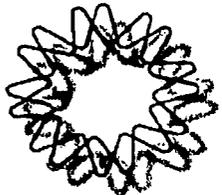


00551
7



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE LINFOCITOS T COOPERADORES INDUCIDOS
DURANTE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN UN MODELO DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

EDGAR ERNESTO ESQUIVEL SOTO

DIRECTOR DE TESIS Dr. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

CUERNAVACA, MORELOS
AGOSTO DEL 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Quiero compartir este trabajo con quienes compartí estos últimos años, espero poder volver a saber de ustedes...

INSP: Dr. Esquivel (Excelente Tutor y Bro...) y Dra. Lourdes Gutiérrez (Bro...), Adolfo y Humberto (Chino I), Óscar (Bro...) y Claudia, Chucho (Bro...), Karla (Contreras, Bro...), Verónica (Bro...), Dr. Ramos, Rosi y Ángel, Dr. Conde, Don Carlos, Dr. Fernando (Bioterio), Gina (Cafetería), Cesar infante y Galileo (Bro... 's), Atala (Bro...), Karla (Aguas) y Raúl (Bro...).

IBT: Georgina Hernández, Antonio Serrato (Bro...), Ingeniero, Abel, Alma Martínez (Súper Bro...), José Manuel, Deyanira Fuentes, Fernando ("Fer" Bro...), Vanesa (Bro...), Sandino (Bro...), Pedro Romero (Bro...), Dr. Ernesto Méndez (Bro...), Dr. Arias (Bro...), Montserrat (Bro...), Mario y Rayo (Tocayo; Bro... 's), Roxana del Río (Bro...), José luís (Bro...), Nora Fierro, Erika, Dra. Rosenstein (Bro...), Dra. Laura Palomares, Miranda Gonzáles, Alina Menéndez (Bro...) y a todos los brother's con quienes haya compartido algún alipus.

CIQ: Iris Cristina (Bro...), Nancy Arias (Bro...), Ana (Bro...), Oscar (Chino; Bro...), Dra. Santana (Bro...), Ana laura, Mery, Mayte (Bro...), Humberto, Sandra DÍmas, (Bro...), Dra. Narváez (Bro...), Ricardo, Patí, Lupita, Dra. Lorena (Bro...) y Dr. Ismael.

OTROS: Todos son brother's: Ángeles Morales, Dr. Vianney Ortiz, Dr. Lazlo, Dr. Blanco, Dr. Luis Padilla, Dr. Constantino, Alex Estrada y los Compás, Dr. Castañeda e hijos, Cintia y Omar (Topo) Dr. Gregorio, Lucía Ocaña, Antonio Ortega, Fernando Peralta, Raúl Balderas, Jorje Trinidad, Janet Pacheco, Fernando (gordo) y Edgar.

Dedico esta obra a mis hermanos: Maria Isabel, Demetrio Emilio y José René.

Uno para todos y todos para uno.

A mi madre: Maria Isabel Soto Robles.

Gracias a ti tengo la paz de Cristo.

A todos gracias.

Edgar Ernesto
Esquivel Soto
12 Septiembre 2003
E. Soto

Agradecimiento por el invaluable apoyo académico al doctor Fernando Esquivel Guadarrama cuya entrega con la docencia y la excelencia en investigación es admirable y a los doctores Angélica Santana, Verónica Narvaez, Carlos Arias, Ernesto Mendez, Jesús Martínez, Lourdez Gutierrez X., Susana López y Martha Argüello. También debo agradecer a los técnicos Pedro Romero y Fernando Gonzalez (maestros en docencia). A los integrantes de la unidad de cómputo M.C. José Ricardo Ciria Merce, Lic. Alma Lidia Martínez Valle y M.C. Juan Manuel Hurtado Ramírez, quienes con su trabajo me apoyaron en todo momento para realizar este proyecto. Por último, agradezco a la Dra. Mata y al Dr. Fernando Hernández todas las facilidades que me brindaron con los ratones de experimentación.

RESUMEN

La infección por rotavirus en infantes humanos ocasiona grandes gastos económicos por concepto de hospitalización y atención médica a nivel mundial. Existe un gran interés por desarrollar una vacuna que proteja contra, por lo menos, 5 serotipos G y 2 serotipos P de rotavirus humanos de importancia clínica. Aunque se ha demostrado que tanto las células T citotóxicas (Tc) como los anticuerpos IgA intestinales son elementos importantes en protección contra la infección por rotavirus, las células T cooperadoras (Th) también juegan un papel central en la eficiente inducción de ambos elementos, asimismo estas células pueden ejercer funciones efectoras directas que coadyuvan a la limpieza de la infección. El objetivo de este trabajo fue el de analizar el repertorio de linfocitos Th generados durante la infección por rotavirus en un modelo de ratón adulto infectado con el rotavirus murino EDIMwt. Primeramente, se determinó la cinética de activación de los linfocitos T y B activados en ganglio linfático mesentérico (GLM) a lo largo de la infección. Se encontró que la activación de los linfocitos Th en GLM precedió a la de los Tc y B. Para determinar el repertorio de células Th contra rotavirus inducidas en la respuesta inmune primaria, se generaron hibridomas de linfocitos procedentes de GLM al día 5 post-infección, día en el que las células Th fueron más abundantes y representaron más del 60 % de la población total. De los 14 hibridomas Th obtenidos ninguno presentó especificidad contra rotavirus cuando se evaluó la respuesta antígeno-específica mediante ensayos de secreción de IL-2. La especificidad de la respuesta secundaria Th contra antígenos de rotavirus se intentó analizar a través de ensayos de proliferación *in vitro*. Tampoco se observó una respuesta proliferativa rotavirus específica en las células Th provenientes de GLM de ratones infectados, no obstante, si hubo una potente respuesta en presencia de Con-A. Asimismo, bajo las mismas condiciones de cultivo, se detectó en la respuesta secundaria contra rotavirus, que linfocitos Th de GLM incrementaron los niveles de mRNA para las citocinas IL-5 y TGF- β . Por lo anterior, es claro que los GLM provenientes de ratones infectados tienen células Th de memoria contra rotavirus que pueden ser estimuladas *in vitro* con antígeno para producir citocinas de manera específica, sin embargo, esta activación no puede ser evaluada a través de proliferación celular. Esto nos sugiere que en la infección por rotavirus las células Th de mucosas responden regulando la respuesta inmune pero con una proliferación limitada.

ABREVIATURAS

BE	Buffer de enlace
β 2-m	Beta 2-microglobulina
CD	Células dendríticas
CIE	Células intra-epiteliales
CLIP	Péptido clase II asociado a la cadena invariable
CPA's	Células presentadoras de antígeno
CPM	Cuentas por minuto
CPR-2	Suero fetal bovino de baja proliferación
DO	Densidad óptica
EDTA	Ac. Etilendiamino tetracético
EDIMwt	Rotavirus productor de diarrea transitoria en el ratón
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GLM	Ganglio linfático mesentérico
HA	Hemaglutinina de influenza
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina- N-2-etanosulfónico
HLA	Antígeno leucocitario humano
Hsc	Proteína de choque térmico
H-Tdr	Timidina triatada
I E	Índice de estimulación
IgAint	IgA's intestinales
Ii	Cadena invariante
IL's	Interleucinas
i.n.	intra-nasal
INF- γ	Interferón gama
i.p.	intra-peritoneal
kDa	Kílo daltones
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacáridos
MAC'S	Sorteador celular magnético

MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
Mc	Macrófago
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIIC	Compartimiento MHC clase II
mRNA	ARN mensajero
MTT	(3-[4, 5-Dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)
NK	Células asesinas naturales
NP	Nucleoproteína de influenza
NSP	Proteína no estructural
PP	Placas de Peyer
pIgR	Receptor polimérico de inmunoglobulinas
RE	Reticulo endoplásmico
RNA _{dc}	ARN de doble cadena
SCID	Ratones con inmuno-deficiencia severa
SFB	Suero fetal bovino
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos T cooperadores
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor necrosante tumoral
Uff	Unidades formadoras de focos infecciosos
VP	Proteína viral
2-ME	2-Mercaptoetanol

INDICE

I INTRODUCCIÓN	1
Los rotavirus	1
1.- Importancia	1
2.- Estructura y propiedades biológicas de la partícula viral	2
3.- Patogénesis y ciclo replicativo	4
4.- Clasificación y epidemiología	5
Respuesta Inmune	6
1.- Generalidades	6
2.- Respuesta de células T	9
2.1.- Receptor de las células T	9
2.2.- Estructura y función del MHC	10
2.3.- Procesamiento y presentación de antígeno	12
2.4.- Maduración tímica y repertorio de células T	15
Inmunidad de Mucosas	16
Inmunidad Anti-Rotavirus	20
1.- Antecedentes	20
2.- Respuesta de células B anti-rotavirus	20
3.- Respuesta de células T citotóxicas (Tc)	22
4.- Respuesta de células T cooperadoras (Th)	22
II JUSTIFICACIÓN	25
III HIPÓTESIS	26
IV OBJETIVOS	27
1.- OBJETIVO GENERAL	27
2.- OBJETIVOS PARTICULARES	27

V MATERIALES Y MÉTODOS	28
1.- Cultivo celular	28
1.2.- Medios de cultivo	28
1.3.- Líneas celulares	28
1.4.- Cultivo de células adherentes	29
1.5.- Cultivo de células no adherentes	30
1.6.- Fuente de IL-2	30
2.- Virus	30
2.1.- Propagación de rotavirus <i>in vivo</i>	30
2.2.- Propagación de rotavirus <i>in vitro</i>	31
2.3.- Semi-purificación de rotavirus	31
2.4.- Determinación de proteína viral	32
2.5.- Determinación de la infectividad de rotavirus	32
2.6.- Tratamiento del virus con luz ultravioleta	33
3.- Proteínas	33
3.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	33
3.2.- Obtención de proteínas recombinantes	34
4.- Ratones e inmunizaciones	35
5.- Detección de rotavirus e IgA anti-rotavirus en heces	35
6.- Citofluorometría	36
7.- Generación de hibridomas de células Th	38
8.- Ensayos de estimulación antigénica	39
8.1.- Estimulación antigénica de hibridomas Th	39
8.2.- Estimulación antigénica de células totales de GLM	40
8.3.- Estimulación antigénica en linfocitos Th	40
9.- Purificación de células Th	41
10.- Tratamiento de células de bazo con Mitomicina –C	42
11.- Determinación de los niveles de RNAm para diferentes citocinas por medio de ensayos de RT-PCR	42
11.1.- Obtención del RNA total	42
11.2.- Diseño y Síntesis de Primers	43

11.3.- Transcripción reversa (RT)	43
11.4.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
11.5.- Cuantificación de las bandas obtenidas de los ensayos de PCR	45
VI RESULTADOS	46
1.- Modelo murino de infección por rotavirus	46
2.- Respuesta antígeno específica <i>in vivo</i> de linfocitos provenientes de GLM durante la infección por rotavirus	48
3.- Generación de hibridomas de células Th primarias específicas para rotavirus provenientes de GLM de ratones infectados	51
4.- Respuesta proliferativa secundaria <i>in vitro</i> de células Th	57
a) Montaje de las condiciones de proliferación celular	57
b) Proliferación de células de GLM contra antígenos de rotavirus	58
c) Proliferación de células Th purificadas contra los antígenos de rotavirus	64
5.- Análisis de la respuesta secundaria <i>in vitro</i> de células Th a través de los niveles de mensaje para diferentes citocinas	67
VII DISCUSIÓN	69
VIII CONCLUSIONES	78
IX PERSPECTIVAS	79
X BIBLIOGRAFÍA	80

I INTRODUCCIÓN

Los rotavirus

1.- Importancia

En diversos estudios epidemiológicos se ha identificado a la infección por rotavirus como la gastroenteritis más común en infantes humanos y neonatos de varias especies de mamíferos y aves (Kapikian y Chanock, 1996; Valdespino et al., 1994). En los humanos, el 20 % de todas las infecciones gastrointestinales que se reportan tienen etiología rotaviral. Esta enfermedad se presenta principalmente en infantes de 6 meses a 2 años de edad y cuando se manifiesta clínicamente aparece como una infección diarreica deshidratante, que produce en el mundo alrededor de 800,000 muertes anuales (Kapikian y Chanock, 1996).

Existe una marcada diferencia en el porcentaje de muertes infantiles provocadas por los rotavirus entre países en vías de desarrollo y desarrollados (Huilan et al., 1991). Es importante señalar que la tasa de infección en ambos tipos de países es muy similar, lo que sugiere muy probablemente que la susceptibilidad a la enfermedad es cosmopolita e independiente de las condiciones de vida (Estes, 1996). Por otro lado, la disparidad en la mortalidad infantil revela la importancia de contar con una atención médica temprana, así como la de administrar soluciones rehidratantes orales o intravenosas, en los casos clínicos que cursen con deshidratación. Sin embargo, el monto de estos tratamientos no es costeable en la mayoría de los países. Estados Unidos, por ejemplo: gasta más de un billón de dólares anuales en atención hospitalaria por deshidratación (Avendano et al., 1993). En la actualidad no se dispone de un tratamiento específico para combatir la enfermedad, ni se cuenta con una vacuna efectiva que prevenga la infección ó al menos disminuya de manera importante la severidad de la diarrea. Todo lo anterior, hace indispensable avanzar en el estudio de la infección por rotavirus en el aspecto básico y, en particular, es necesario esclarecer las interacciones de este virus con el sistema inmunológico, de tal manera que se obtengan las bases experimentales para la producción de una vacuna eficiente, económica y capaz de brindar protección a toda la población.

2.- Estructura y propiedades biológicas de la partícula viral

A 30 años de la identificación de los rotavirus en biopsias intestinales humanas (Bishop et al., 1973), se ha generado una gran cantidad de información sobre las propiedades biológicas, bioquímicas e inmunogénicas de estos virus (Estes, 1996). El cultivo *in vitro* de los rotavirus de cepas animales y humanas, la clonación del genoma rotaviral completo, la expresión por separado de las diferentes proteínas virales en sistemas de vectores recombinantes (Both, Bellamy y Mitchell, 1994) y el uso de modelos experimentales animales, han proveído un conocimiento detallado sobre la estructura y función de la partícula viral.

Con técnicas como la crio-microscopía electrónica y la reconstrucción de imágenes por computadora, se ha determinado que la partícula infectante completa o virión tiene una geometría icosaédrica con un diámetro aproximado de 75 nm (Prasad et al., 1988). Asimismo, se determinó que los rotavirus están conformados por tres capas proteicas concéntricas (Figura-1-). La capa más interna ó cápside está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 (del inglés "Viral Protein") (102 kDa). Esta capa engloba tanto al genoma viral, constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), como a dos proteínas de la maquinaria replicativa; VP1 (125 kDa) que es la polimerasa viral y VP3 (88 kDa) que es una guanilil-transferasa (Prasad et al., 1996). La capa intermedia está constituida en su totalidad por 260 trímeros de VP6 (45 kDa), ésta es la proteína más conservada, inmunogénica y abundante del virión. VP6 constituye el 51% de la masa total y contiene determinantes antigénicos conservados en todas las cepas conocidas de rotavirus. La capa más externa del virión esta formada por 260 trímeros de la glico-proteína VP7 (37 kDa). Sobre esta capa emergen a manera de espículas 60 dímeros de 10-12 nm de longitud, compuestos por la proteína VP4 (86 kDa) (Shaw 1993).

Análisis funcionales en VP4 determinaron que en presencia de tripsina, la proteína es cortada específicamente en los aminoácidos 231, 241 y 247, con ello la infectividad del virus se incrementa hasta mil veces. El extremo carboxi-terminal de VP4 genera a VP5 (60 kDa) y el extremo amino-terminal a VP8 (28 kDa), (López et al., 1986; Crawford et al.,

2001). Ambas proteínas muy probablemente están involucradas directamente en el ingreso del virión a la célula blanco. Además, los determinantes antigénicos (epítomos) contenidos en las proteínas VP7 y VP4 (VP5 y VP8), son los únicos antígenos blanco de anticuerpos neutralizantes (Johansen y Svensson, 1997).

De los 11 segmentos génicos que conforman al genoma sólo 5 segmentos codifican para 6 proteínas que se encuentran involucradas principalmente en la replicación y morfogénesis rotaviral dentro de la célula blanco y no en la estructura proteica del virión. Se les enumera del 1 al 6 y designa por convención con el prefijo NSP (del inglés "Non Structural Protein") (Estes y Cohen, 1989). Es interesante destacar que el segmento génico 11 tiene dos marcos abiertos de lectura, que codifican para dos NSP's diferentes (Mattion et al., 1991).

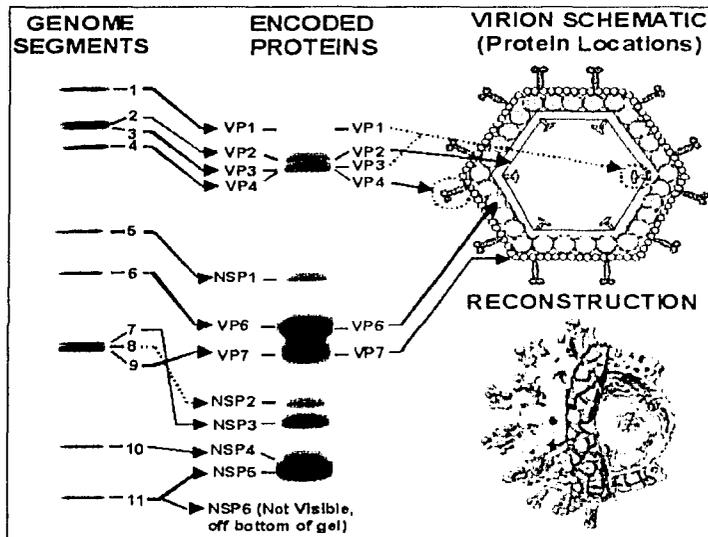


Figura-1.- Estructura del rotavirus (Estes, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.- Patogénesis y ciclo replicativo

La principal vía de transmisión de los rotavirus es la fecal-oral. La infección se lleva a cabo en los enterocitos maduros localizados en las puntas de las micro vellosidades intestinales, sin embargo, en estados de inmunodepresión severa puede penetrar e infectar otro tipo de tejidos en el organismo (Estes et al., 1991). En el duodeno se produce el corte proteolítico de VP4 con tripsina (enzima pancreática), evento indispensable para el proceso infeccioso. Se sabe que algunas cepas de rotavirus de origen animal dependen de la interacción de VP8 con residuos de ácido siálico de la superficie celular para iniciar una infección productiva. Sin embargo, este evento es sólo el principio ya que actualmente se ha demostrado que las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha V\beta 3$, y más recientemente la Hsc70 (del inglés "heath shock cognate"), están involucradas en la adsorción y/o penetración del rotavirus (Guerrero et al., 2002; Arias et al., 2002). Por otro lado, en el caso de rotavirus humanos la interacción inicial de VP8 con ácido siálico no es necesaria, ya que aparentemente la primera interacción se da con algún otro receptor, probablemente a través de VP5 (Zarate et al., 2000).

Durante la penetración a la célula blanco se desprende la capa más externa del virión, la exposición en el citoplasma de la partícula de dos capas proteicas activa a la RNA polimerasa dependiente del RNA viral y forma los transcritos de mRNA. Estos transcritos pueden ser traducidos en proteínas virales o servir como moldes para la replicación del genoma en estructuras presentes en las células infectadas llamadas viroplasmos. En los viroplasmos se lleva a cabo la morfogénesis y el ensamblaje de partículas intermedias constituidas por VP2 y VP6 englobando a los 11 segmentos del genoma asociados a VP1 y VP3. En estos eventos las NSP's 1, 2, 5 y 6 juegan un papel determinante (Estes, 1996). Para completar la maduración del virión, la partícula viral es translocada al lumen del RE por medio de la interacción de VP6 con el dominio citosólico de NSP4, proteína viral transmembranal residente del retículo endoplásmico (RE). En este paso hacia el interior del RE los rotavirus obtienen una membrana lipídica transitoria (la cual se pierde a los pocos minutos) y la tercera capa proteica constituida por VP7 y VP4, las cuales se encuentran residentes en el RE. Sin embargo, el mecanismo de incorporación de VP4 a la partícula viral es menos claro, se sugiere que esta se incorpora de su estado soluble en citosol justo

en el proceso de translocación (Suzuki, 1996). Finalmente, en estadios tardíos de la infección, los viriones son liberados al lumen intestinal por citólisis. El ciclo replicativo completo dura alrededor de ocho horas.

Aunque se han propuesto varios mecanismos fisio-patológicos que expliquen la producción de diarrea en la infección por rotavirus, aún se desconoce el mecanismo completo *in vivo*. Los principales mecanismos productores de diarrea conocidos a la fecha son por un lado, la destrucción celular masiva, imposibilitando la eficiente absorción de agua, y la secreción intestinal de Cl₂, producida muy probablemente por factores viro-tóxicos; como es el caso de la proteína rotaviral NSP4. Esta proteína es la primera enterotoxina viral reportada, ya que se ha demostrado que induce diarrea en ratones neonatos (Estes y Morris, 1999). También muy recientemente ha sido propuesta la participación del sistema nervioso entérico como otro de los factores que inducen la secreción de Cl₂. Probablemente activado por proteínas virales entre las cuales NSP4 pudiera estar jugando un papel importante (Lundgren et al., 2000).

4.- Clasificación y epidemiología

Los estudios sobre la clasificación de los rotavirus se fundamentaron en la identificación de determinantes antigénicos en VP6 capaces de producir una respuesta inmune humoral distinta entre diferentes cepas de rotavirus. A partir de estas diferencias serológicas se dividió a los rotavirus en 7 grupos a saber (A-G) siendo el grupo A el de mayor importancia clínica (Matsui et al., 1990; Estes y Graham, 1985). Asimismo, se describieron los epítomos I y II. Los cuales subdividen a los rotavirus del grupo A en 4 subgrupos I, II, I/II y no I/II (López et al., 1994). Como se mencionó anteriormente, la capa externa del virión está conformada por VP7 y VP4, y cada una de estas proteínas es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que la especificidad de serotipo tiene una doble clasificación. Se clasifica "G" (por glicoproteína) a los serotipos dependientes de VP7 y "P" (por proteína sensible a proteasa) a los serotipos que dependen de VP4 (Kapikian, 1996). Sin embargo, en los ensayos de neutralización la reactividad predominante es contra los determinantes antigénicos de VP7.

Ensayos posteriores con sueros hiper inmunes y anticuerpos monoclonales han establecido a la fecha 14 serotipos G, de los cuales 9 son capaces de infectar a seres humano y sólo 5 serotipos humanos (G1 a G4 y G9) tienen relevancia epidemiológica (Menchaca et al., 1998). Además, se han podido identificar 7 serotipos y 2 subtipos de VP4 en muestras de heces humanas, de los cuales P1A, P1B, y P2 tienen relevancia epidemiológica en el humano (Okada, 2000; Gorrell y Bishop, 1999).

Respuesta Inmune

1.- Generalidades

Durante la evolución han prevalecido dos mecanismos de defensa contra agentes patógenos: la inmunidad innata ó natural y la inmunidad adquirida ó específica. La filogenia de la primera es muy antigua y algunos elementos están presentes desde los primeros organismos multi-celulares, mientras la última aparece sólo en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Paul, 1998; Thompson, 1995). En los mamíferos se ha desarrollado un sistema inmune altamente complejo que integra a ambos tipos de inmunidad, facultado para distinguir lo propio de lo no propio y responder sólo ante esto último (Paul, 1998).

Si bien, tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida reconocen patógenos de manera específica, los mecanismos moleculares de reconocimiento antigénico difieren sustancialmente entre ambas clases de inmunidad (Zinkernagel, 2000). El sistema inmune innato se caracteriza por respuestas relativamente rápidas que no generan memoria inmunológica y está compuesto por una gran variedad de estirpes celulares que incluyen a las células dendríticas (CD), macrófagos (Mc), neutrófilos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK; del inglés "Natural Killer"), entre otras. La principal función de estas células es el reconocimiento y destrucción de agentes extraños al organismo y potencialmente patogénicos, a través de mecanismos efectores directos y/o de la generación de señales de alarma (como quimiocinas y citocinas) (Teixeira, Almeida y Gazzinelli, 2002) que coadyuvan con la generación de una respuesta inmune adquirida.

El reconocimiento de estos agentes extraños se da a través de receptores de membrana y factores solubles que usualmente reconocen estructuras compuestas por carbohidratos. Aparte de los receptores de alta afinidad hacia carbohidratos, los Mc expresan, entre otras proteínas, a los TLR's (del inglés "Toll-Like Receptor") que son receptores altamente conservados durante la evolución que reconocen estructuras como lipopolisacáridos (LPS) y ácidos nucleicos (Adeem y Ulevitch, 2000).

La respuesta inmune adquirida está constituida por los linfocitos B y T, y a diferencia de las células del sistema inmune innato, los linfocitos reconocen patógenos a través de receptores de membrana con alta especificidad hacia el antígeno. Esto se da por la capacidad de las células B y T de generar clonas antígeno específicas capaces de reconocer de 1×10^{10} a 1×10^{11} estructuras moleculares potencialmente antigénicas. La respuesta inmune adquirida es capaz de generar memoria inmunológica de larga duración, que se reactiva al estimularse con el antígeno original. De hecho, esta característica es la base de la generación de vacunas.

Las células B vírgenes reconocen antígeno a través de su receptor de membrana que, es una inmunoglobulina IgM. Una vez activadas por el antígeno, estas se diferencian a células plasmáticas, que son las células encargadas de secretar las inmunoglobulinas solubles a las mucosas o al torrente sanguíneo. En respuestas secundarias cambia el isotipo de las inmunoglobulinas de IgM a IgG ó IgE a nivel sistémico ó IgA en mucosas. El receptor de las células B reconocen a los antígenos tanto solubles como insolubles de manera directa, estos antígenos pueden ser tanto carbohidratos, proteínas, lípidos ó grupos químicos simples. Funcionalmente, el principal papel de las inmunoglobulinas es el de neutralizar microorganismos patógenos y toxinas que invaden al organismo, sin embargo, también los anticuerpos no neutralizantes juegan un papel importante en la eliminación de los patógenos ya que son capaces de opsonizarlos para que puedan ser fagocitados por los Mc vía sus receptores Fc.

