

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**INMUNOPOTENCIACION DE LA VACUNA DE INFLUENZA
MEDIANTE LA UTILIZACION DEL PEPTIDO SINTÉTICO GK-1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

RENÉ ALVARO SEGURA VELÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDDA SCIUTTO CONDE

MÉXICO, D. F.



SEPTIEMBRE, 2004



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

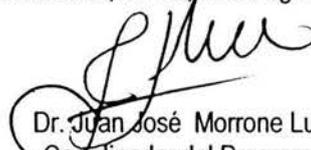
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de junio del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **René Alvaro Segura Velázquez**, con número de cuenta 501093628 con la tesis titulada: "Inmunopotenciación de la vacuna de influenza mediante la utilización del péptido sintético GK-1", bajo la dirección del(a) **Dra. Edda Sciutto Conde**.

Presidente:	Dra. Aline Schunemann de Aluja
Vocal:	Dra. Emma Isabel Melendro Lozano
Secretario:	Dra. Edda Sciutto Conde
Suplente:	Dra. Beatriz Gómez García
Suplente:	Dr. Armando Isibasi Araujo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 31 de agosto del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

COMITÉ TUTORAL :

DRA. EDDA SCIUTTO CONDE

DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

DRA. ALINE SCHUNEMANN DE ALUJA

DRA. GLADIS FRAGOSOS GONZALEZ

DEDICATORIAS

A

MIS PADRES
SILVIA Y ALEJANDRO

A

MI HERMANA
YAEL

A

CRISTINA

“Por creer en mi además de darme todo su amor, ayuda y confianza”

AGRADECIMIENTOS

Dr. Armando Pérez Torres. Facultad de Medicina UNAM. Por su apoyo en la realización del presente trabajo en su parte histológica con la toma de imágenes y sus valiosa ayuda en la interpretación de las mismas.

Dr. Armando Isibasi Araujo Jefe del U. I. M. Inmunoquímica Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. Por formar parte de mi comité tutorial y por la gran motivación y colaboración en la realización de este trabajo.

Dra Aline Schunemann de Aluja Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Por formar parte de mi comité tutorial, su apoyo para la elaboración del presente trabajo y sus valiosos comentarios.

A todos mis compañeros de laboratorio sin los cuales hubiera sido imposible la realización de este trabajo brindándome su amistad, apoyo y conocimientos.

M. en C. Ernesto Acosta Jiménez. Por darme la oportunidad de conocer un verdadero amigo y a la ayuda otorgada en la elaboración de la parte experimental de este trabajo.

MVZ DV. Gerardo Arrellín. Jefe del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomedicas, por todas las facilidades otorgadas.

Dra. Edda Sciutto Conde y Dra. Gladis Fragoso González, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, brindarme todo su apoyo y confianza, y sobre todo, por la gran motivación y orientación para llevar a cabo mis estudios y terminar los mismos con la elaboración de este trabajo.

INMUNOPOTENCIACION DE LA VACUNA DE INFLUENZA MEDIANTE LA UTILIZACION DEL PEPTIDO SINTETICO GK-1

Resumen

La influenza es una enfermedad viral altamente contagiosa de impacto mundial que afecta al tracto respiratorio. Su control se basa en el uso de vacunas. Sin embargo, las vacunas existentes presentan baja eficiencia de protección en la población mayor de 60 años, población de mayor riesgo de morbi-mortalidad lo que señala la relevancia y el interés mundial de potenciar su respuesta.

En esta tesis se evaluó la capacidad inmunopotenciadora del péptido sintético GK-1 en incrementar la inmunogenicidad de la vacuna de influenza. GK-1, identificado a partir de un antígeno de *Taenia crassiceps*, induce una respuesta inflamatoria exacerbada, que podría favorecer la presentación más efectiva de los antígenos vacunales. Se evaluó esta posibilidad en un modelo experimental de influenza murino. Los resultados indican que en ratones viejos la coinmunización de la vacuna con GK-1 aumenta el porcentaje de individuos respondedores y los niveles de anticuerpos inducidos. La coinmunización de la vacuna en presencia de GK-1 promueve la ausencia de daños histológicos inducidos por la vacunación y la eliminación más eficiente del virus en el pulmón después del desafío con una aparente infiltración linfocitaria más temprana que se asoció a una evolución favorable, presentando los pulmones un aspecto histológico normal a los 9 días posteriores a la infección. Un comportamiento similar pero en tiempos más prolongados se observó en los ratones que solo recibieron la vacuna.

