memoria de linfocitos T CD8⁺ es heterogéneo conlleva a pensar que los TCM y TEM podrían surgir independientemente, con base al compromiso previo de las células T “naïve” individuales o bien, en función de sus condiciones de estimulación (Bouneaud et al., 2005). Durante una inmunización sistémica, aproximadamente dos tercios de los linfocitos “naïve” estimulados pueden dar lugar a poblaciones TCM y TEM que pueden coexistir, al menos transitoriamente, en órganos periféricos y linfoides (Bouneaud et al., 2005). Aunque aproximadamente dos tercios de los clones TCM y TEM derivan de un precursor común, es posible que surjan algunos clones TCM sin pasar por una etapa TEM.

Las células T CD8⁺ de memoria pueden surgir de las células efectoras (Weninger, et al., 2002). El programa de diferenciación de células T CD8⁺ de memoria, que ocurre después de una infección aguda, es lineal y progresiva y culmina en la formación de células T CD8⁺ de memoria que son capaces de persistencia independiente del antígeno a largo plazo como resultado de la lenta proliferación homeostática en respuesta a IL-7 e IL-15 (Wherry et al., 2004).

La diferenciación de las células T CD8⁺ de memoria está dictada por el historial acumulativo de exposición a antígeno (Masopust, et al., 2006). Los TEM parecen mantenerse estables en humanos, pero se convierten en TCM en ratones, lo que sugiere que la diferenciación de células T CD8⁺ de memoria es fundamentalmente diferente entre las especies. Con respecto a la expresión de CD62L y CD127, el potencial citolítico, la producción de citocinas, la capacidad proliferativa y la distribución anatómica, el aumento del número de desafíos de antígeno (Ag) promueve preferentemente la generación y el mantenimiento de TEM en ratones (Bouneaud et al., 2005). Los TCM están especializados en el manejo de infecciones sistémicas debido a su ubicación centralizada dentro de los órganos linfoides secundarios y sus capacidades proliferativas superiores y a que los TEM se especializan en el manejo de infecciones que surgen dentro de los órganos periféricos debido a su citotoxicidad y su capacidad de localización en los tejidos (Bouneaud et al., 2005).

3.8 Vacunas y adyuvantes

Una característica distintiva del sistema inmunitario es su capacidad para recordar su exposición con un patógeno por varias décadas, incluso durante toda la vida. Esta propiedad fundamental del sistema inmune es la base para la vacunación, cuyo objetivo es inducir inmunidad protectora a largo plazo contra un patógeno en específico (Pulendran and Ahmed, 2006). La vacunación es el método más exitoso y rentable para prevenir enfermedades infecciosas.

Muchas vacunas se han desarrollado sobre la base de prueba y error y sus mecanismos inmunológicos de protección siguen siendo desconocidos (Bonam, et al., 2017). Las vacunas abarcan “cualquier” preparación utilizada como inoculación preventiva para conferir inmunidad contra una enfermedad específica, generalmente empleando una forma inocua del agente de la enfermedad, como bacterias o virus muertos o debilitados, para estimular la producción de anticuerpos e inmunidad celular (Bonam, et al., 2017). Las vacunas que contienen microorganismos inactivados o sus subunidades, son menos inmunogénicas que las vacunas vivas atenuadas y con frecuencia, se administran con un adyuvante (Aguilar Rubido & Leal Angulo, 2000). Por lo tanto, para mejorar su inmunogenicidad, se requiere la administración conjunta de adyuvantes, que son sustancias o procedimientos que funcionan como inmunoestimulantes y aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados (Rubido., et al., 2000; Bonam S.R., et al., 2017).

Entre los beneficios del empleo de adyuvantes en formulaciones vacunales está la capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos, la reducción de la cantidad de antígeno y del número de re-inmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora, el aumento de la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunocomprometidas y el incremento de la respuesta inmune a nivel de mucosas (Aguilar Rubido & Leal Angulo, 2000). Específicamente, los adyuvantes estimulan el sistema inmune innato directamente al actuar sobre las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos, lo que lleva a la activación del sistema inmune adaptativo (Bonam, et al., 2017). La naturaleza del adyuvante puede determinar el tipo particular de respuesta inmune, que puede estar sesgada hacia las respuestas de células T citotóxicas (CTL), respuestas de anticuerpos o clases particulares de respuestas de linfocitos T cooperadores (Th por sus siglas en inglés) e isotipos de anticuerpos (Pulendran and Ahmed, 2006).

Los sistemas de administración de vacunas y adyuvantes aprobados para su uso en humanos como lo son las sales de aluminio y virosomas, tienen como fin, principalmente, el estimular las respuestas inmunes humorales. Sin embargo, estudios preclínicos sugieren fuertemente que las vacunas exitosas contra los patógenos intracelulares, así como las vacunas contra el cáncer, requieren tanto respuestas humorales, como aquella mediada por células (Adotevi et al., 2007). En un estudio realizado por Adotevi et al. en 2007 se demostró que existe sinergia entre el adyuvante α -galactosilceramida y la vacuna basada en la subunidad no tóxica de la toxina Shiga (STxB) de *Shigella dysenteriae*, conduciendo a una potente respuesta mediada por células T CD8+, en

comparación con otros adyuvantes probados como el poli (I:C) o CpG combinados con STxB químicamente acoplado a ovoalbúmina (STxB-OVA). Así, el adyuvante α -GalCer provocó un aumento significativo en el porcentaje de CTL antígeno-específicos, demostrando que las vacunas basadas en STxB combinadas con este adyuvante resultan en una respuesta celular más potente (Adotevi et al., 2007).

El glicolípido α -galactosilceramida, también conocido como α -GalCer, derivado de una esponja marina, ha demostrado ser un potente inductor de células NKT, células que median en una reacción rápida al glicolípido α -galactosilceramida, lo que desencadena la liberación de grandes cantidades de citocinas en el suero. Este glicolípido es presentado por un monomórfico CD1d en células dendríticas y reconocido por las células NKT, también conocidas como células asesinas naturales T invariantes (iNKT), las cuales son un subconjunto de linfocitos con un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. Se sabe que la estimulación de células NKT con α -GalCer induce la expansión de otras células, incluyendo las células NK y algunas células T (Nagaraj et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que α -GalCer actúa como coadyuvante en la inducción de la inmunidad involucrando células T contra las células tanto cancerosas como las infectadas por virus, a través de una activación y maduración eficiente de las células dendríticas. Los monocitos, células dendríticas inmaduras y macrófagos derivados de monocitos, se vuelven potentes estimuladores de la expansión de las células iNKT e inducen la producción de las interferones Th1, IFN- γ e interleucina 4 una vez unidos a la molécula α -GalCer (Courtney et al., 2009). Su activación mediante este glicolípido podría dar lugar a la activación secundaria de otros tipos de células como las NK, células B, células T CD8+, células dendríticas, mieloides y jugar un papel en la maduración de las células T CD4+ en células Th1 o Th2 (Berkers & Ova, 2005). Un *hallmark* o sello distintivo de las células iNKT, es la rápida secreción de múltiples citocinas en el desencadenamiento de TCR, aumentando así su capacidad citotóxica. Las citocinas secretadas por las células iNKT incluyen tanto citocinas reguladoras, como IL-4 e IL-10, así como citocinas proinflamatorias como IL-2 e IFN γ , las cuales están involucradas en la supresión o estimulación de la respuesta inmune (Nowak et al., 2010).

Se ha demostrado que una variedad de bacterias, parásitos y virus desencadenan una activación de las células iNKT, las cuales también están involucradas en respuestas antitumorales (Blauvelt et al., 2008). La principal característica de las células iNKT, en comparación con otros tipos de células a menudo denominadas células NKT, reside en su capacidad para reaccionar con α -GalCer en el contexto de la molécula CD1d1, relacionada con la molécula MHC de clase I (Van Kaer, 2005).

Son abundantes en el timo, el hígado y la médula ósea y se pueden encontrar en grandes concentraciones en el bazo y la sangre periférica, pero son raras en los ganglios linfáticos. Estas células pueden producir grandes cantidades de citocinas y llevar a cabo funciones efectoras, cosa que se distingue de las células del sistema inmune innato (Van Kaer, 2005). Las células iNKT reconocen específicamente al glicolípido ligado a CD1d exógeno, α -GalCer (Hachem et al., 2005). En respuesta a α -GalCer, las células iNKT generan una rápida respuesta, liberando una amplia gama de citocinas, incluidas IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF (Hachem et al., 2005).

Las vacunas contra el Virus del Papiloma humano han sido desarrolladas con 2 objetivos clínicos primarios: la prevención y el tratamiento terapéutico en mujeres ya infectadas para evitar una mayor progresión de enfermedad o la necesidad de terapias más invasivas tales como tratamientos excisionales del cervix (Vici, et al., 2014). Las respuestas profilácticas desafían la primer infección al inhibir la unión de las partículas virales de VPH a las células durante las primeras fases de la entrada del virus mediante anticuerpos neutralizantes (Vici, et al., 2014). Por otro lado, las vacunas terapéuticas pretenden erradicar o reducir las células ya infectadas mediante la estimulación de las células T citotóxicas contra las células diana infectadas y regulando positivamente la expresión de moléculas MHC de clase I.

En 1991, Zhou y colaboradores desarrollaron las primeras partículas similares a virus (virus like particles o VLP) expresando los genes tardíos L1 y L2 del VPH16 en células eucariontes. Posteriormente, otro grupo de investigadores detallaron la técnica y demostraron que L1 era suficiente para el ensamble de las VLPs (Martin & Badovinac, 2018). El desarrollo de las vacunas profilácticas fue impulsado por el desarrollo de partículas VLP con alta inmunogenicidad. La proteína L1, principal componente de la cápside de VPH se puede producir en células eucariotas por tecnología de DNA recombinante utilizando un variedad de vectores, incluidas bacterias, virus y levaduras (Padilla-Paz, 2005) y muestran una alta capacidad de producir anticuerpos neutralizantes en humanos. La vacuna terapéutica adyuvada con HP0-16/18 AS04 mostró una alta eficacia contra neoplasia intraepitelial cervical escamosa 2 (CIN2) asociada a VPH16/18 y los tipos de VPH oncogénicos no vacunales, así como un efecto general sustancial en cohortes que son relevantes para la vacunación masiva universal y los programas de recuperación (Paavonen et al., 2009). Actualmente, existen tres vacunas profilácticas en el mercado basadas en VLPs y dirigidas contra epítopes de L1: la bivalente (Cervarix™), la tetravalente (Gardasil™) y la nonavalente (Gardasil9™). Todas incluyen protección contra infecciones por VPH16 y 18; la tetravalente

incluye además protección contra los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11 y la nonavalente incluye estos y otros 5 genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico. Dichas vacunas en su acción de forma profiláctica, han mostrado una excelente protección impidiendo el establecimiento de infecciones y por ende, el establecimiento de lesiones vulvares y vaginales de alto grado asociadas a los tipos de VPH relacionados con las vacunas (Xu et al., 2019). Sin embargo, estas vacunas no actúan de manera terapéutica, es decir que no protegen contra lesiones ya establecidas.

Las proteínas E6 y E7 han sido los inmunógenos más atractivos para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VPH. Las primeras aplicaciones clínicas de las vacunas terapéuticas que muestran resultados prometedores incluyen el uso del virus vaccinia recombinante que codifica las oncoproteínas del VPH16/18. Una de las limitaciones que pueden encontrar las vacunas terapéuticas es una dependencia de respuesta esperada basada en el MHC y los antecedentes genéticos, un problema que puede requerir la personalización de vacunas para diferentes subpoblaciones (Padilla-Paz, 2005). Otros ejemplos de tratamientos terapéuticos, como el tratamiento con DNA CRT/E7 en combinación con imiquimod conduce a una mejora en las respuestas inmunes de células T CD8 + específicas de E7 y una disminución en el número de células supresoras derivadas de mieloides en el microambiente tumoral de ratones con tumor (Chuang, et al., 2010). La vacunación terapéutica con DNA del VPH con tratamiento tópico con el agonista TLR7 imiquimod aumenta la inmunidad antitumoral inducida por la vacunación con DNA (Chuang, et al., 2010; Schijns & O'Hagan, 2017).

3.9 Citocinas involucradas en fenotipos de memoria inmunológica

Las citocinas son un grupo de proteínas solubles producidas de forma transitoria que juegan un papel importante en la comunicación intercelular, mediando las interacciones complejas entre las células, al unirse a receptores en la membrana de una célula y ejercer acciones diversas (Figura 4). Poseen acciones importantes en la activación o inhibición de la respuesta celular de los sistemas inmunitarios y hematopoyético. También ayudan a regular el desarrollo de las células efectoras del sistema inmune (Kindt, et al., 2007). Estas proteínas poseen actividades biológicas como la capacidad de regular la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, proliferación, diferenciación o una combinación de éstas en distintas células, además de controlar la secreción de anticuerpos y otras citocinas. Existen más de 200 citocinas distintas, clasificadas en alguna de las siguientes familias: eritropoyetinas, interferones, quimiocinas y factores de necrosis tumoral (Kindt, et al., 2007).

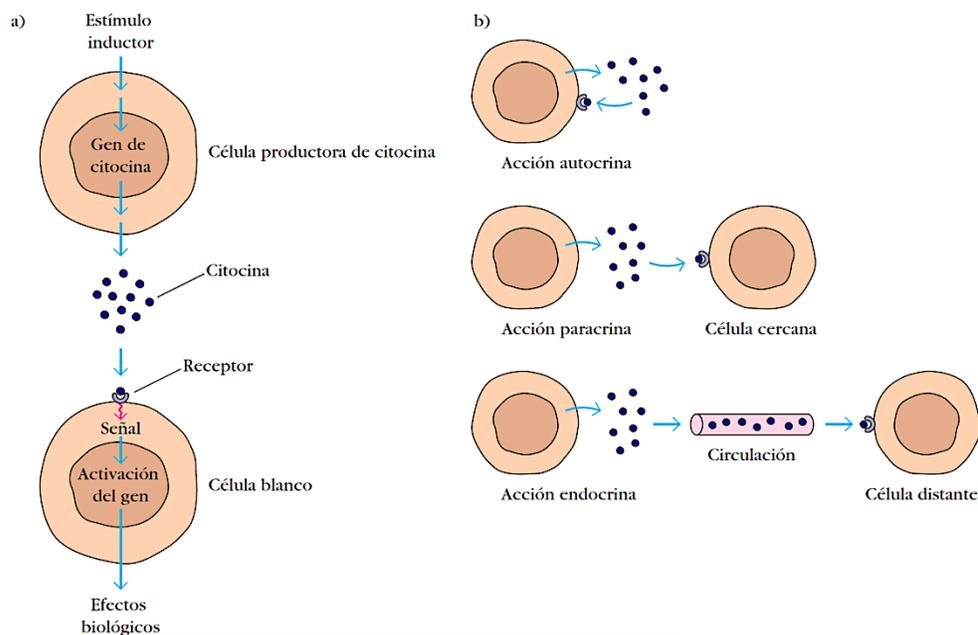


Figura 4. Esquema de la función de inducción y función general de las citocinas. A) Ante un estímulo la célula secreta citocinas que ejercen algún efecto biológico en células blanco al unirse a receptores en la membrana; B) ya sea en la misma célula que la secreta (autocrina) o en células blanco cercanas a la célula productora (paracrino), o bien en células blanco en partes distintas del organismo (endocrina) (Tomada de Kindt, et al., 2007).