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) ($CD4^-$; $CD8^+$) reconocen antígeno en forma de péptidos de 8 a 9 aminoácidos, derivados de la degradación de proteínas antigénicas en el citosol celular, en asociación con las moléculas del MHC (del inglés "Major Histocompatibility Complex") clase I expresados en la superficie celular (Yewdell y Bennink, 1992). La principal función de las células Tc es el reconocimiento y eliminación de células infectadas con virus a través de citotoxicidad directa mediada por perforina ó por la inducción de apoptosis a través de la molécula Fas presente en las células infectadas. Asimismo, la célula Tc secreta citocinas anti-virales y promotoras de la presentación de antígeno, como interferón gama ($INF-\gamma$) y el factor necrosante tumoral (del inglés "TNF; Tumor Necrosis Factor").

Los linfocitos T cooperadores (Th) ($CD4^+$; $CD8^-$) reconocen antígenos en forma de péptidos de 13 a 25 aminoácidos (en promedio), derivados generalmente de la degradación de proteínas exógenas en un compartimiento endosomal - lisosomal, en asociación con las moléculas del MHC clase II expresadas en la superficie celular (Cresswell, 1994). Las células Th son esenciales para la proliferación y diferenciación de las células B y Tc a través de la secreción de citocinas. Basándose en el perfil de secreción de citocinas estas células se clasifican en Th1 ó Th2. Las células Th1 secretan predominantemente interleucina (IL)-2 e $INF-\gamma$ y promueven respuestas inflamatorias. Por otro lado, las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10 y promueven las respuestas anti-inflamatorias y alérgicas. En una respuesta inmune antiviral se presentan ambos tipos de células Th, sin embargo, dependiendo de las características de la infección, los tiempos y la intensidad de una u otra respuesta varían.

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) ($CD4^-$; $CD8^+$) reconocen antígeno en forma de péptidos de 8 a 9 aminoácidos, derivados de la degradación de proteínas antigénicas en el citosol celular, en asociación con las moléculas del MHC (del inglés "Major Histocompatibility Complex") clase I expresados en la superficie celular (Yewdell y Bennink, 1992). La principal función de las células Tc es el reconocimiento y eliminación de células infectadas con virus a través de citotoxicidad directa mediada por perforina ó por la inducción de apoptosis a través de la molécula Fas presente en las células infectadas. Asimismo, la célula Tc secreta citocinas anti-virales y promotoras de la presentación de antígeno, como interferón gama ($INF-\gamma$) y el factor necrosante tumoral (del inglés "TNF; Tumor Necrosis Factor").

Los linfocitos T cooperadores (Th) ($CD4^+$; $CD8^-$) reconocen antígenos en forma de péptidos de 13 a 25 aminoácidos (en promedio), derivados generalmente de la degradación de proteínas exógenas en un compartimiento endosomal - lisosomal, en asociación con las moléculas del MHC clase II expresadas en la superficie celular (Cresswell, 1994). Las células Th son esenciales para la proliferación y diferenciación de las células B y Tc a través de la secreción de citocinas. Basándose en el perfil de secreción de citocinas estas células se clasifican en Th1 ó Th2. Las células Th1 secretan predominantemente interleucina (IL)-2 e $INF-\gamma$ y promueven respuestas inflamatorias. Por otro lado, las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10 y promueven las respuestas anti-inflamatorias y alérgicas. En una respuesta inmune antiviral se presentan ambos tipos de células Th, sin embargo, dependiendo de las características de la infección, los tiempos y la intensidad de una u otra respuesta varían.

2.- Respuesta de células T

2.1.- Receptor de las células T

El receptor de las células T ó TCR (del inglés "T Cell Receptor") es un heterodímero constituido por las cadenas α y β asociadas por enlaces disulfuro. Estas cadenas son glicoproteínas de entre 40 a 50 kDa pertenecientes a la gran familia de las inmunoglobulinas. Aunque existe otro tipo de TCR constituido por el heterodímero de las cadenas γ y δ , este se presenta solamente en una pequeña subpoblación de linfocitos T que se alojan predominantemente en mucosas. Ambos tipos de TCR se expresan en la superficie celular asociados al complejo CD3, que es un conjunto de cinco polipéptidos involucrados en transducción de señales a núcleo.

Las cadenas del TCR tienen una región constante y una variable, lo cual recuerda la estructura de las inmunoglobulinas. La región constante se encuentra proximal a la membrana plasmática y la región variable en la región amino-terminal que es la más distal a la membrana. Las regiones variables de ambas cadenas del TCR son responsables del reconocimiento del complejo MHC-péptido, sin embargo, las cadenas CD8 ó CD4 son importantes para determinar el tipo de MHC que se va a reconocer. CD8 se asocia al MHC I y CD4 al MHC II, generando de esta manera la dicotomía Tc Vs. Th. La diversidad del TCR se genera de una manera muy similar a la de la inmunoglobulina, esto es por re-arreglo somático. En el caso de la cadena β los genes V se asocian a genes D y J y en el caso de la cadena α los genes V se asocian sólo a genes J. Estas recombinaciones se llevan a cabo por las recombinasas RAG-1 y RAG-2, que son las mismas recombinasas que actúan en la generación de las inmunoglobulinas. Es por esto que en ausencia de estas recombinasas, se presenta un cuadro de inmunodeficiencia severa ya que no se generan ni células T ni B (Cavazzana, 2002).

Las cadenas del CD3 (γ , δ , ϵ , ζ y η) son componentes integrales de la membrana plasmática, se expresan junto con el TCR y también pertenecen a la gran familia de las inmunoglobulinas (Rothenberg, 1992). Funcionalmente la expresión de estas moléculas es

indispensable para la señalización al núcleo durante la activación a través del TCR. Dado que las cadenas TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ tienen regiones citoplasmáticas muy cortas y sin dominios de señalización, su actividad biológica depende de CD3.

El complejo CD3/TCR es necesario para la activación pero no suficiente, ya que es sabido que los linfocitos T requieren al menos dos señales para activarse. La primera señal se genera con la interacción del TCR con el MHC-péptido, esto produce el entrecruzamiento entre TCR's y la cascada de señalización a través de CD3 (Bretscher, 1999). La segunda señal depende de la expresión de moléculas co-estimuladoras o co-receptores en células presentadoras de antígeno (CPA's) y su interacción con ligandos específicos, como el caso de CD28 expresado en linfocitos vírgenes y B7.1 (CD80) / B7.2 (CD86) en macrófagos activados (Unanue, 1984). La generación de la primera señal sin la participación de la segunda favorece la anergia ó delección del linfocito, fenómeno fundamental para mantener la tolerancia periférica (Matzinger, 1994).

2.2.- Estructura y función del MHC

El MHC es un grupo de genes estrechamente relacionados, localizado en el cromosoma 6 humano (HLA) (del inglés "Human Leukocyte Antigen") y el cromosoma 17 murino (H-2). Existen 3 diferentes regiones del MHC y cada una codifica para diferentes moléculas. El MHC clase I se expresa en la superficie de casi la todas las células del organismo, a excepción de las neuronas y células germinales, y son altamente polimórficas. En humanos y en ratón se conocen 3 alelos llamados HLA-A, B y C' y H-2-K, D y L, respectivamente. Las moléculas del MHC tipo II sólo se encuentran en la superficie celular de CPA's profesionales como Mc, CD y células B, aunque bajo ciertas condiciones también se encuentran en la superficie de células epiteliales. Al igual que las moléculas del MHC clase I, las moléculas del MHC clase II son altamente polimórficas, presentándose 3 alelos en el humano HLA-DQ, DP y DR y 2 en el ratón IA e IE. Por otro lado, la región del MHC III codifica para diferentes proteínas que incluyen proteínas componentes del sistema de complemento y TNF- α y β (Whitehead y Sackstein, 1985).

Estudios bioquímicos y de cristalografía han demostrado que las proteínas del MHC clase I no cargadas con péptido son heterodímeros enlazados no covalentemente conformados por la cadena α , codificada por el MHC, y la β -2-microglobulina (β -2m) que es un polipéptido globular no polimórfico de 12 kDa (Saper, Bjorkman y Wiley, 1991). La cadena α es una glicoproteína de membrana de aproximadamente 44 kDa, con la región amino-terminal proyectándose extra-celularmente y la región carboxi-terminal localizada en el citosol. La porción extracelular se compone de 3 dominios bien definidos llamados α 1 (región amino-terminal), α 2 y α 3. Los dominios α 1 y α 2 son las regiones polimórficas de la molécula y constituyen el sitio de enlace al péptido antigénico. Estos dominios forman una hendidura que mide aproximadamente $25\text{\AA} \times 25\text{\AA} \times 11\text{\AA}$, constituida por las hélices α en los flancos y en la base por una lámina de ocho bandas β plegadas en forma anti-paralela. Esta hendidura está cerrada en sus extremos, lo que limita el tamaño de los péptidos enlazados a una longitud de entre 8 a 11 amino-ácidos. El dominio α 3 está altamente conservado y es el sitio de enlace de la β -2m y la molécula CD8 de las células Tc (Madden et al., 1992).

Las proteínas de clase II también son heterodímeros enlazados no covalentemente, constituidos por la cadena α (31 kDa - 34 kDa) y por la cadena β (29 kDa - 32 kDa). Ambas cadenas son codificadas por el MHC y son glicoproteínas de la membrana celular, con la región amino-terminal localizada en la parte extracelular y la carboxi-terminal intracelularmente. Las dos cadenas tienen dos dominios extracelulares llamados α 1 y α 2, en el caso de la cadena α , y β 1 y β 2, en el caso de la cadena β . α 1 y β 1 se encuentran en la región amino-terminal, son las regiones polimórficas de la molécula y conforman el sitio de enlace al péptido antigénico, el cual es muy similar a la hendidura encontrada en las moléculas de clase I pero con la diferencia de que la hendidura presente en clase II está abierta en sus extremos, lo cual le confiere la capacidad de asociarse a péptidos más largos de entre 13 a 25 amino-ácidos en promedio. Los dominios α 2/ β 2 están altamente conservados entre los diferentes alelos de clase II y en particular la cadena β 2 que es el sitio de enlace de la molécula CD4 de las células Th (Dessen et al., 1997).

2.3.- Procesamiento y presentación de antígeno

En los últimos años ha habido un incremento notable en el conocimiento sobre los mecanismos moleculares del procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas del MHC clase I y clase II a células T (Antoniou, Powis y Elliott, 2003; Watts, 2001). En general se puede decir que la vía de procesamiento de clase I es principalmente endógena, esto es, los péptidos asociados a esta molécula provienen de proteínas localizadas en el citosol celular, estas proteínas pueden ser tanto propias como no propias, como es el caso de las proteínas sintetizadas durante infecciones virales.

En el caso de las moléculas de clase II, los antígenos derivan de proteínas “exógenas” que ingresan en el sistema endosomal de la célula. Actualmente sabemos que estas proteínas no necesariamente provienen del ambiente externo celular, sino también provienen de proteínas de la célula que en su transporte interceptan el compartimiento endosomal. La dicotomía descrita arriba se puede explicar basándose en la diferente biología de las moléculas de clase I y II. La cadena α de la molécula de clase I es sintetizada y translocada al lumen del RE donde se asocia con la chaperona Bip (Antoniou, Powis y Elliott, 2003). Posteriormente, Bip es sustituida por otra chaperona llamada calnexina que a su vez se encuentra asociada a una bisulfuro-isomerasa llamada ER57. Este complejo permite la captación de la β -2m, que se encuentra en forma soluble en el RE y que se une a la cadena α permitiendo su plegado casi definitivo. En este momento la hendidura de la molécula de clase I que enlaza a péptido se encuentra vacía y protegida por las interacciones con las chaperonas. Este complejo se asocia a calreticulina y a la tapasina, que son proteínas que auxilian a la molécula de clase I a recibir de manera eficiente al péptido proveniente del citosol. Asimismo, la tapasina estabiliza el complejo al dímero conformado por TAP (del inglés “Transporter associated with Antigen Processing”) 1 y TAP 2 que son ATPasas que forman un poro en la membrana del RE y que de manera selectiva introducen del citosol péptidos de alta afinidad de 8 a 10 aa para que se unan a la molécula de clase I. Los péptidos generados en el citosol provienen de proteínas procesadas por un complejo multi-catalítico llamado proteasoma (Kloetzel, 2001). Una vez que se genera el trímero conformado por la cadena α , β -2m y el péptido, este es transportado a través del camino exocítico al aparato de Golgi y de allí a la membrana celular (Figura-2-).

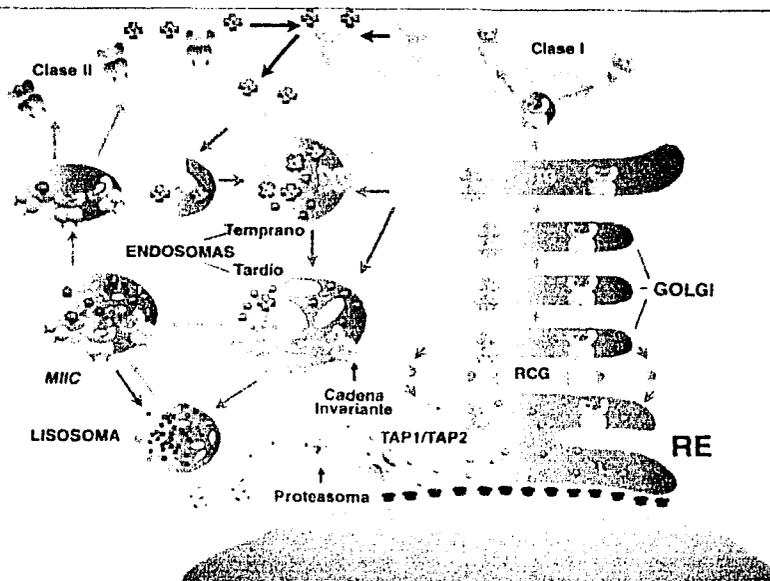


Figura-2- Vías de procesamiento y presentación de antígenos (Moreno, 1996).

La presencia de $\text{INF-}\gamma$, como resultado de una respuesta inmune, no solamente incrementa la síntesis de varias moléculas involucradas en el procesamiento de antígeno para hacerlo más eficiente, sino que induce la síntesis de nuevas moléculas como es el caso de las proteínas de bajo peso molecular $\text{PA28}\alpha$, $\text{PA28}\beta$, LMP2, LMP7 y LMP10, homólogas a sub-unidades del proteasoma (Topalian, 1994). El intercambio de sub-unidades produce diferencias en la calidad y cantidad de los péptidos procesados, limitando el procesamiento de péptidos propios (Groettrup et al., 1996).

Por otro lado, las cadenas α y β de las moléculas de clase II son sintetizadas y translocadas al lumen de RE. En el RE, 3 moléculas de clase II (heterodímeros) se unen a 3 moléculas de una proteína llamada cadena invariante (Ii), que es una proteína no polimórfica indispensable en el ensamblaje de este complejo nonamérico $[(\alpha\beta)3\text{Ii}3]$, (Cresswell, 1996). Una región de la cadena Ii se une a la hendidura donde se inserta el péptido antigénico, de esta manera, las moléculas de clase II son protegidas para evitar el enlace de péptidos no óptimos presentes en el RE, entre ellos los que se enlazan a las moléculas de clase I (Watts,

2001). Los nonámeros son posteriormente transportados a través de aparato de Golgi y dirigidos a un compartimiento similar a un endosoma tardío con un pH bajo, que algunos autores han nombrado MIIC (del inglés "MHC class II Compartment"). Por la acción de proteasas, entre ellas la cathepsina S ó L, la cadena Ii es degradada, quedando solamente un pequeño fragmento llamado CLIP (del inglés "Class II-associated Invariant-chain Peptide") ocupando el sitio de enlace a antígeno. Proteínas propias ó derivadas de microorganismos que entraron a la vía endocítica son degradadas por la acción del pH bajo y varias proteasas, generando péptidos de entre 14 a 25 aa que al encontrarse con las moléculas de clase II en el compartimiento MIIC desplazan a CLIP y ocupan el sitio de enlace a péptidos. Este evento, sin embargo, es facilitado por una molécula muy similar a las moléculas de clase II llamada HLA-DM en humanos ó H-2M en ratones (Brocke et al., 2002). Esta molécula es codificada por la región del MHC clase II, no es polimórfica y no requiere enlazar a péptidos para estabilizarse. HLA-DM, al igual que tapasina para clase I, induce cambios conformacionales en la molécula de clase II que resultan en la liberación de CLIP y en el enlace de péptidos óptimos de alta afinidad. Una vez que los péptidos enlazan a las moléculas de clase II, estas moléculas se estabilizan y los transportan a la superficie celular.

En células epiteliales de timo y células B existe otra molécula similar a HLA-DM llamada HLA-DO en humanos y H-2O en ratones (Brocke et al., 2002). Esta molécula al igual que HLA-DM se encuentra sólo intracelularmente, estando totalmente ausente de la superficie. Su papel aún no es muy claro pero se cree que sirve como un regulador negativo de HLA-DM a pH's no muy ácidos y un regulador positivo a pH's ácidos. En el caso de las células B, la inmunoglobulina de membrana, que actúa como un receptor, internaliza los antígenos selectivamente. Si esta inmunoglobulina es de baja afinidad libera al antígeno en compartimientos endosomales tempranos donde DO impide el enlace de péptidos, sin embargo, si la inmunoglobulina es de alta afinidad, libera al antígeno en compartimientos tardíos donde DO promueve el enlace de péptidos antigénicos. De esta manera, los complejos clase II-péptido presentados en la superficie inducirán el reconocimiento de los linfocitos Th que a su vez auxiliarán a las células B con receptores de alta afinidad solamente (Brocke et al., 2002).

Existen varios mecanismos para internalizar proteínas por parte de las CPA's, como son: (a) inespecíficas como la endocitosis ó la fagocitosis (b) específicas a través de receptores como la inmunoglobulina de membrana en las células B. En general el ingreso de estas proteínas se da a través de vesículas llamadas endosomas tempranos que tienen un pH entre 6.0 y 6.5 y termina en vesículas como endosomas tardíos, lisosomas ó el compartimiento MIIC con un pH ácido entre 5.0 y 4.5.

Desde los endosomas tempranos comienzan a actuar enzimas proteolíticas que incluyen en especial a proteasas de cisteína, Ac. aspartico y serina, y metaloproteasas. Sin embargo, las enzimas que predominan en las CPA's son la catepsina D (una proteasa aspártica) y las catepsinas B, F, H, L, S y Z (Driessen et al., 2002). Estas enzimas degradan progresivamente a las proteínas hasta llevarlas a aminoácidos simples en los compartimientos más ácidos, a menos que los fragmentos generados sean protegidos como en el caso de los péptidos que se unen a las moléculas de clase II. Finalmente, al igual que con clase I, la presencia de INF- γ incrementa la síntesis no solo de las moléculas de clase II y CLIP, si no también de algunas proteasas para acelerar y refinar el corte de proteínas en el compartimiento endosomal.

2.4.- Maduración tímica y repertorio de células T

El timo es el órgano donde los linfocitos T se desarrollan y diferencian fenotípicamente. Ahí, se "selecciona" al repertorio maduro de células T antígeno-específicas. Una prueba de esto se observa en individuos con atrofia congénita del timo (síndrome de Di George), donde el número de células T maduras es muy limitado y la susceptibilidad a infecciones muy alta (Mayrhofer y Bazin, 1981). Desde antes del nacimiento, los precursores de los linfocitos T provenientes de la médula ósea migran al timo, a partir de ese momento se les denomina timocitos. En fases tempranas los timocitos no expresan CD4, CD8 (timocitos dobles negativos), CD3 ni TCR. En esta fase los genes de las cadenas β y α del TCR se rearreglan en forma aleatoria e independiente a las moléculas del MHC presentes en el timo. Es necesario que se inicie la expresión de las moléculas de superficie TCR y CD3, que son importantes en las funciones de reconocimiento de antígenos y de selección de las

células T funcionales. Cuando los receptores TCR (con diferentes especificidades) se han expresado en la superficie de las diferentes clonas de células T en desarrollo, ese repertorio es modificado o "esculpido" mediante dos fenómenos de selección (1) la selección positiva, por la cual el repertorio es restringido por el MHC propio durante el proceso de educación tímica (2) la selección negativa, que elimina o inactiva clonas potencialmente auto-reactivas, asegurando con ello que el repertorio final de células T maduras sea auto-tolerante. (Paul, 1998).

Esos procesos de selección que suceden en todas las células T que están desarrollándose en el timo, se deben a un crecimiento selectivo de algunas clonas y a la muerte de otras. Los timocitos primero llegan a la corteza tímica, donde se asegura que mueran (por apoptosis) aquellas clonas de células T no restringidas por el MHC. Así, los timocitos que reconocen moléculas del MHC propio con afinidad media son seleccionados (selección positiva). A continuación viajan a la medula donde los timocitos que reconocen al MHC propio con un antígeno propio unido serán eliminados, sobreviviendo sólo los timocitos que reconocen el MHC con baja afinidad (selección negativa). Sin embargo, en un modelo reciente se propone que ambos procesos de selección se inicien desde la corteza tímica (Janeway et al., 2001).

Inmunidad de Mucosas

Hasta ahora la mayoría de los estudios sobre la respuesta inmune se han enfocado a la respuesta inmune periférica. Sin embargo, actualmente el estudio de la respuesta inmune de mucosas, y en especial el de la mucosa intestinal ha adquirido gran relevancia por las características particulares de esta respuesta. Los antígenos del medio externo, así como diversos microorganismos comensales son aislados del organismo por barreras epiteliales. En el hombre, los epitelios: respiratorio, gastrointestinal y urinario-reproductivo, representan la mayor superficie de contacto con el exterior. El tracto digestivo de un adulto esta constituido por aproximadamente 400 m² de epitelio mucoso, expuesto a una gran variedad de parásitos, bacterias, hongos y virus potencialmente invasores (Ogra, 1999).

Generalmente las respuestas inmunes inducidas periféricamente no actúan a nivel de mucosas, sin embargo, las respuestas inducidas en mucosas pueden actuar tanto en otras mucosas como periféricamente (Brandtzaeg, Ferstad y Heraldson, 1999). Esto se debe a que la respuesta inmune adaptativa de las mucosas está conectada por una red integral de órganos linfoides llamada MALT (del inglés "Mucosa Associated Lymphoid Tissue"), de esta manera, las respuestas de células B y T inducidas en un tipo de mucosa pueden actuar en la mucosa donde se indujeron y en otro tipo de mucosa separada anatómicamente, gracias a la expresión de un receptor de direccionalidad (homing receptor) compuesto por las integrinas $\alpha 4\beta 7$, que sirve de llave para ingresar a los tejidos linfoides de mucosa (Butcher y Picker, 1996). Para actuar en otras mucosas necesitan viajar a través de la linfa y la sangre pudiéndose alojar, aunque de manera ineficiente, en órganos linfoides periféricos y actuar a este nivel.

La mucosa intestinal está constituida principalmente por una mono-capa de células epiteliales (enterocitos) íntimamente adheridas por uniones fuertes especializadas. Entre los enterocitos se encuentran células secretoras de moco, células de Paneth, células M y células de Goblet. Estas células continuamente secretan a la luz intestinal una gama de inmunopéptidos y glicoproteínas que forman al glicocalix como: defensinas, mucinas, lisosima y diversas inmunoglobulinas intestinales principalmente del tipo IgA (IgAint) (Neutra y Kraehenbuhl, 2001). Las secreciones protegen a la mono-capa de epitelio intestinal de los patógenos residentes e invasores, sin afectar la absorción de agua y nutrientes esenciales. El tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal (GALT; del inglés "Gut-Associated Lymphoid Tissue") se divide anatómicamente y funcionalmente en dos partes: (a) los sitios de inducción constituidos por las placas de Peyer (PP) y los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y (b) el sitio efector constituido por la Lámina Propria (LP) (Nagler-Anderson, 2001). Varios estudios apoyan la idea que la entrada principal de antígenos al GALT para inducir una respuesta inmune adaptativa es a través de las células M. Estas células tienen la capacidad de internalizar de la luz intestinal hacia la PP proteínas ó partículas provenientes de microorganismos sin destruirlos. Las PP al igual que otros órganos linfoides consisten en cúmulos de células B vírgenes llamados folículos linfoides, que incluyen áreas de células B activadas conocidas como centros germinales. Cada centro germinal está

flanqueado por zonas ricas en linfocitos T, donde se alojan grandes vénulas endoteliales que son los sitios de entrada y salida de células migratorias. Las proteínas transportadas por las células M son depositadas en la región subepitelial, donde células dendríticas capturan el antígeno para después viajar al centro germinal y presentárselo a células B y T. Una vez activadas estas células viajan a los GLM's y a través de la linfa al ducto torácico, donde entran a la circulación sanguínea. Alternativamente, las células dendríticas cargadas con antígeno viajan al GLM donde activan a las células B y T y estas inician el viaje descrito (Figura-3-) (Brandtzaeg, Ferstad y Heraldson, 1999).

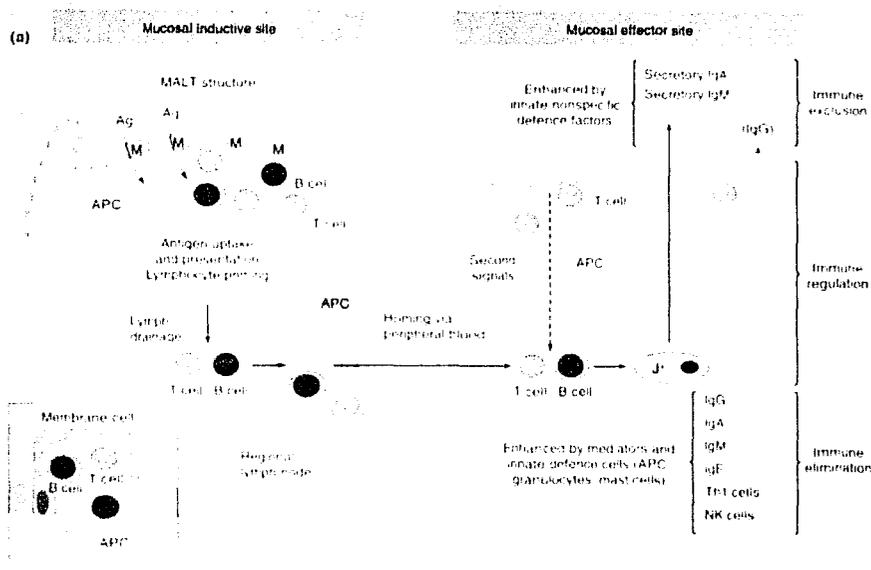


Figura-3.- Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal.