Los resultados obtenidos en esta tesis señalan a GK-1 como un adyuvante a considerar para optimizar las propiedades protectoras de la vacuna de influenza.

IMMUNOPOTENTIATION OF THE INFLUENZA VACCINE BY MEANS OF THE USE OF THE SYNTHETIC PEPTIDO GK-1

Summary

The influenza is a highly contagious viral illness of world impact that affects to the breathing tract. Its control is based on the use of vaccine. However, the existent vaccines has low efficiency in elderly people, this population has more risk of morbi-mortality what points out the relevance and the world interest of increasing efficiency of influenza vaccines.

The aim of this research was the evaluation of the capacity immunopotentiación of the synthetic peptid GK-1, increasing the inmunogenicidad of the influenza vaccine. GK-1, was identified from *Taenia crassiceps*, it induces an exacerbated inflammatory response and it could influence in a positive way, the antigen presentation from influenza vaccine. This possibility was evaluated using an experimental model of influenza murino. The results show that in old mice the coinmunización of the vaccine with GK-1 increases the number of individual's respondent and the levels of induced antibodies. The co-immunization also promotes the absence of histological damages, induced by the influenza vaccination, and the most efficient viral elimination in the lung, after the viral challenge, with an apparent earlier lymphocytic infiltration that was associated to a favorable evolution, presenting the lungs an histological normal aspect 9 days post-infection. A similar behavior but delayed, was observed in mice that just received the vaccine.

The results obtained in this research point out to GK-1 like an adjuvant that could optimize the properties protectors of the influenza vaccine.

ÍNDICE

	Página
ANTECEDENTES	
• Virus de Influenza	1
• Influenza humana	2
• La influenza en los ancianos	3
• Respuesta inmune en influenza	4
• Prevención y control de la influenza	5
• Vacunación contra influenza en personas mayores	6
• Eficiencia clínica de la vacuna de influenza en adultos mayores	7
• Potenciación de la eficiencia de vacunación a través del uso de adyuvantes	8
INTODUCCION	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES y MÉTODOS	14
Estrategia experimental	14
• Desarrollo de un modelo murino de infección con virus de influenza	14
• Definición de tratamientos	14
• Vacuna de influenza	14
• GK-1	15
• Virus y titulación	15
• Adaptación y propagación del virus	15
• Título hemaglutinante	16
• Grupos experimentales	16
• Infección experimental de los ratones con la cepa del virus	17
• Muestras para examen histológico	17
• Determinación de IgG e IgA	18
• Análisis Estadístico	19
RESULTADOS	20
• Identificación de la dosis de vacuna a utilizar.	20
• Identificación de la dosis óptima de GK-1	22

	Página
• Evaluación del requerimiento de adyuvantes adicionales	23
• Efecto de la saponina	23
• Efecto de la alúmina	24
Evaluación de la capacidad de potenciar la respuesta a la vacuna de influenza en ratones jóvenes	25
• Niveles de IgG séricas específicas	25
• Niveles de IgA séricas específicas	26
• Niveles de IgA específicas en lavado bronquial	27
• Medición de título viral en lavados bronquiales	28
Evaluación histológica en pulmón	29
• Descripción histológica antes del desafío	29
• Descripción histológica 6 días posteriores al desafío	30
• Descripción histológica 9 días posteriores al desafío	31
Evaluación de la capacidad de potenciar la respuesta a la vacuna de influenza en ratones viejos (> de 18 meses)	32
• Comparación de niveles de IgG séricas específicas inducidas entre los ratones adultos y los ratones viejos	32
• Niveles de IgG séricas específicas	33
• Porcentaje de ratones respondedores y no respondedores	34
• Niveles de IgA séricas específicas	35
• Niveles de IgA específicas en lavado bronquial	36
• Medición de título viral en lavados bronquiales	37
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES	38
APENDICES	
• Apéndice I: Proteínas del virus de influenza	43
• Apéndice II: Pandemias de influenza	46
• Apéndice II: Senescencia inmunológica	49
• Apéndice IV: Los Interferones	55
• Apéndice V: El control de la influenza	57
• Apéndice VI: Desarrollo de nuevas alternativas de vacunas	58
• Apéndice VII: Modo de acción de los adyuvantes	60
REFERENCIAS	62