Se ha demostrado que ambientes particulares de citocinas favorecen la diferenciación de TCM o TEM *in Vitro* e *in Vivo* (Bouneaud et al., 2005). Numerosos estudios han centrado la atención en el papel de las citocinas comunes de la cadena γ o γc (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21), las cuales se caracterizan por estar involucradas en diversos procesos biológicos en células inmunitarias, como IL-7 o IL-15 en la persistencia y desarrollo de células T CD8⁺ de memoria (Lin J.X. y Leonard W.J., 2018). Estas citocinas son esenciales en la homeostasis de las células T CD8⁺ de memoria. Se demostró que la inyección del complejo IL-2/anti-IL-2 Ab aumenta la actividad biológica de IL-2 induciendo la proliferación homeostática de las células T CD8⁺ de memoria en ratones (Boyman, 2006). Paralelamente, un enfoque similar usando el complejo IL-4/anti-IL-4 Ab también indujo la proliferación de las células T del fenotipo de memoria CD8⁺, lo que sugiere un papel para IL-4 en el mantenimiento de las células de memoria. Del mismo modo, se observó proliferación del fenotipo de memoria de células T CD8⁺ en respuesta a la IL-4 producida después de la activación de NKT (Ventre et al., 2012).

Las células T CD8⁺ de memoria son capaces de persistir durante mucho tiempo en el huésped de manera independiente del antígeno y del TCR, pero dependiente de las citocinas (Geginat, et al., 2003). En la Tabla 2, se hace un resumen bibliográfico de las citocinas involucradas en la

diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria. Algunos estudios han demostrado que ciertas citocinas favorecen preferencialmente la generación de TCM o de TEM.

Tabla 2. Citocinas involucradas en la diferenciación de linfocitos T CD8+ de memoria

Citocinas involucradas en la generación de T CD8+ de memoria central	Citocinas involucradas en la generación de T CD8+ de memoria efectora
	IL-2 (Obar y LeFrançois, 2010)
	IL-4 (Cho et al., 2012); (Sallusto, Geginat & Lanzavecchia, 2004)
IL-7 (Huster et al., 2004); (Purton et al., 2008); (Willinger, et al., 2005)	
IL-33 (Yang et al., 2011)	
IL-15 (Obar y LeFrançois, 2010)	IL-15 (Rautela & Huntington, 2017)
IFN- γ (Geninat et al., 2003)	IFN- γ (Miyajima et al., 2017)
TNF- α (Golubovskaya); (Wu, 2016)	TNF- α (Obar y LeFrançois, 2010); (Willinger, et al., 2005)

En verde, citocinas involucradas en la inducción de cada tipo de memoria; en rojo, citocinas involucradas en la generación de los dos tipos de memoria.

La capacidad única de las células T CD8+ de memoria para experimentar proliferación homeostática en respuesta a IL-15 e IL-7 permite su autorrenovación y el mantenimiento de un conjunto funcional de células T de memoria que pueden responder rápidamente a la reinfección y conferir inmunidad protectora (Wherry et al., 2004).

Estudios *in Vitro* demostraron que la activación mediada por antígenos de las células T CD8+ en la presencia de IL-2 o IL-15 resulta en la generación de células efectoras de tipo TEM o TCM, respectivamente (Obar & Lefrançois, 2010). La familia de las citocinas γc contiene 6 miembros; IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, e impactan en la diferenciación de las células de memoria. Estas fases de una respuesta de células T y el consiguiente mantenimiento de las células T de memoria están formadas por las citocinas, especialmente IL-2, IL-7 e IL-15. La producción en estado estacionario de IL-7 e IL-15 es necesaria para la proliferación y la supervivencia homeostática de las células T de memoria CD4+ y CD8+. Durante las respuestas inmunes, los niveles aumentados de IL-2, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18 e interferones de tipo I determinan el potencial de memoria de las células efectoras específicas de antígeno CD8+, mientras que el aumento de IL-2 e IL-15 causa la proliferación de células T heterólogas de memoria CD4+ y CD8+ (Raeber, et al., 2018).

La proliferación y la supervivencia homeostática de las células T CD8⁺ de memoria dependen principalmente de IL-15 y en menor medida de IL-7. IL-15 conduce en la memoria a las células T CD8⁺ a través de los factores de transcripción T-bet y Eomesodermina. IL-7 es la segunda citocina crítica para la homeostasis de células T CD8⁺ de memoria. La proliferación homeostática de las células T de memoria CD8⁺ se atenúa significativamente en ratones IL-7^{-/-} y puede inhibirse bloqueando IL-7 e IL-15. Aunque IL-15 e IL-7 son fisiológicamente los reguladores más prominentes de la homeostasis de las células T CD8⁺ de memoria, otras citocinas pueden afectar de manera similar a las células T CD8⁺ de memoria (Raeber, et al., 2018).

Las moléculas IL-4 producidas por células NKT conllevan a una diferenciación de los timocitos positivos para CD8 a linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria, también llamadas células T CD8⁺ innatas (Ventre et al., 2012). La interleucina IL-4 es capaz de desregular negativamente, *in Vitro* e *in Vivo* en un ambiente dependiente de STAT6, la expresión específica de memoria de NKG2D, molécula involucrada en la inmunovigilancia y presente en linfocitos T de memoria activados, aumentando así el umbral de activación de las células T CD8⁺ de memoria. Adicionalmente, IL-4 inhibe la activación y diferenciación a células efectoras de las células de memoria *in Vivo*, además de estar involucrado en la modulación de la expresión de genes involucrados en las funciones de T CD8⁺ de memoria, como la proliferación celular (Ventre et al., 2012).

La IL-7 es una proteína de la familia de las citocinas con cadena γ en su receptor, también presenta una cadena α de unión a ligando única. Esta citocina, así como la citocina IL-15 influyen en la homeostasis de las células T *in Vivo*. El mantenimiento del “pool” de células T de periferia con composición normal de células “naïve” y células T de memoria es respaldada por IL-2, IL-7 e IL-15 (Purton, et al., 2008). Estudios sugieren que IL-7 provee la señal clave durante la transición efectora a memoria (Figura 5), también se ha demostrado que la expresión del receptor IL-7R α , también llamado CD127, por sí solo es suficiente para asegurar la supervivencia y continuar con la diferenciación de las células T CD8⁺ efectoras. Se ha demostrado que la señalización sinérgica de IL-7 e IL-15 promueve la formación de células T CD8⁺ de memoria y que la presencia de la interleucina 7 durante la fase de contracción de los linfocitos T, es capaz de aumentar la acumulación células T de memoria antígeno-específicas funcionales (Purton, et al., 2008) (Figura 5).

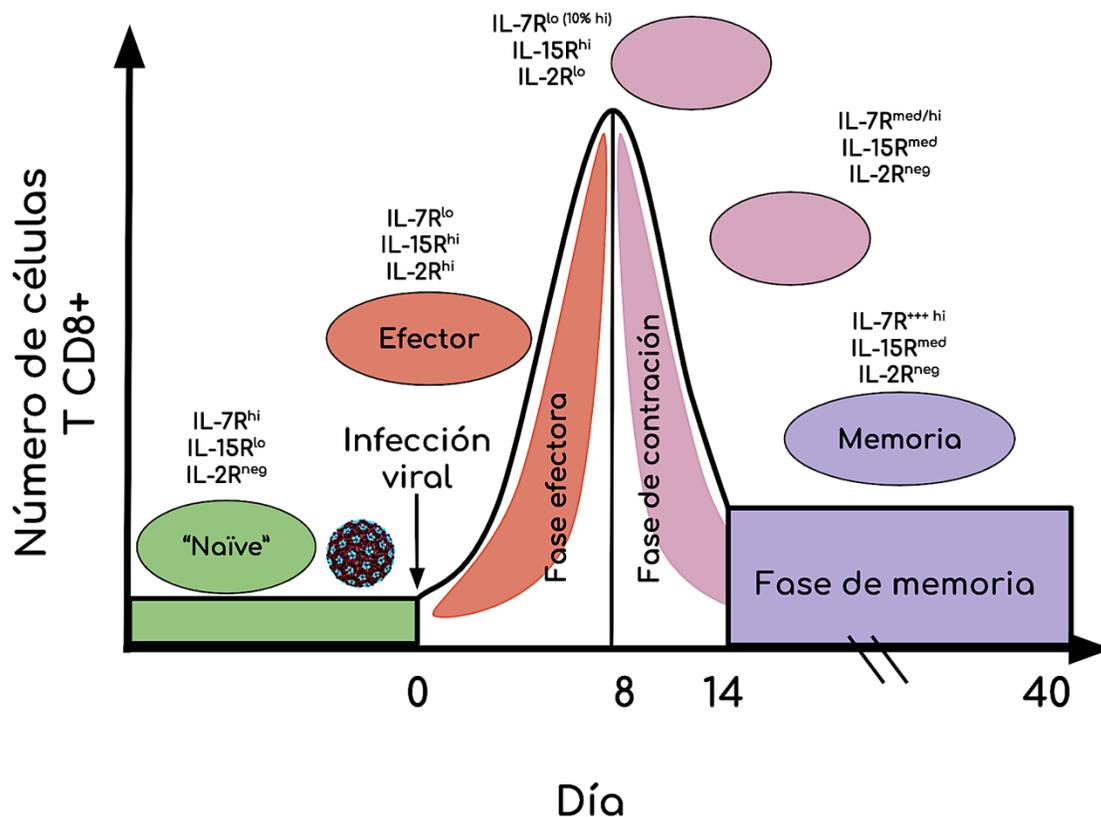


Figura 5. Esquema de la evolución temporal de los linfocitos T CD8+ antígeno-específicos y las citocinas involucradas en el desarrollo de éstos (Modificada de Purton, et al., 2008). La cantidad de células T CD8+ antígeno-específicas y la expresión de las citocinas se presentan antes, durante y después de la infección. Los mecanismos que controlan la formación de células T de memoria aún no es conocida pero se observa un rol importante por parte de IL-2, IL-7 e IL-15 para regular la homeostasis de estas células.

En trabajos previos, se ha demostrado que las poblaciones de células T CD8+ efectoras retienen la expresión de CD127 (IL-7R α); sin embargo, la señal de IL-7 no es necesaria para la supervivencia de estas poblaciones (Obar & Lefrançois, 2010). Esta proteína actúa como factor de crecimiento para los progenitores de los linfocitos T, aunque también está involucrado en la estimulación del crecimiento de linfocitos T maduros (Palomo González, 2002). Se ha observado que IL-7 es necesaria para la supervivencia de las células “naïve” y promueve la supervivencia de las células T CD8+ de memoria y los informes iniciales sugieren que la expresión de CD127 podría usarse para identificar las células efectoras precursoras de la memoria que muestran una mayor capacidad para formar células de memoria de larga duración y células efectoras de corta duración que son deficientes para generar células de memoria de larga duración (Martin & Badovinac, 2018). Ésta última estimula la proliferación homeostática de las células T CD8+ tanto “naïve” como de

memoria, mientras que la IL-15 expande las células T CD8⁺ de memoria (Schluns & Lefrançois, 2003).

La interleucina 15 (IL-15) es una proteína de unos 14 a 15 kDa secretada por los monocitos y células epiteliales; sin embargo, se encuentra en una variedad muy grande de tipos celulares y tienen como blanco celular a los linfocitos T, afectando su proliferación y generando linfocitos T citotóxicos específicos (Palomo González, 2002). Las células T CD8⁺ de ratón estimulados *in Vitro* en presencia de IL-15 adquieren un fenotipo de memoria central, mientras que las células T CD8⁺ activadas con IL-2 se asemejan a las células T de memoria efectora, indicando que posiblemente juegue un papel influyente el ambiente de citocinas en el que se encuentren embebidas las células T CD8⁺ antígeno-específico. Se sabe que la IL-15 e IL-7 tienen efectos positivos en el mantenimiento de la memoria de las células T CD8⁺ y que el número de células T de memoria CD8⁺ específicas para un antígeno dado permanece estable durante largos períodos de tiempo (Schluns & Lefrançois, 2003). Debido a que las células T CD8⁺ de memoria tienen poca respuesta a la interleucina 2, se presume que la IL-15 actúa directamente sobre las células T CD8⁺ de memoria para inducir la división celular, mientras que la IL-2 actúa indirectamente sobre otro tipo de célula para inhibir la división de células T CD8⁺ de memoria (Figura 5).

Por otra parte, las células iNKT estimuladas con el adyuvante α -GalCer se caracterizan por la rápida producción de diversas citocinas que incluyen IFN- γ , factor de necrosis tumoral, osteopontina, las interleucinas 2, 4, 10 y 13, el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y el factor de crecimiento transformante β o TGF- β (Van Kaer, 2005). A pesar de que se determinó una gran liberación de citocinas por parte de las iNKT estimuladas por este glicolípido, se ha demostrado que la respuesta inicial está dominada principalmente por la producción de IL-4, para después ser reemplazado por una alta dominancia en la producción de IFN- γ (Van Kaer, 2005). Adicionalmente, se descubrió que posterior a la activación de estas células, se lleva a cabo una activación de células del sistema inmune como células NK, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células B y células T convencionales, evento que también ha sido demostrado al activar células iNKT humanas (Van Kaer, 2005).

4. ANTECEDENTES

La respuesta inmune innata no siempre es suficiente para eliminar infecciones tales como las del VPH, requiriendo así la activación del sistema inmune celular mediante la producción de componentes importantes como las citocinas. Estas moléculas no solamente son capaces de

encender la respuesta celular, sino que también se han visto involucradas en la estimulación y mantenimiento de poblaciones inmunológicas implicadas en la generación de la memoria inmunológica. Dada la implicación en la potenciación de la respuesta inmune, diversos estudios se han centrado en la caracterización de las poblaciones de memoria en modelos del virus de la influenza, demostrando que el adyuvante α -GalCer puede ser un inmunoestimulante eficaz. Uno de estos estudios determinó que el adyuvante α -GalCer es capaz de favorecer la generación de las células T CD8⁺ de memoria. Se demostró que la inoculación del adyuvante y el virus de la influenza A inactivado, tiene la propiedad de promover la supervivencia de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria (Guillonnet, et al., 2009). Por otro lado, en nuestro laboratorio se determinó la capacidad inmunogénica de la proteína E1 del VPH18 en un modelo murino encontrando que los ratones inmunizados con E1 en combinación con α -GalCer indujeron la generación de linfocitos T CD8⁺ E1-específicos y respuestas NK citotóxicas. De manera interesante, esto correlacionó con la inhibición del crecimiento de células de melanoma de ratón (B16F0) que expresaron E1, en un modelo de xenotransplante. Estos resultados alentadores se observaron tanto en un protocolo profiláctico como en el terapéutico. Es decir, la combinación de E1 y α -GalCer podría ser utilizada como componente tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas contra VPH o lesiones por VPH ya establecidas (Amador Molina, et al., 2019).