Como se mencionó anteriormente, las células B y T estimuladas en PP o GLM expresan altos niveles del receptor de direccionalidad $\alpha 4\beta 7$ que les permite enlazarse a la adhesina MAdCAM-1 presente en las vénulas endoteliales altas del intestino y penetrar a la LP intestinal, que es una región continua localizada en la base de las células epiteliales intestinales e interrumpida solamente por las PP (Butcher y Picket, 1996). Al ingresar las

células B, estas se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos IgAint con la ayuda de las citocinas secretadas por las células Th. Las células Tc, también con la ayuda de las citocinas secretadas por las células Th, se transforman en células efectoras capaces de destruir a las células epiteliales infectadas y secretar citocinas pro-inflamatorias como INF- γ . Las IgAint secretadas en LP son dímeros unidos por la cadena J de las inmunoglobulinas y transportadas a la luz intestinal a través de los enterocitos por un mecanismo llamado transcitosis. En este proceso las IgAint diméricas son enlazadas a través de la cadena J por el receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) presente en la región basolateral de los enterocitos. El complejo es transportado en vesículas a través de citosol celular y liberado en la luz intestinal.

Insertadas entre los enterocitos existe un gran número de células T llamadas células intra-epiteliales (CIE) con receptores del tipo tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ que expresan dos tipos de CD8; CD8 constituido por el hetero-dímero $\alpha\beta$ que se encuentra comúnmente en otros sitios linfoides y el poco común CD8 constituido por el heterodímero $\alpha\alpha$ (Nagler-Anderson, 2001). La función y el origen de estas células aún no son claros.

Recientemente se ha descrito un mecanismo alterno de entrada de antígenos a GALT, que se lleva a cabo por células dendríticas residentes de LP que atraviesan la capa epitelial a través de sus prolongaciones y muestrean la luz intestinal directamente. Al captar el antígeno de esta manera, muy probablemente lo presentan directamente en LP, sin embargo todavía no son claras las consecuencias inmunológicas (Recigno et al., 2001). Interesantemente, la permeabilidad del epitelio no se ve afectada durante el proceso de penetración debido a la expresión por parte de las células dendríticas de proteínas de unión fuerte como la ocludina, claudina 1 y zónula ocluyentes que mantienen la estabilidad de las uniones estrechas epiteliales.

TESIS CON
FALLA DE ... EN

Inmunidad anti-rotavirus

1.- Antecedentes

La morbilidad, mortalidad y repercusiones económicas que ocasionan las enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años y la posibilidad de utilizar vacunas para su control, han generado un gran interés en los mecanismos de inmunidad intestinal. En 1998, en Estados Unidos salió al mercado una vacuna contra la infección por rotavirus nombrada RotaShield-TV, que es una vacuna recombinante tetravalente de segunda generación diseñada en base a los cuatro serotipos de VP7 presentes en cepas de importancia clínica (G1 a G4). Administrada en tres dosis inducía inmunidad semejante a la generada por infecciones naturales y evitaba la producción de diarrea profusa en infantes inmunizados. Sin embargo, en 1999 se reportó un incremento en el número de casos de intususcepción en niños vacunados (Gay, Ramsay y Waight, 1999; Barnes, 1999), que es una forma de invaginación del intestino que puede conducir a la muerte, lo que provocó el retiro de la vacuna. De esta manera, estudiar la naturaleza de los mecanismos inmunológicos involucrados en conferir protección y los antígenos blanco de esta respuesta, podría ayudar al diseño de vacunas más efectivas y seguras.

Los estudios en el hombre sobre la respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus han sido muy limitados, ya que casi en su totalidad han analizado la respuesta inmune humoral lo que ha resultado en un conocimiento muy pobre sobre la respuesta inmune celular. El principal obstáculo para analizar la respuesta inmune celular en infantes infectados por rotavirus, es la dificultad en tomar muestras de intestino u órganos linfoides asociados a mucosa intestinal. Por lo que se ha recurrido al uso de modelos animales susceptibles a la infección por rotavirus. El cerdo gonobiótico fue el primer mamífero grande usado para estudiar *in vivo* los mecanismos de inmunidad contra rotavirus. Además, es el único animal que presenta diarrea al infectarse con cepas de rotavirus humano (Saif et al., 1998). Sin embargo, el manejo de animales grandes en el laboratorio, la muy limitada disponibilidad de anticuerpos y demás reactivos, hacen poco práctico su empleo como modelo. Se ha propuesto el uso de animales más pequeños como el ratón (neonato y adulto) para estudiar la inmunidad contra rotavirus (Rose, Franco y Greenberg, 1998) y para

evaluar el potencial de nuevas vacunas (Esquivel et al., 2000). El ratón es susceptible a la infección por rotavirus murinos y de otras cepas, en todos los casos las manifestaciones clínicas (diarrea) solo se presentan en neonatos (ratones menores de 14 días), después la enfermedad es asintomática, pero detectable por carga viral.

2.- Respuesta de células B anti-rotavirus

La infección por rotavirus induce una potente respuesta de anticuerpos séricos e intestinales tanto en humano como en los diferentes modelos animales estudiados. En humanos se ha demostrado que anticuerpos IgAint son los únicos que correlacionan con la limpieza de una infección primaria y la prevención de una infección secundaria por un rotavirus del mismo serotipo (Coulson et al., 1992). Cuando la re-infección se da por un rotavirus de diferente serotipo esta no se previene pero sí se atenúa (Velázquez et al., 1996). En este último caso muy probablemente también la respuesta heterotípica de los linfocitos T juegan un papel importante.

El papel de los anticuerpos IgAint contra la infección por rotavirus en el humano se ha corroborado en el modelo de ratón. Franco y Greenberg (1995) y Burns y Cols. (1995) demostraron que en la respuesta primaria, los anticuerpos IgAint podrían estar involucrados en la eliminación del virus cuando ya ha ocurrido la infección. Por otro lado, en la respuesta secundaria la presencia de IgAint contra rotavirus del mismo serotipo es suficiente para prevenir la infección, esto es, actúan de una manera profiláctica. Los mecanismos involucrados en la protección mediada por anticuerpos del tipo IgA, sin embargo, no son totalmente claros. Además de la posible actividad neutralizante de los anticuerpos dirigidos contra VP4 y VP7, se ha sugerido que IgA's contra la proteína interna VP6 - que no son neutralizantes - podrían estar bloqueando la infección dentro de la célula epitelial durante su transcitosis para ser vertidos en el lumen intestinal (Burns et al., 1996). Así, los anticuerpos IgAint podrían estar mediando protección contra la infección por rotavirus por medio de al menos dos mecanismos diferentes.

3.- Respuesta de células T citotóxicas (Tc)

Uno de los primeros trabajos sobre la importancia de los linfocitos Tc en la infección por rotavirus en el ratón, demostró la inducción de linfocitos Tc CD8⁺ rotavirus específicos en la mucosa intestinal de ratones infectados con EDIMwt en la primera semana de infección (Offit y Dudzik, 1989). Por otro lado, la transferencia pasiva de linfocitos T CD8⁺ provenientes de bazo de ratones infectados con rotavirus en ratones neonatos singénicos, evitó la aparición de diarrea cuando los ratones fueron retados con el rotavirus EDIMwt. En otro estudio, la transferencia pasiva de linfocitos Tc CD8⁺ rotavirus específicos de ratones inmuno-competentes a ratones SCID (ratones con inmuno-deficiencia severa por la ausencia de linfocitos B y T) singénicos limpió la infección crónica (Dharakul, Rott y Greenberg, 1990). Es importante mencionar que ratones SCID infectados con rotavirus presentan una infección intestinal crónica, razón por lo cual estos ratones son un excelente modelo para analizar la función de linfocitos B y T (transferidos) en la resolución de la infección.

Posteriormente, usando ratones knock-out de células B y T, se demostró de manera concluyente que las células Tc juegan un papel importante en protección, terminando ó atenuando una infección ya establecida, tanto de manera homotípica como heterotípica (Franco y Greenberg, 1995). Sin embargo, el mecanismo a través del cual estas células ejercen su función anti-viral en la infección por rotavirus no es claro, ya que se ha demostrado que es independiente de perforina, Fas ó INF- γ (Franco et al. 1997).

4.- Respuesta de células Th

En varios trabajos se ha demostrado que los linfocitos Th participan en la resolución y prevención de infecciones virales (como en la infección por influenza) y que lo pueden hacer a través de diversos mecanismos (Gao, Liew y Tite, 1989). Las citocinas que producen los linfocitos Th activados auxilian en la activación y maduración de linfocitos B y Tc (Doherty, Allan y Eichelberger, 1992). Recientemente, se ha encontrado que los Th son importantes en la eficiente inducción de células Tc de memoria (Tanchot y Rocha, 2003). Además, pueden producir citocinas antivirales como INF- γ o por si mismos

presentar actividad citotóxica (Kuge et al., 1995). Sin embargo, existe muy poca información acerca del papel específico de los linfocitos CD4⁺ en la generación de células efectoras y de memoria en el intestino.

Linfocitos Th aislados de sangre periférica proveniente de niños y adultos infectados con rotavirus muestran una respuesta proliferativa específica cuando son re-estimulados *in vitro* con rotavirus homólogos y heterólogos (Offit et al., 1992). Estudios *in vivo* en cerdos y borregos gonobióticos también sugieren la participación de linfocitos Th en la inducción de anticuerpos anti-rotavirus intestinales y séricos (Van Pinxteren, 1999; Ward et al., 1996). Sin embargo, existe poca información acerca de la especificidad de las células Th hacia los antígenos de rotavirus.

En modelos no infecciosos donde ratones fueron inoculados con cepas de rotavirus heterólogas por la vía parenteral se ha encontrado, al igual que en el humano, que la respuesta proliferativa de linfocitos Th de bazo y de ganglios linfáticos periféricos re-estimulados *in vitro* con rotavirus es tanto homotípica como heterotípica (Baños et al., 1997; Bruce et al., 1994). Bruce et al. (1994) demostró que líneas de células Th provenientes de ratones BALB/c reconocieron predominantemente a la proteína interna de rotavirus VP6. Posteriormente, en nuestro laboratorio encontramos que células Th provenientes de bazo de ratones BALB/c adultos inmunizados intra-peritonealmente (i.p.) con el rotavirus murino porcino YM reconocieron a VP6, y que esta proteína contenía al menos 2 epítomos (Baños et al., 1997). A nivel clonal, por medio de un hibridoma de célula Th, se determinó que uno de los epítomos reconocidos estaba constituido por la secuencia de VP6 del rotavirus YM comprendida entre los aminoácidos 289-302 (RLSFQLVRRPPNMTP), en asociación con la molécula del MHC clase II IE^d. Esta secuencia esta altamente conservada en la mayoría de los rotavirus tipo A secuenciados hasta la fecha, incluyendo el rotavirus murino EDIMwt. Asimismo, se determinó de manera experimental que el hibridoma reconocía de manera heterotípica a VP6. Finalmente, se encontró que las células Th específicas para el epítomo descrito constituían una proporción importante de la respuesta total contra el rotavirus.

A nivel funcional se ha demostrado que las células Th pueden tener un papel tanto directo como indirecto en la eliminación de la infección. Kushnir et al. (2001) demostró que la transferencia de células Th específicas para rotavirus en ratones SCID infectados persistentemente con EDIMwt limpiaba la infección. Asimismo, en trabajos recientes se encontró que VP6, como proteína de fusión, y el péptido sintético de VP6 289-302 (epítipo de células Th) administrados intranasalmente (i.n.) junto con la entero-toxina de E. Coli LT (R192G) (una forma mutada de LT) indujeron una protección casi total contra la infección (Choi et al., 2000). Los autores demostraron que esta protección se dio casi exclusivamente por la acción de las células Th específicas para VP6. Por otro lado, en otro trabajo se encontró que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD4 en ratones μ Mt- (deficientes en células B) previo a una infección con EDIMwt, provoca que se instale una infección permanente (McNeal, Rae y Ward, 1997). Este efecto se pudo deber a la ausencia de un efecto directo de las células Th ó a una deficiente inducción de células Tc ó ambos.

La participación indirecta de las células Th en el combate de la infección por rotavirus a través de la ayuda a células B y Tc ha sido previamente demostrada. (Kushnir, 2001; Franco y Greenberg, 1997; Riepnhoff-Talty y Ogra, 1987). Así se encontró que la transferencia de células Tc anti-rotavirus en ratones SCID infectados persistentemente con el rotavirus murino EDIMwt limpia la infección, sin embargo, cuando las células Tc son co-transferidas con células Th rotavirus específicas esta limpieza es más rápida y eficiente. En este laboratorio se demostró que células Th específicas para VP6 son capaces de auxiliar a células B específicas para las proteínas externas del rotavirus VP4 y VP7 a través del fenómeno de ayuda intermolecular, aumentando considerablemente los títulos de los anticuerpos neutralizantes y acelerando la limpieza de la infección (Esquivel et al., 2000).

II JUSTIFICACIÓN

La infección por rotavirus en infantes humanos genera grandes gastos económicos por concepto de hospitalización y atención médica a escala mundial. Debido a esto, existe un gran interés por el desarrollo de una vacuna efectiva para ser aplicada en la infancia temprana. Sin embargo, esta vacuna tiene que proteger de manera cruzada contra por lo menos 4 serotipos G y 2 serotipos P de rotavirus humanos de importancia clínica (Estes, 1996). Debido a lo anterior, es de suma importancia conocer tanto la especificidad como la función de los elementos inmuno-protectores en la infección y así diseñar una vacuna que incorpore el ó los antígenos relevantes.

Se ha demostrado que tanto las células Tc como los anticuerpos IgAint son elementos importantes en protección contra la infección por rotavirus, sin embargo, las células Th juegan un papel central en la eficiente inducción de ambos elementos, además, estas células pueden ejercer funciones efectoras directas que coadyuvan a la limpieza de la infección. De esta manera, es importante conocer más acerca del repertorio de la especificidad de las células Th hacia los diferentes antígenos de rotavirus en una infección. Los únicos dos estudios al respecto (Baños et al., 1997; Bruce et al., 1994) encontraron en sistemas no infecciosos (rotavirus heterólogos inoculados parenteralmente) que VP6 es un antígeno blanco importante de la respuesta inmune secundaria de células Th a nivel clonal y policlonal. Asimismo, se encontró que clones de células Th pueden reconocer a VP6 de manera cruzada (heterotípica) dada su alta conservación en la secuencia de aminoácidos (hasta 97 %) en por lo menos 25 cepas de rotavirus reportadas (Baños et al., 1997).

Por lo anterior VP6 parecería ser un candidato importante para ser usado como vacuna contra la infección por rotavirus, sin embargo, aún no se sabe si en una infección natural (a nivel intestinal) con un rotavirus de ratón homólogo, las células Th tienen una especificidad similar y si VP6 es el antígeno blanco dominante de estas células ó existen otros antígenos del virus que son eficientemente reconocidos. Asimismo, sería importante evaluar estas respuestas en órganos linfoides asociados a mucosas, como PP ó GLM, para tener una visión más clara de lo que sucede en una respuesta inmune en el medio ambiente de la

mucosa intestinal. Por último, un aspecto importante que aún no se había abordado es el análisis de la especificidad de las células Th que se generan en respuesta primaria y secundaria. En la respuesta primaria las clonas que se generan están involucradas en la limpieza de una primo-infección, por otro lado, en la respuesta secundaria la especificidad será la de aquellas clonas que permanecieron como células de memoria, mismas que estarían involucradas en protección contra una segunda infección. El repertorio en ambos casos pudiera ser diferente.

Así, en este trabajo me propuse iniciar el estudio del repertorio de la especificidad de las células Th contra los antígenos de rotavirus en GLM de ratones infectados oralmente con el rotavirus homólogo (de ratón) silvestre EDIMwt, tanto en respuesta primaria como secundaria. Para analizar la respuesta primaria se intentará generar hibridomas de células Th activadas por la infección, para después determinar su especificidad usando rotavirus y proteínas del rotavirus como antígeno. Para la respuesta secundaria se estimularán las células Th de memoria *in vitro* usando los mismos antígenos. Es importante aclarar que el principal enfoque de este trabajo es montar las condiciones experimentales necesarias y concentrarme en las respuestas hacia VP6. En estudios posteriores se planea determinar de manera más completa, usando este sistema, la respuesta contra otros antígenos del rotavirus, sin embargo, no se descarta que este trabajo pudiera tener avances al respecto.

III HIPÓTESIS

Es muy probable que VP6 sea un antígeno blanco importante de las células Th de GLM provenientes de ratones infectados con el rotavirus EDIMwt, tanto en la respuesta primaria como secundaria. Sin embargo, es posible que en la respuesta primaria la especificidad de las células Th sea más amplia que en la respuesta secundaria.

IV OBJETIVOS

1.- OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones experimentales que nos permitan determinar la especificidad contra los antígenos de rotavirus de las células Th provenientes de GLM's de ratones infectados con el rotavirus murino EDIMwt.

2.- OBJETIVOS PARTICULARES

2.1.- Estandarizar el modelo murino de infección con el rotavirus EDIMwt.

2.2.- Analizar la cinética de activación de células T y B provenientes de GLM durante la infección.

2.3.- Determinar la especificidad de la respuesta primaria de células Th provenientes de GLM de ratones infectados, con énfasis en el reconocimiento de VP6, a través de la generación de hibridomas de células Th.

2.4.- Determinar la especificidad de la respuesta secundaria *in vitro* de células Th provenientes de GLM de ratones infectados, con énfasis en el reconocimiento de VP6, a través de ensayos de proliferación y producción de citocinas.

V MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cultivo celular

1.1.- Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo y sus complementos que aquí se mencionan fueron adquiridos a GIBCO BRL, excepto en los casos que se indican. Asimismo, todos los medios fueron ajustados a un pH de 7.0 y esterilizados por medio de filtración a través de una membrana de 0.22 μm . A continuación se detalla la preparación de los medios:

RPMI: RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina y 2 gr de NaHCO_3 por litro.

RPMI⁺: RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 2 gr de NaHCO_3 por litro, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol (2-ME), 10 mM HEPES, 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina y 10 % suero fetal bovino (SFB; Certificado).

RPMI-CPR2: RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 2 gr de NaHCO_3 por litro, 5×10^{-5} M 2-ME, 10 mM HEPES, 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina y 5 % suero fetal bovino de baja proliferación (CPR-2 certificado; Sigma).

DMEM: DMEM alto en glucosa suplementado con 2 mM L-glutamina, 110 mg/lit piruvato de sodio y 3.7 gr de NaHCO_3 por litro.

DMEM⁺: DMEM alto en glucosa suplementado con 2 mM L-glutamina, 3.7 gr de NaHCO_3 por litro, 110 mg/lit piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina y 10 % SFB.

1.2.- Líneas celulares

MA-104: Línea procedente de células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus (*Macaca mulatta*).

CTL-2: Línea tumoral de linfocitos T citotóxicos de ratón (*Mus musculus*), C57BL/6 (H-2^b) dependientes de IL-2, IL-4 e IL-15 (Russell y Vindelo, 1998).

XG310mIL-2: Línea celular productora de IL-2 de ratón. Creada a partir de la transfección estable del mieloma de ratón XG310 con el gen de IL-2 murino (Karasuyama y Melchers, 1988).

A.20.j.: Linfoma de células B de ratón (H-2^d), MHC clase I y II positivas IGM e IgG de superficie (McKean et al., 1981).

A.20A.45.: Células A.20.j transfectadas con genes del haplotipo H-2^k que expresan híbridos de clase II $\alpha^d \beta^k$.

BW5147 $\alpha^- \beta^-$: Línea celular de ratón AKR (H-2^b) mutante, proveniente del timoma BW5147 (HPRT⁻), con ausencia de las cadenas α y β del TCR y susceptible a selección por HAT (White et al., 1989).

3G5.7.1D: Híbridoma Th (H-2^d), que reconoce la región de aminoácidos 289-302 de VP6 del rotavirus porcino YM (Baños et al., 1997).

Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad saturante.

1.3.- Cultivo de células adherentes

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25, 75 ó 162 cm² y cada vez que llegaban a confluencia eran diluidas en proporción 1 a 10 para su mantenimiento en cultivo. Para esto, el medio de cultivo se aspiró y la mono-capa celular se lavó 1 vez con 5 ml de PBS. Posteriormente, se adicionaron de 2 a 4 ml de tripsina-EDTA en PBS (0.25% tripsina 1:250 y 1 mM EDTA) y se incubó por 5 min a 37 °C para despegar las células adheridas al plástico. Se tomó un volumen de la suspensión celular y se diluyó 1 en 10 en medio fresco, para sembrarse en un frasco nuevo. El volumen se llevó a 7, 12 y 22 ml de medio en los frascos de 25, 75 y 162 cm² respectivamente.

1.4.- Cultivo de células no adherentes

Las células no adherentes CTLL-2, XG310mIL-2, A.20.j y BW5147 $\alpha^{-}\beta^{-}$ fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25, 75 ó 162 cm² y una vez que la suspensión celular llegaba a saturación estas eran diluidas 1 a 10 en medio RPMI⁺ fresco. El volumen se llevó a 7, 12 y 22 ml de medio en los frascos de 25, 75 y 162 cm² respectivamente.

1.5.- Fuente de IL-2

La línea celular XGL310 mIL-2 secreta de manera constitutiva IL-2 soluble (de ratón), por lo que para la obtención de este factor se realizaron cultivos en frascos de 162 cm² con 200 ml de RPMI⁺. Posteriormente, el cultivo fue monitoreado diariamente hasta que se alcanzó un 80 % de mortalidad celular. La suspensión celular fue colectada y centrifugada a 2,500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue congelado, descongelado y filtrado a través de una membrana de 0.22 μ m. Se prepararon alícuotas de 45 ml, mismas que se congelaron a -20 °C hasta su uso.

2.- Virus

Los rotavirus del grupo A YM (Po/G11P9, SGI) de cerdo, RRV (Sa/G3P11, SGII) de simio y EDIMwt (Mu/G3P10, SGII) de ratón, fueron propagados *in vitro* en la línea celular MA-104 como se describe más adelante. El rotavirus EDIMwt silvestre propagado *in vivo* fue amablemente proporcionado por el Dr. Richard Ward (Gamble Institute of Medical Research, Cincinnati, Ohio).

2.1.- Propagación de rotavirus *in vivo*

EDIMwt fue propagado en intestinos de ratones neonatos. Para esto, se inocularon oralmente grupos de 10 ratones BALB/c de 5 a 7 días de nacidos con 100 μ l de diarrea suspendida en DMEM⁺ obtenida de ratones neonatos infectados con EDIMwt. Dos días posteriores a la infección se aislaron muestras de heces diarreicas en tubos eppendorf con 500 μ l de DMEM⁺ y se congelaron a -70 °C. Una vez colectadas todas las muestras, éstas se mezclaron, se hicieron alícuotas de 500 μ l y se congelaron a -70 °C hasta su uso (Feng et al., 1994).

2.2.- Propagación de rotavirus *in vitro*

Células MA-104 en confluencia cultivadas en frascos de cultivo de 75 ó 162 cm² fueron infectadas con las cepas de rotavirus RRV, YM ó adaptadas a su propagación *in vitro*. Para esto, el medio de cultivo se decantó y la mono-capa celular se lavó 2 veces con 5 ml de PBS, con la finalidad de eliminar todo el SFB residual. Posteriormente, se adicionaron de 1 a 2 ml de lisados celulares de MA-104 conteniendo de 1 a 2 unidades formadoras de focos (uff) de las diferentes cepas de rotavirus, previamente tratados con 10 µg/ml de tripsina (Sigma) por 30 min a 37 °C (para generar partículas infecciosas). Las células se incubaron por 1 hr a 37 °C, distribuyendo el inóculo viral cada 15 min y se agregó DMEM⁻ para diluir el inóculo inicial 10 veces. Después de 24 a 48 hrs de incubación las células y el medio fueron colectados juntos y congelados a -70 °C. El lisado celular fue congelado y descongelado 2 veces para liberar las partículas virales, alicuotado y congelado a -70 °C hasta su uso. Finalmente, el rotavirus murino adaptado a cultivo fue propagado en células MA-104 crecidas en tubos de cultivo de fondo plano de 3 ml, manteniendo las proporciones arriba descritas.

2.3.- Semi-purificación de rotavirus

En cada semi-purificación se usaron de 100 a 200 ml de lisados celulares de MA-104 infectadas con el rotavirus RRV ó lisados de MA-104 sin infectar. Estos últimos sirvieron como fuente de proteína control en ensayos de proliferación de linfocitos. Los lisados fueron congelados a -20 °C y descongelados 2 veces para liberar la mayor cantidad de partículas virales contenidas dentro de las células. Los lisados se centrifugaron a 25,000 rpm en el rotor SW28 a 4 °C por 2 horas, la pastilla resultante compuesta por restos celulares y partículas virales se resuspendió en 10 ml de buffer TSC (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, 10 mM Ca⁺⁺, pH: 7.4) y se le agregó un volumen igual de tricloro-fluoro-metano (freón). La mezcla se agitó vigorosamente por 10 min, con la finalidad de liberar al virus de las membranas celulares y se centrifugó a 6,500 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, se tomó la fase acuosa superior, se pasó a otro tubo (el cual se mantuvo a 4 °C), se adicionaron 10 ml de buffer TSC al tubo con freón y se repitió el proceso de extracción por segunda vez. Las fases acuosas de la primera y de la segunda extracción se combinaron y se centrifugaron a 25,000 rpm por 2 horas.