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Niveles de IgG específicas inducidas por dos diferentes dosis de vacuna de influenza en presencia y ausencia de GK-1	20
Tabla 2. Niveles de IgG específicas inducidas por dos distintas dosis de vacuna de influenza intermedias a las previamente analizadas en presencia y ausencia de GK-1	21
Tabla 3. Niveles de IgG específicas inducidas por la vacuna de influenza coadministrada con tres diferentes dosis de GK-1	22
Tabla 4. Niveles de IgG específicas inducidas por la coadministración de Vacuna de Influenza y GK-1 con y sin saponina	23
Tabla 5. Niveles de IgG específicas inducidas por la coadministración de Vacuna de Influenza y GK-1 con y sin alúmina	24
Tabla 6. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos	25
Tabla 7. Niveles de IgA específicas inducidas en suero de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos	26
Tabla 8. Niveles inducidos de IgA específicas en lavados bronquiales de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos	27
Tabla 9. Título viral que presentaron los lavados bronquiales de ratones jóvenes antes del desafío y en los tiempos posteriores al desafío	28
Tabla 10. Comparación entre los niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones adultos y viejos	32
Tabla 11. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos	33
Tabla 12. La co-administración de la vacuna de influenza con GK-1 aumento el porcentaje de individuos respondedores en ratones viejos	34
Tabla 13. Niveles de IgA específicas inducidas en suero de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos	35
Tabla 14. Niveles inducidos de IgA específicas en lavados bronquiales de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos	36

	Página
Tabla 15. Título viral que presentaron los lavados bronquiales de ratones viejos antes del desafío y en los tiempos posteriores al desafío	37
Figura 1. Fotomicrografías de pulmón 45 días pos-inmunización	29
Figura 2. Fotomicrografías de pulmón 6 días pos-desafío	30
Figura 3. Fotomicrografías de pulmón 9 días pos-desafío	31

ANTECEDENTES

Virus Influenza

El virus influenza es un *Orthomixovirus* que infecta células epiteliales del tracto respiratorio humano y de otros animales. Existen dos tipos de virus de influenza que circulan en la población que se encuentran asociados con la mayor parte de casos de influenza en humanos, éstos son el virus de influenza tipo A y B. Aunque sus genes en conjunto tienen menos del 30% de similitud, los dos tipos comparten un ancestro común y ambos contienen genomas que consisten de 8 fragmentos de RNA de polaridad negativa que producen 10 mRNAs (dos resultan a partir de splicing) que codifican a 10 proteínas; los 8 segmentos se transcriben por separado y se empaquetan dentro de lo que se conoce como "partículas ribonucleoproteicas virales" (vRNPs) en asociación con la proteína de matriz (M1) y la proteína de nucleocápside (NP). En el éxito epidemiológico de la influenza parece jugar un papel principal el hecho de que el virus se encuentra bajo los constantes cambios antigénicos. En la envoltura lipídica de los viriones se insertan dos proteínas claves para su antigenicidad: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).

Los dos antígenos de superficie del virus de influenza A se encuentran bajo dos tipos de variación; drift (tendencia) y shift (cambio) [1], mientras que el virus de influenza B solo muestra drift antigénico. El "drift" antigénico involucra cambios menores en la hemaglutinina y en la neuraminidasa, y resulta por la acumulación de una serie de mutaciones puntuales que trae como consecuencia la sustitución de aminoácidos de los sitios antigénicos del A al E en la región distal de la membrana de la HA. Esta sustitución es la que previene la unión de anticuerpos producidos por previas infecciones, y así el virus puede generar nuevas variantes capaces de reinfectar al hospedero.

Mientras tanto, el "shift" antigénico involucra cambios mayores en éstas moléculas dando como resultado el reemplazo de segmentos genéticos más extensos.

Los viriones de influenza atacan a las células por interacción entre la HA y los residuos de ácido siálico de la superficie celular de la célula hospedera o entre la NA y los receptores de siálico-proteínas. Las partículas virales son internalizadas al endosoma celular mediante endocitosis mediada por receptor [2]; el bajo pH ácido endosomal (pH 5-6) causa cambios conformacionales en la HA, que expone la secuencia amino terminal hidrofóbica de la HA, la cual induce la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal. Al fusionarse la membrana viral con la membrana endosomal permite la entrada del complejo vRNP-M1 al citoplasma, la proteína M1 es removida del complejo [3]