Con el fin de lograr una mejor caracterización de dicha respuesta, surgió el interés de evaluar el efecto inmunoestimulante de este tipo de inmunización. Es decir, que a través de la estimulación de las células iNKT se genere un perfil de citocinas que de forma directa o indirecta sea capaz de promover la generación de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria E1-específicos y no específicos de bazo de ratón. Con ello se pretende caracterizar el perfil de citocinas involucrado en una posible generación de linfocitos CD8⁺ de memoria generados por E1 y α -GalCer, encaminado a aportar información sobre componentes potenciales para el desarrollo de nuevas vacunas contra el VPH.

5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que existen tratamientos quirúrgicos para eliminar lesiones premalignas del cérvix causadas por VPH, las estrategias terapéuticas con enfoque inmunológico son limitadas. Por esta razón es importante investigar el potencial de antígenos virales para generar respuesta inmune celular y memoria inmunológica, con el fin de generar conocimiento útil para el desarrollo de nuevas herramientas en el tratamiento de infecciones ya establecidas por VPH.

Desde el inicio de su uso en la clínica, las vacunas profilácticas contra VPH han mostrado más del 90% de eficacia en la prevención del desarrollo de lesiones de cérvix. Sin embargo, estas vacunas muestran pobre efecto terapéutico sobre la infección preexistente por VPH (Hung, et al., 2008). Con el fin de eliminar infecciones por VPH ya establecidas, se han desarrollado enfoques inmunoterapéuticos dirigidos contra células infectadas por VPH-AR para inducir respuestas inmunes celulares eficaces. De esta manera, surge el interés de encontrar nuevos blancos terapéuticos y adyuvantes eficaces en la promoción de una respuesta celular que permita la eliminación de células infectadas, para lo cual resulta necesario caracterizar los perfiles de citocinas involucrados en dichas respuestas.

6. HIPÓTESIS

La inoculación con α -GalCer combinado con E1 de VPH18 generará un perfil de citocinas que favorecerá el aumento de poblaciones de células T CD8⁺ de memoria central y efectora en comparación con el generado con E1 solo, en un modelo murino.

7. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los patrones de citocinas y poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria inmunológica, generados por E1 de VPH18, α -GalCer y E1/ α -GalCer en un modelo murino.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Aplicar un esquema de inmunización en ratones C57BL6 bajo distintas condiciones que involucran a la proteína E1 de VPH18 y al adyuvante α -GalCer.
- II. Determinar las poblaciones de memoria central y efectora en los diferentes grupos de ratones inoculados.
- III. Determinar los niveles de citocinas relacionadas a la respuesta de memoria inmunológica de linfocitos T CD8⁺: IL-4, IL-7, IL-15 en el suero de los ratones inoculados bajo los distintos esquemas de inmunización.

9. METODOLOGÍA

9.1 Protocolo de inmunización

Se estableció un protocolo de inmunización con 4 grupos de 3 ratones cada uno. Se homogenizó el protocolo experimental con la utilización de hembras exclusivamente correspondientes a la cepa de ratones C57BL/6.

Los ratones C57BL/6 provinieron del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México. Todos los animales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y se alimentaron con pellets (croquetas) y agua *ad libitum*. Los Comités de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto Nacional de Cancerología, México, aprobaron los procedimientos de cuidado y uso de animales (PAPIIT-IN221810), (017/001/IBI), (CEI/1076/17). Por ende, se llevaron a cabo todas las reglamentaciones institucionales aplicables relacionadas con el uso ético de los animales.

Los grupos de ratones fueron inoculados con PBS (Gibco™), α -galactosilceramida (KRN7000), proteína E1₂₀₂₋₆₅₄ y con E1₂₀₂₋₆₅₄ + α -GalCer. Las dosis administradas para cada uno de los tratamientos se concentran en la tabla 3. Catorce días después de la primera inoculación se administró un refuerzo a la misma dosis de cada uno de los tratamientos. La administración del inoculo se realizó vía subcutánea en el flanco izquierdo.

Tabla 3. Dosis empleadas en el protocolo de inmunización

Reactivo	Dosis
PBS	50-70 μ L
α -GalCer	4 μ L
PBS	50-70 μ L
Proteína E1 ₂₀₂₋₆₅₄	20 μ L
PBS	50-70 μ L
α -GalCer	4 μ L
Proteína E1 ₂₀₂₋₆₅₄	20 μ L
PBS	30-50 μ L

Siete días después del refuerzo inmunológico, se realizaron las extracciones de sangre periférica mediante incisiones de menos de 1 cm sobre la cola (incisiones de la vena caudal). Posterior a la extracción de sangre periférica, los ratones fueron sacrificados empleando la cámara de CO₂ de acuerdo con las reglamentaciones indicadas en la NOM-033-SAG/ZOO-2014, para la disección de bazo.

9.2 Obtención de suero a partir de muestras de sangre periférica de ratones C57BL/6.

Se colectó la sangre periférica en tubos estériles sin anticoagulantes y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-24°C). Posterior a la coagulación de la sangre, se centrifugaron

los tubos a 1800 g durante 15 minutos para separar el suero. Se recolectó el suero evitando tomar el coágulo. Finalmente, el suero obtenido se alicuotó y almacenó a -20°C hasta su uso.

9.3 Cuantificación de proteínas totales en suero

La cuantificación de proteínas en suero se llevó a cabo mediante una curva de albúmina, utilizando el método de ácido bicinónico y sulfato de cobre II. En una placa de 96 pozos se realizaron diluciones de concentraciones conocidas de la proteína albumina (0 a 21 µg, equivalente; 1µg/µL). Esto se llevó a cabo por triplicado para asegurar reproducibilidad y se leyeron a 540 nm en el lector de microplacas. A partir de esta curva de concentraciones conocidas de albumina, se determinó las concentraciones de proteína de cada uno de los sueros obtenidos de ratones, a partir de una regresión lineal, asegurándose que el valor R^2 fuera mayor a 0.98.

9.4 Determinación del perfil de citocinas por inmunoensayo

La determinación de citocinas en suero se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA indirecto, utilizando una curva estándar de concentraciones conocidas de cada una de las citocinas de interés (IL-4: Recombinant Human IL-4 (carrier-free) 574004/25 µg BioLegend ®; IL-7: Mouse IL-7/Interleukin 7 Protein 50217-MNAE Sino Biological™; IL-15: Human IL-15/IL15/Interleukin 15 Protein (His Tag) 10360-H07E Sino Biological™). Se usaron controles de isotipo correspondientes para cada uno de los anticuerpos que detectaban las interleucinas 4, 7 y 15 con la finalidad de distinguir una posible unión inespecífica de los anticuerpos primarios (Goat IgG Isotype Control 02-6202 Invitrogen™, Rabbit IgG Isotype Control Invitrogen™).

El protocolo de ELISA indirecto fue el siguiente:

DÍA 1

1. Se diluyó el antígeno a una concentración final deseada (µg/µL) en DPBS (Gibco™). Se cubrieron los pocillos de la placa de microtitulación de PVC de fondo plano con el antígeno, pipeteando 50 µL de la dilución de antígeno en los pocillos superiores de la placa.
2. Se cubrió la placa con parafilm e incubó a 4°C durante toda la noche, en agitación constante.

DÍA 2

3. Se lavó la placa de tres a cuatro veces llenando los pocillos con 200 µL de DPBS. Los lavados se eliminaron colocando la placa sobre un fregadero. Las gotas restantes se eliminaron golpeando la placa sobre una toalla de papel.

4. Se bloquearon los sitios de unión a proteínas restantes (inespecificidades) en los pocillos recubiertos agregando 200 µL de buffer de bloqueo (DPBS/suero fetal bovino 5%).
5. Se cubrió la placa e incubó durante al menos dos horas a temperatura ambiente, en agitación.
6. Se lavó la placa de dos a tres veces con DPBS.
7. Se añadieron 100 µL de anticuerpo primario diluido (1:250 para interleucinas 4, 7 y 15) a todos los pocillos (IL-4: IL-4/IL4/Interleukin-4 Antibody, Rabbit Pab 51084-RP01 Sino Biological™, IL-7: IL-7 Polyclonal Antibody PA5-46944 ThermoFisher SCIENTIFIC™, IL-15: Purified Rabbit Anti-mouse IL-15 TP242 de Torrey Pines Biolabs Inc.).
8. Se cubrió la placa e incubó toda la noche a 4°C, en agitación constante.

DÍA 3

9. Se lavó la placa de cuatro a cinco veces con DPBS.
10. Se agregaron 100 µL de anticuerpo secundario conjugado (Goat Anti-rabbit IgG, HRP Invitrogen™; Rabbit Anti-goat, HRP Invitrogen™; Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, HRP Invitrogen™), diluido a una concentración de 1:10 000 en el buffer de bloqueo justo antes de su uso.
11. Se cubrió la placa e incubó dos horas a temperatura ambiente.
12. Se lavó la placa de cuatro a cinco veces con DPBS.
13. Se agregaron 100 µL de la solución de sustrato (substrate reagent A: substrate reagent B, BD OptEIA™; 1:1), la cual se preparó 15 minutos antes de ser utilizada, a todos los pozos e incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
14. Se agregaron 50 µL de solución de paro (Stop solution, BD OptEIA™) a cada pozo y se leyó a 450 nm en el lector de ELISA, antes de que transcurrieran 30 minutos.

Una vez obtenidas las lecturas de ELISA en unidades absorbancia de luz a una longitud de onda de 450 nm, se extrapolaron en las curvas estándar de concentraciones conocidas del analito con el fin de determinar la concentración en unidades de picogramos/uL de cada uno de los sueros problema. Se tomaron únicamente las rectas con valor de R^2 mayor a 0.98.

Para realizar dicho cálculo se utilizó el software <https://www.elisaanalysis.com/> (Durante Septiembre-Diciembre 2019) y se graficaron en el software GraphPad Prism.

9.5 Obtención de linfocitos T CD8+ de bazo de ratones C57BL/6 inmunizados

Una vez sacrificados los ratones, se realizó la extracción del bazo mediante una incisión en la cavidad abdominal. Los bazos fueron extirpados y colectados en tubos estériles con PBS estéril.

Con el fin de obtener las células de tejido (bazo); se colocó el bazo en un tamiz celular estéril de 70 μm (Corning™ Life Sciences) anexada a un tubo cónico de 50 mL y se maceró, dejando caer el resultante en un tubo.

Los esplenocitos totales fueron lavados con PBS y centrifugados a 1,600 rpm por 5 minutos. El botón celular fue incubado con solución de lisis (Becton Dickinson Pharm Lyse™) por dos minutos a 37 °C para eliminar eritrocitos. Posteriormente se detuvo la reacción de lisis diluyendo con 40 mL de PBS y se centrifugó a 1,600 rpm por 5 minutos.

A partir del botón de esplenocitos libre de eritrocitos se llevó a cabo la purificación de linfocitos T CD8⁺ usando el Kit de Miltenyi Biotec (CD8 α ⁺ T Cell Isolation Kit II/ LS QuadroMACS™), el cual realiza una separación magnética, la cual consiste en la utilización de anticuerpos específicos para todos los tipos de células del bazo, con excepción de los linfocitos T CD8⁺.

Una vez purificados los linfocitos T CD8⁺, se evaluó su viabilidad por conteo celular con azul de tripano y posteriormente se determinó su pureza a través de citometría de flujo.

9.6 Determinación de T CD8⁺ de bazo de ratones C57BL/6 inmunizados mediante citometría de flujo

Una vez aislados los linfocitos T CD8⁺ de bazo mediante selección negativa, se evaluó la pureza de estas muestras a través de citometría de flujo usando los anticuerpos anti-CD3 (PE anti-mouse CD3, BioLegend ®) y anti-CD8 (PE anti-mouse CD8a, BioLegend ®) (Figura 10). La determinación del marcaje de linfocitos T CD8⁺ se evaluó tanto en esplenocitos totales, fracción libre de células CD8⁺ y de fracción enriquecida de linfocitos T CD8⁺.

Una vez que la pureza fue determinada, se identificaron los fenotipos de memoria de linfocitos T CD8⁺ empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: BV421-A CD127⁺ (Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD127 (IL-7R α), BioLegend ®) y PErCP- A CD62L⁺ (PerCP anti-mouse CD62L, BioLegend ®). Las muestras celulares fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Aria™ II (Becton Dickinson) empleando el software FACS Diva 8.0.1. Los resultados obtenidos fueron analizados en el software FlowJo versión 10.2. Se adquirieron 50,000 eventos por muestra.

9.7 Análisis Estadístico

9.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó a través de ANOVA de una cola y con una prueba de Tukey's post-análisis, usando el software GraphPad Prism. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

10. RESULTADOS

10.1 Patrón diferencial de las citocinas IL-4, IL-7 e IL-15 en ratones inmunizados con α -GalCer + E1

El objetivo de este trabajo fue determinar los patrones de citocinas involucrados en el establecimiento de fenotipos de memoria de linfocitos T CD8+, así como los porcentajes de dichos linfocitos, generados por la administración de la proteína E1, α -GalCer o su coadministración. Para ello, se inmunizaron ratones C57BL6 en 4 grupos diferentes como se describe en materiales y métodos.

En la figura 6A, se muestra la cuantificación de la IL-4 purificada, obtenida mediante una curva estandar. Cabe hacer notar que en esta curva se empleó a la interleucina 4 purificada, a diferentes concentraciones (rango de 0.00000005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se utilizó el anticuerpo primario anti-IL-4 para su detección mediante un anticuerpo secundario acoplado a HRP, obteniendo así señal colorimétrica (reacción de Biuret). La señal se midió en un lector de ELISA a 450 nm.