La pastilla resultante se resuspendió en 4 ml de TSC y se centrifugó sobre un colchón de 1 ml sacarosa al 30 % en TSC (P/V) a 40,000 rpm, en un rotor SW50 a 4 °C por 2 hrs. Con la finalidad de eliminar residuos de sacarosa, la pastilla del virus semi-purificado fue resuspendida en 5 ml de TSC y se repitió la centrifugación anterior (40,000 rpm a 4 °C por 2 hrs). Finalmente, el virus fue resuspendido en 1 ml de TSC, se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenó a -70 °C hasta su uso. En el caso de los lisados de células MA-104 se obtienen proteínas celulares particuladas que pueden sedimentar a través del colchón de sacarosa. La concentración de proteína y la pureza de la preparación se determinó por el método BCA (Pierce, 1991) y por un gel de poliacrilamida al 11 %, respectivamente.

2.4.- Determinación de proteína viral

La concentración de proteína en las preparaciones virales fue determinada por el método de BCA. Para esto, se preparó una solución "stock" de 2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, fracción V; Sigma) en agua. En una micro-placa de 96 pozos se adicionaron por duplicado 2.5 µg de BSA en 50 µl de TSC en los pozos inmediatos inferiores cantidades crecientes de la proteína hasta llegar a 35 µg en 50 µl de TSC. Para determinar la concentración de proteína en nuestras preparaciones virales, se adicionaron por duplicado 5 µl de virus semi-purificado más 45 µl de TSC y 10 µl de virus semi-purificado más 40 µl de TSC. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de una mezcla de 147 µl de reactivo A más 3 µl de reactivo B a cada pozo de la placa y se dejó 45 min a T/A. Por último, la placa fue analizada en un lector de ELISA a 570nm, los valores resultantes se graficaron y se obtuvo una curva con la proteína de concentración conocida. Una vez graficados los valores obtenidos de nuestras preparaciones virales se dividieron por su respectivo factor (de 5 para las de 5 µl y de 10 para las de 10 µl), para así obtener la concentración de proteína en µg/ml.

2.5.- Determinación de la infectividad de rotavirus

La infectividad de las preparaciones virales se evaluó cuantificando la formación de focos de infección en células MA-104. Estas se llevaron a confluencia en cajas de 96 pozos de fondo plano (Falcon), se aspiró el medio de cultivo y cada pozo se lavó 2 veces con 200 µl de PBS para eliminar el SFB residual. Se agregó por duplicado 50 µl de cada preparación

viral (previamente tratadas con 10 µg/ml de tripsina por 30 min a 37 °C) a diferentes diluciones e incubó a 37 °C por 1 hr. Posteriormente se agregaron 150 µl de DMEM y se incubó a 37 °C por 14 horas más. Por último, se lavó con 200 µl PBS y las células se fijaron con 100 µl de acetona al 80 % en PBS, pasados 30 minutos se lavó dos veces con 200 µl PBS. La formación focos de infecciosos se determinó incubando las células con 50 µl de un anticuerpo policlonal de conejo contra rotavirus YM diluido 1:2000 en PBS por 1 hr a 37 °C. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se adicionaron 50 µl de Proteína-A acoplada a peroxidasa (Amersham) diluida 1:2500 en PBS. Por 1 hr a 37 °C. Se reveló con 50 µl del sustrato precipitable carbasol (Sigma) de 5 a 10 min a T/A. Finalmente, los pozos se lavaron 2 veces más con agua destilada, se secaron por 2 hrs al aire y los focos de infección fueron cuantificados en un microscopio utilizando el objetivo 20X. Los títulos de infección se expresaron como unidades formadoras de focos (uff).

2.6.- Tratamiento del virus con luz ultravioleta

Alicuotas de 50 a 100 µl de las diferentes preparaciones de los virus semi-purificados fueron puestos en una caja Petri de 35 mm de diámetro, previamente colocada sobre una cama de hielo. La muestra fue irradiada con luz U.V. con una longitud de onda de 254 nm con una lámpara U.V. (Mineralight, Multiband U.V. 254-366 nm) a una distancia de 10 cm a los tiempos especificados en los diferentes experimentos.

3.- Proteínas

3.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para determinar la pureza de las preparaciones virales estas se analizaron en geles de poliacrilamida, por el método de Laemmli (1970), al 11 % bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. Para esto, a cada muestra de 20 µl de virus semi-purificado se le agregó 5 µl de buffer de carga "5X" (para una concentración final de: 1 % SDS, 1 mM 2-ME, 2 mM EDTA, 10 % glicerol, 50 mM Tris HCL, pH: 6.8) y se hirvieron por 2 min. Después de haberse enfriado en hielo se cargaron en el gel y se corrieron a un voltaje constante de 200 V por 2 hrs. Al término de este tiempo, el gel se tiñó en una solución de 0.05 % de azul de Coomassie en 50 % de agua destilada, 43 % metanol y 7 % de ácido

acético por 30 min. Finalmente, el gel se destiñó por 4 hrs en una solución al 40 % metanol y 10 % de ácido acético en agua destilada.

3.2.- Obtención de proteínas recombinantes

Bacterias de la cepa E. Coli JM109, transformadas con los plásmidos pGEX-4T ó pGEX-YM6, se crecieron toda la noche a 37 °C en medio luria líquido suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. El plásmido pGEX-4T codifica para el polipéptido de 26 kDa Glutación-S-Transferasa (GST) y el plásmido pGEX-YM6 para la proteína de fusión GST-VP6 de 70 kDa, la secuencia de VP6 proviene del rotavirus YM (Baños et al., 1997). Al día siguiente, se sub-cultivaron 1/100 en el mismo medio hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.3 y se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con 1 mM de IPTG por 3 hrs a 37 °C. Posteriormente, con la finalidad de enriquecer las proteínas de interés, se realizó la separación de la fracción insoluble de las bacterias. GST se presenta tanto en la fracción soluble como insoluble pero GST-VP6 se expresa predominantemente en la fracción insoluble, por esto en los ensayos de estimulación *in vitro* se utiliza sólo la fracción insoluble. Así, la suspensión bacteriana se lavó dos veces con buffer de lavado (50 mM Tris, 1 mM 2-ME en PBS) centrifugando a 1500 g por 10 min cada vez. Después del último lavado, las células previo a su sonicación se resuspendieron en 2 ml del mismo buffer en presencia de los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM, leupeptina 1 µM y aprotinina 0.3 µM. La sonicación consistió de 3 pulsos de 14-18 mm de amplitud por 30 segundos, en un sonicador SoniPrep 150 (SANYO MSE). Al finalizar este tratamiento, la suspensión se centrifugó para separar la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble se desechó y la fracción insoluble (pastilla en el fondo del tubo) se lavó dos veces más con PBS más los inhibidores de proteasas usados anteriormente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en PBS, se hicieron alícuotas de 50 µl y se congelaron a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteína total fue evaluada por el método de BCA (BIO-RAD) y la pureza de la preparación se evaluó a través de un gel de acrilamida al 11 %, el cual fue teñido con azul de Coomassie. Las muestras usadas en los ensayos de proliferación fueron tratadas con luz U.V. como se describe para las preparaciones virales, pero sólo con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos en los cultivos.

4.- Ratones e inmunizaciones

Todos los experimentos se realizaron con ratones singénicos hembras de la cepa BALB/c (haplotipo H-2^d) de 4 a 6 semanas de nacidos, mantenidos bajo condiciones libres de patógenos, provenientes de los bioterios del Instituto Nacional de Salud Pública, Instituto de Biotecnología de la UNAM y la compañía HARLAN. Previo a cada experimento todos los ratones fueron sangrados y el suero fue analizado para la presencia de anticuerpos anti-rotavirus por medio de un ensayo de ELISA. Es importante mencionar que el 100 % de los ratones utilizados fueron negativos a previa exposición a rotavirus. Una vez comprobada la ausencia de anticuerpos anti-rotavirus, grupos de 3 a 5 ratones fueron inoculados oralmente con 100 µl de bicarbonato de sodio al 1.33 %, para neutralizar los ácidos estomacales. De 5 a 10 minutos después, los ratones fueron inoculados oralmente con 100 µl de DMEM⁺ conteniendo 1×10^5 uff de EDIMwt. Para demostrar que los ratones fueron realmente infectados, se tomaron muestras de heces a cada ratón justo antes de la infección y cada 24 hrs durante 8 días. Las heces fueron almacenadas a -20 °C para posteriormente evaluar la presencia de virus (carga viral), e IgA anti-rotavirus usando el método de ELISA de captura.

5.- Detección de rotavirus e IgA anti-rotavirus en heces

Muestras de heces mantenidas a -20 °C fueron descongeladas, suspendidas al 5 % (peso / volumen) en solución amortiguadora disolvente (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 % SFB, 0.05 % Tween-20 y azida de sodio 10 mM, pH: 7.4) y almacenadas toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las partículas de rotavirus contenidas en las heces fueron liberadas por agitación en un vortex y la suspensión obtenida centrifugada a 2,000 rpm por 5 min (microcentrífuga refrigerada). El sobrenadante conteniendo las partículas virales fue pasado a otro tubo eppendorf y la cantidad de antígeno rotaviral determinada a través de un ensayo de ELISA de captura. Para esto, micro-placas de 96 pozos (Costar) fueron cargadas con 50 µl de una dilución 1:5000 en PBS con 0.02 % de azida de sodio del anticuerpo de captura - anticuerpo hiper-inmune de cabra dirigido contra diferentes cepas de rotavirus- e incubadas toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, las placas fueron bloqueadas por 2 hrs a temperatura ambiente con una solución al 5 % de leche Carnation sin grasa en TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH: 7.4). Las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado

(PBS y Tween-20 0.05 %), se adicionaron 50 μ l por duplicado del sobrenadante de la suspensión de heces y se incubó por 2 hrs a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron 4 veces, se adicionaron 50 μ l de un anticuerpo hiper-inmune de conejo anti-rotavirus (generado contra la cepa RRV) diluido 1:2000 en solución de bloqueo y se incubó por 1 hr a 37 °C. Después de lavar 4 veces, se adicionaron 50 μ l de una dilución 1:2000 de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) y se incubó por 1 hr a 37 °C. Al término de este tiempo, se lavó 4 veces, se adicionaron 50 μ l de sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio; Sigma) y se dejó desarrollar el color por 30-45 min a 37 °C. Finalmente, se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, Burlington, Vt). Como control positivo se usó un lisado de células infectadas con el rotavirus RRV, en lugar de la suspensión de heces. En todos los caso el valor del control negativo sin antígeno fue restado al resto de la placa.

Para la detección de IgA anti-rotavirus en heces, las micro-placas cargadas con el anticuerpo hiper-inmune de cabra anti-rotavirus y bloqueadas como arriba se mencionó, fueron cargadas con 50 μ l de un lisado de células MA-104 infectadas con el rotavirus RRV e incubadas por 2 hrs a 37 °C. Las placas fueron lavadas 4 veces e incubadas con 50 μ l del sobrenadante de la suspensión de heces por 1 hr a 37 °C. Posteriormente, las placas fueron lavadas 4 veces e incubadas con 50 μ l de una dilución 1:1000 de anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa (Kirkegaard and Perry Labs) por 1 hr a 37 °C. Después de lavar, se adicionaron 50 μ l del sustrato o-fenilenediamina (Sigma) en buffer de acetatos y se incubó por 15-20 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se paró la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm.

6.- Citofluorometría

Células provenientes de GLM obtenidos de 5 ratones BALB/c así como diferentes líneas celulares fueron incubadas a 4 °C con anticuerpos anti-IL-2, anti-CD25, anti-CD69, anti-CD3, anti-B220, anti-CD4 y anti-CD8 para su posterior análisis por citofluorometría de flujo. Para esto, se sacrificaron por luxación cervical grupos de 5 ratones BALB/c inoculados con 1×10^5 uff de EDIMwt, los GLM obtenidos se disgregaron en RPMI⁺ con ayuda de una rejilla metálica y un embolo. Las células obtenidas se pasaron a un tubo de 15

ml conteniendo 10 ml de RPMI⁺ y centrifugaron a 1,800 rpm por 7 minutos. La pastilla resultante fue resuspendida en 10 ml de buffer de enlace (BE: PBS, 2% SFB y 0.02 % de azida de sodio, pH: 7.4) posteriormente, el tubo se centrifugó a 1800 rpm por 7 min y el botón celular fue resuspendido en 2 ml de BE. Por último, las células se contaron y llevaron a una densidad de 2×10^6 /ml para su posterior distribución en tubos eppendorf. Los tubos eppendorf fueron centrifugados a 2,000 rpm por 5 min, el botón fue resuspendido en 50 μ l de BE y fueron agregados los siguientes anticuerpos monoclonales:

- a) GK1.5: Anticuerpo monoclonal de rata (Lewis) IgG2b anti-CD4 de ratón; usado como ascites a una dilución 1:50 y acoplado a PE (BD; 0.1mg) se usó a una dilución de 1:200.
- b) 5H10-1: Anticuerpo monoclonal de rata IgG2b, λ anti-CD8 de ratón, (BD) 0.5mg, acoplado a FITC y usado a una dilución de 1:200.
- c) RA3-6B2: Anticuerpo monoclonal de rata IgG2a, κ anti-CD45R/B220 de ratón, (BD) 0.1mg, acoplado Cy-chrome y usado a una dilución de 1:200.
- d) OKT3: Anticuerpo monoclonal de rata IgG2a anti-CD3 Epsilon (T3) de ratón; (Serotec) purificado a 1μ g/ μ l y usado a una dilución de 1μ g por 50 μ l de BE.
- e) H1.2F3: Anticuerpo monoclonal de Hámster Armenio IgG, grupo 1, λ anti-CD69 de ratón; (BD) 0.5mg, acoplado a biotina y usado a una dilución de 1:200.
- f) PC61: Anticuerpo monoclonal de rata IgG1, λ anti-CD25 (IL-2 R α , p55) de ratón; (BD) 0.5mg, acoplado a biotina y usado a una dilución de 1:200.
- g) Streptavidina acoplada a PE (BD) 0.5mg y usada a una dilución de 1:200.
- h) Streptavidina acoplada a FITC (BD) 0.5mg y usada a una dilución de 1:200.
- i) Streptavidina acoplada a Cy-chrome (BD) 0.1mg y usada a una dilución de 1:200.
- j) 7D4: Anticuerpo monoclonal de rata IgG1, κ acoplado a PE como control de isotipo.
- k) JES6-1A12: Anticuerpo monoclonal de rata IgG2a anti-IL-2 de ratón, (Anne Ó garra, Dymax, Palo Alto) purificado en el laboratorio usando sefárosa G a partir de medios de cultivo condicionados y usado a una dilución de 1μ g por 50 μ l de BE.
- l) Fracción F(ab')² de anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-rata 1.5mg, acoplado a FITC (Jackson/ ImmunoResearch) se usó a una dilución de 1:20.

Las células fueron incubadas con los diferentes anticuerpos en hielo por 30 min, al terminó los tubos fueron centrifugados a 2,000 rpm por 5 min y el botón fue resuspendido en 1 ml de BE. Sólo en el caso de los anticuerpos no acoplados a fluoróforos las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 50 μ l de BE a una dilución 1/50 de fragmentos F(ab')² del anticuerpo IgG de ratón anti-rata fluoresceínado (FITC) (Jackson) ó a streptavidina acoplada a Cy-chrome, FITC ó PE, en ambos casos se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y lavadas con 1 ml de BE. Por último, los tubos fueron centrifugados a 2,000 rpm por 5 min, el botón fue resuspendido en 100 μ l de BE y las células fueron fijadas por la adición de 100 μ l de paraformaldehído al 2 % en PBS (pH: 7.3). Se resguardaron de la luz y almacenaron a 4 °C (por un máximo de 7 días) hasta su análisis por citofluorometría de flujo usando los citofluorómetros FACSCAN y FACS-SCALYBUR (Becton Dicksons).

7.- Generación de hibridomas de células Th

Grupos de 3 ratones hembras BALB/c fueron inoculados oralmente con 1×10^5 ufc del rotavirus murino EDIMwt. Cinco días después se obtuvieron los GLM y se disgregaron en RPMI⁻ con la ayuda de una rejilla metálica y un émbolo de jeringa. Las células obtenidas de manera estéril se resuspendieron en 10 ml de RPMI⁻ y se centrifugaron a 1,200 rpm por 5 min. El botón celular resultante se resuspendió en 2 ml de medio, se contaron las células y se llevaron a una concentración de 2×10^7 células/ml. A la suspensión celular se le adicionaron 4×10^6 células del timoma BW5147 $\alpha\beta$ ⁻ (HPRT⁻), para obtener una mezcla celular de 5:1 (esta proporción varió en algunos experimentos). La mezcla celular fue centrifugada a 1,200 rpm por 10 min, el sobrenadante decantado y las células en el botón celular fusionadas agregando 1 ml de polietilenglicol 1500 (PEG; Boheringer) a 37 °C. En este paso el PEG fue agregado gota a gota y mezclando cuidadosamente las células. Inmediatamente después se adicionaron 3 ml de RPMI⁻ a 37 °C por un lapso de 2 min, seguido de 7 ml del mismo medio en un lapso de 3 min. Las células así fusionadas se centrifugaron a 1,200 rpm por 5 min y se diluyeron a una densidad de 1×10^6 células/ml (basado en el número de células de GLM inicial) en RPMI⁺ suplementado con 200 μ M hipoxantina, 0.8 μ M aminópterina y 32 μ M timidina (HAT 2X; Boheringer) y se adicionaron 100 μ l de la suspensión celular en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc),

previamente sembradas con 1×10^5 timocitos por pozo en $100 \mu\text{l}$ de RPMI⁺. Los timocitos fueron obtenidos a partir de timos de ratones de 2 semanas de nacidos y fueron sembrados a manera de células alimentadoras 18 hrs antes de la fusión. Las células BW5147 $\alpha\beta$ ⁺ son incapaces de utilizar la vía del salvamento en la síntesis de nucleótidos por poseer una mutación en la enzima HPRT, esto resulta en la muerte de todas las células no fusionadas al cabo de unos 8-10 días de cultivo en la presencia de HAT. Por esta razón, al día 6 de cultivo se substituyeron $100 \mu\text{l}$ del medio de los hibridomas por $100 \mu\text{l}$ de RPMI⁻ HAT 2X fresco. Después de 12 a 18 días de cultivo, se transfirieron $100 \mu\text{l}$ de los pozos que presentaron proliferación celular a placas de 24 pozos conteniendo 1 ml de RPMI⁺ con $100 \mu\text{M}$ hipoxantina y $16 \mu\text{M}$ timidina (HT; Boheringer), para posteriormente determinar la especificidad y fenotipo de los hibridomas en ensayos de estimulación antigénica y citofluorometría respectivamente. Los hibridomas que resultaron positivos para alguno de los parámetros evaluados fueron congelados y almacenados en nitrógeno líquido.

8.- Ensayos de estimulación antigénica

8.1.- Estimulación antigénica en hibridomas Th

Este ensayo se basa en la secreción de IL-2 de los hibridomas de células Th en respuesta a una estimulación antigénica. Los hibridomas generados fueron cultivados en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc) a una densidad de 5×10^4 células/pozo en presencia de 1×10^5 células/pozo de las líneas celulares A.20.j ó A20.A45 como CPA's y diferentes concentraciones de antígeno, en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ de RPMI⁺. Después de 24 hrs de cultivo, se colectaron $100 \mu\text{l}$ de los sobrenadantes y se congelaron a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Como control negativo se usó medio de cultivo solo en vez de antígeno y como control positivo se usó el activador policlonal de células T Concanavalina-A a $2.5 \mu\text{g/ml}$. El contenido de IL-2 en los sobrenadantes fue evaluado en la línea celular CTLL-2 dependiente para su proliferación de este factor.

8.2.- Estimulación antigénica en células totales de GLM

Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inoculados oralmente con 100 μ l de DMEM⁻ (grupo control) ó 100 μ l de DMEM⁻ con 1×10^5 uff del rotavirus EDIMwt. De 7 a 31 días después se obtuvieron los GLM y se disgregaron en RPMI-CPR2 con ayuda de una rejilla metálica y un émbolo. Las células en suspensión se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min y se resuspendieron en un volumen adecuado de RPMI-CPR2. Para los ensayos de proliferación celular se sembraron de 2 a 4×10^5 células en un volumen de 100 μ l (por triplicado) en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc) y se adicionaron 100 μ l de medio con diferentes concentraciones de antígeno. Como control negativo se adicionó medio solo y como control positivo 2.5 μ g/ml de Con-A. Después de 3 o 4 días de incubación se midió la proliferación celular adicionando 10 μ l de medio con 0.5 μ Ci de timidina tritiada (H^3 -Tdr; Amersham) e incubando las células por 18 hrs. Posteriormente, las células fueron colectadas en hojas de fibra de vidrio usando un colector de células (Skatron) y la incorporación de H^3 -Tdr al DNA celular fue medida, en líquido de centelleo, usando un contador de emisiones β . La respuesta proliferativa se determinó por medio del índice de estimulación (IE), que es el cociente entre las medias aritméticas de los conteos por minuto (cpm) de las células estimuladas y las células control no estimuladas. Se consideró una respuesta proliferativa positiva cuando el IE era ≥ 3 .

8.3.- Estimulación antigénica en linfocitos Th

Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inoculados oralmente con 100 μ l de DMEM⁻ (grupo control) ó 100 μ l de DMEM⁻ con 1×10^5 uff del rotavirus EDIMwt. De 7 a 31 días después se obtuvieron los GLM, se disgregaron y se purificaron las células Th $CD4^+$ por el método inmuno-magnético MAC'S descrito más adelante. Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 1×10^5 células en un volumen de 50 μ l (por triplicado) en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc), más 50 μ l de medio con 2×10^5 células de bazo provenientes de ratones BALB/c normales tratadas con mitomicina-C como fuente de CPA's y 100 μ l de medio con diferentes concentraciones de antígeno. Como control negativo se adicionó medio solo y como control positivo 2.5 μ g/ml de Con-A. Después de 4 días de incubación se midió la proliferación celular por el método radioactivo descrito previamente.

9.- Purificación de células Th

Se purificaron las células Th CD4⁺ positivamente a partir de células linfoides totales provenientes de GLM, por medio de micro-esferas magnéticas cargadas con anticuerpo anti-CD4 de ratón. Este método se denomina en inglés "Magnetic cell sorting" (MAC'S; Miltenyi Biotec, Alemania) y está recomendado como un método sencillo en el que se obtienen niveles altos (arriba del 95 %) de pureza en las poblaciones aisladas. Se siguió el protocolo recomendado en el manual de la compañía. Para esto, se eliminaron las células muertas de las suspensiones celulares a través de un colchón de Lympholyte-M (Cedarlane, Hornby, Canadá), colocando 5 ml de medio con 1×10^7 células/ml sobre 5 ml de Lympholyte-M en un tubo cónico de 50 ml y centrifugando 20 min a 1000-1500 g a T/A. Posteriormente, se obtuvo la banda celular de la interfase, se diluyó en 10 ml de buffer de enlace (BE; PBS, 0.5 % de SFB, 2 mM, pH: 7.2) y se centrifugó a 400 g por 5 min, repitiéndose el proceso 2 veces más. Después de la última centrifugación, el botón celular se resuspendió en BE a una concentración de 1×10^7 células por cada 90 μ l y se adicionaron 10 μ l de micro-esferas magnéticas cargadas con el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 de ratón GK1.5, mezclándose cuidadosamente e incubándose por 15 min a 4 °C. Al término de la incubación, las células se diluyeron con 5 ml de BE, se centrifugaron y se resuspendieron en 500 μ l de BE. La suspensión celular se pasó a través de una columna MS⁺/RS⁺ colocada en un campo magnético de alto poder (con capacidad para seleccionar hasta 1×10^7 células positivamente), previamente equilibrada con 500 μ l de BE, lavando 3 veces con 500 μ l de BE se dejó fluir a las células negativas y las células enlazadas a las micro-esferas fueron retenidas por el magneto. Para liberar a las células de la columna, esta se separó del campo magnético, se aplicó 1 ml de BE y se ejerció presión con un émbolo. Las células se colectaron en un tubo cónico de plástico y se lavaron con 5 ml de BE antes de usarse. Para determinar la identidad de las células obtenidas, se tomaron alícuotas de la población inicial, la población negativa y la población positiva y se realizó un ensayo de citofluorometría con un anticuerpo anti-CD4 acoplado a FITC.

10.- Tratamiento de células de bazo con Mitomicina -C'

Con la finalidad de bloquear la división de las células de bazo de ratones BALB/c normales a utilizar como células presentadoras de antígeno (CPA's) se utilizó como agente entrecruzador del DNA mitomicina-C. Bazos de ratones normales fueron disgregados en medio de cultivo a través de una rejilla metálica usando un émbolo de jeringa. La suspensión celular fue centrifugada, el botón celular fue resuspendido en 5 ml de una solución de NH_4Cl al 0.84 % (P/V) en agua Milli-Q, para lisar los eritrocitos, y se incubó por 5 min a T/A. Las células se lavaron 2 veces con medio y se llevaron a una densidad de 2×10^7 células/ml, para incubarse a 37 °C por 20 min en presencia de 25 µg/ml de mitomicina-C. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con medio RPMI-CPSR-2, se resuspendieron en 10 ml del mismo medio y se incubaron a 37 °C por 2 hrs. Finalmente, las células se centrifugaron y resuspendieron en medio completo a la concentración adecuada.

11.- Determinación de los niveles de mRNA para diferentes citocinas por medio de ensayos de RT-PCR

Se obtuvieron células totales de GLM de ratones BALB/c sanos (día 0) y 7 días posteriores a la inoculación de 1×10^4 ufc de EDIMwt. Estas se sembraron en placas de 24 pozos (Costar) a 2×10^6 células/ml en 2 ml de RPMI⁺, en presencia de medio solo, 8 µg/ml de rotavirus RRV semipurificado ó 2.5 µg/ml de Con-A. Después de 48 hrs de incubación, las células fueron colectadas en tubos eppendorf y lavadas 2 veces con PBS, el botón celular resultante se congeló a -70 °C. A partir de las células congeladas se aisló el RNA total por el método de Tiocianato de Guanidina/Fenol: Cloroformo (Chomezynski et al., 1987). Todo el material usado fue previamente horneado a 180 °C toda la noche, asimismo, el agua empleada fue libre de pirógenos y tratada con DEPC 1:1000 (V/V) durante 12 hrs.