Los niveles de citocinas cuantificados por ensayos de ELISA de cada uno de los grupos de ratones indicaron que la citocina IL-4 aumentó significativamente en el grupo inmunizado con α -GalCer + la proteína E1 con respecto a todos los demás grupos, alcanzando niveles por arriba de 300 $\text{pg}/\mu\text{l}$. Por ejemplo, α -GalCer + E1 presenta niveles de IL-4 de casi 3 veces sobre aquellos presentados por la inmunización de E1 sola. Sin embargo, aquellos inmunizados solo con E1 también mostraron un aumento significativo con respecto al grupo control (PBS), por arriba de 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$ (casi 100 veces más) (Figura 6B).

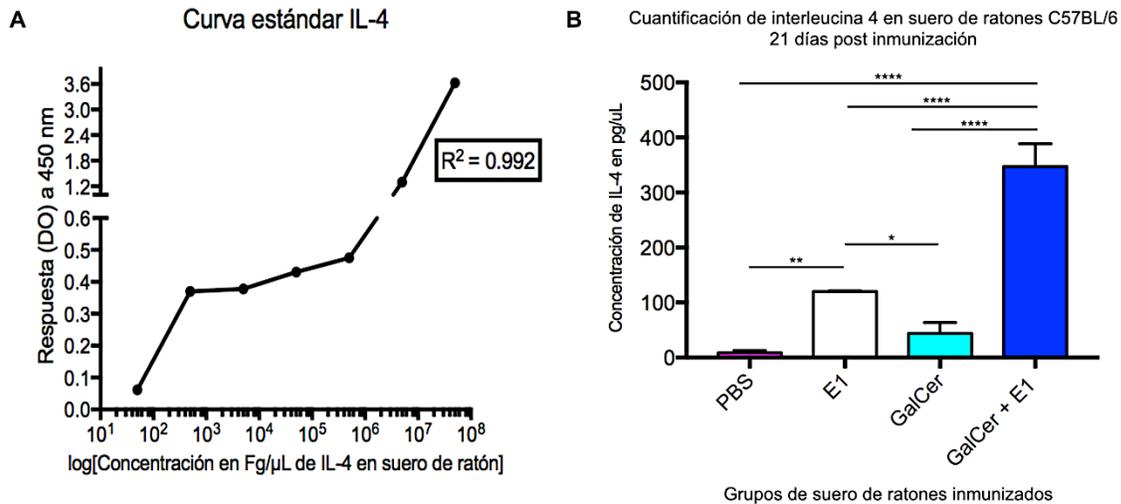


Figura. 6 Los niveles de interleucina 4 aumentaron significativamente en los grupos inoculados con α -GalCer y la proteína viral E1. **A)** Curva estándar anti-IL-4 (Fg/ μ L), $R^2=0.992$. **B)** Cuantificación de los niveles de la proteína interleucina 4 (pg/ μ L) en ratones C57BL/6 21 días post inmunización (4 grupos, n=3; PBS vs. E1, $p=0.0014$; PBS vs. α -GalCer, $p=0.2935$; PBS vs. α -GalCer + E1, $p<0.0001$; E1 vs. α -GalCer, $p=0.047$; E1 vs. α -GalCer + E1, $p<0.0001$; α -GalCer vs. α -GalCer + E1, $p<0.0001$). Significancia $p > 0.05$.

Después de determinar que las inmunizaciones con E1 y mayormente con α -GalCer + E1 inducen la producción de IL-4, se procedió de la misma manera a cuantificar los niveles de IL-7 en los mismos esquemas de inmunización. En la figura 7A se observa la curva de estandarización para medir, en esta ocasión, a la interleucina 7 con anticuerpos específicos (Ver procedimiento descripción figura 6A). Como se observa en la figura 7B, solo el grupo inmunizado con α -GalCer + E1 mostró un aumento significativo de IL-7 en suero de ratones, en relación a los otros grupos, alcanzando niveles de 3000 pg/ μ L. Por ejemplo, los niveles de interleucina 7 son 3 veces más que aquellos presentados en el grupo inmunizado con la proteína E1 sola.

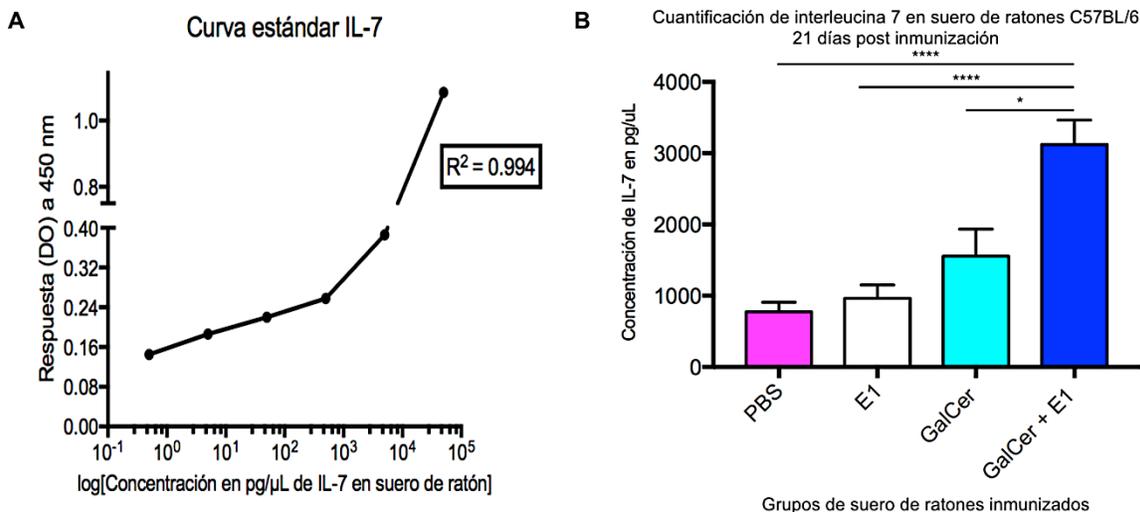


Figura 7. Los niveles de interleucina 7 aumentaron significativamente en los grupos inoculados con α -GalCer y la proteína viral E1. A) Curva estándar anti-IL-7 (pg/ μ L), $R^2= 0.994$. **B)** Cuantificación de los niveles de la proteína interleucina 7 (pg/ μ L) en ratones C57BL/6 21 días post inmunización (4 grupos, n=3; PBS vs. E1 $p=0.9420$, PBS vs. α -GalCer $p=0.3643$, PBS vs. α -GalCer + E1 $p<0.0001$, E1 vs. α -GalCer $p=0.4820$, E1 vs. α -GalCer + E1 $p<0.0001$, α -GalCer vs. α -GalCer + E1 $p=0.0201$). Significancia $p>0.05$.

Nuestros resultados muestran que las interleucinas 4 y 7 aumentaron significativamente en los ratones inmunizados con E1 + α -GalCer y cabe resaltar que se ha reportado que éstas juegan un papel importante en la generación de linfocitos de memoria (Ventre et al., 2012; Schluns & Lefrançois, 2003), lo que sugiere que con esta inmunización se esté estimulando una respuesta de memoria.

Por otro lado, la interleucina 15 también ha sido reportado como una de las principales citocinas de generar un ambiente propicio para la diferenciación a poblaciones de memoria. Para medir esta interleucina en nuestro modelo, también realizamos una curva estándar con proteína IL-15 purificada y su respectivo anticuerpo (Figura 8A). Sin embargo, en nuestros resultados observamos que en los niveles séricos de IL-15 en ratones inmunizados no hubo cambios estadísticamente significativos entre ninguno de los grupos (Figura 8B). Aun así, se pudo observar una tendencia en la cual las concentraciones sericas de IL-15 presentaron un aumento en ratones inmunizados con E1 + α -GalCer, con niveles cercanos a 2000 pg/ μ L.

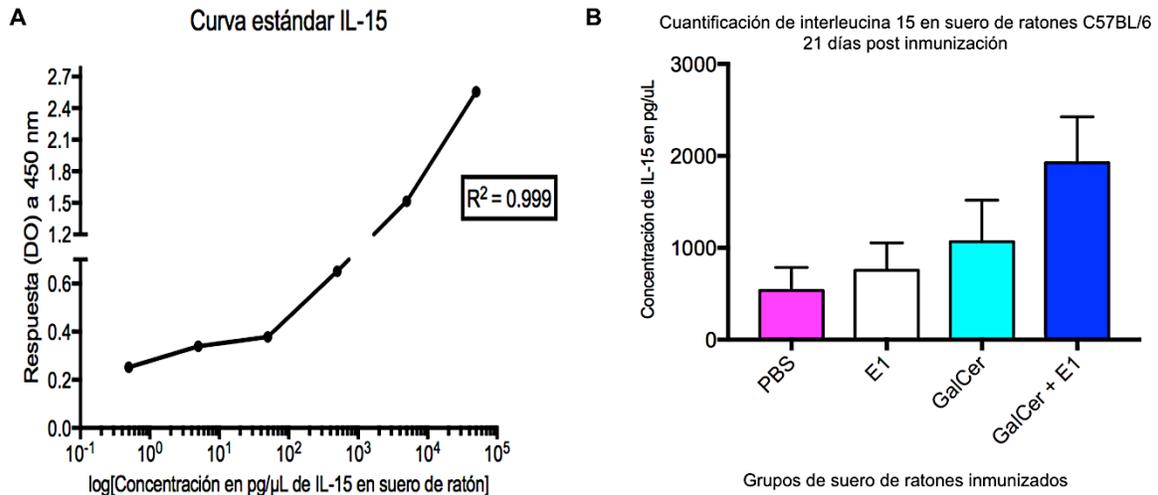


Figura 8. Los niveles de interleucina 15 muestran una tendencia al aumento en los grupos inoculados con α -GalCer y la proteína viral E1. A) Curva estándar anti-IL-15 (pg/ μ L), $R^2 = 0.999$. **B)** Cuantificación de los niveles de la proteína interleucina 15 (pg/ μ L) en ratones C57BL/6 21 días post inmunización (4 grupos, n=3; PBS vs. E1 p=0.9888, PBS vs. α -GalCer p=0.8451, PBS vs. α -GalCer + E1 p=0.2418, E1 vs. α -GalCer p=0.9613, E1 vs. α -GalCer + E1 p=0.3569, α -GalCer vs. α -GalCer + E1 p=0.5015). Significancia p>0.05.

10.2 Evaluación de perfiles de linfocitos T CD8+ de memoria inmunológica

Simultáneamente a la determinación de citocinas mediante ensayos de ELISA indirecto, se determinaron los porcentajes de linfocitos T CD8+ mediante citometría de flujo a través de los marcajes de las moléculas CD62L y CD127. El uso de estos marcadores de memoria ha sido ampliamente reportado en modelos de ratón (Henaio-Tamayo et al., 2010; Curiel, 2013; Huster et al., 2006) y permiten identificar diferentes poblaciones de memoria como se indica en la figura 9. La fracción de células que son doble positivas para los dos marcadores (CD62L+/CD127+) corresponde a la fracción de memoria central (TCM), en el cuadrante superior derecho. Por otro lado, la población celular positiva solamente a CD127 corresponde a los linfocitos de memoria efectora (TEM), en el cuadrante inferior derecho.

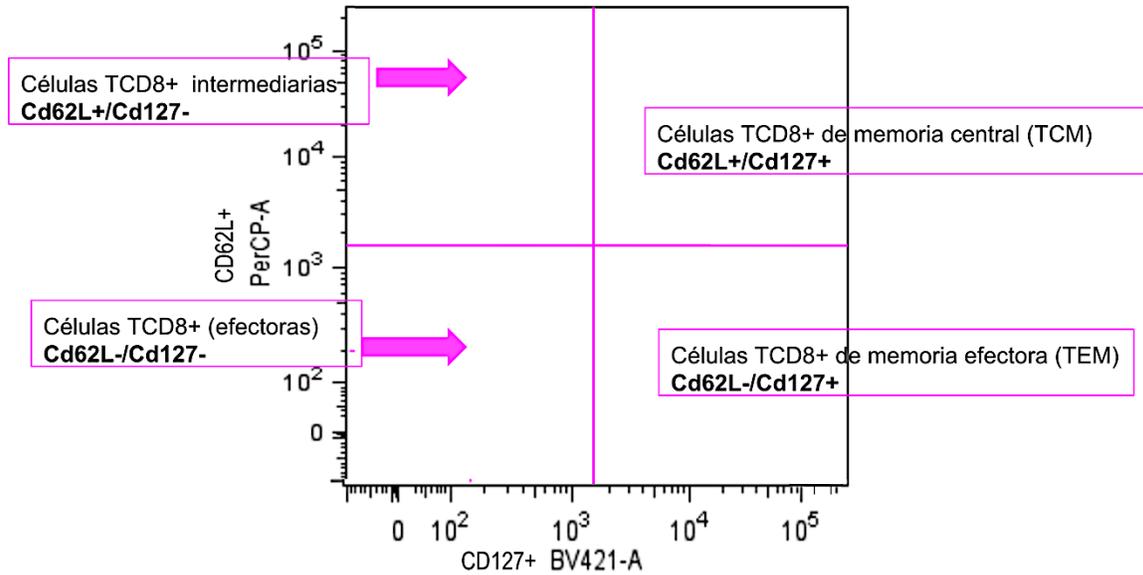


Figura 9. Representación biparamétrica en 2D (Dot plot density). Selección de las poblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria mediante citometría de flujo. Se utilizaron los marcadores de superficie; CD62L+PerCP-A y CD127+BV421-A. Cuadrante superior izquierdo; Células T CD8+ intermediarias (Cd62L+/Cd127-), Cuadrante inferior izquierdo; Células T CD8+ efectoras (Cd62L-/Cd127-), Cuadrante superior derecho; Células T CD8+ de memoria central Cd62L+/Cd127+), Cuadrante inferior derecho; Células T CD8+ de memoria efectora (Cd62L-/Cd127-).

10.3 Evaluación de la pureza de los linfocitos T CD8+ purificados de bazo

Para evaluar el porcentaje de linfocitos T CD8+ de memoria en cada uno de los grupos de ratones, primero se purificó toda la población de CD8+ de bazo por separación magnética como se describe en materiales y métodos. Se verificó que el porcentaje de pureza de la población de linfocitos T CD8+ fuera mayor a 88%, lo cual corresponde al mínimo indispensable de pureza que señala el fabricante.

PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS (CD8+/CD3+) de BAZO

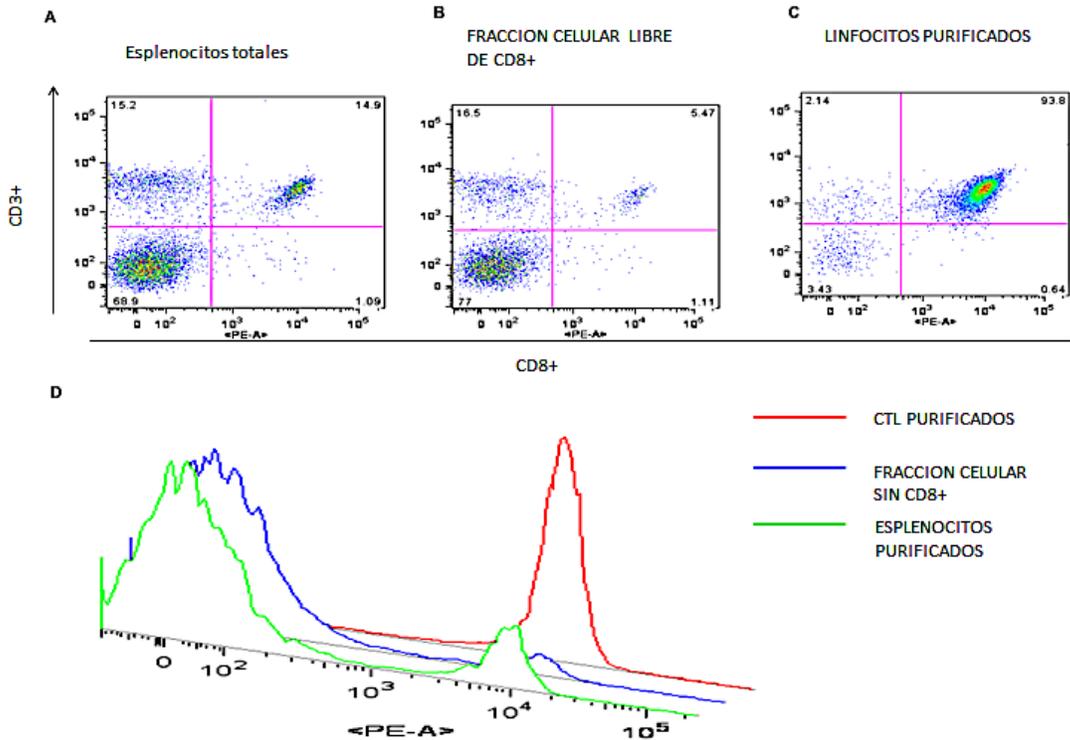


Figura 10. Purificación de linfocitos T CD8⁺ a partir de esplenocitos por medio del kit *CD8a+ T Cell Isolation Kit mouse*. Dot blots representativos de las poblaciones purificadas; **A)** Esplenocitos totales teñidos con anti-CD3 y anti-CD8 para identificar el total de linfocitos T CD8⁺ esplénicos (14.9 %). **B)** Fracción celular después de aislar linfocitos T CD8⁺ (5.47 % de linfocitos T CD8⁺). **C)** El porcentaje de pureza corresponde a un 93.8 %, posterior a la purificación magnética. **D)** Histograma que ejemplifica las tres poblaciones de linfocitos T CD8⁺ identificadas en: **A**, **B** y **C**) (intensidad de fluorescencia para PE-A; positividad para el marcador CD8⁺) obtenidas mediante la purificación de esplenocitos y linfocitos T CD8⁺ de bazo de ratón.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos de la purificación de los linfocitos T CD8⁺ obtenidos de los esplenocitos recolectados de los bazos de ratón, una vez finalizado el periodo de inmunizaciones. Las fracciones celulares correspondientes a las mostradas en la figura 10D demostraron una baja contaminación entre poblaciones previamente identificadas (Figura 10A, B). Además de haber obtenido un alto porcentaje de pureza al finalizar la separación magnética corresponde como se muestra en la figura 10C.

10. 4 Aumento de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria en ratones inmunizados

Posterior a este enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺, el análisis de citometría mostró la presencia de una población única con respecto a sus características de tamaño y complejidad, la cual fue incubada con controles de isotipo para definir los cuadrantes negativos a las moléculas CD62L y CD127 (Figura 11 B y C). La figura 11 D, se muestran las poblaciones de memoria central y efectora en cada uno de los tratamientos. Se observa que en los ratones con PBS no presentan un enriquecimiento en las poblaciones de interés. Sin embargo, los ratones inmunizados con E1 si bien no presentan un enriquecimiento en las poblaciones de interés, tienen un marcaje positivo a CD62L, que corresponden a las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ con un fenotipo intermedio descritas previamente (Bachmann, et al., 2005). Por otro lado, en los linfocitos de los ratones inoculados tanto con α -GalCer como con α -GalCer + E1, se muestra un incremento significativo de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria central y efectora (Figura 12).

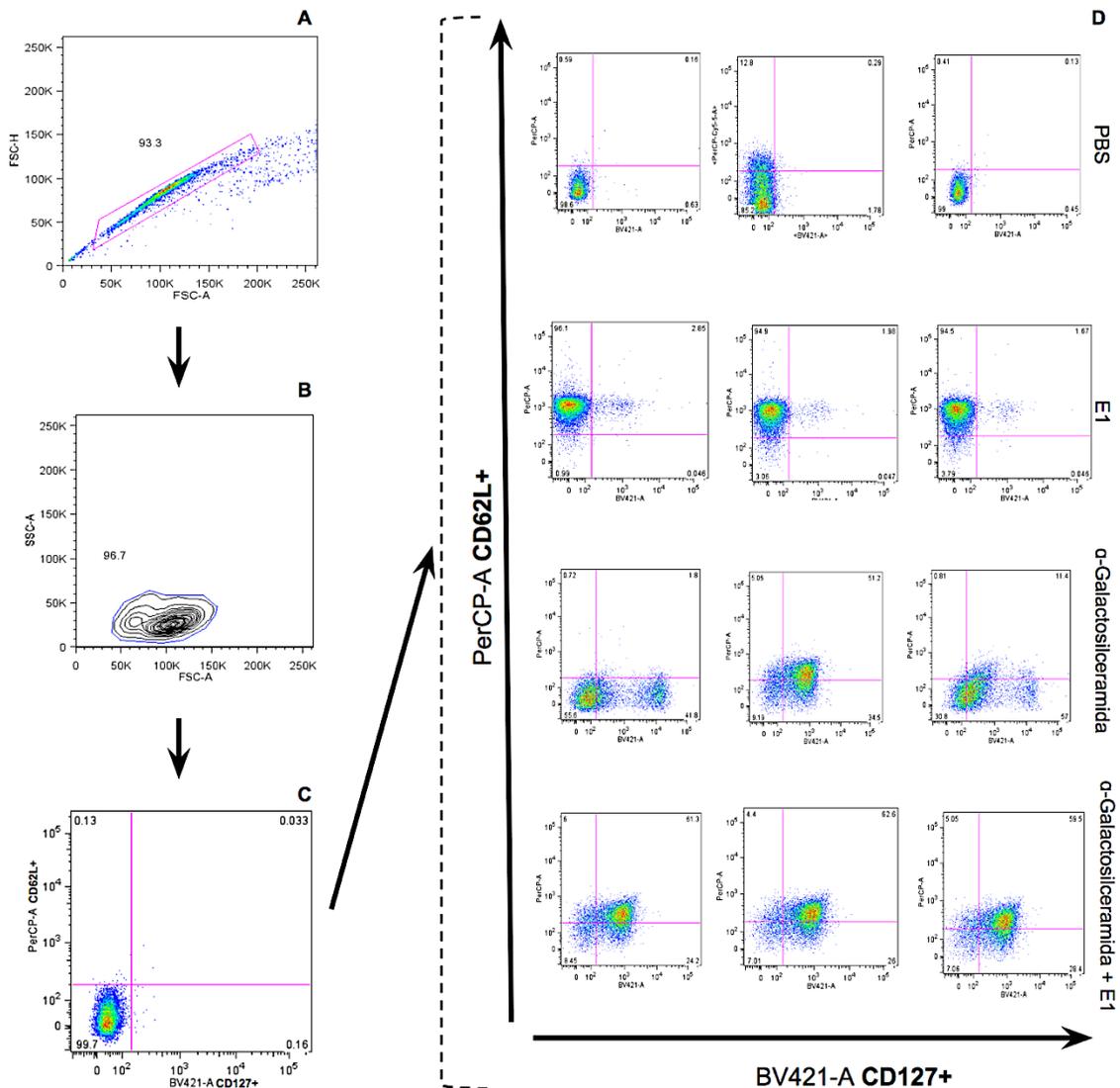


Figura 11. Acotamiento de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria. **A)** Selección de los singletes, evitando los falsos positivos. **B)** A partir de la selección de células individuales, se analizaron por las características de complejidad y tamaño, observándose una población única. **C)** A partir de esta población se delimitaron los cuadrantes positivos a las marcas de cd62L y cd127, gracias al uso de anticuerpos de isotipos, para determinar la presencia de pegado inespecífico. **D)** A partir de la delimitación de los cuadrantes, se aplicó el análisis a todas las muestras problema. Diagramas Dot-plot density para las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de bazo de ratones C57BL/6 21 días post inmunización (4 grupos, n=3), marcados con los siguientes marcadores de superficie: CD62L+PerCP-A y CD127+BV421-A; **PBS:** Células T CD8+ intermediarias (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =4.6%; Células T CD8+ efectoras (Cd62L-/Cd127-) \bar{x} = 94.26%; Células T CD8+ de memoria central (Cd62L+/Cd127+) \bar{x} =0.193%; Células T CD8+ de memoria efectora (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =0.953%. **E1:** Células T CD8+ intermediarias (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =95.16%; Células T CD8+ efectoras (Cd62L-/Cd127-) \bar{x} =2.613%; Células T CD8+ de memoria central (Cd62L+/Cd127+) \bar{x} =2.166%; Células T CD8+ de memoria efectora (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =0.0463%. **α -GalCer:** Células T CD8+ intermediarias (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =2.193%; Células T CD8+ efectoras (Cd62L-/Cd127-) \bar{x} =31.863%; Células T CD8+ de memoria central (Cd62L+/Cd127+) \bar{x} =21.466%; Células T CD8+ de memoria efectora (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =44.433%. **α -GalCer + E1:** Células T CD8+ intermediarias (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =5.15%; Células T CD8+ efectoras (Cd62L-/Cd127-) \bar{x} =7.506%; Células T CD8+ de memoria central (Cd62L+/Cd127+) \bar{x} =61.133%; Células T CD8+ de memoria efectora (Cd62L+/Cd127-) \bar{x} =26.2%.

El análisis de las poblaciones de memoria muestra que en los ratones inmunizados con α -GalCer + E1 y α -GalCer incrementaron las poblaciones de memoria central (CD62L+/CD127+; Figura 12-A) y memoria efectora (CD62L-/CD127+; Figura 12-B), resaltando que el mayor porcentaje de linfocitos TCM son los más altos con la inmunización de α -GalCer + E1, representando un 61.133% de los linfocitos totales; mientras que el nivel más elevado de linfocitos TEM se observa con la inoculación de α -GalCer solo, representando 44.433% de los linfocitos totales (vs. 26.2% con α -GalCer + E1).

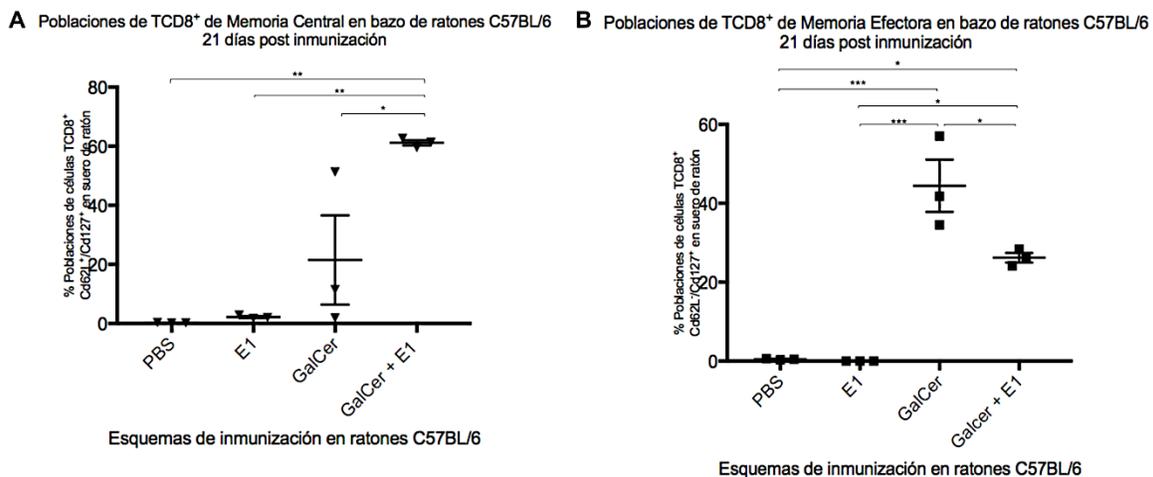


Figura 12. Cuantificación de las poblaciones de células T CD8+ de ratones C57BL/6 21 días post inmunización. **A)** Diagrama de dispersión de los porcentajes de células T CD8+ Cd62L+/Cd127+ (TCM) de bazo para los 4 grupos de ratones (n=3). Análisis estadístico; PBS vs. E1, p=0.9976; PBS vs. α -GalCer, p=0.2691; PBS vs. α -GalCer + E1, p=0.0021; E1 vs. α -GalCer, p = 0.3392; E1 vs. α -GalCer +

E1, $p=0.0025$; α -GalCer vs. α -GalCer + E1, $p=0.0250$. Significancia $p>0.05$. **B)** Diagrama de dispersión de los porcentajes de células T CD8+ Cd62L-/Cd127+ (TEM) de bazo para los 4 grupos de ratones ($n=3$). Análisis estadístico; PBS vs. E1, $p=0.9997$; PBS vs. α -GalCer, $p<0.0001$; PBS vs. α -GalCer + E1, $p=0.0029$; E1 vs. α -GalCer, $p<0.0001$; E1 vs. α -GalCer + E1, $p=0.0026$; α -GalCer vs. α -GalCer + E1, $p=0.0210$. Significancia $p>0.05$.

Se mostró un aumento significativo con los distintos tipos de inmunización en el porcentaje de poblaciones tanto de memoria efectora (hasta aproximadamente un 40%) como de memoria central (hasta aproximadamente un 60%). Específicamente, como se puede observar en la figura 12-A, en el caso del fenotipo de memoria central, se encontró que los ratones coimmunizados con α -GalCer y E1 mostraron un aumento significativo para la población de memoria central con respecto a todos los grupos de ratones. Respecto a la subpoblación de memoria efectora T CD8+, se detectó un aumento significativo en ratones inmunizados con α -GalCer solo y co-inmunizados con la proteína viral E1 con respecto a los demás grupos (Figura 12-B). En ambos casos, puede verse que el uso de α -GalCer promueve la generación de fenotipos de memoria CD8+ (Figura 12). Sin embargo, resulta interesante que el efecto de α -GalCer es mayor en TEM cuando se inocula solo, que combinado con E1, mostrando que α -GalCer estimula la generación de células de memoria sin especificidad antigénica.