11.1.- Obtención del RNA total

Los tubos eppendorf almacenados previamente a -70 °C fueron puestos sobre hielo seco y al botón celular se le adicionaron 500 µl de una solución de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 6.3 M, citrato de sodio 39.2 mM, sarcocil 0.5 % y 2-ME 100 mM en agua; pH: 7). Usando un pistilo para tubos eppendorf se homogenizaron las células y se

añadieron 50 μ l de acetato de sodio 2M (pH: 4), 550 μ l de fenol saturado y 200 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se homogenizó la mezcla invirtiendo los tubos durante 10 segundos y se centrifugó durante 10 min a 15,000 rpm a 4 °C. Se extrajo la capa superior (que contenía el RNA), se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen equivalente de isopropanol para precipitar el RNA. La mezcla se dejó a -20 °C toda la noche, para posteriormente centrifugar 10 min a 15,000 rpm a 4 °C y decantar el sobrenadante. La pastilla obtenida se disolvió nuevamente en 166 μ l de tiocianato de guanidina, y para volver a precipitar el RNA, se adicionó un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C) y se dejó al menos 1 hr a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 15,000 rpm a 4 °C, se decantó y se lavó la pastilla adicionando 1 ml de etanol al 75 % y centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente, se decantó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar al aire y se solubilizó con 15-20 μ l de agua. Normalmente para solubilizar completamente el RNA se calentó en un baño maría por 5 min a 65 °C. Para cuantificar y determinar la pureza del RNA obtenido se midió su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman). La calidad del RNA fue analizada mediante la electroforesis de 2 μ g de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1% en presencia de formaldehído.

11.2.- Diseño y Síntesis de Primers

La secuencia de los pares de primers para la amplificación del cDNA de TGF- β 1, fueron descritos anteriormente por (Autenrieth et al., 1997). La secuencia de los pares de primers para la amplificación del cDNA de β -actina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ fue determinada mediante el programa OLIGO-4, en base a las secuencias del cDNA obtenido del Gen-Bank (Tabla-1-). La síntesis de los primers antes mencionados, incluyendo el oligo dT, fue realizada en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando el método del fosfito-triester en fase sólida.

11.3.- Transcripción reversa (RT)

A partir del RNA total se generó cDNA usando la técnica de RT. Para esto, se realizaron reacciones de 20 μ l que contenían buffer de reacción (Gibco) (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂ y 75 mM KCl; pH: 8.3), 10 mM DTT (Boehringer-Mannheim), 1 mM dNTP's

(Gibco), 5.2 mM de oligo dT, 20 U de inhibidor de RNAsas (Boehringer-Mannheim), 200 U de la enzima M-MLV RT (Gibco) y 2.5 µg de RNA. Las reacciones fueron cubiertas con 16 µl de aceite de mineral e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, 1 hora a 37 °C y 10 minutos a 95 °C en un termociclador (Techne), modelo PHC-2. Al término de la reacción el cDNA obtenido durante este proceso fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

Tabla-1- Pares de primers utilizados para la amplificación del cDNA de diferentes citocinas de ratón.

Citocina	Primer Sentido	Primer Anti-sentido	Amplifica
β-actina	TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TTG	CGA CTC CTT TTC CGC TCC CTG AG	550 pb
IL-2	AAC AGC GCA CCC ACT TCA A	TTG AGA TGA TGC TTT GAC A	442 pb
IL-4	TAG TTG TCA TCC TGC TCT T	CTA CGA GTA ATC CAT TTG C	404 pb
IL-5	AAG GAT GCT TCT GCA CTT GA	ACA CCA AGG AAC TCT TGC A	365 pb
IL-10	AAC TGG TAG AAG TGA TGG CCC AGG A	CTA TGG AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	237 pb
INF-γ	TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG	CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG	460 pb
TGF-β1	CCT CCC CCA TGC CGC CCT CG	CCA GGA ATT GTT GCT ATA TTT CTC	545 pb

11.4.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomaron 2 µl de los cDNA's obtenidos en las reacciones de RT y se desnaturalizaron a 94 °C por 1 minuto 15 segundos. El cDNA desnaturalizado se mezcló con buffer de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM y 1.5 mM MgCl₂; pH: 8.3), 0.2 mM de dNTP's, 2 µM de los primers correspondientes y 0.5 U de la enzima Taq DNA

polimerasa. Las mezclas fueron cubiertas con aceite mineral y se realizaron 30 ciclos de amplificación en un termociclador, bajo las siguientes condiciones: (a) desnaturalización 45 segundos a 92 °C (b) alineación 1 min a 62 °C y (c) extensión 1 min 45 segundos a 72 °C. Los productos fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 %. Se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a 0.25 µg/ml durante 5 min y las bandas resultantes fueron visualizadas mediante la exposición del gel a través de luz U.V.. Se tomaron las fotografías para el posterior análisis de las bandas resultantes.

11.5.- Cuantificación de las bandas obtenidas de los ensayos de PCR

Las fotografías tomadas de los geles de PCR ante la exposición de luz U.V. fueron analizadas utilizando el programa NIH-Image, y las densidades de banda obtenidas fueron comparadas y graficadas con relación a las bandas de expresión del gen constitutivo (β -actina), mediante la siguiente relación: Densidad relativa = Densidad banda problema (citocina) / Densidad banda β -actina.

VI RESULTADOS

1.- Modelo murino de infección por rotavirus

A principios de los años noventa Ward y Cols. (1990) generaron un modelo de infección por rotavirus en ratón adulto. En este modelo se da tanto una replicación viral vigorosa como una respuesta de anticuerpos IgA intestinales específicos para el virus, sin embargo, no se presenta un cuadro de diarrea como en los ratones neonatos. A pesar de esto último, el modelo de ratón adulto ha sido de gran utilidad en el análisis de la respuesta inmune y por ende en la evaluación de vacunas contra la infección por rotavirus. De esta manera, se decidió montar este modelo para analizar la respuesta de las células Th de GLM en la infección por rotavirus.

Se inocularon por vía oral grupos de 5 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad con 1×10^4 uff del rotavirus murino silvestre EDIMwt. Se tomaron muestras de heces previo a la inoculación y cada 24 hrs hasta el día 8. Los contenidos de partículas virales e IgA anti-rotavirus en las heces fueron evaluados por medio de ensayo de ELISA de captura. En la Figura-4 se muestra la replicación del rotavirus EDIMwt y la respuesta de anticuerpos IgA intestinales a lo largo de la infección. En nuestros ratones la excreción de partículas virales se presentó a partir del día 2 de iniciado el experimento, alcanzando los niveles máximos. Desde ese momento, los niveles se mantuvieron hasta el día 4. A partir del día 5 post-infección los niveles de excreción comenzaron a decrecer de manera sostenida, hasta no ser detectables en el día 8 post-infección. Por otro lado, la respuesta IgA anti-rotavirus fue detectada a partir del cuarto día de iniciado el experimento, con un incremento sostenido hasta el día 8 post-infección, que fue el último día analizado. En otros experimentos encontramos (dato no mostrado) que los anticuerpos IgA continúan incrementándose hasta llegar a un máximo al día 21 post-infección.

Como era de esperarse, durante el curso de la infección no se detectaron signos de diarrea ni otro tipo de alteración obvia en el ratón. Es importante mencionar que la aparición de IgA anti-rotavirus en el intestino coincide con la disminución de la replicación viral y su posterior eliminación, lo cual es esperado ya que previamente se ha demostrado que este tipo de anticuerpos son determinantes tanto en la eliminación de una infección primaria como en la prevención de una infección secundaria con el mismo serotipo viral (McNeal, Broome y Ward, 1994). La cinética y magnitud de la replicación viral y producción de IgA intestinal anti-rotavirus en los ratones BALB/c infectados con EDIMwt en este estudio, coinciden completamente con el modelo de infección previamente reportado (Ward, McNeal y Sheridan, 1990), por lo que consideramos válido el uso de este modelo para analizar la respuesta de las células Th de mucosa intestinal contra rotavirus en una infección.

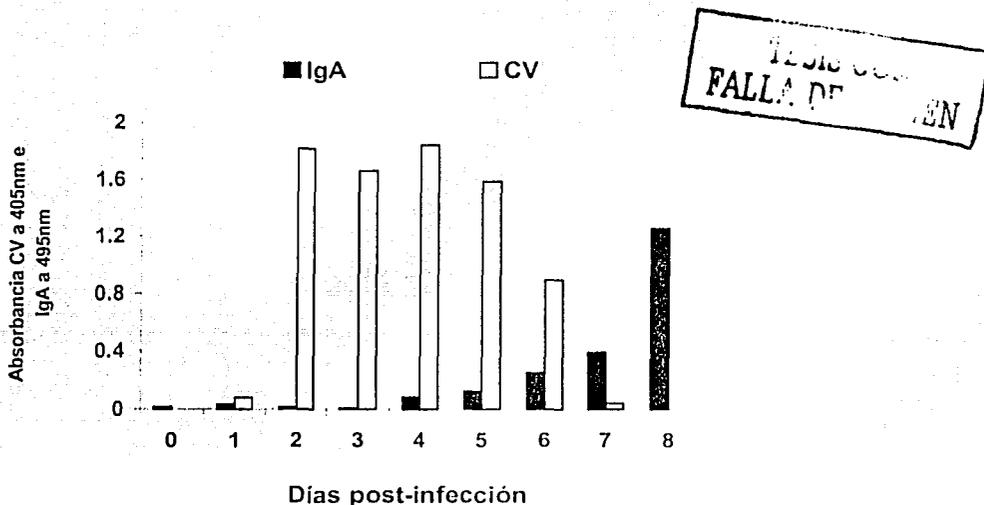


Figura-4.- Carga viral y presencia de IgA anti-rotavirus en heces de ratones infectados con el rotavirus EDIMwt.- La determinación de rotavirus y anticuerpos IgA anti-rotavirus en heces fue realizada por ensayos de ELISA de captura. Para determinar la carga viral se usó como primer anticuerpo a un anticuerpo policlonal hiper-immune de cabra contra rotavirus y como anticuerpo de detección se empleó un anticuerpo policlonal contra rotavirus producido en conejo. El ensayo se reveló con un anticuerpo policlonal contra IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina y se leyó en un lector de placas de ELISA a 405nm. Para la detección de los anticuerpos IgA anti-rotavirus se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra seguido por un lisado de células MA-104 infectadas con rotavirus RRV. El ensayo se reveló con un anticuerpo policlonal anti-IgA de ratón marcado con peroxidasa y se leyó en un lector de placas de ELISA a 492 nm.

2.- Respuesta antígeno específica *in vivo* de linfocitos provenientes de GLM durante la infección por rotavirus.

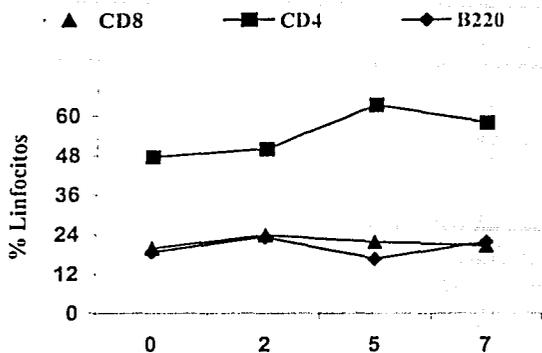
Se sabe que en PP y GLM se induce a las células antígeno específicas contra los enteropatógenos, para que posteriormente éstas penetren en la LP y realicen su función efectora. Muy probablemente, las partículas virales generadas durante la replicación de rotavirus en los enterocitos son captadas por las células M e introducidas a las PP, donde las células dendríticas locales se encargarían de presentar los antígenos de rotavirus a los linfocitos B y T para su activación. Asimismo, estas células dendríticas podrían viajar y presentar antígeno a los linfocitos de GLM. Acorde con esto, en ratones infectados con el rotavirus EDIMwt se induce una clara hiperplasia de PP y GLM desde el día 2 y hasta el día 6 postinfección (Dato no mostrado).

Previos estudios han demostrado (Blutt et al., 2002) que en PP de ratones infectados con rotavirus se genera una proliferación celular dominada por los linfocitos B, contrario al GLM donde se observó una mayor respuesta de linfocitos T. Por lo anterior, se decidió estudiar la respuesta primaria y secundaria de las células Th inducidas durante la infección por rotavirus en los GLM. Con la finalidad de determinar los tiempos óptimos para realizar las fusiones de linfocitos Th primarios contra rotavirus y de reestimulación *in vitro* de linfocitos Th secundarios, se evaluó la cinética de amplificación (expansión) y activación de las diferentes poblaciones linfocitarias en GLM en respuesta a la infección, a través del método de citofluorometría de flujo. Para esto, se obtuvieron las células de GLM de 5 ratones infectados con el rotavirus EDIMwt (aproximadamente 5 GLM por ratón) a los días 0, 2, 5 y 7 post-infección y se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-CD4, CD8 y B220, que definen a las células Th, Tc y B, respectivamente, acoplados a diferentes fluorocromos. El día 0 se refiere a los ratones control no infectados. Para determinar a las poblaciones celulares se usaron los anticuerpos monoclonales. La activación fue determinada usando anticuerpos monoclonales anti-CD69 y anti-CD25. CD69 es un marcador de activación temprana y CD25 (cadena α del receptor para IL-2) un marcador de activación tardía. Ambos marcadores se expresan en células T y B que se activan a través de su receptor a antígeno.

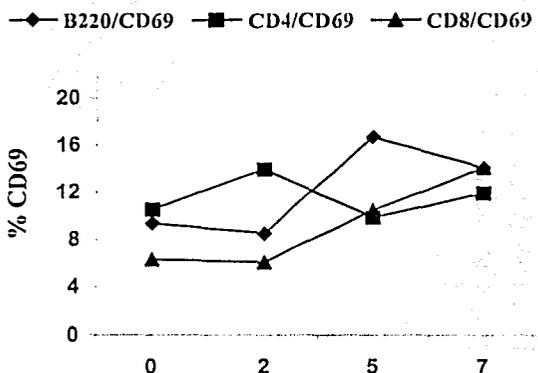
En ratones no infectados se encontró que en la población celular total en GLM, las células Th representan alrededor de un 49 % seguidas de las células Tc y B con aproximadamente un 20 % cada una (Figura-5A). Esto concuerda con lo reportado en la literatura (Blutt et al., 2002). En respuesta a la infección por rotavirus EDIMwt, las células Th incrementaron su número a más del doble (datos no mostrados) llegando a representar hasta un 63 % de la población total al día 5 post-infección, tiempo en el cual comenzaron a disminuir hasta llegar a un 58 % al día 7 post-infección. Por otra parte, las células Tc y B también se incrementaron en número, pero presentaron una menor variación en cuanto a su porcentaje con respecto al día 0. Esta paradoja se debe en parte a que en la población total de linfocitos analizados no se tomó en cuenta a otras células residentes de GLM, mismas que pudieron modificar el porcentaje final del análisis citofluorométrico. Debido a lo anterior, las moléculas de activación fueron analizadas en el citofluorómetro de flujo (programa Cell Quest) usando ventanas para cada una de las poblaciones linfocíticas (siendo un 100 % la población analizada). Se encontró que los niveles basales de expresión de CD69 en GLM de ratones no infectados son bastante reducidos, contrastando con otros sitios de inducción como es el bazo, ya que células B y Th presentaron aproximadamente un 10 % de expresión cada una y las células Tc 6 % (Figura-5B). Las células Th fueron las primeras en incrementar la expresión en respuesta a la infección alcanzando 14 % de positividad al día 2 post-infección y disminuyendo al 12 % para el día 7. Tanto las células Tc como B mantuvieron la expresión basal al día 2 y a partir de este momento incrementaron fuertemente la expresión de CD69. Las células Tc tuvieron un aumento continuo hasta el día 7 donde se alcanzó un 14 % de expresión y las células B alcanzaron un máximo de 17 % al día 5 para disminuir a un 14 % al día 7 post-infección.

Los niveles de expresión del marcador de activación tardío CD25 en células Tc y B de GLM de ratones no infectados fueron de entre 1 y 3 % (Figura-5C). En estas poblaciones celulares no se observó ningún incremento importante durante la infección. Las células Th presentaron niveles basales de un 13 % y sorpresivamente estos niveles disminuyeron en respuesta a la infección llegando a un 10 % para el día 7.

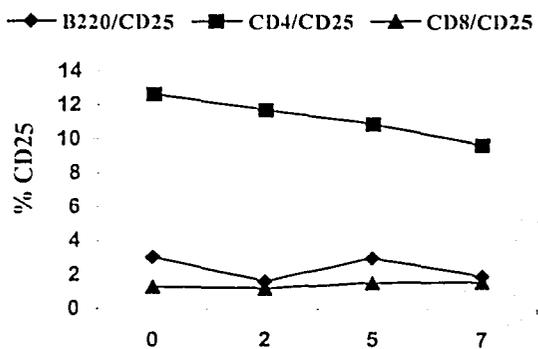
A)



B)



C)



D í a s

Figura-5.- Análisis citofluorométrico de la cinética de aparición de marcadores de superficie en linfocitos de GLM de ratones infectados con el rotavirus ED1Mwt.

(A) Porcentaje de las diferentes poblaciones linfocíticas. Se analizó el efecto de la infección sobre el porcentaje de linfocitos Th, Tc y B en la población celular total de GLM, usando anticuerpos monoclonales anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC ó anti-B220-Cyrom, respectivamente.

(B) Expresión de CD69. Se analizó el efecto de la infección sobre la inducción de CD69 en la superficie de linfocitos Th, Tc y B, usando doble tinción con anticuerpos monoclonales contra los marcadores poblacionales y contra CD69. Este último anticuerpo se usó acoplado a biotina y se detectó con estreptavidina acoplada a PE. Se analizaron las ventanas de cada población.

(C) Expresión de CD25. Igual que en B pero usando un anticuerpo monoclonal anti-CD25.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados sugieren que las células linfoides de GLM analizadas son activadas en respuesta a la infección por rotavirus, sin embargo, su estado de activación es limitado ya que el marcador tardío de activación CD25 no se incrementa, e inclusive llega a disminuir como en el caso de las células Th. Esta activación limitada resulta en incrementos celulares en este órgano también limitados.

3.- Generación de hibridomas de células Th primarias específicas para rotavirus provenientes de GLM de ratones infectados.

En este trabajo se propuso iniciar el estudio del repertorio de la especificidad que se genera en una respuesta primaria analizando células provenientes de GLM en ratones infectados con el rotavirus homólogo EDIMwt. El objetivo de estudiar la respuesta inmune primaria es el de analizar el repertorio Th justo después de la infección, sin las manipulaciones que se dan en las estimulaciones secundarias *in vitro*, que probablemente pudieran polarizar una respuesta hacia cierto determinante antigénico. De esta manera, se intentó generar hibridomas de células Th provenientes de GLM. Así, ratones BALB/c fueron infectados oralmente con 1×10^5 uff del rotavirus EDIMwt y a los 5 días las células totales de GLM se fusionaron con el tímoma BWTCR $\alpha\beta$. Se realizaron las fusiones en este día basándose en los resultados de la sección anterior (Figura-5 A y B), donde se observó que las células Th de GLM son activadas por la infección desde el día 2 teniendo una expansión máxima al día 5. Las células fusionadas fueron sembradas en cajas de 96 pozos en presencia de IAT. En algunos casos también se co-cultivaron las fusiones con timocitos como células alimentadoras. Los hibridomas que lograron proliferar en los pozos fueron expandidos secuencialmente a placas de 48 y 24 pozos y frascos de 25 cm² para su congelación y análisis funcional.

Como se muestra en la Tabla-2, se realizaron un total de 4 fusiones. En las 2 primeras fusiones se observó poca proliferación en los pozos y no se obtuvo ningún hibridoma estable. Dada la baja viabilidad en las fusiones se exploró la posibilidad de que las células BWTCR $\alpha\beta$ estuvieran contaminadas con micoplasma, ya que se ha reportado que este

tipo de infección en cultivo puede influir negativamente en la generación de hibridomas (Uphoff y Drexler, 2001). Para esto, se utilizó un kit de detección de micoplasma comercial (Stratagene), basado en la amplificación por PCR de dos regiones del genoma de la bacteria. En la Figura-6A se muestra un gel de agarosa. En el carril 4 se corrieron los productos de amplificación del control positivo incluido en el kit donde se observan dos bandas de 600 pb y 180 pb, que son las bandas firma de la presencia de micoplasma. El control negativo (carril 3) no muestra las bandas, sin embargo, el carril 2 correspondiente a las células BWTCR $\alpha\beta$ muestran las dos bandas firma del micoplasma. Por lo que se concluyó que efectivamente las células BWTCR $\alpha\beta$ estaban contaminadas con micoplasma. De esta manera, la línea celular fue tratada por 16 días con concentraciones altas de gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para eliminar la infección, lo cual se logró, ya que como se puede ver en la Figura-6B después del tratamiento no se detectaron secuencias específicas de micoplasma en las células.

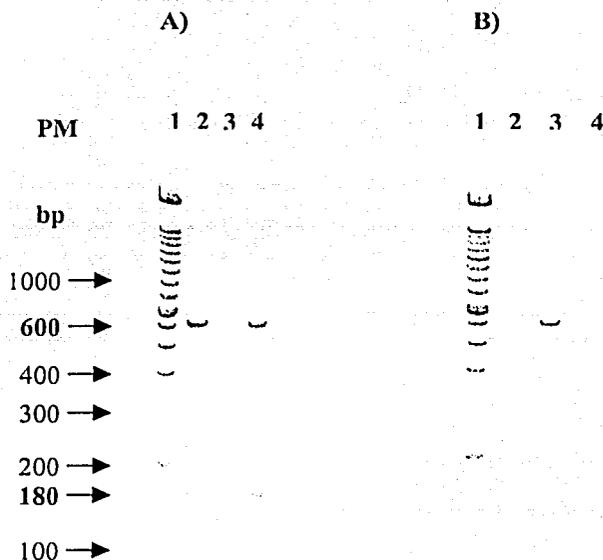


Figura-6.- Productos de PCR obtenidos a partir de sobrenadantes de BWTCR $\alpha\beta$.
 A) 1.- marcador de DNA de 100 pb. 2.- BWTCR $\alpha\beta$. 3.- control negativo (medio). 4.- control positivo (DNA genómico de micoplasma orale) B) 1.- marcador de DNA de 100 pb. 2.- BWTCR $\alpha\beta$ tratadas durante 16 días con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Gentamicina. 3.- control positivo (DNA genómico de micoplasma orale). 4.- control negativo (medio).

TESIS CON
 FALLA DE OML

Usando las células BWTCR $\alpha\beta^+$ libres de micoplasma se realizaron 2 fusiones más. Esta vez se lograron obtener un total de 14 hibridomas estables (Tabla-2), a los cuales se les analizó la especificidad antigénica y la presencia de marcadores de superficie.

Tabla-2.- Resumen de las fusiones obtenidas a partir de células provenientes de GLM de ratones infectados EDIMwt y la línea BWTCR $\alpha\beta^+$.

Fusión #	Placas sembradas	Radio de linfocitos / BWTCR $\alpha\beta^+$	Timocitos 1X10 ⁵ /pozo	Hibridomas estables	Días de crecimiento
1	4	5:1	No	0	ND
2	2	2:1	Si	0	ND
3	2	5:1	Si	11: 1P.7B, 1P.8C, 1P.9C, 1P.5D, 1P.11I, 1P.21I, 1P.51I, 2P.1F, 2P.2G, 2P.3B y 2P.4C	10-18
4	2	5:1	Si	3: P2.9D, P1.3F y P2.5G	12-25

Para determinar si los hibridomas reconocían alguna de las proteínas estructurales del rotavirus, se realizaron ensayos de activación en los cuales los hibridomas son co-cultivados con antígeno y células presentadoras de antígeno singénicas. Si existe activación de los hibridomas estos secretan al medio IL-2, que se detecta cultivando las células CTLL-2 dependientes de este factor con los sobrenadantes de los cultivos. Así, la proliferación de las células CTLL-2 nos indica de manera indirecta que los hibridomas son específicos para el antígeno analizado. Como células presentadoras se usaron a las células A.20.j que tienen en su superficie tanto moléculas del MHC tipo I como tipo II (haplotipo H-2^d), sin embargo, en este tipo de ensayos donde el antígeno se adiciona de manera exógena, la presentación se da en el contexto de las moléculas tipo II y por lo tanto se detecta la respuesta de células Th.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

En la Figura-7 se muestra un resultado representativo donde se observa que ninguno de los 14 hibridomas fue capaz de reconocer alguna de las proteínas estructurales de una preparación semi-purificada del rotavirus murino EDIMwt. Como control positivo, se incluyó el hibridoma 3G5.7.1D, que es una clona del hibridoma 3G5.7 previamente reportado en este laboratorio (Baños et al., 1997), que reconoce al igual que el hibridoma madre a la secuencia de aminoácidos 289-302 de VP6 de al menos 8 cepas de rotavirus, incluyendo VP6 del rotavirus EDIMwt, en el contexto de la molécula del MHC tipo II IE^d. Como se esperaba, este hibridoma tuvo una clara respuesta específica contra EDIMwt. Los hibridomas generados en este trabajo tampoco pudieron reconocer la proteína de fusión GST-VP6 proveniente del rotavirus EDIMwt ni el péptido sintético 289-302 de la misma secuencia de VP6 (datos no mostrados).

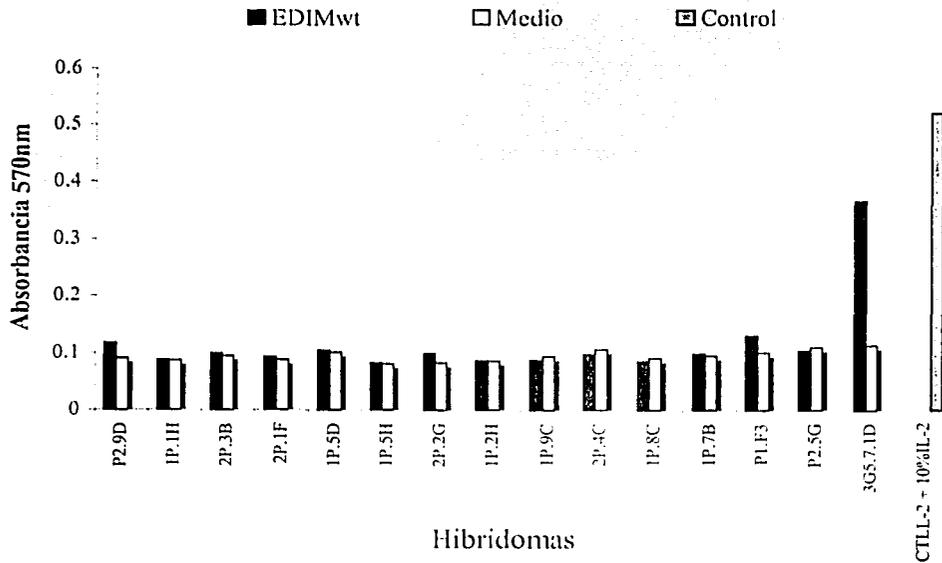


Figura-7.- Respuesta de hibridomas contra el rotavirus EDIMwt.- Secreción de interleucinas por hibridomas de células Th, estimulados por células A.20j y 10 µl de EDIMwt semi-purificado. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la incorporación de MTT en las células CTLL-2 proliferantes. Los hibridomas cuya respuesta fue similar al hibridoma 3G5.7.1D anti-rotavirus fueron considerados como positivos.

Es claro que para que un hibridoma de células Th pueda reconocer antígeno es necesario que exprese en su superficie niveles apropiados del TCR y CD4. Esta molécula auxilia a la respuesta antígeno específica aumentando la afinidad del complejo de reconocimiento a través de su unión al MHC tipo II. El hecho de que ninguno de los hibridomas generados a partir de GLM de ratones infectados se activara pudiera deberse a la ausencia de alguna ó ambas de estas moléculas. Por lo que se analizó por citofluorometría de flujo la presencia de CD3 y CD4 en la superficie de 8 hibridomas. Se analizó CD3 como indicador de la presencia del TCR ya que es conocido que el complejo CD3 es indispensable para el eficiente ensamblaje y transporte del TCR (Blumberg et al., 1991).

Se usaron anticuerpos monoclonales de rata anti-CD3 y CD4 de ratón y como segundo anticuerpo fragmentos F(ab')² de cabra anti-Ig's de rata acoplados a FITC. Como control de isotipo se incluyó un anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-4 de ratón, ya que esta citocina no se encuentra presente en la superficie de las células. Como control negativo se usaron células BWTCR $\alpha\beta$ que no expresan ni CD3 ni CD4, y como control positivo células totales de bazo. Se encontró que 4 hibridomas presentaban tanto CD3 como CD4 (1P.1H, 1P.5D, 1P.5H y 2P.3B) (Figura-8), 2 presentaron sólo CD4 (1P.2H y 1P.9C), uno sólo CD3 (2P.1F) y el restante no presentó ninguna de las moléculas (2P.2G). Finalmente, como era de esperarse CD3 y CD4 no se expresaron en las células BWTCR $\alpha\beta$ y sí en las de bazo.

Estos resultados nos muestran que al menos la mitad de los hibridomas generados de GLM no tenían las moléculas necesarias para generar una respuesta antígeno específica, y la otra mitad a pesar de tener tanto TCR como CD4 tienen una especificidad antigénica diferente de las 6 proteínas estructurales del rotavirus EDIMwt.

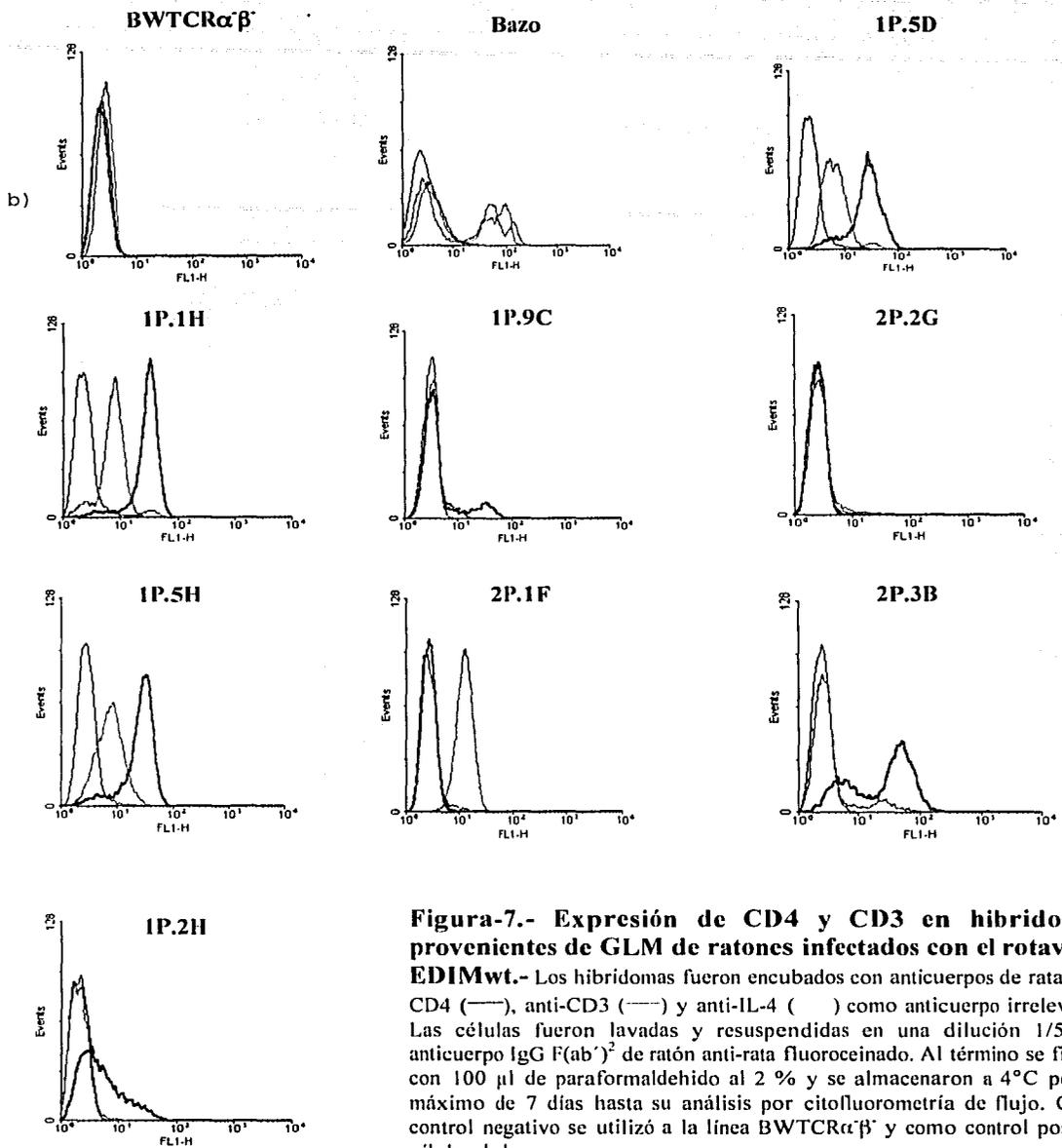


Figura-7.- Expresión de CD4 y CD3 en hibridomas provenientes de GLM de ratones infectados con el rotavirus EDIMwt.- Los hibridomas fueron encubados con anticuerpos de rata anti-CD4 (—), anti-CD3 (---) y anti-IL-4 (····) como anticuerpo irrelevante. Las células fueron lavadas y resuspendidas en una dilución 1/50 de anticuerpo IgG F(ab')² de ratón anti-rata fluorocinado. Al término se fijaron con 100 μ l de paraformaldehído al 2 % y se almacenaron a 4°C por un máximo de 7 días hasta su análisis por citofluorometría de flujo. Como control negativo se utilizó a la línea BWTCR $\alpha\beta$ ⁻ y como control positivo células de bazo.

TESIS DE
FALLA DE CALIDAD

4.- Respuesta proliferativa secundaria *in vitro* de células Th.

La especificidad de la respuesta secundaria de células Th específicas para antígenos de rotavirus se intentó analizar a través de ensayos de proliferación *in vitro* con células provenientes de GLM de ratones infectados con rotavirus murino. Se utilizó este ensayo por su sencillez, ya que sólo se necesita obtener una suspensión celular del órgano linfoide y cultivar las células en presencia de antígeno. En estas condiciones la respuesta proliferativa celular total depende de la respuesta de las células Th, ya que estas células son la principal fuente de citocinas necesarias para la proliferación y activación de células B y Tc. Por otro lado, es sabido que a partir del tercer día de cultivo la proliferación de células B en respuesta a antígeno es mínima y la estimulación por un antígeno exógeno no infeccioso, como se utiliza en estos ensayos, sólo induce la proliferación de células Th.

a) Montaje de las condiciones de proliferación celular.

Se evaluaron las condiciones óptimas, número de células y tiempo de incubación, para obtener la mayor respuesta proliferativa posible. Para esto, células provenientes de GLM de ratones BALB/c normales ó infectados oralmente con el rotavirus EDIMwt (10 días postinfección) se cultivaron en micro-placas de 96-pozos a 1×10^5 , 2×10^5 y 4×10^5 células por pozo en presencia o ausencia de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de Con-A (estimulador policlonal de células T) y se incubaron por 72 ó 96 hrs. Al término de estos tiempos se adicionó Tdr- $[\text{H}^3]$ y se incubó por 18 hrs más. Aunque en las 3 concentraciones celulares y los dos tiempos de incubación utilizados se obtuvieron niveles proliferativos altos (arriba de un IE de 20), 2×10^5 y 4×10^5 células cultivadas por 96 hrs dieron en general los mejores IE tanto para las células de ratones control como infectados (entre 70 y 90 de IE) (Figura-9). Así, se decidió realizar los ensayos de estimulación antigénica a cualquiera de las dos concentraciones celulares mencionadas por 96 hrs.

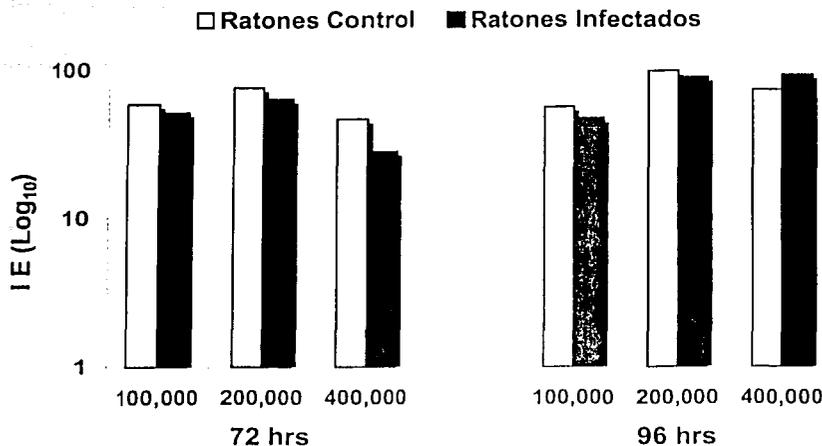


Figura-9.- Proliferación de células de GLM estimuladas con Con-A.- Células provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con rotavirus EDIMwt diez días antes fueron cultivadas en presencia de 2.5 µg/ml de Con-A. Como control se incubó a las células con medio solo. Se variaron los números celulares y tiempos de incubación como se indica en la gráfica. Al final de los tiempos de incubación, se adicionaron a los cultivos 0.5 µCi de [³H]-Tdr. Después de 18 hrs más de incubación las células fueron colectadas y los niveles de [³H]-Tdr incorporado al DNA evaluados en un contador de radiaciones β. La incorporación de [³H]-Tdr al DNA celular nos indica de manera indirecta la proliferación celular. Los resultados se expresan como Índice de Estimulación (IE) = CPM experimental/CPM medio de cultivo.

b) Proliferación de células de GLM contra antígenos de rotavirus.

Con la finalidad de determinar la especificidad de las células Th de memoria contra las proteínas estructurales del rotavirus, ratones BALB/c fueron inoculados oralmente con medio de cultivo ó con 1X10⁵ uff del rotavirus EDIMwt. Diez días después se obtuvieron las células de los GLM y se cultivaron en presencia de 7.5 y 15 µg/ml de los rotavirus semi-purificados EDIMwt, RRV y YM, bajo las condiciones arriba descritas. La calidad y la pureza de las preparaciones virales se verificaron por medio de geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie. En la Figura-10 se muestra una preparación de rotavirus RRV semi-purificado (que ejemplifica lo encontrado en las otras cepas de rotavirus usadas), donde no se detectaron proteínas abundantes provenientes de las células MA-104 y por el contrario se observó la presencia de todas las proteínas estructurales. Como controles

células fueron cultivadas con medio de cultivo solo ó con lisado de células MA-104 sin infectar Como control positivo de proliferación, las células se cultivaron con 2.5 µg de Con-A.

Gel de poliacrilamida al 11%

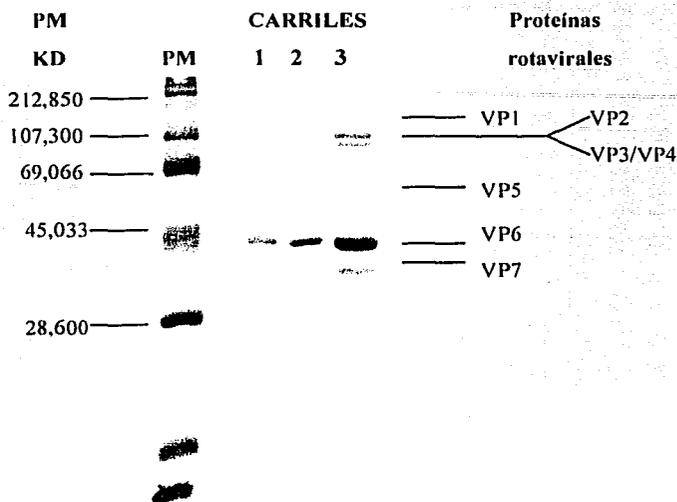


Figura-9- Migración electroforética de las proteínas estructurales que conforman a rotavirus.- Se analizó el patrón electroforético de las proteínas estructurales del rotavirus RRV semi-purificado, a través de un gel de poliacrilamida al 11 % bajo condiciones reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a 2.5, 5 y 10 µg de proteína de la preparación viral.

En la Figura-10 se muestra un resultado representativo de 3 experimentos realizados, donde se observa que las células de GLM de ratones infectados no proliferaron de manera específica contra ninguno de los rotavirus evaluados, ya que aunque se encontraron IE mayores a 3 las células provenientes de ratones no infectados presentaron en todos los casos niveles de proliferación ligeramente superiores. En presencia de lisado de células no infectadas también se observaron niveles proliferativos ligeramente superiores a un IE de 3, pero en este caso la respuesta de células de ratones infectados fue un poco más alta que las células de los ratones control. Como se esperaba, en presencia de Con-A las células de los ratones control e infectados tuvieron una potente proliferación con IE de entre 50 y 100.

FAUL...
 . FAUL...
 . FAUL...

Aunque en la Figura-11 se observa una menor proliferación de las células de los ratones infectados, esto podría variar de experimento a experimento.

El hecho de que las células proliferaran en presencia de Con-A pero no en presencia de antígeno, claramente nos indica que la ausencia de proliferación específica hacia el antígeno no se debió a que las células estuvieran dañadas o fueran incapaces de proliferar. Finalmente, tampoco se obtuvieron respuestas proliferativas rotavirus específicas cuando se analizaron células de GLM a los 14, 21 y 30 días posteriores a la infección (resultados no mostrados), lo que descarta la posibilidad que a los 10 días postinfección las células Th de GLM estén aún en la fase de memoria y, por lo tanto, sean anérgicas a la estimulación con antígeno.

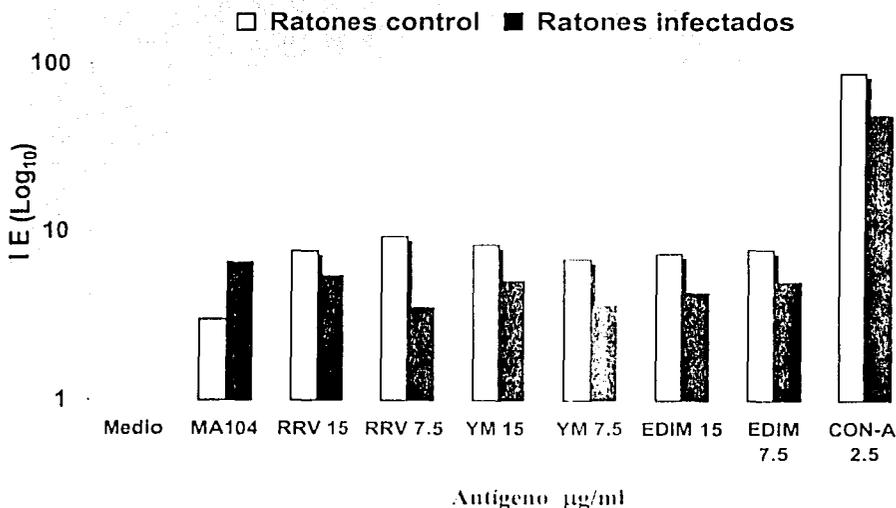
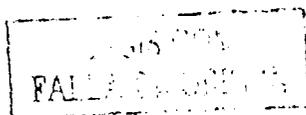


Figura-11.- Proliferación de células totales de GLM contra antígenos de rotavirus.- Cuatrocientas mil células provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con rotavirus EDIMwt diez días antes fueron cultivadas en presencia de 7.5 ó 15 µg de rotavirus EDIMwt, RRV y YM semi-purificados. Como controles negativos se incubaron células con medio solo ó con lisados de células MA-104, y como control positivo se adicionó 2.5 µg de Con-A. Después de 4 días de incubación, se adicionaron a los cultivos 0.5 µCi de [H³]-Tdr. Después de 18 hrs de incubación, las células fueron colectadas y los niveles de [H³]-Tdr incorporado al DNA evaluados en un contador de radiaciones β. Los resultados se expresan como IE.



En un trabajo previo, se demostró que rotavirus semi-purificado o purificado puede inducir respuestas proliferativas inespecíficas de células B (Bruce et al., 1994), probablemente por la presencia del RNA de doble cadena. En ese trabajo se eliminó el efecto inespecífico al irradiar con luz U.V. las preparaciones virales, para de esta manera entrecruzar las bases del RNA y evitar la estimulación de las células B. En este trabajo es posible que la respuesta inespecífica de las células de GLM provenientes de los ratones no infectados haya enmascarado la respuesta antígeno específica de las células provenientes de ratones infectados. Por esta razón, se repitió el ensayo de proliferación usando como antígeno rotavirus RRV irradiado con luz U.V. Así, rotavirus RRV semipurificado fue irradiado con una lámpara de luz U.V. a una longitud de onda corta de 254 nm por 5, 10 y 20 minutos y la infectividad de la preparación fue evaluada en ensayos de formación de focos infecciosos en células MA-104, como una medida de la inactivación del virus por entrecruzamiento del RNA. Se encontró que 5 min de exposición a la luz U.V. redujo en un 90 % la infectividad del rotavirus, y a partir de los 10 min de exposición hubo una reducción del 100 % de la infectividad (Figura-12). Se analizó el estado de las proteínas mediante un gel de acrilamida y se observó que el tratamiento con luz U.V. no alteró las propiedades electroforéticas de las proteínas tratadas al compararlas con las de virus no tratado (resultado no mostrado).

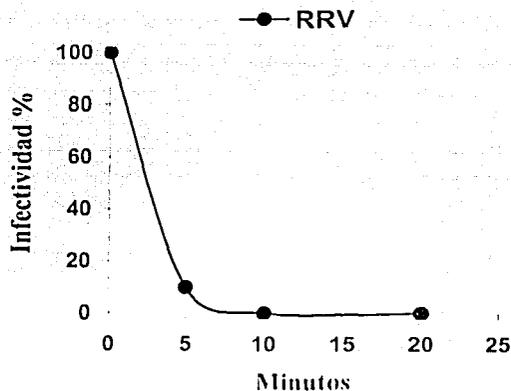


Figura-12.- Efecto de la luz U.V. sobre la infectividad de rotavirus.- Rotavirus RRV semi-purificado fue expuesto a luz U.V. de onda corta (254 nm) por 5, 10 y 20 min, a una distancia de 10 cm. La infectividad se evaluó a través de la formación de focos infecciosos en células MA-104. Células provenientes de GLM de ratones inoculados con DMEM o 1×10^5 ufl de rotavirus EDIMwt fueron cultivadas con 7.5 μ g del rotavirus RRV semi-purificado sin tratar o tratado por 20 min con luz U.V..

Se encontró que el tratamiento con luz U.V. de la preparación del rotavirus RRV no revirtió la ausencia de proliferación antígeno específica que se observa con el rotavirus sin inactivar (Figura-13).

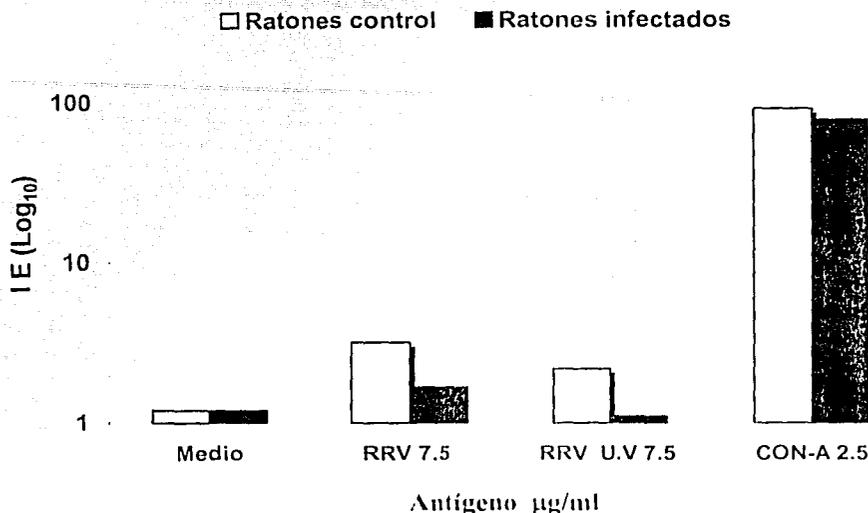


Figura-13.- Proliferación de células totales de GLM contra rotavirus tratado con luz U.V.- Cuatrocientas mil células provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con rotavirus EDIMwt veinticinco días antes fueron cultivadas en presencia de 7.5 µg de rotavirus RRV semi-purificado tratado ó sin tratar con luz U.V.. La preparación de RRV fue expuesta 20 min a luz U.V. Como controles negativo se incubaron células con medio solo, y como control positivo se adicionó 2.5 µg de Con-A. Después de 4 días de incubación, se adicionaron a los cultivos 0.5 µCi de [³H]-Tdr. Después de 18 hrs de incubación, las células fueron colectadas y los niveles de [³H]-Tdr incorporado al DNA evaluados en un contador de radiaciones β. Los resultados se expresan como IE.

Estudios previos en este laboratorio demostraron que VP6 es el blanco principal reconocido por células Th de memoria provenientes de ratones inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con rotavirus (Baños et al., 1997). De esta manera, se evaluó si estimulando las células Th provenientes de ratones infectados *in vitro* con VP6 se aumentaban las posibilidades de detectar proliferación específica. Así, células de GLM de ratones no infectados e infectados (21 días postinfección) fueron cultivadas con 5, 10 y 20 µg de las proteínas de fusión GST y GST-VP6 producidas en bacterias. La secuencia de VP6 se deriva del rotavirus YM y es prácticamente igual a la secuencia de VP6 del rotavirus EDIMwt ya que difiere en sólo 2 aminoácidos (Estes y Cohen, 1989).

Cuando las proteínas de fusión fueron analizadas en un gel de acrilamida se observaron bandas predominantes de GST y GST-VP6 respectivamente (Figura-14).

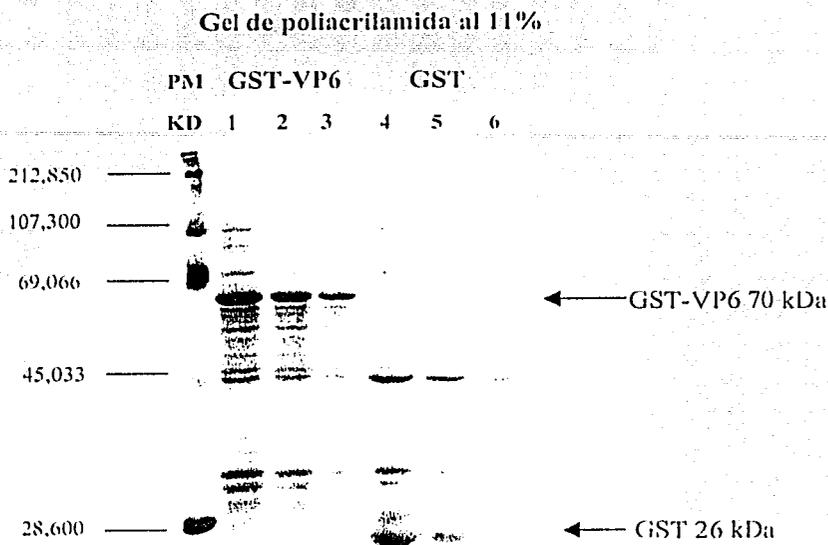
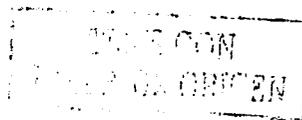


Figura-14.- Expresión de las proteínas recombinantes.- Las fracciones insolubles de lisados de bacterias inducidas a producir GST ó GST-VP6 fueron resueltas en un gel de acrilamida al 11% en condiciones reducidas, y teñidas con azul de Comassie. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a 20, 10 y 5 μ g de proteína total de bacterias productoras de GST-VP6. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a las mismas cantidades de proteína total proveniente de bacterias productoras de GST.