11. DISCUSIÓN

El Virus del Papiloma humano es el agente etiológico del cáncer de cuello uterino, en México se posiciona como el tercer lugar en incidencia y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. A pesar de que aproximadamente el 90% de las infecciones por VPH pueden ser revertidas espontáneamente en mujeres inmunocompetentes (Rincón L., et al., 2007; Tindle R., 2002), se ha reportado que un 10 a 15% de mujeres sexualmente activas no produce una respuesta inmune eficiente contra el VPH (Stanley, et al., 2007). Se sabe que en los pacientes que revierten de manera natural la infección, una de las principales respuestas inmunes empleadas por el organismo para eliminar células infectadas es la respuesta celular mediada por linfocitos T CD8+ (Rincón, O., et al., 2007; Erazo-Luna & Velásquez-Lopera, 2019; Nicol, et al., 2005). Cuando esta respuesta no es suficientemente efectiva para eliminar estas infecciones, se ha visto que el uso de adyuvantes inmunológicos mejora dicha respuesta. Se ha demostrado que la mayoría de los adyuvantes son efectivos para potenciar una respuesta humoral que involucra anticuerpos. Sin embargo, α -GalCer es un adyuvante que promueve preferentemente una respuesta inmune T CD8+ específica de antígeno (Adotevi, et al. 2007).

Se ha reportado que α -GalCer es capaz de inducir poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria antígeno-específicos, en modelos que utilizan antígenos del virus de influenza (Guillonnet al., 2009). En particular, los autores encontraron un aumento significativo de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria central. En nuestro trabajo confirmamos la eficacia del adyuvante α -GalCer como potente estimulador de la respuesta inmune de memoria. Así, confirmamos que la presencia de un coestimulante, como lo es el fragmento de la proteína viral E1 que utilizamos, aumenta significativamente la respuesta de memoria, tanto la central como la efectora. Además, resulta interesante que nosotros observamos que la inoculación con α -GalCer sin antígeno también mostró un incremento significativo en la respuesta de memoria efectora, que no había sido previamente demostrado, lo que abre un área de interés para analizar en el futuro la implicación de esta respuesta, que probablemente en presencia de un antígeno podría favorecer la rapidez de la activación de la respuesta inmune. Por otro lado, resulta necesario demostrar la especificidad de la respuesta contra E1 en nuestro modelo.

Hallazgos de nuestro laboratorio demuestran que la inoculación con α -GalCer junto con la proteína E1 es capaz de generar células T CD8⁺ antígeno específicas en un modelo murino (Amador-Molina et al., 2019). De esta manera, en el presente estudio evaluamos los perfiles de citocinas involucradas en la generación de poblaciones de memoria, ya que no existen hallazgos que señalen si α -GalCer co-administrado con un antígeno proteico promueve citocinas que favorezcan la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ efectora a linfocitos T CD8⁺ de memoria central y memoria efectora.

Para evaluar esta hipótesis se inmunizaron ratones con PBS, E1, α -GalCer y α -GalCer + E1 y se determinaron, como primer acercamiento, los niveles séricos de IL-4, IL-7 e IL-15. Estas citocinas están involucradas principalmente en el mantenimiento y la inducción de señales antiapoptóticas. Por lo tanto, nos interesamos en conocer los perfiles de citocinas específicos para la generación de diferentes poblaciones de memoria, en un modelo murino inmunizado por α -GalCer y la proteína viral E1 (Tabla 2).

En este trabajo observamos un aumento significativo de las IL-4 e IL-7 en los ratones coimmunizados con la proteína viral E1 y α -GalCer. Es relevante mencionar que estas citocinas están clasificadas como moléculas importantes en la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria debido a su capacidad de inducir la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ de memoria, así como su mantenimiento (Ventre et al., 2012; Schluns & Lefrançois, 2003). Los resultados obtenidos en nuestros inmunoensayos indican que las citocinas IL-4 e IL-7 se encuentran aumentadas

significativamente en ratones inmunizados con la proteína E1/ α -GalCer con respecto a los demás grupos. Se observaron diferencias significativas para dos de las tres citocinas evaluadas, lo cual podemos atribuir al hecho de que todas forman parte de la familia de citocinas γc , las cuales han sido previamente reportadas como partícipes de la diferenciación de las células de memoria (Raeber, et al., 2018). Por otro lado, estas dos citocinas juegan un importante papel en la estimulación de las poblaciones de memoria de linfocitos T CD8⁺. Por ejemplo, Nanjappa et al., (2008) determinaron que la inoculación con la IL-7 durante la fase de contracción de una respuesta de células T tiene la capacidad de aumentar las concentraciones de células T de memoria viral-específicas. Mientras que la interleucina 4, producida por las células NKT, las cuales fueron directamente estimuladas por el adyuvante α -GalCer (Hill & Sarvetnick, 2002), conllevan a una diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ a un fenotipo de memoria, así como su diferenciación en células citotóxicas activas (Ventre et al., 2012).

En el caso de las interleucinas 7 y 15 se observó un aumento en las concentraciones en suero de los ratones inmunizados, aunque este aumento no fue significativo (Figura 7 y 8). Este aumento podría deberse a la capacidad estimuladora del adyuvante α -GalCer. Por otro lado, en el caso de la interleucina 4 (Figura 6) se observa un aumento significativo, en presencia del antígeno E1, que aumenta con el adyuvante. La IL-4 es una citocina que regula múltiples funciones biológicas, está involucrada en la proliferación, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares de origen hematopoyético y no hematopoyético durante una respuesta inmune normal, entre numerosas otras funciones (Zamorano, Rivas & Pérez-G, 2003).

Se pudo observar la generación de linfocitos T CD8⁺ sin especificidad antigénica, estimulados por la inoculación del adyuvante α -GalCer. En este caso cabe resaltar que se ha descrito una subpoblación de linfocitos T CD8⁺ de memoria conocidas como células innatas de memoria que podrían explicar en parte este efecto (Ventre et al., 2012).

Las células de memoria innata se definen como el linaje o fenotipo de células T de memoria, normalmente en estado latente, cuyo estado de exposición al antígeno es nulo (Jacomet et al., 2015). Estas células comparten diversas características con las células de memoria antígeno-específicas, tal como su capacidad inmediata de secreción de IFN- γ en respuesta a la activación de su TCR (Ventre et al., 2012). La generación de este fenotipo celular está impulsada por la estimulación del TCR por la respuesta a ciertas citocinas (Jameson, Lee & Hogquist, 2015). Esto puede correlacionarse con nuestros hallazgos, ya que las interleucinas evaluadas: IL-4, IL-7 e IL-15, forman parte de las

citocinas involucradas en este proceso de diferenciación para este tipo de fenotipo de memoria, especialmente de la IL-4, para la cual ya se ha reportado una subpoblación conocida como «células de memoria IL-4 inducidas» (Jameson, Lee & Hogquist, 2015). Éstas últimas, pueden ser primariamente detectadas en el timo (Lee et al., 2011), órgano linfoide del cual fueron extraídos en este trabajo, todos los linfocitos T CD8⁺ de memoria. Al haber estimulado la activación de las células iNKT, se incentivó la producción y liberación de IL-4, promoviendo este subtipo celular, correlacionando los datos obtenidos en el aumento de esta citocina (Figura 6B) y el aumento de las poblaciones de memoria en los grupos de ratones inoculados con α -GalCer solo (Figura 12 A-B).

La relevancia de la presencia de este tipo de memoria radica en que estas células poseen superioridad funcional sobre las células T CD8⁺ “naïve”, así como su potencial de respuesta aumentado para la eliminación de patógenos, a pesar de ser menos efectivas contra patógenos en comparación a las células T CD8⁺ de memoria verdaderas o antígeno-específicas (Ventre et al., 2012). Aún así, todavía el papel de esta población y sus funciones biológicas aún permanece en investigación.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de la interleucina 15, se observó una tendencia del aumento de esta citocina en los grupos de ratones inoculados con α -GalCer +E1 y α -GalCer solo. No se descarta que los niveles de esta citocina puedan ser más elevados en tiempos mas largos después del refuerzo inmunológico, debido a que es necesaria para la renovación proliferativa de las células TCD8⁺ de memoria virus-específicas (Becker et al., 2002).

Finalmente, un análisis cuantitativo de la interleucina 2 se sugiere con el fin de determinar factores de regulación negativa de la proliferación y diferenciación de las poblaciones de linfocitos TCD8⁺ de memoria, ya que se ha reportado que la interleucina-2 puede inducir muerte en las células T activadas y en las células proliferativas de fenotipo de memoria CD8⁺ (Ku, 2000). Esto podría dar un panorama más completo de los perfiles de citocinas involucradas en la generación de las poblaciones de memoria linfocitaria.

Simultáneamente, el análisis de citometría mostró un aumento significativo en las poblaciones de memoria central y efectora de linfocitos T CD8⁺ en los ratones coimmunizados con α -GalCer + E1. En el caso de los linfocitos T CD8⁺ de memoria central, se observó un aumento significativo en el grupo de ratones coimmunizados con α -GalCer + E1 además de que, al igual que con lo observado para las citocinas, con excepción de IL-4, se pudo observar una tendencia en aumento para los

distintos grupos de ratones y sus porcentajes, siendo el grupo inmunizado con la proteína E1 aquel en el que los niveles séricos de las citocinas evaluadas fueron los más bajos y los inmunizados con α -GalCer y/o la proteína E1, los más altos.

Los resultados de citometría de flujo se correlacionan con los resultados obtenidos mediante ensayos de ELISA, donde los niveles séricos de IL-4 e IL-7 están más elevados en el grupo de ratones coimmunizados con α -GalCer y E1. Esta correlación toma importancia ya que estas citocinas confieren el potencial de proliferación y diferenciación de los subconjuntos de células T CD8+ de memoria (Geginat, et al., 2003). El hecho de que los niveles de IL-7 también se encontraron aumentados en el grupo de ratones inmunizados con α -GalCer solo, indica que se logra establecer y mantener una población de células T CD8+ con memoria en ausencia de antígeno. Una de las ventajas de los TCM es su potencial proliferativo y su inmunidad protectora, la cual indica que la inducción y el mantenimiento óptimos de este subconjunto, así como el de las células T de memoria residentes en los tejidos se puede establecer y mantener en ausencia de antígeno (Wherry & Ahmed, 2004). Por lo que el aumento significativo de estas poblaciones celulares necesitaría un perfil de citocinas idóneo para lograr generar poblaciones de memoria con α -GalCer y E1, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos (Figura 12 A).

Cabe señalar que los porcentajes en las poblaciones de memoria, así como los perfiles de citocinas, pueden fluctuar drásticamente dependiendo del número de refuerzos inmunológicos, el momento en el cual se determinen estos parámetros durante el protocolo de inmunización, así como la naturaleza del antígeno y adyuvante (Remy-Ziller et al., 2013).

Por otro lado, se observó un incremento de las poblaciones de linfocitos T CD8+ con fenotipo "Cd62L⁺/Cd127⁻", también conocidas como células T CD8+ intermedias, en la citometría de los bazo de ratones inoculados únicamente con la proteína viral E1 (Figura 11-D). Esta población celular de fenotipo intermedio o transitorio (Cd62L⁺/Cd127⁻) se puede originar debido la presencia de una estimulación débil y corta del antígeno (Bachmann, et al., 2005). Sin embargo, cabe mencionar que la generación de subpoblaciones de células T CD8+ es la consecuencia de la variabilidad en la intensidad de señal, que se define como el parámetro multifactorial que afecta la activación de las células T, incluida la afinidad por el TCR-MHC y el antígeno, la concentración de antígeno y el acceso a receptores, coestimuladores y citocinas (Huster et al., 2006).

El equipo de investigación de Bachmann en 2005 propuso un modelo en el que las células T CD8+ “naïve” se diferencian en el primer encuentro con el antígeno en una etapa intermedia transitoria (Cd62L⁺/Cd127⁻). El mantenimiento de los linfocitos en este fenotipo puede deberse a la ausencia de expansión clonal periférica. Sin embargo, con una exposición al antígeno adecuada estas células se pueden diferenciar a células de fenotipo TEM, con función efectora y con gran potencial de expansión (Bachmann, et al., 2005). Dicho esto, se puede suponer que podría notarse una respuesta de memoria diferente a la observada en este trabajo si se modificara el tiempo y dosis de exposición al antígeno E1 en los ratones, tomando en cuenta que el contacto adicional con el antígeno también podría inducir a una regulación negativa de CD127, provocando que las células no desarrollen memoria de larga vida (Bachmann, et al., 2005). Todos estos factores deben ser considerados en el momento de diseñar una estrategia de inmunización.

En cuanto a los resultados que se obtuvieron para las poblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria efectora, se observó un aumento significativo en los ratones inmunizados con α -GalCer solo o coimmunizado con la proteína E1, con respecto al grupo control y al inmunizado con E1. Para este fenotipo de memoria no se observó una correlación con los niveles de citocinas evaluadas, por lo que se debería de ampliar el perfil de citocinas con el fin de determinar cuales juegan un papel importante en este fenotipo de memoria.

De manera conjunta, los resultados sugieren que el adyuvante juega un papel importante en la generación del ambiente idóneo para la generación de los linfocitos T CD8+ de memoria en presencia de E1, misma que podría proponerse como potencial blanco terapéutico, corroborando que la inoculación con α -GalCer combinado con E1 generó un perfil de citocinas distinto a aquel obtenido con E1 solo o en ratones sin inmunizaciones, lo que favoreció el aumento de poblaciones de células T CD8+ de memoria central y efectora en el modelo murino.

Nuestros resultados resultan prometedores en relación a que la proteína E1 combinada con α -GalCer podría incluirse en las formulaciones de vacunas contra VPH, no solo esperando una respuesta profiláctica contra la infección, sino también una respuesta terapéutica contra lesiones por VPH ya establecidas. Con todos los datos recopilados, se pueden proponer componentes y su posible coimmunización con el fin de generar una vacuna altamente inmunogénica, inmunoestimulante y polivalente.

12. CONCLUSIONES

12. CONCLUSIONES

La inmunización con α -GalCer + E1 promueve el aumento de IL-4 e IL-7, favoreciendo la generación diferencial de las poblaciones de memoria de linfocitos T CD8+.

El adyuvante α -GalCer juega un papel importante en la generación del ambiente idóneo para la generación diferencial de las poblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria, en coinmunización con la proteína E1, misma que podría proponerse como potencial inmunógeno para vacunas terapéuticas contra lesiones producidas por VPH.