Al igual que en los experimentos anteriores las células fueron también cultivadas en presencia de medio solo y 2.5 μ g/ml de Con-A. Se encontró que tanto GST como GST-VP6 indujeron niveles proliferativos muy bajos (aprox. Un IE de 2) tanto en células provenientes de ratones control como infectados, excepto a la concentración de 10 μ g/ml donde se observó una fuerte estimulación inespecífica (Figura-15). Como se esperaba, Con-A indujo una proliferación de los linfocitos, lo que valida la observación de que no existió una respuesta VP6 específica *in vitro* de células Th provenientes de GLM de ratones infectados con EDIMwt.



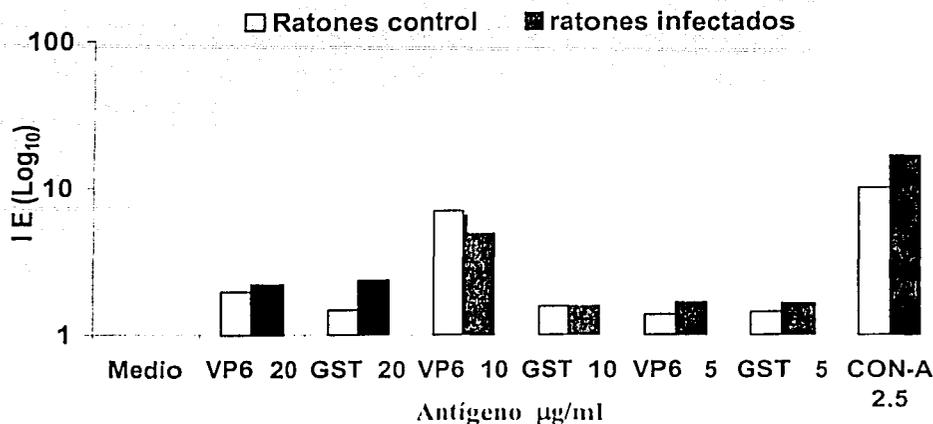


Figura-15.- Proliferación de células totales de GLM contra VP6 de rotavirus.- Cuatrocientas mil células provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con rotavirus EDIMwt veintidós días antes fueron cultivadas en presencia de GST y la proteína de fusión GST-VP6 a 5, 10 y 20 µg/ml. La secuencia de VP6 proviene del rotavirus YM. Como controles negativos se incubaron células con medio solo ó con lisados de células MA-104, y como control positivo se adicionó 2.5 µg de Con-A. Después de 4 días de incubación, se adicionaron a los cultivos 0.5 µCi de [³H]-Tdr. Después de 18 hrs de incubación, las células fueron colectadas y los niveles de [³H]-Tdr incorporado al DNA evaluados en un contador de radiaciones β. Los resultados se expresan como IE.

c) Proliferación de células Th purificadas contra los antígenos de rotavirus.

Dada la ausencia de una proliferación rotavirus específica detectable *in vitro* usando la población linfocítica total de los GLM, se decidió enriquecer la población de linfocitos Th de GLM por medio de un sistema inmuno-magnético (MAC'S), que consiste en incubar las células con micro-esferas magnetizadas cargadas con un anticuerpo monoclonal de rata contra la molécula de superficie CD4 de ratón para posteriormente aislar la población de linfocitos Th CD4⁺ por medio un de magneto. La población celular aislada de esta manera tuvo una pureza de aproximadamente un 98 % (Figura-16).

TESIS CON
FALLA DE
JUN

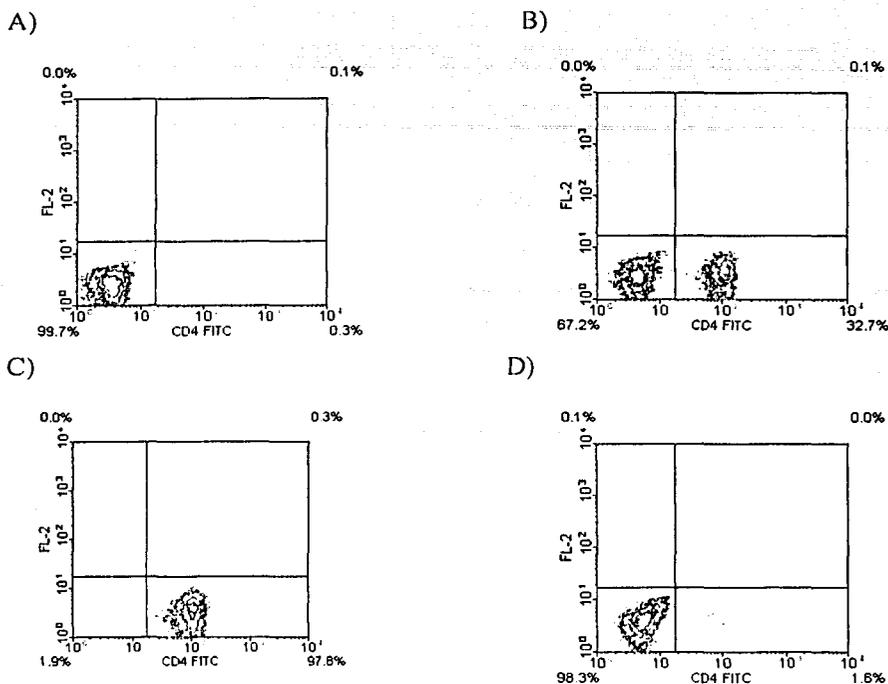


Figura-16.- Análisis citofluorométrico de células de GLM seleccionadas positivamente para la expresión de la molécula CD4.- Células provenientes de GLM de ratones normales fueron incubadas con micro-esferas cargadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón GK1.5 y sometidas a un campo magnético para seleccionar positivamente células Th. Las células totales previo a la separación y las poblaciones resultantes fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón RM4-4 acoplado a FITC. A) Población total de linfocitos sin teñir. B) Población total de linfocitos teñidos con anti-CD4. C) Población total de linfocitos aislados teñidos con anti-CD4. D) Población residual teñida con anti-CD4.

De esta manera, 1×10^5 células Th provenientes de GLM de ratones control e infectados con el rotavirus EDIMwt (día 26 postinfección) fueron cultivadas *in vitro* con células de bazo de ratón BALB/c normal tratadas con mitomicina-C, como fuente de CPA's, y $8 \mu\text{g/ml}$ de rotavirus RRV semi-purificado. Como control negativo se adicionó medio sólo y como control positivo $2.5 \mu\text{g/ml}$ de Con-A. Desafortunadamente, en este caso tampoco se observó una respuesta proliferativa de rotavirus específica en las células Th provenientes de ratones infectados, sin embargo, si hubo una potente respuesta en presencia de Con-A. Una posibilidad para explicar este resultado negativo es que las CPA's estaban dañadas por el

tratamiento por mitomicina-C y esto les impidió procesar y presentar antígeno adecuadamente. Sin embargo, esto no parece ser el caso ya que es conocido que la proliferación de los linfocitos T inducida por Con-A depende de la presencia de APC's metabólicamente activas capaces de secretar IL-1 (Dinarello 1991; Taira et al., 1993). Esto se confirmó en nuestro sistema ya que células Th purificadas cultivadas *in vitro* con Con-A en ausencia de APC's no fueron capaces de proliferar (Figura-17).

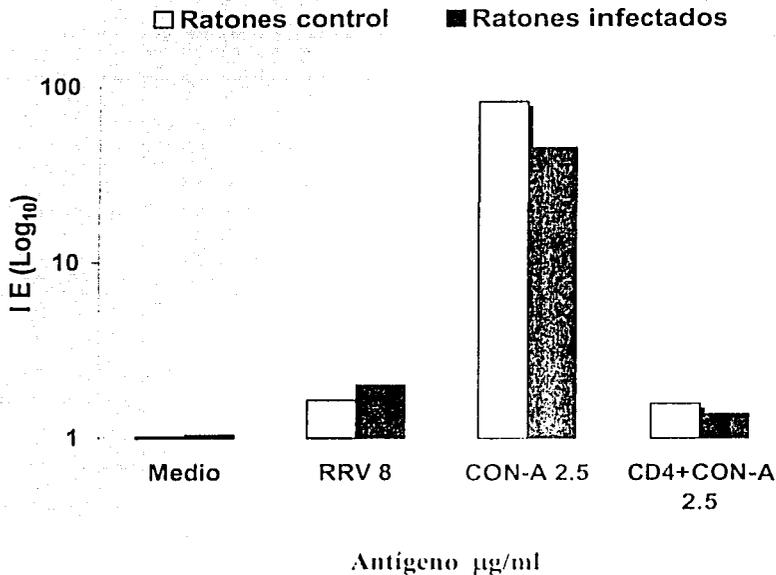


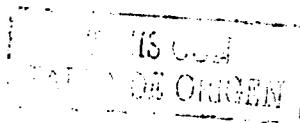
Figura-17.- Proliferación de células Th de GLM contra antígenos de rotavirus.- Cien mil células Th aisladas positivamente por el método inmuno-magnético (MAC'S) provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con rotavirus EDIMwt veintiséis días antes, fueron cultivadas en presencia de 2×10^5 células de bazo de ratones normales tratadas con mitomicina-e (CPA's). Como antígeno se adicionó 8 µg/ml de rotavirus RRV semi-purificado. Como control negativo se incubó a las células con medio solo y como control positivo se adicionó 2.5 µg de Con-A. Como control de la actividad de las CPA's se cultivaron células Th con Con-A en ausencia de CPA's. Después de 4 días de incubación, se adicionaron a los cultivos 0.5 µCi de [H^3]-Tdr. Después de 18 hrs más de incubación, las células fueron colectadas y los niveles de [H^3]-Tdr incorporado al DNA evaluados en un contador de radiaciones β. Los resultados se expresan como IE.

TESIS
 DE GRADUACIÓN
 EN BIOMEDICINA

5.- Análisis de la respuesta secundaria *in vitro* de células Th a través de los niveles de mensaje para diferentes citocinas.

La ausencia de proliferación *in vitro* de células Th secundarias provenientes de GLM contra antígenos de rotavirus, no excluía la posibilidad de que estas células estuvieran respondiendo sólo a través de la secreción de citocinas. En mucosa intestinal se han descrito poblaciones de células T activadas capaces de secretar citocinas pero sin evidente actividad proliferativa (Levings, Sangregorio y Roncarolo 2001; Thornton y Shevach 1998). De esta manera, se decidió evaluar la respuesta de las células Th secundarias *in vitro* específicas para rotavirus a través del análisis del mRNA para diferentes citocinas características de las sub-poblaciones Th1 (IL-2 e INF- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y Th3 (TGF- β). Para esto, células provenientes de GLM de ratones control ó infectados oralmente con 1×10^5 ufc de EDIMwt (día 7 postinfección) fueron cultivados *in vitro* con 8 μ g/ml de rotavirus RRV semi-purificado. Como control negativo, las células fueron cultivadas con medio solo. Después de 48 hrs de incubación, se obtuvo el mRNA total y los niveles de mensaje para las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ y TGF- β y la proteína de expresión constitutiva β -actina fueron evaluados por medio de un ensayo de RT-PCR usando cebadores específicos. Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de acrilamida al 6 % y la intensidad de las bandas calculada por densitometría. La intensidad de las bandas para las citocinas fue dividida entre la intensidad de la banda para β -actina, para de esta manera normalizar los resultados. Asimismo, se restaron los valores obtenidos de las células cultivadas con medio solo a los valores de las células estimuladas con virus, para así obtener los niveles reales de estimulación.

Como se puede observar en la Figura-18, la estimulación con rotavirus indujo un incremento en el mensaje para IL-2, IL-4, IL-10 e INF- γ en células de GLM provenientes de ratones control y de todas las citocinas analizadas en GLM provenientes de ratones infectados. En estos últimos, los niveles de mensaje para IL-2, 4, 5, INF- γ y TGF- β fueron superiores con respecto a los GLM de ratones control, sin embargo, el mensaje para IL-10 fue inferior. Por lo anterior, muy probablemente los GLM provenientes de ratones infectados tienen linfocitos Th de memoria contra rotavirus que pueden ser estimulados *in*



in vitro con antígeno para producir citocinas de manera específica, sin embargo, esta activación no puede ser evaluada a través de proliferación celular. Esto nos sugiere que en la infección por rotavirus las células Th de mucosas responden regulando la respuesta inmune pero con una proliferación limitada.

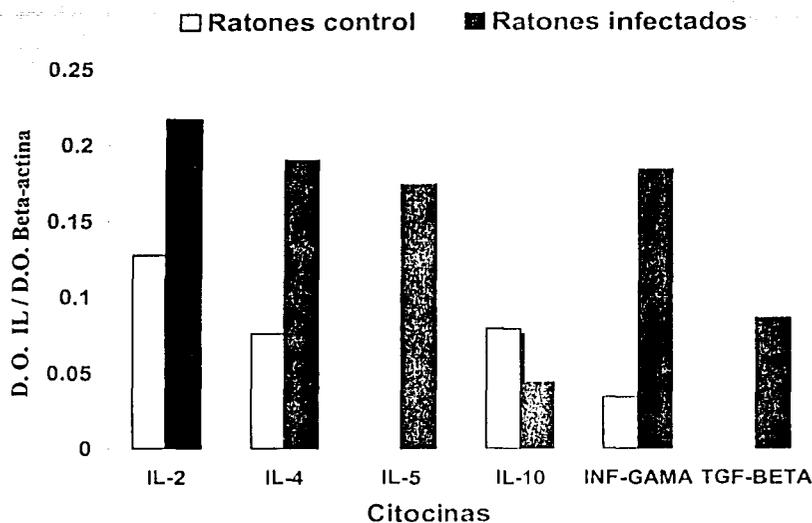


Figura-18.- Inducción de mRNA para diferentes citocinas en células totales de GLM estimuladas *in vitro* con rotavirus.- Células totales de GLM de ratones control ó infectados con EDIMwt (7 días postinfección) fueron cultivadas *in vitro* con medio solo ó en presencia de rotavirus RRV por 48 hrs. Posteriormente, los niveles de mensaje para las diferentes citocinas señaladas y β -actina fueron evaluados por el método de RT-PCR. Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 6 %, teñidos con bromuro de etidio y las cantidades relativas analizadas por densitometría. Los resultados están normalizados con respecto al mensajero de β -actina. Los valores obtenidos con las células cultivadas con medio fueron restados a los valores obtenidos con las células estimuladas con antígeno.

TESIS CON
VALOR DE TITULO

VII DISCUSIÓN

En este trabajo se montaron las condiciones experimentales para analizar el repertorio de la especificidad de los linfocitos Th en la respuestas primaria y secundaria en ratones infectados con rotavirus murino. Se analizó la respuesta en GLM, que es un órgano linfoide asociado a la mucosa intestinal, ya que no existe información previa sobre la especificidad de las células Th en GALT en una infección por rotavirus (Franco y Greenberg, 2001). Para esto, se montó en el laboratorio el modelo de infección de ratón adulto reportado por primera vez por el grupo del Dr. R. Ward a principios de los años 90's (Ward, McNeal y Sheridan, 1990), el cual ha sido fundamental para estudiar los mecanismos de inmunidad contra rotavirus (Franco y Greenberg, 1999). Aunque en este modelo no se presenta diarrea como en los ratones neonatos, si existe una vigorosa replicación de los rotavirus en el intestino que puede ser detectada en las heces a través de ensayos tipo ELISA. Asimismo, existe una respuesta de anticuerpos intestinales del tipo IgA que correlaciona con la limpieza de la infección. Cuando infectamos ratones adultos BALB/c oralmente con el rotavirus murino silvestre EDIMwt, encontramos replicación viral desde el día 2 y hasta el día 7 post-infección. A partir del día 8 no se detectaron partículas virales. En respuesta a la infección se encontraron IgAint anti-rotavirus a partir del día 4 con un aumento sostenido hasta el día 8, que fue el último día evaluado. De esta manera, es claro que el modelo de infección por rotavirus montado en este laboratorio reproduce lo reportado previamente en otros laboratorios y por lo tanto valida los estudios inmunológicos que se obtuvieron.

Para analizar el repertorio de las células Th anti-rotavirus en una respuesta primaria, se propuso fusionar estas células y generar hibridomas Th que nos permitieran mapear la especificidad a nivel clonal. De esta manera, inicialmente se caracterizó la respuesta de los linfocitos B y T en los GLM's de ratones infectados para determinar el tiempo óptimo de las fusiones. En general se puede decir que una respuesta primaria de células T inicia al 3er ó 4to día, llegando a un máximo a los días 7 u 8 y desapareciendo al día 10 (Zinkernagel, 2000), tiempo a partir del cual se puede generar una respuesta secundaria por la presencia de las células T de memoria generadas.

TESIS COMPLETADA
A DE EN

Se observó que a partir del segundo día post-infección existió una hipertrofia de los GLM's que se mantuvo hasta el día 7, fenómeno que estuvo acompañado de un aumento hasta del 100 % en el número de células de este órgano en comparación a los ratones no infectados. Con la finalidad de determinar la activación antígeno específica en respuesta a la infección, se analizaron los niveles del marcador de activación temprana CD69 y el marcador de activación tardía CD25 en la superficie de los linfocitos. Se encontró que tanto en células B como T se indujo la expresión de CD69, sin embargo la cinética fue diferente: las células Th tuvieron un aumento de este marcador al día 2 para bajar a niveles basales a los días 5 y 7 y las células Tc y B aumentaron CD69 en forma tardía a los días 5 y 7. Esto nos indica que la activación de las células Th claramente precede a la activación de las células Tc y B, lo cual es esperado ya que es sabido que estas dos últimas poblaciones dependen para su proliferación y subsecuente maduración de las citocinas secretadas por las células Th. Inesperadamente ninguna de las poblaciones analizadas incrementaron sus niveles CD25, y por el contrario, las células Th tuvieron una disminución porcentual en respuesta a la infección. El marcador CD25 es la cadena alfa del receptor de IL-2 que normalmente se incrementa en células en división (Ammar et al., 1991), por lo cual este resultado nos estaría indicando que las células se activan pero no proliferan, lo cual podría estar contradiciendo el aumento en la población celular observado en los GLM's en respuesta a la infección. Una posible explicación a este fenómeno radica en que sólo se representó el aumento proporcional de los marcadores en las diferentes poblaciones y no el aumento neto en base al número celular total a los diferentes días. Es claro que usando este último parámetro tanto CD69 como CD25 tienen un aumento a partir del día dos por célula, sin embargo, para los fines de este trabajo era más importante saber la intensidad (proporción) de la respuesta de las células Th.

Durante la realización de este trabajo, Blutt et al., (2002) reportó que en ratones adultos CD-1 infectados con el rotavirus murino ECwt el incremento de CD69 en GLM se debió casi exclusivamente a la población de linfocitos B. Este incremento se presentó a partir del día 3 y hasta el día 6 post-infección. Aunque también se evaluó la activación de las células Th y Tc, el aumento de los niveles de CD69 en estas poblaciones fue mínimo. La discrepancia con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio podría deberse a las

diferentes cepas de rotavirus usadas en ambos trabajos, ya que es sabido que la cepa de rotavirus murino ECwt es la más virulenta entre las cepas murinas usadas, incluyendo al rotavirus EDIMwt empleado en este trabajo (Burns et al., 1995). Es posible que la virulencia de ECwt sea suficientemente alta para inducir una respuesta de células B T-independiente, como ha sido sugerido en otros trabajos usando ratones knock out deficientes en linfocitos T (Franco y Greenberg, 1997). Sin embargo, es importante mencionar que en ambos modelos existe la generación de una inmunidad protectora que persiste a lo largo de la vida del ratón. Esto nos sugiere que las propiedades biológicas de las diferentes cepas de rotavirus pudieran inducir un balance diferencial en la activación de las diferentes poblaciones celulares, sin alterar la inmunidad protectora.

En condiciones de inmuno-competencia los rotavirus se replican sólo en los enterocitos maduros, localizados en la parte más distal de las micro vellosidades intestinales, lo cual limita su ingreso al organismo. Es muy probable que las partículas virales generadas en la infección ingresen a las PP a través de las células M, donde son capturadas por CD's y/o Mc's que las procesan y presentan a las células T. Los mecanismos de activación de las células B en este órgano aún no son muy claros, sin embargo, es posible que el receptor de estas células reconozca antígenos de la partícula viral presentados por CD's (Brown y Offit, 1998) y reciban ayuda de las células Th. Alternativamente, un estímulo potente (como es el caso de la infección por ECwt) podría inducir la activación de las células B sin la ayuda de las células Th, como ha sido reportado en otros modelos de infección viral (Zinkernagel, 2000). Una vez que las células B y T son activadas en PP, estas viajan al GLM y de ahí a la LP, que es el sitio efector de la mucosa intestinal. En nuestros resultados, se observó que a partir del día 2 post-infección las células linfoides presentan activación específica. En principio estas células activadas vendrían de la PP, sin embargo, existen reportes que muestran que en el modelo de infección por rotavirus se encuentran partículas virales tanto en PP como en GLM (Ogra et al., 1988). De esta manera, no podemos descartar que la activación pueda ser inducida en ambos órganos. Se requieren más estudios para este describir con claridad la dinámica de activación en GALT.

El aumento del marcador de activación temprana CD69 en la población de linfocitos CD4 de GLM en los ratones infectados nos indica la presencia de células Th contra rotavirus. Por lo que se decidió inmortalizar estas células a través de la generación de hibridomas Th y de esta manera determinar el repertorio Th en una respuesta primaria contra rotavirus. Al día 5 post-infección se obtuvo el mayor incremento en la población Th de GLM, ya que estas células representaron más del 60 % de la población total. Por este motivo, todas las fusiones realizadas fueron en este día. Se realizaron un total de 4 fusiones de las cuales en sólo 2 se generaron un total de 14 hibridomas, de los cuales ninguno fue capaz de reconocer antígenos de rotavirus presentados por CPA's en el contexto de las moléculas del MHC clase II. Sin embargo es importante apuntar que sólo 4 de ellos presentaron tanto TCR como CD4 en la superficie celular, moléculas indispensables en el reconocimiento de antígeno. Generalmente la generación de hibridomas Th requiere de re-estimulaciones antigénicas *in vitro* para poder expandir las clonas antígeno específicas y aumentar las probabilidades de obtener los hibridomas deseados (Baños et al., 1997). En este trabajo, no se hizo lo anterior ya que nuestro principal objetivo era el de describir el repertorio de la respuesta primaria *in vivo* sin manipulaciones *in vitro* que pudieran modificarlo. Al día 2 post-infección hubo un incremento de aproximadamente 5 % de células Th que presentaban el marcador CD69 con respecto al control, lo cual se reflejó en una limitada expansión de la población Th al día 5 (15 % arriba del control) pero una regresión a niveles de fondo de CD69. De esta manera, en el mejor de los casos la posible frecuencia de células Th específicas para rotavirus en GLM al día 5 fue de 1:10, lo cual es bajo si se considera que en poblaciones enriquecidas se tiene una frecuencia de células T antígeno específicas de entre 1:2 a 1:3. En conclusión es muy probable que la imposibilidad de generar hibridomas Th en este trabajo se debió a la baja frecuencia de las células Th anti-rotavirus en la respuesta primaria.

Una alternativa a futuro sería la de purificar por MAC'S a la población de linfocitos CD4/CD69 positivas al día 2 post-infección y fusionarlas directamente sin previa re-estimulación. De esta manera, se capturarían las células Th rotavirus específicas generadas por la infección. Alternativamente, se podría intentar el mapeo de epítomos por medio de tetrámeros de clase II cargados con péptidos relevantes. Sin embargo, esta técnica es

sumamente cara y al momento sólo se ha reportado un epítipo de células Th, el péptido 289-302 de VP6 (Baños et al., 1997), por lo cual el análisis de la respuesta estaría muy limitado.

El repertorio de células Th en la respuesta secundaria se intentó analizar mediante ensayos de estimulación antigénica y proliferación celular *in vitro*. La respuesta secundaria se puede distinguir de la primaria dado que tiene un periodo de inducción mas corto, por lo tanto la respuesta es más rápida, más potente y de mayor duración. Esto se debe principalmente al hecho de que la población de células antígeno específicas de memoria es mayor que la población de células antígeno específicas vírgenes, otro factor se debe a que las células de memoria se activan de forma más rápida y eficiente que la vírgenes (Sprent, 2002). Para los ensayos de proliferación celular, se estimularon *in vitro* células provenientes de GLM obtenidos de 10 a 30 días post-infección.

Como antígeno se utilizaron cepas homólogas y heterólogas semi-purificadas de rotavirus, así como VP6 heteróloga fusionada a GST. En ningún experimento se observó proliferación antígeno específica a pesar de que las células se encontraban en buen estado y capaces de responder a un estímulo policlonal como es Con-A. En el caso de la estimulación con rotavirus semi-purificado hubo una clara respuesta inespecífica por parte de las células control que posiblemente enmascaró una pequeña respuesta por parte de las células de memoria. En trabajo previo se reportó que los rotavirus son capaces de inducir respuestas proliferativas inespecíficas de células B en poblaciones totales de ganglio linfático, debido a muy probablemente al RNA de cadena doble presente en los viriones (Bruce et al., 1994).

Es sabido que RNA de doble cadena activa CD a través del receptor tipo Toll 3 en su superficie (Datta et al., 2003). Es probable que factores secretados por estas células o la presencia de estos receptores en células B pudieran inducir esta respuesta. Contrario a lo reportado por Bruce et al., (1994) cuando se trataron los viriones con luz U.V. para entrecruzar el RNA y de esta manera eliminar la inespecificidad, no se logró reducir por completo este efecto. De cualquier manera los niveles proliferativos encontrados fueron

bastante bajos, lo que impediría un análisis fino del repertorio de las células Th a partir de poblaciones totales de GLM. Con la finalidad de mejorar los niveles de proliferación antigénica específica, se purificaron las células Th provenientes de GLM. Sin embargo, tampoco obtuvimos niveles detectables de proliferación. En conclusión, podemos decir que el método de proliferación para analizar la especificidad de células Th provenientes de GLM de ratones infectados con rotavirus no es el adecuado.

Por lo anterior, se exploró otra función de las células Th como es la producción de citocinas en respuesta a un estímulo antigénico *in vitro*. Para esto, se analizaron los niveles de mensaje para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ y TGF- β por el método de RT-PCR en células de memoria provenientes de GLM estimuladas con rotavirus semi-purificado heterólogo. Se encontró que células provenientes de ratones no infectados respondieron con un incremento del mensaje para IL-2, IL-4, IL-10 e INF- γ en respuesta a la estimulación antigénica. Por otro lado, las células provenientes de ratones infectados respondieron con incremento de mensaje para todas las citocinas evaluadas en respuesta al estímulo antigénico, en el caso de los mensajes para IL-2, IL-4, IL-5, INF- γ y TGF- β se encontraron niveles superiores a los del control y por el contrario el mensaje para IL-10 fue inferior. Aunque no tenemos evidencias que el aumento de mensajes se deba exclusivamente a las células Th, es sabido que estas células son principales productoras de algunas citocinas como IL-2, IL-4 y IL-5, contribuyendo entre otras poblaciones a la producción de IL-10, INF- γ y TGF- β (Gonnella, et al., 1998), por lo tanto consideramos que esta metodología es útil para en un futuro analizar el repertorio de las células Th en la infección por rotavirus.

Un aspecto interesante de estos resultados es que las células Th de memoria de GLM específicas contra rotavirus presentan un perfil de citocinas mixto, esto es, inducen mensajes para citocinas tipo Th1 (IL-2 e INF- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y Th3 (TGF- β). La existencia de las células Th3 ha sido controversial, ya que en periferia no es muy claro su papel, sin embargo a nivel de mucosas las células Th3 juegan un papel importante anti-inflamatorio y regulador a través de la producción de TGF- β y se distinguen claramente como una población separada (Lehmann, 2002). Casi no existen datos concretos en la

literatura sobre el patrón de citocinas inducidas a nivel intestinal en respuesta a patógenos (Biron, 1994).

Una de las causas de la ausencia de datos son los altos niveles constitutivos de la mayoría de las citocinas estudiadas en GALT. En este laboratorio, usando el método de RT-PCR, se logró determinar que en una respuesta primaria las células del GLM de ratones infectados con rotavirus responden aumentando el mensaje para INF- γ , IL-10 e IL-12, sin embargo, no se determinó el tipo celular responsable de los incrementos (Iris Santillán, tesis de maestría). Por otro lado, los niveles de IL-2, IL-4 e IL-5 no tuvieron un incremento detectable. En principio estos resultados nos indicarían que en la respuesta primaria y secundaria de las células de GLM de ratones infectados con rotavirus existe un cambio de patrón de citocinas, lo cual no es sorprendente ya que las condiciones de estimulación antigénica *in vivo* vs *in vitro* son diferentes y por lo tanto conducen a una regulación diferente. Fromantin et al., (1998) demostró que células de bazo provenientes de ratones infectados reestimuladas *in vitro* con rotavirus heterólogo secretaron INF γ , IL-5 e IL-10 en respuesta al estímulo antigénico, siendo negativas para la producción de IL-2 e IL-4. El patrón de citocinas encontrado por Fromantin et al. en bazo contrasta con lo encontrado en nuestro estudio en GLM, sin embargo, consideramos que nuestros resultados son más representativos de los que sucede en la infección por rotavirus en GALT, ya que el bazo se considera un órgano linfoide periférico.

El intestino juega un papel preponderante en la evolución de los mamíferos, ya que es el órgano encargado de la asimilación de los nutrientes necesarios para la vida. Por esta razón, la mucosa intestinal está expuesta a infinidad de proteínas extrañas al organismo derivadas de los alimentos y de los microorganismos de la flora intestinal, que potencialmente pueden generar respuestas inmunes que interfieran con el funcionamiento intestinal. Para prevenir esta posibilidad tanto el epitelio como los órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal han generado un ambiente de tolerancia inmunológica hacia las proteínas no asociadas a patógenos. La IL-10 y TGF- β son factores importantísimos en este fenómeno ya que inducen funciones antagónicas a la respuesta inflamatoria. Esto se ha demostrado claramente en ratones knock out deficientes en IL-10 ó TGF- β , ya que estos ratones

presentan inflamación espontánea del intestino provocada por una hiper-reactividad de la respuesta inmune humoral y celular así como una predominancia de respuestas Th1 pro-inflamatorias (Kuhn et al., 1993).

El ambiente de tolerancia en el intestino puede ser alterado por la entrada de patógenos, como es el caso de la infección por *Salmonella thyfi*. Esta bacteria penetra las PP donde infecta a los Mc y se reproduce, viajando posteriormente al GLM y al bazo para finalmente inducir la fiebre tifoidea. La entrada de la Salmonella a los órganos linfoides induce una activación excesiva de los Mc que provoca el rompimiento del ambiente supresor lo que resulta en el proceso inflamatorio del intestino característico de esta enfermedad. Por el contrario, aunque la infección por rotavirus puede provocar diarrea profusa en neonatos, esta infección se caracteriza por no inducir inflamación. Como se explicó anteriormente, rotavirus no infecta células de GALT, razón por la cual no se induce una inflamación importante. De esta manera, la inducción de la respuesta inmune contra rotavirus en GALT está regulada bajo el ambiente de tolerancia intestinal inducido por TGF- β e IL-10. Sin embargo, es claro que a pesar de esto se puede generar una respuesta inmune protectora de células B y T, que persiste a lo largo de la vida del ratón. Así, es posible que exista una regulación fina que mantenga el equilibrio entre tolerancia e inmunidad, que genere los beneficios de la inmunidad protectora de larga duración sin alterar las funciones intestinales. En apoyo a esta idea podemos señalar el hecho que en GLM's de ratones infectados se duplicó la población de linfocitos totales y en cada población se observaron incrementos de CD69 significativos, en ausencia de un incremento en CD25, o sea existió una activación antígeno específica pero una respuesta proliferativa limitada. Asimismo, cuando se midió la capacidad proliferativa antígeno específica *in vitro* de células de memoria de GLM's de ratones infectados, sólo observamos respuestas en presencia de un mitógeno de células T (Con-A). Este bloqueo en la proliferación pudiera claramente deberse a un micro-ambiente tolerante en las condiciones de cultivo utilizadas, de hecho se pudieron detectar niveles elevados de TGF-B.

Aunque no se pudo determinar el repertorio de las células Th en la respuesta primaria y secundaria en la infección por rotavirus, este estudio establece las bases para que en futuros trabajos se evalúe el repertorio por métodos más apropiados como los mencionados durante la discusión. Por otro lado, este trabajo muestra que los métodos tradicionales utilizados para determinar las respuestas inmunes periféricas no necesariamente son útiles para determinar la respuesta inmune de mucosas.

VIII CONCLUSIONES

- 1.- Se logró reproducir el modelo de infección por rotavirus, reportado previamente, en ratones adultos BALB/c.
- 2.- Las células Th son la población predominante en los GLM y su activación en respuesta a la infección por rotavirus precede a la activación de las células B y Tc.
- 3.- No fue posible iniciar el estudio del repertorio de las células Th primarias de GLM en respuesta a la infección por rotavirus, ya que ninguno de los hibridomas Th generados fue específico para este patógeno. Esto fue muy probablemente debido a la baja frecuencia de células Th rotavirus específicas en GLM.
- 4.- Los ensayos de proliferación celular no son los adecuados para determinar el repertorio de las células Th en la respuesta secundaria contra rotavirus *in vitro*, debido a la inespecificidad y bajos niveles de la respuesta proliferativa.
- 5.- El análisis de la producción de citocinas es un método más adecuado para analizar el repertorio de las células Th en la respuesta secundaria contra rotavirus *in vitro*.
- 6.- En la mucosa intestinal prevalece un ambiente anti-inflamatorio, el cual podría explicar la limitada expansión *in vivo* e *in vitro* de los linfocitos T anti-rotavirus. Este ambiente favorece las funciones reguladoras, como es la secreción de citocinas.

IX PERSPECTIVAS

1.- La generación de hibridomas de células Th sigue siendo una buena alternativa para tener un panorama general del repertorio de las células Th primarias de GLM en una infección por rotavirus. Para esto, en futuros trabajos sería muy importante purificar por MAC'S a las células Th CD69 positivas presentes al día 2 post-infección y fusionarlas, para de esta manera aumentar las posibilidades de generar hibridomas de células Th rotavirus específicos.

2.- La citofluorometría nos permite analizar de manera simultánea a la población total de linfocitos activados en la infección por rotavirus y la producción de citocinas por cada una de estas células. De esta manera, se podría determinar el repertorio de células Th en la respuesta primaria y secundaria mediante la expresión de marcadores específicos para cada caso.

3.- Para determinar el repertorio de las células Th de memoria anti-rotavirus *in vitro* sería recomendable realizar ensayos de secreción de citocinas a través de la técnica de ELISA ó por el método de ELISPOT.

TESIS CON
SELLA DE OPICEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

X BIBLIOGRAFÍA

1. - Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 17 406:6797 782-7.
2. - Ammar A, Cibert C, Bertoli AM, Tsilivakosm V, Jasmin C, Georgoulas V. 1991. Biological and biochemical characterization of a factor produced spontaneously by adherent cells of human immunodeficiency virus-infected patients inhibiting interleukin-2 receptor alpha chain (Tac) expression on normal T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 87: 2048-55.
3. - Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T. 2003. Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol*. 1 75-81.
4. - Arias, C. F., S. López, and R. T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J Virol*. 41:42-50.
5. - Arias CF, Isa P, Guerrero CA, Méndez E, Zarate S, López T, Espinosa R, Romero P, López S. 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch Med Res*. 33:4 356-61.
6. - Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, Heinze G, Horak I 1997. Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut*. 41:793-800.
7. - Avendano P., Matson D. O., Long J., Whitney S., Matson C. C., Pickering L. K. 1993. Costs associated with office visits for diarrhea in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J*. 12(11): 897-902.
8. - Baños DM, López S, Arias CF, Esquivel FR. 1997. Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol*. 71(1): 419-26.
9. - Barnes G. 1999. Intussusception and rotavirus vaccine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 29:4 375.
10. - "BCA Protein Assay Reagent." 1991. Pierce catalog p. F-18. BCA Application Note #13; Acetone precipitation: elimination of soluble interfering substances from samples in preparation for protein estimation by Pierce's BCA* Protein Assay Reagent. Pierce Chemical Company, Rockford, Il 61105.
11. - Biron CA. 1994. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of virus infection. *Curr Opin Immunol*. 6:4 530-8.

12. - Bishop R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*. 1281-1283.
13. - Blumberg RS, Sancho J, Ley SC, McDermott FV, Tan KN, Breitmeyer J, Terhorst C. 1991. Genetic reconstitution of the T cell receptor (TCR) alpha/beta heterodimer restores the association of CD3 zeta 2 with the TCR/CD3 complex. *Eur J Immunol*. 21(2): 473-81.
- 14.- Blutt SE, Warfield KL, Lewis DE, Conner ME. 2002. Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J Immunol*. 1; 168(11): 5716-21.
- 15.- Both, G. W., A. R. Bellamy, and D. B. Mitchell. 1994. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 185:67-105.
- 16.- Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G. 1999. Regional specialization in the mucosa immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today*. 20:6 267-77.
- 17.- Bretscher P. A. 1999. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 5 96:1 185-90.
- 18.- Brocke P., Garbi N, Momburg F, Hammerling GJ. 2002. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol*. 14:1 22-9.
- 19.- Brown KA, Offit PA. 1998. Rotavirus-specific proteins are detected in murine macrophages in both intestinal and extra intestinal lymphoid tissues. *Microb Pathog*. 24:6 327-31.
- 20.- Bruce MG, Campbell I, Xiong Y, Redmond M, Snodgrass DR. 1994. Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells. *J Gen Virol*. 75 (Pt 8): 1859-66.
- 21.- Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB. 1995. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*. 20 207:1 143-53.
- 22.- Burns JW, Siadat_Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 5 272:5258 104-7.
- 23.- Butcher EC, Picker LJ. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 272:5258 60-6.

- 24.- Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*. 2, 361 - 367.
- 25.- Choi AH, Basu M, McNeal MM, Flint J, VanCott JL, Clements JD, Ward RL. 2000. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *J Virol*. 74:24 11574-80.
- 26.- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:1 156-9.
- 27.- Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. 1992. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol*. 30:7 1678-84.
- 28.- Crawford S. E., Mukherjee S. K., Estes M. K., Lawton J. A., Shaw A. L., Ramig R. F., Prasad B. V. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol*. 75:13 6052-61.
- 29.- Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*. 12: 259-93.
- 30.- Cresswell P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. 84, 505-507.
- 31.- Datta SK, Redecke V, Prilliman KR, Takabayashi K, Corr M, Tallant T, DiDonato J, Dziarski R, Akira S, Schoenberger SP, Raz E. 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*. 170:8 4102-10.
- 32.- Dessen A., Lawrence C. M., Cupo S., Zaller D. M., Wiley D. C. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. 7:4 473-81.
- 33.- Dharakul T, Riepenhoff-Talty M, Albini B, Ogra PL. 1988. Distribution of rotavirus antigen in intestinal lymphoid tissues: potential role in development of the mucosal immune response to rotavirus. *Clin Exp Immunol*. 74:1 14-9.
- 34.- Dharakul T, Rott L, Greenberg HB. 1990. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8+ T lymphocytes. *J Virol*. 64:9 4375-82.

- 35.- Dinarello CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 15;77(8):1627-52. Review.
- 36.- Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, Carding SR. 1992. Roles of alpha beta and gamma delta T cell subsets in viral immunity. *Annu Rev Immunol*. 10: 123-51.
- 37.- Esquivel FR, Lopez S, Guitierrez-X L, Arias C. 2000. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Arch Virol*. 145(4):813-25.
- 38.- Estes, M. K. 1996. Rotaviruses and their replication. p. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
- 39.- Estes, M. K., and A. P. Morris. 1999. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 473:73-82.
- 40.- Estes, M. K., and D. Y. Graham. 1985. Rotavirus antigens. *Adv Exp Med Biol*. 185:201-214.
- 41.- Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 53:410-449.
- 42.- Franco MA, Greenberg HB. 1995. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol*. 69:12 7800-6.
- 43.- Franco MA, Greenberg HB. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology*. 238(2):169-79.
- 44.- Franco MA, Greenberg HB. 1999. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis*. 179 Suppl 3: S466-9.
- 45.- Franco MA, Greenberg HB. 2001. Challenges for rotavirus vaccines. *Virology*. 15 281:2 153-5.
- 46.- Franco MA, Tin C, Rott LS, VanCott JL, McGhee JR, Greenberg HB. 1997. Evidence for CD8+ T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon. *J Virol*. 71:1 479-86.
- 47.- Fromantin C, Piroth L, Petitpas I, Pothier P, Kohli E. 1998. Oral delivery of homologous and heterologous strains of rotavirus to BALB/c mice induces the same profile of cytokine production by spleen cells. *Virology*. 10 244:2 252-60.
- 48.- *Fundamental Immunology* by William E. Paul. 1998. Hardcover 4th Bk&cdr edition Lippincott Williams & Wilkins Publishers; ISBN: 0781714125.

- 49.- Gao XM, Liew FY, Tite JP. 1989. Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of influenza A virus. *J Immunol.* 143:9 3007-14.
- 50.- Gay N, Ramsay M, Waight P. 1999. Rotavirus vaccination and intussusception. *Lancet.* 11 354:9182 956.
- 51.- Gonnella PA, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner HL. 1998. In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J Immunol.* 160:10 4708-18.
- 52.- Gorrell RJ, Bishop RF. 1999. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J Med Virol.* 57:2 204-11.
- 53.- Groettrup, M. 1996. Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after INF-gamma stimulation. *Immunol. Today.* 17,429-435.
- 54.- Guerrero, C. A., Bouyssouade D., Zárate S., Isa P., López T., Espinosa R., Romero P., Méndez E., López S., Arias C. F. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol.* 76:4096-102.
- 55.- Huilan, S., Zhen L. G., Mathan M. M., Mathew M. M., Olarte J., Espejo R. 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull WHO.* 69: 549-555.
- 56.- Johansen K., Svensson L. 1997. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch Virol.* 142:7 1491-8.
- 57.- Kapikian, A. Z. 1996. Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl*;12:7-19. Review.
- 58.- Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock 1996. Rotaviruses. p. 1657-1708. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
- 59.- Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. 1988. Recombinant interleukin 2 or 5, but not 3 or 4, induces maturation of resting mouse B lymphocytes and propagates proliferation of activated B cell blasts. *J Exp Med.* 167(4):1377-90.
- 60.- Kloetzel PM. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:3 179-87.

- 61.- Kuge S, Miura Y, Nakamura Y, Mitomi T, Habu S, Nishimura T. 1995. Superantigen-induced human CD4+ helper/killer T cell phenomenon. Selective induction of Th1 helper/killer T cells and application to tumor immunotherapy. *J Immunol.* 15 154:4 1777-85.
- 62.- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75:2 263-74.
- 63.- Kushnir N, Bos NA, Zuercher AW, Coffin SE, Moser CA, Offit PA, Cebra JJ. 2001. B2 but not B1 cells can contribute to CD4+ T-cell-mediated clearance of rotavirus in SCID mice. *J Virol.* 75:12 5482-90.
- 64.- Laemmli. 1970. *Nature*, 277, p. 680.
- 65.- Lautwein A, Burster T, Lennon_Dumenil AM, Overkleef HS, Weber E, Kalbacher H, Driessen C 2002. Inflammatory stimuli recruit cathepsin activity to late endosomal compartments in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 32:12 3348-57.
- 66.- Lehmann, J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *PNAS.* 99(20): 13031 - 13036.
- 67.- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. 2001 Human CD25(+)CD4(+) regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 4;193(11):1295-302.
- 68.- Lopez, S., Espinosa, R., Greenberg, H. B. Arias, C. F. 1994. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology.* 204(1):153-62.
- 69.- Lopez S, Arias CF, Mendez E, Espejo RT. 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology.* 154:1 224-7.
- 70.- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnö, I. & Svensson, L. 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science.* 287, 491-495.
- 71.- Madden D. R., Gorga J. C., Strominger J. L., Wiley D. C. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell.* 18 70:6 1035-48.

- 72.- M. A. Gilger, MD, D. O. Matson, MD, PhD, M. E. Conner, PhD, H. M. Rosenblatt, MD, M. J. Finegold, MD, and M. K. Estes PhD. 1991. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* Vol. 120, 6: 912-917.
- 73.- Maria Rescigno, Matteo Urbano, Barbara Valzasina, Maura Francolini, Gianluca Rotta, Roberto Bonasio, Francesca Granucci, Jean-Pierre Kraehenbuhl & Paola Ricciardi-
- 74.- Marie Riepenhoff-Talty and Pearay L. Ogra. 1987. Persistent Rotavirus Infection In Mice With Severe Combined Immunodeficiency. *J Virol.* p. 3345-3348.
- 75.- Matsui, S. M., Mackow, E. R., Matsuno, S., Paul P. S., Greenberg H. B. 1990. Sequence analysis of gene 11 equivalents from "short" and super short strains of rotaviruses. *J Virol.* 64:120-124.
- 76.- Mattion, N. M., Mitchell D. B., Both G. W., Estes M. K. 1991. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology.* 181:1 295-304.
- 77.- Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 12: 991-1045.
- 78.- Mayrhofer G, Bazin H. 1981. Nature of the thymus dependency of mucosal mast cells. III. Mucosal mast cells in nude mice and nude rats, in B rats and in a child with the Di George syndrome. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 64:3 320-31.
- 79.- McKean DJ, Infante AJ, Nilson A, Kimoto M, Fathman CG, Walker E, Warner N. 1981. Major histocompatibility complex-restricted antigen presentation to antigen-reactive T cells by B lymphocyte tumor cells. *J Exp Med.* 154:5 1419-31.
- 80.- McNeal MM, Broome RL, Ward RL. 1994. Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum rotavirus IgA following vaccination. *Virology.* 1; 204(2): 642-50.
- 81.- McNeal, M. M., M. N. Rae, and R. L. Ward. 1997. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. *J. Virol.* 71:8735-8742.
- 82.- Menchaca, G., Padilla-Noriega, L., Mendez-Toss, M., Contreras, J. F., Puerto, F. I., Guiscafre, H., Mota, F., Herrera, I., Cedillo, R., Muñoz, O., Ward, R., Hocino, Lopez, S., y Arias, C. F. 1998. Serotype specificity of the neutralizing-antibody response induced by the

individual surface proteins of rotavirus in natural infections of young children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5(3):328-34.

83.- Michae E. Lamm, John Bienenstock, Jiri Mestecky, Warren Strober, Jerry R. McHgee, Jerry R. McGhee and Pearay L. Ogra, 1999. *Mucosal Immunology*. Editions: Hardcover Book News, Inc.(r), Portland, OR.

84.- Nagler_Anderson C. 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol.* 1:1 59-67.

85.- Neutra MR, Mantis NJ, Krachenbuhl JP. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2:11 1004-9.

86.- Offit PA, Dudzik KI. 1989. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J Virol.* 63:8 3507-12.

87.- Offit PA, Hoffenberg EJ, Pia ES, Panackal PA, Hill NL. 1992. Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults. *J Infect Dis.* 165:6 1107-11.

88.- Okada, J, Urasawa, T., Kobayashi, N., Taniguchi, K., Hasegawa, A., Mise K., Urasawa S. 2000. New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J Med Virol.* 60(1):63-9.

89.- Othenberg EV. 1992. The development of functionally responsive T cells. *Adv Immunol.* 51: 85-214.

90.- Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* 199:269-275.

91.- Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, C. Q. Y. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, and M. K. Estes. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 382:471-473.

92.- R. M. Zinkernagel. 2000. A Primitive T Cell-Independent Mechanism of Intestinal Mucosal IgA Responses to Commensal Bacteria. *Science.* Vol.: 228 P: 2222-2226.

93.- Rose J, Franco M, Greenberg H. 1998. The immunology of rotavirus infection in the mouse. *Adv Virus Res.* 51: 203-35.

94.- Russell CA, Vindelov LL. 1998. Optimization and comparison of the MTT assay and the 3H-TdR assay for the detection of IL-2 in helper T cell precursor assays. *J Immunol Methods.* 1;217(1-2):165-75.

- 95.- Saif LJ, Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL. 1996. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch Virol. Suppl.*12: 153-61.
- 96.- Saper M. A., Bjorkman P. J., Wiley D. C. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol.* 20 219:2 277-319.
- 97.- Shaw, A. L., R. Rothnagel, D. Chen, R. F. Ramig, W. Chiu, and B. V. Prasad. 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 74:693-701.
- 98.- Sprent J. 2002. T memory cells: quality not quantity. *Curr Biol.* 12:5 R174-6.
- 99.- Suzuki, H. 1996. A hypothesis about the mechanism of assembly of double-shelled rotavirus particles. *Arch. Virol. Suppl.* 12:79-85.
- 100.- Taira S, Kato T, Yamamoto K, Inoue T, Nariuchi H. 1993. Differential requirement for humoral factors for IL-2R expression of murine T cell subsets, Th1, Th2, and CD8Th clones. *Cell Immunol.* 147(1):41-50.
- 101.- Tanchot C, Rocha B. 2003. CD8 and B cell memory: same strategy, same signals. *Nat Immunol.* 4:5 431-2.
- 102.- Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 4:9 883-6.
- 103.- Thompson, C. B. 1995. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity.* 3:5 531-9.
- 104.- Thornton AM, Shevach EM. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 20; 188 (2):287-96.
- 105.- Topalian S. 1994. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 6,741-754.
- 106.- To TL, Ward LA, Yuan L, Saif LJ. 1998. Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J Gen Virol.* 79 (Pt 11): 2661-72.
- 107.- Unanue, E. R. 1984. Antigen presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395-42.
- 108.- Uphoff CC, Drexler HG. 2001. Prevention of mycoplasma contamination in leukemia-lymphoma cell lines. *V. Hum Cell.* 14:3 244-7.

- 109.- Valdespino-Gómez J. L., García-García M. L., del Río-Zolezzi A., Giono-Cerezo S., Salcedo-Álvarez R. A., Sepúlveda-Amor J. 1994. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. *Rev Lat-Amer Microbiol.* 36: 307-24.
- 110.- Van Pinxteren LA, Bruce MG, Campbell I, Wood A, Clarke CJ, Bellman A, Morein B, Snodgrass DR. 1999. Effect of oral rotavirus vaccines on immune responses in gnotobiotic lambs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1 71:1 53-67.
- 111.- Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter_Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz_Palacios GM. 1996. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 3 335:14 1022-8.
- 112.- Viret C, Sant_Angelo DB, He X, Ramaswamy H, Janeway CA. 2001. A role for accessibility to self-peptide-self-MHC complexes in intrathymic negative selection. *J Immunol.* 166:7 4429-37.
- 113.- Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. 1990. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J Virol.* 64(10): 5070-5.
- 114.- Watts C. 2001. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol.* 13:1 26-31.
- 115.- Whitehead A. S., Sackstein R. 1985. Molecular biology of the human and mouse MHC class III genes: phylogenetic conservation, genetics and regulation of expression. *Immunol Rev.* 87: 185-208.
- 116.- White J, Blackman M, Bill J, Kappler J, Marrack P, Gold DP, Born W J. 1989. Two better cell lines for making hybridomas expressing specific T cell receptors. *Immunol.* 15 143:6 1822-5.
- 117.- Yates F, Malassis_Seris M, Stockholm D, Bouncaud C, Larousserie F, Noguez_Hellin P, Danos O, Kohn DB, Fischer A, de Villartay JP, Cavazzana_Calvo M. 2002. Gene therapy of RAG-2-/- mice: sustained correction of the immunodeficiency. *Blood.* 1 100:12 3942-9.
- 118.- Yewdell JW, Bennink JR. 1992. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52: 1-123.
- 119.- Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C. F., López, S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol.* 74:2 593-9.