13. PERSPECTIVAS

Como futura investigación, se propone realizar experimentos complementarios de mayor n para establecer un vínculo entre las poblaciones de memoria efectora y el entorno de citocinas, sugiriendo una n de al menos 5 ratones por grupo o un total de 30 ratones, dato que se ha reportado para experimentos en los que se lleva a cabo la evaluación de poblaciones de memoria vía *priming* a ratones C57BL/6 hembras (Obar & Lefrançois, 2010). Adicionalmente, se sugiere una evaluación de las concentraciones de citocinas proinflamatorias, así como citocinas de la familia γ c, las cuales impactan en la diferenciación de las células de memoria que no hayan sido evaluadas como IL-2 (Raeber, et al., 2018), INF- γ (Geninat et al., 2003) y TNF- α (Golubovskaya y Wu, 2016), citocinas involucradas en la generación de poblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria central. Finalmente, evaluar a la citocina IL-33, que junto con la señalización de TCR y / o IL-12 promueve la producción de IFN- γ y está involucrada en la generación de un fenotipo de memoria central (Yang et al., 2011).

Cabe mencionar que sería importante determinar si las poblaciones de memoria observadas en este trabajo corresponden a poblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria antígeno-específicos, con el fin de evaluar en su totalidad la capacidad del adyuvante y la proteína E1 en nuestro modelo. Además de sugerir una probable relación entre estas subpoblaciones y la producción de la IL-15, la cual es necesaria para la renovación proliferativa de las células T CD8+ de memoria virus-específicas (Becker et al., 2002). De este modo, se sugiere determinar los fenotipos de memoria de linfocitos T CD8+ antígeno-específico, mediante el empleo de tetrámeros diseñados para la detección de linfocitos T CD8+ E1-específicos en presencia de α -GalCer, como los empleados en grupos de trabajo de Adotevi y cols. (2007), en donde se llevó a cabo la determinación de poblaciones antígeno-específicas de linfocitos T CD8+ expuestos a diversos adyuvantes inmunológicos.

14. REFERENCIAS

- Adotevi, O., Vingert, B., Freyburger, L., Shrikant, P., Lone, Y., & Quintin-Colonna, F. et al. (2007). B Subunit of Shiga Toxin-Based Vaccines Synergize with α -Galactosylceramide to Break Tolerance against Self Antigen and Elicit Antiviral Immunity. *The Journal Of Immunology*, 179(5), 3371-3379. doi: 10.4049/jimmunol.179.5.3371
- Aguilar Rubido, J., & Leal Angulo, M. (2000). Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Elfos Scientiae*, 17, 147-160.
- Ahmed, R. and Gray, D. (1996). Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Science*, 272(5258), pp.54-60.
- Álvarez Aldana, Adalucy, Sepúlveda Arias, Juan Carlos, & Siller López, Fernando. (2012). Carcinogénesis inducida por el Virus del Papiloma Humano. *Investigaciones Andina*, 14(24), 438-456.
- Amador-Molina, A., Trejo-Moreno, C., Romero-Rodríguez, D., Sada-Ovalle, I., Pérez-Cárdenas, E., & Lamoyi, E. et al. (2019). Vaccination with human papillomavirus-18 E1 protein plus α -galactosyl-ceramide induces CD8+ cytotoxic response and impairs the growth of E1-expressing tumors. *Vaccine*, 37(9), 1219-1228. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.036
- Anaya, J., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. and Cervera, R., 2013. *Autoimmunity*. Bogota: Universidad del Rosario, pp.169-184.
- Bachmann, M., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., & Oxenius, A. (2005). Functional Properties and Lineage Relationship of CD8+ T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor α and CD62L. *The Journal Of Immunology*, 175(7), 4686-4696. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4686
- Baedyananda, F., Chaiwongkot, A., & Bhattarakosol, P. (2017). Elevated HPV16 E1 Expression Is Associated with Cervical Cancer Progression. *Intervirology*, 60(5), 171-180. doi: 10.1159/000487048
- Baumann, C., Fröhlich, A., Brunner, T., Holecska, V., Pinschewer, D., & Löhning, M. (2019). Memory CD8+ T Cell Protection From Viral Reinfection Depends on Interleukin-33 Alarmin Signals. *Frontiers In Immunology*, 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.01833
- Becker, T., Wherry, E., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., & Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 195(12), 1541-1548. doi: 10.1084/jem.20020369
- Bergvall, M., Melendy, T. and Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445(1-2), pp.35-56.
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445(1-2), 35-56.
- Berkens, C., & Ova, H. (2005). Immunotherapeutic potential for ceramide-based activators of iNKT cells. *Elsevier*, (Vol.26 No.5), 252-257.
- Bonam, S., Partidos, C., Halmuthur, S. and Muller, S., 2017. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(9), pp.771-793.
- Bonam, S., Partidos, C., Halmuthur, S., & Muller, S. (2017). An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends In Pharmacological Sciences*, 38(9), 771-793. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.002
- Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P. and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(4), pp.579-590.
- Boyman, O. (2006). Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science*, 311(5769), 1924-1927. doi: 10.1126/science.1122927
- Brunner, S., Rubner, C., Kesselring, R., Martin, M., Griesshammer, E., & Ruemmele, P. et al. (2015). Tumor-infiltrating, interleukin-33-producing effector-memory CD8+T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival. *Hepatology*, 61(6), 1957-1967. doi: 10.1002/hep.27728
- Bzhalava, D., Eklund, C., & Dillner, J. (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341-344.
- Castellanos Martínez, R., Guevara Rosales, M., Robinson Rodríguez, R., & Vázquez Ríos, L. (2000). Respuestas inmunes innata y adaptativa. *Medisan*, 4(2), 64-74.
- Castellsagué, X., Bosch, F., & Muñoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*, 89(2), 191-199. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00188-0
- Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekakalsananan, T., Kongyingoes, B., & Kleebkaow, P. et al. (2012). Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *International Journal Of Cancer*, 132(9), 2087-2094. doi: 10.1002/ijc.27906
- Chen, Y., Williams, V., Filippova, M., Filippov, V., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. *Cancers*, 6(4), 2155-2186. doi: 10.3390/cancers6042155
- Cho, B., Sim, J., Park, J., Kim, H., Yoo, W., & Lee, S. et al. (2012). Characterization of Effector Memory CD8+ T Cells in the Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis. *Journal Of Clinical Immunology*, 32(4), 709-720. doi: 10.1007/s10875-012-9674-3
- Cho, B., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H., & Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(6), 2976-2981. doi: 10.1073/pnas.96.6.2976
- Chuang, C., Monie, A., Hung, C., & Wu, T. (2010). Treatment with Imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination. *Journal Of Biomedical Science*, 17(1), 32. doi: 10.1186/1423-0127-17-32
- Collado, V., Porras, R., Cutuli, M. and Gómez-Lucía, E. (2018). The innate immune system I: its mechanisms. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), pp.1-16.
- Courtney, A., Nehete, P., Nehete, B., Thapa, P., Zhou, D., & Sastry, K. (2009). Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens. *Vaccine*, 27(25-26), 3335-3341. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.083

- Courtney, A., Nehete, P., Nehete, B., Thapa, P., Zhou, D., & Sastry, K. (2009). Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens. *Vaccine*, 27(25-26), 3335-3341. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.083
- Curiel, T. (2013). *Cancer immunotherapy* (pp. 441-442). New York, NY: Springer New York.
- Dalianis, T. (2014). Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy. *International journal of oncology*, 44(6), 1799-1805.
- Daling, J. R., Madeleine, M. M., McKnight, B., Carter, J. J., Wipf, G. C., Ashley, R., ... & Galloway, D. A. (1996). The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 5(7), 541-548.
- del Toro-Arreola, S., García-Chagollán, M. and Jave-Suárez, L. (2018). Mecanismos de escape a la respuesta inmune innata en cáncer cervicouterino asociado a VPH. *Revista de Medicina del Instituto Mexicano del Seguro Social*, pp.S194-9.
- Díaz-Benítez, C., Navarro-Fuentes, K., Flores-Sosa, J., Juárez-Díaz, J., Uribe-Salas, F., & Román-Basaure, E. et al. (2009). CD3 ζ Expression and T Cell Proliferation are Inhibited by TGF- β 1 and IL-10 in Cervical Cancer Patients. *Journal Of Clinical Immunology*, 29(4), 532-544. doi: 10.1007/s10875-009-9279-7
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, 7–15. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.006
- Enemark, E., Chen, G., Vaughn, D., Stenlund, A. and Joshua-Tor, L. (2000). Crystal Structure of the DNA Binding Domain of the Replication Initiation Protein E1 from Papillomavirus. *Molecular Cell*, 6, pp.149-158.
- Erazo-Luna, E., & Velásquez-Lopera, M. (2019). Respuesta inmunológica al virus del papiloma humano. *Dermatología Revista Mexicana*, 63(1), 50.
- Farmer, J., Packard, N. and Perelson, A. (1986). The immune system, adaptation, and machine learning. *Physica*, 22, pp.187-204.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2002; cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC- Press, Lyon, 2004. (<http://www-dep.iarc.fr/>)
- Frias Navarro, María Dolores, & Pascual Llobell, Juan, & García Pérez, José Fernando (2000). Tamaño del efecto del tratamiento y significación estadística. *Psicothema*, 12(Su2), undefined-undefined. [fecha de Consulta 27 de Noviembre de 2019]. ISSN: 0214-9915. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=727/72797056>
- Fujii, S., Shimizu, K., Hemmi, H., Fukui, M., J. Bonito, A., & Chen, G. et al. (2006). Glycolipid α -C-galactosylceramide is a distinct inducer of dendritic cell function during innate and adaptive immune responses of mice. *PNAS*, (vol. 103/no. 30), 11252–11257.
- Gaffen, S., & Liu, K. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. Elsevier, 109-123.
- Garcia-Iglesias, T., del Toro-Arreola, A., Albarran-Somoza, B., del Toro-Arreola, S., Sanchez-Hernandez, P., Ramirez-Dueñas, M., Balderas-Peña, L., Bravo-Cuellar, A., Ortiz-Lazareno, P. and Daneri-Navarro, A., 2009. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, 9(1).
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 101(11), 4260-4266. doi: 10.1182/blood-2002-11-3577
- Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers*, 8(3), 36. doi: 10.3390/cancers8030036
- Graham, S. V. (2017). Keratinocyte differentiation-dependent human papillomavirus gene regulation. *Viruses*, 9(9), 245.
- Graham, Sheila V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science*, 131(17), 2201-2221.
- Gray, D. (1993). Immunological Memory. *Annual Review of Immunology*, 11(1), pp.49-77.
- Guillonneau, C., Mintern, J. D., Hubert, F. X., Hurt, A. C., Besra, G. S., Porcelli, S., ... & Turner, S. J. (2009). Combined NKT cell activation and influenza virus vaccination boosts memory CTL generation and protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3330-3335.
- Guillonneau, C., Mintern, J., Hubert, F., Hurt, A., Besra, G., & Porcelli, S. et al. (2009). Combined NKT cell activation and influenza virus vaccination boosts memory CTL generation and protective immunity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(9), 3330-3335. doi: 10.1073/pnas.0813309106
- Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M., Diem, S., Roongapinun, S., & Lefort, J. et al. (2005). α -Galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: Role of IFN- γ . *European Journal Of Immunology*, (35), 2793–2802.
- Harty, J., Tvinnereim, A., & White, D. (2000). CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. *Annual Review Of Immunology*, 18(1), 275-308. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.275
- Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews On Cancer*, 1288(2), F55-F78. doi: 10.1016/0304-419x(96)00020-0
- Henaó-Tamayo, M., Ordway, D., Irwin, S., Shang, S., Shanley, C., & Orme, I. (2010). Phenotypic Definition of Effector and Memory T-Lymphocyte Subsets in Mice Chronically Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical And Vaccine Immunology*, 17(4), 618-625. doi: 10.1128/cvi.00368-09
- Hercend, T., & Schmidt, R. (1988). Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunology Today*, 9(10), 291-293. doi: 10.1016/0167-5699(88)91317-5
- Hidalgo-Martínez, A. (2006). El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Revista Biomed*, (17), pp.81-84.
- Hill, N., & Sarvetnick, N. (2002). Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Current Opinion In Immunology*, 14(6), 791-797. doi: 10.1016/s0952-7915(02)00403-x

- Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), 971–974. doi:10.1038/ni1004-971
- Hu, Z., Zhu, D., Wang, W., Li, W., Jia, W., & Zeng, X. et al. (2015). Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature Genetics*, 47(2), 158-163. doi: 10.1038/ng.3178
- Hung, C., Ma, B., Monie, A., Tsen, S., & Wu, T. (2008). Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opinion On Biological Therapy*, 8(4), 421-439. doi: 10.1517/14712598.8.4.421
- Huster, K., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K., Wagner, H., & Busch, D. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 101(15), 5610-5615. doi: 10.1073/pnas.0308054101
- Huster, K., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., & Busch, D. (2006). Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective *Listeria*-specific effector memory T cells. *European Journal Of Immunology*, 36(6), 1453-1464. doi: 10.1002/eji.200635874
- Huster, K., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., & Busch, D. (2006). Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective *Listeria*-specific effector memory T cells. *European Journal Of Immunology*, 36(6), 1453-1464. doi: 10.1002/eji.200635874
- IARC – International Agency for Research on Cancer. (2019). Consultado el 28 de febrero 2020, de <https://www.iarc.fr/>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2007). IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human- Human Papillomavirus, World Health Organization, ISBN 978-832-1290-4, Lyon, France.
- Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., & Desmier, D. et al. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8+KIR/NKG2A+T cells in human adults and cord blood samples. *European Journal Of Immunology*, 45(7), 1926-1933. doi: 10.1002/eji.201545539
- Jameson, S., Lee, Y., & Hogquist, K. (2015). Innate Memory T cells. *Advances In Immunology*, 173-213. doi: 10.1016/bs.ai.2014.12.001
- Kim, M., & Harty, J. (2014). Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. *Frontiers In Immunology*, 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00295
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B., Kuby, J., & Palacios Martínez, R. (2007). *Inmunología de Kuby*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Ku, C. (2000). Control of Homeostasis of CD8+ Memory T Cells by Opposing Cytokines. *Science*, 288(5466), 675-678. doi: 10.1126/science.288.5466.675
- Kurg, R. (2011). The role of E2 proteins in papillomavirus DNA replication. In *DNA Replication-Current Advances*. IntechOpen.
- L. Blauvelt, M., Khalili, M., Jaung, W., Paulsen, J., C. Anderson, A., Wilson, S., & R.Howell, A. (2008). α -S-GalCer: Synthesis and evaluation for iNKT cell stimulation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (18), 6374–6376.
- Lacruz Pelea, C. (2003). Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Revista Española De Patología*, 36(1), 5-10. Retrieved from <http://www.patologia.es/volumen36/vol36-num1/pdf%20patologia%2036-1/36-1-02.pdf>
- Laidlaw, B., Cui, W., Amezcuita, R., Gray, S., Guan, T., & Lu, Y. et al. (2015). Production of IL-10 by CD4+ regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*, 16(8), 871-879. doi: 10.1038/ni.3224
- Laing, K. Respuestas inmunitarias frente a virus. *British Society For Immunology*.
- Lee, A., Park, S., Park, C., Kang, B., Park, S., Ha, S., & Jung, K. (2015). IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLOS Pathogens*, 11(10), e1005193. doi: 10.1371/journal.ppat.1005193
- Lentz, M. R., Stevens, S. M., Raynes, J., & Elkhoury, N. (2006). A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virology journal*, 3(1), 13.
- Lewis, M. (2004). Análisis de la situación del Cáncer Cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington, D.C.: Biblioteca Sede OPS, Organización Panamericana de la Salud. pp.1-30.
- Liew, F., Pitman, N., & McInnes, I. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews*, (10), 103-110.
- Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2018). The common cytokine receptor γ chain family of cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(9), a028449.
- Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., & Contreras-Paredes, A. (2009). Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*, 4, 205-16.
- Longworth, M. S., & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2), 362-372.
- Mach, B., Dean, Y., Kosco-Vilbois, M., Elson, G., Fischer, N., & Leger, O. (2010). U.S. Patent No. 7,728,114. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Marsden, V., Kappler, J., & Marrack, P. (2006). Homeostasis of the Memory T Cell Pool. *International Archives Of Allergy And Immunology*, 139(1), 63-74. doi: 10.1159/000090000
- Martin, M. and Badovinac, V. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Martin, M., & Badovinac, V. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers In Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.02692
- Masopust, D., Ha, S., Vezys, V., & Ahmed, R. (2006). Stimulation History Dictates Memory CD8 T Cell Phenotype: Implications for Prime-Boost Vaccination. *The Journal Of Immunology*, 177(2), 831-839. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.831

- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., & Nakahara, T. et al. (2003). Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. *Journal Of Virology*, 77(19), 10186-10201. doi: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003
- Miyajima, M., Zhang, B., Sugiura, Y., Sonomura, K., Guerrini, M., & Tsutsui, Y. et al. (2017). Metabolic shift induced by systemic activation of T cells in PD-1-deficient mice perturbs brain monoamines and emotional behavior. *Nature Immunology*, 18(12), 1342-1352. doi: 10.1038/ni.3867
- Mora-García, M. and Monroy-García, A. (2018). Respuesta inmune en cáncer cervicouterino. Estrategias para el desarrollo de vacunas terapéuticas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, (vol.53, núm. 2), pp.S206-S211.
- N. Courtney, A., N. Nehete, P., P. Nehete, B., Thapa, P., Zhou, D., & Jagannadha Sastry, K. (2009). Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens. Elsevier, 3335–3341.
- Nagaraj, S., Ziske, C., Strehl, J., Messmer, D., Sauerbruch, T., & Schmidt-Wolf, I. (2006). Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo. *He Japanese Society For Immunology*, (Vol. 18, No. 8), 1279–1283.
- Nanjappa, S., Walent, J., Morre, M., & Suresh, M. (2008). Effects of IL-7 on memory CD8+ T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *Journal Of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/jci32020
- Nicol, A., Fernandes, A., & Bonecini-Almeida, M. (2005). Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection - review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1), 1-12. doi: 10.1590/s0074-02762005000100001
- Nowak, M., S. Arredouani, M., Tun-Kyi, A., Schmidt-Wolf, I., G. Sanda, M., P. Balk, S., & A. Exley, M. (2010). Defective NKT Cell Activation by CD1d+ TRAMP Prostate Tumor Cells Is Corrected by Interleukin-12 with alpha-Galactosylceramide. *Plos One*, (6).
- O'Hara, G., Welten, S., Klenerman, P. and Arens, R. (2012). Memory T cell inflation: understanding cause and effect. *Trends in Immunology*, 33(2), pp.84-90.
- Obar, J., & Lefrançois, L. (2010). Memory CD8+ T cell differentiation. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1183(1), 251-266. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05126.x
- Owen, J., Punt, J. and Stranford, S. (2014). *Inmunología de Kuby*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C., Chow, S., & Apter, D. et al. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet*, 374(9686), 301-314. doi: 10.1016/s0140-6736(09)61248-4
- Padilla-Paz, L. (2005). Human Papillomavirus Vaccine: History, Immunology, Current Status, and Future Prospects. *Clinical Obstetrics And Gynecology*, 48(1), 226-240. doi: 10.1097/01.grf.0000151585.16357.e6
- Palomo González, I. (2002). *Fundamentos de inmunología básica y clínica*. Talca, Chile: Editorial Universidad de Talca.
- Pulendran, B. and Ahmed, R. (2006). Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development. *Cell*, 124(4), pp.849-863.
- Purton, J., Martin, C., & Surh, C. (2008). Enhancing T cell memory: IL-7 as an adjuvant to boost memory T-cell generation. *Immunology And Cell Biology*, 86(5), 385-386. doi: 10.1038/icb.2008.30
- Raeber, M., Zurbuchen, Y., Impellizzeri, D., & Boyman, O. (2018). The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunological Reviews*, 283(1), 176-193. doi: 10.1111/imr.12644
- Rautela, J., & Huntington, N. (2017). IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Current Opinion In Immunology*, 44, 1-6. doi: 10.1016/j.coi.2016.10.004
- Reinherz, E., & Schlossman, S. (1980). Regulation of the Immune Response — Inducer and Suppressor T-Lymphocyte Subsets in Human Beings. *New England Journal Of Medicine*, 303(7), 370-373. doi: 10.1056/nejm198008143030704
- Remy-Ziller, C., Germain, C., Spindler, A., Hoffmann, C., Silvestre, N., & Rooke, R. et al. (2013). Immunological Characterization of a Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Expressing the Human Papillomavirus 16 E1 Protein. *Clinical And Vaccine Immunology*, 21(2), 147-155 pp.147-155. doi: 10.1128/cvi.00678-13
- Rincón, O., Pareja, L., Jaramillo, S. and Aristizábal, B., 2007. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 58(3), pp.202-212.
- Rubido, J. C. A., & Angulo, M. D. J. L. (2000). Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada*, 17(3), 147-160.
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review Of Immunology*, 22(1), 745-763. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J. and Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista de Medicina Instituto Mexicano del Seguro Social*, pp.S166-71.
- Sasagawa, T., Takagi, H., & Makinoda, S. (2012). Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(6), 807–815. doi:10.1007/s10156-012-0485-5
- Schijns, V. and O'Hagan, D., 2017. *Immunopotentiators In Modern Vaccines*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, pp.149-162.
- Schluns, K., & Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews*, (Vol. 3), 269-279.
- Secretaría de Salud de México. *Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios. Vacunas autorizadas en México*; 2008. Disponible en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cofepris/inf/vacunas/VacunasRegistradas.htm>

- Serman, F. (2002). Cancer cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del Virus Papiloma humano: Perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena De Obstetricia Y Ginecología*, 67(4). doi: 10.4067/s0717-75262002000400011
- Serman, F. (2002). Cáncer cervicouterino: Epidemiología, Historia natural y rol del virus del Papiloma Humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia Ginecología*, (67(4), pp.318-323.
- Slifka, M. and Whitton, J. (2000). Activated and Memory CD8+ T Cells Can Be Distinguished by Their Cytokine Profiles and Phenotypic Markers. *The Journal of Immunology*, 164(1), pp.208-216.
- Stanley, M., Pett, M., & Coleman, N. (2007). HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1456-1460. doi: 10.1042/bst0351456
- Sverdrup, F. and Khan, S. (1993). Replication of Human Papillomavirus (HPV) DNAs Supported by the HPV Type 18 E1 and E2 Proteins. *Journal of Virology*, 68(1), pp.P. 505-509.
- Tan, J., Ernst, B., Kieper, W., LeRoy, E., Sprent, J., & Surh, C. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype CD8+ Cells but Are Not Required for Memory Phenotype CD4+ Cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 195(12), 1523-1532. doi: 10.1084/jem.20020066
- Taniguchi, M., Tashiro, T., Dashtsoodol, N., Hongo, N., & Watarai, H. (2009). The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *The Japanese Society For Immunology*, (Vol. 22, No. 1), 1–6.
- Tindle, R. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 59-64. doi: 10.1038/nrc700
- Van Kaer, L. (2005). α -galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nature Review Immunology*, (5), 31-42.
- Ventre, E., Brinza, L., Schicklin, S., Mafille, J., Coupet, C., & Marçais, A. et al. (2012). Negative Regulation of NKG2D Expression by IL-4 in Memory CD8 T Cells. *The Journal Of Immunology*, 189(7), 3480-3489. doi: 10.4049/jimmunol.1102954
- Vesely, M., Kershaw, M., Schreiber, R., & Smyth, M. (2018). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *The Annual Review Of Immunology*, (29), 235-271.
- Vici, P., Mariani, L., Pizzuti, L., Sergi, D., Di Lauro, L., & Vizza, E. et al. (2014). Immunologic treatments for precancerous lesions and uterine cervical cancer. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 29. doi: 10.1186/1756-9966-33-29
- Villarreal, D. O., Svoronos, N., Wise, M. C., Walters, J. N., Morrow, M., & Weiner, D. B. (2014). 192. Cytokine, 70(1), 74. doi:10.1016/j.cyto.2014.07.199
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., & Melsheimer, P. et al. (2008). Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research*, 68(1), 307-313. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2754
- Waggoner, S. (2003). Cervical cancer. *The Lancet*, (361: 2217–25), pp.2217-2225.
- Weninger, W., Manjunath, N. and von Andrian, U. (2002). Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 186(1), pp.221-233.
- Weninger, W., Manjunath, N., & von Andrian, U. (2002). Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 186(1), 221-233. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18618.x
- Wherry, E., & Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *Journal Of Virology*, 78(11), 5535-5545. doi: 10.1128/jvi.78.11.5535-5545.2004
- Wherry, E., Barber, D., Kaech, S., Blattman, J. and Ahmed, R. (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), pp.16004-16009.
- Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A., & Callan, M. (2005). Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *The Journal Of Immunology*, 175(9), 5895-5903. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.5895
- Wilson, V., West, M., Woytek, K. and Rangasamy, D. (2002). Papillomavirus E1 proteins: Form, Function, and Features. *Virus Genes*, 24(3), pp.275-290.
- Xu L, Selk A, Garland SM, Bogliatto F, Kyrgiou M, Weyers S, Arbyn M. (2019). Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent vulvar and vaginal cancer and their precursors. *Expert Rev Vaccines*, 18(11),1157-1166. doi: 10.1080/14760584.2019.1692658.
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., & Turnquist, H. et al. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+T cells. *European Journal Of Immunology*, 41(11), 3351-3360. doi: 10.1002/eji.201141629
- Yewdell, J., & Del Val, M. (2004). Immunodominance in TCD8+ Responses to Viruses. *Immunity*, 21(2), 149-153. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.015
- Yoshimatsu Y, Nakahara T, Tanaka K et al (2017) Roles of the PDZ-binding motif of HPV 16 E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. *Cancer Sci* 108:1303–1309. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80035-0>
- Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M. and Vega Malagón, G. (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, (77(4), pp.315-321.
- Zamorano, J., Rivas, M., & Pérez-G, M. (2003). Revisión; Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunología*, 22(2), 215-224.
- Zhang, N., & Bevan, M. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2), 161-168. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010
- Zinkernagel, R., Bachmann, M., Kündig, T., Oehen, S., Pirchet, H. and Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.*, 14, pp.333-67.

15. ANEXOS

• PUBLICACIONES

Alfredo, A., Gonzalez-Telona, A., & Lizano, M. (2019). The inoculation of α -Galactosylceramide and HPV18-E1 protein promote a cytokines profile involved in the generation of central memory CD8 + T cells. *The Journal Of Immunology*, 202(1 Supplement), 196.26. Retrieved from https://www.jimmunol.org/content/202/1_Supplement/196.26

• RECONOCIMIENTOS



AMIINSHAE

La Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, A.C.

Otorga el presente reconocimiento a:

Gonzalez-Telona Ana Daniela, Amador-Molina Alfredo, Lizano-Soberón Marcela

por su participación con el trabajo

-galactosilceramida induce un perfil de citocinas involucradas en la generación de linfocitos TCD8+ de memoria

en el 4to. Congreso de la AMIINSHAE, llevado a cabo los días 8 y 9 de noviembre de 2018 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez
Presidencia Colegiada

M. en C. María del Carmen Parra Cid
Representante del Comité Organizador



La Sección Estudiantil de Divulgación de Inmunología de la Facultad de Ciencias

OTORGA
la presente

CONSTANCIA

a

Ana Daniela González Telona

Por haber obtenido el **1er lugar** de la categoría experimental en el concurso de carteles del I COLOQUIO DE INMUNOBIOLOGÍA de la Facultad de Ciencias con el trabajo

Efecto de alfa-galactosilceramida y la proteína VPH18-E1 en el ambiente de citocinas involucradas en la generación de linfocitos TCD8+ de memoria, en un modelo murino

Dr. Rogelio Hernández Pando
Presidente de la Sociedad Mexicana de Inmunología A.C.

Juan Francisco Duarte Campos
Comité Organizador

Ciudad Universitaria
11 de noviembre de 2019



La Sociedad Mexicana de Virología y la Asociación Mexicana de Bioseguridad otorgan la presente

CONSTANCIA

a GONZALEZ-TELONA ANA DANIELA, Amador-Molina Alfredo, Lizano-Soberón Marcela . por su valiosa exposición del trabajo libre en PRESENTACIÓN ORAL intitulado Effect of alpha-galactosylceramide and HPV18-E1 protein in the environment of cytokines involved in the generation of memory TCD8 + lymphocytes, in a murine model presentado en el XI CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA que tuvo lugar del 4 al 7 de septiembre de 2019 en los Espacios Magnos de la Universidad de Guanajuato. Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México, a 7 de septiembre de 2019.

Dr. Ramón González García Conde
Presidente
Sociedad Mexicana de Virología AC
Folio: XICNV-CONF13



QFB Lissete Valenzuela Fabris
Presidenta
Asociación Mexicana de Bioseguridad AC

5a REUNIÓN ANUAL DEL COLEGIO MEXICANO PARA LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA
ANA DANIELA GONZALEZ TELONA
MIEMBRO: 271365
Por la presentación del Trabajo:
Efecto de α-galactosilceramida y/o la proteína E1 de VPH18 en el ambiente de citocinas involucradas en la generación de linfocitos T CD8+ de memoria en un modelo murino
En la 5ª Reunión Anual del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer realizado en la H. Puebla de Zaragoza del 26 al 29 de Septiembre del 2018
Dr. Abelardo Menezes García
Dr. Eulalio Morales Palacios
Logos: Instituto Nacional de Cancerología, C-MiC, BUAP.