y la vRNP entra al núcleo para iniciar su replicación y transcripción. Una señal de localización nuclear en la nucleoproteína (NP) facilita la importación de la RNP viral “desnuda” al núcleo de la célula hospedera a través de interacciones con la proteína celular NPI-1 o karioferina- α . Una vez en el núcleo, se inicia la replicación y la transcripción del RNA, que es llevada a cabo por la RNA polimerasa dependiente del RNA viral. La RNA polimerasa es un complejo de tres proteínas virales (subunidad básica de la polimerasa 1 [PB1], subunidad básica de la polimerasa 2 [PB2] y subunidad ácida de la polimerasa [PA]). El mRNA viral es transportado hacia el citosol y traducido en 10 proteínas definidas. Las nuevas NP sintetizadas y las proteínas de la polimerasa se mueven de regreso al núcleo para posteriormente amplificar la replicación del RNA. La HA, NA y la proteína M2 entran al retículo endoplásmico (RE) y son transportadas hacia la membrana citoplasmática [4]. HA se une a las proteínas NKp46 y NKp44, activando a las células NK, que movilizan el sistema inmune innato en contra del virus de influenza. Entre tanto la proteína no estructural 1 (NS1) desarma los mecanismos de defensa antiviral del hospedero mediado por el INF tipo 1, también causa daño a través de la vía de apoptosis. La proteína M2 es una proteína no glicosilada que es parte integral de la membrana y se expresa en la superficies de las células infectadas [5], contiene dominios transmembranales siendo muy conservada en los tipos de influenza A. Su función es servir como canal de iones de hidrógeno [6]. Se ha propuesto que este canal permite el flujo de protones del endosoma al interior del virión antes de la fusión de la membrana endosomal con la envoltura del virus. La acidificación en el interior del virión puede inducir cambios conformacionales en las proteínas de la nucleocápside y participar principalmente en la disociación del complejo vRNP-M1 [7]. Sin embargo, este canal de iones M2 también puede hacer fluir a través de él protones que salgan del compartimiento ácido al pasar a través del complejo trans-Golgi para así incrementar el pH luminal y prevenir los cambios de conformación ácida de la HA durante el ensamble del virión en la célula infectada (ver Apéndice I).

Influenza humana

La influenza se contagia por contacto directo, mediante virus que pasan a través del aire al toser, o por objetos que una persona enferma pase a otra. Los síntomas más comunes, que se presentan 48 horas posteriores a la infección, suelen ser: fiebre elevada, escalofríos, dolores musculares, secreción nasal, tos seca, dolor de cabeza y garganta, cansancio, falta de apetito y malestar en general; siendo causa de ausentismos laborales

y escolares. Sin embargo, en algunos casos la enfermedad llega a tener mayor sintomatología presentándose complicaciones más serias como neumonías y bronquitis que puede llegar hasta la muerte. En personas que se encuentran sufriendo alguna otra enfermedad puede causar el agravamiento o descompensación de esos padecimientos.

Las epidemias, ocurren generalmente en invierno, la enfermedad se propaga muy fácilmente entre niños (de edad preescolar y escolar) y entre adultos de edad avanzada, grupos considerados de alto riesgo.

El impacto de la Influenza en los individuos y en la sociedad es casi universal afectando también a adultos jóvenes; llegando a afectar cada año a cerca del 10-20% de la población [8]. El virus de influenza es un virus que afecta el tracto respiratorio y se encuentra bajo constante variación genética, lo que provoca que sea un blanco móvil para el sistema inmune; por lo que la formulación de la vacuna anualmente se ve obligada a tratar de igualar las más recientes variaciones virales que surgen [9]. Esta variabilidad antigénica puede haber sido la responsables de las grandes pandemias ocasionadas (Ver apéndice II).

La Influenza en los Ancianos

Los humanos mayores de 65 años son consideradas personas de alto riesgo, ya que durante las epidemias de influenza de las personas hospitalizadas de éste grupo etáreo cerca del 90% mueren [10]. En estas personas se ha observado una reducción de las células inmunes B y T y en los niveles de IL-2. Estas y otras modificaciones en la respuesta inmune se asocian con el impacto de la influenza en esta población (Ver Apéndice III).

Considerando el alto índice de mortalidad en éste grupo etáreo, que además tiene el mayor riesgo a contraer influenza, se recomienda la vacunación anual. Se ha observado que la aplicación de la vacuna reduce el número de hospitalizaciones y en los que surgen complicaciones, disminuye la mortalidad hasta en un 50% [11]. También se ha demostrado que se requieren vacunaciones anuales en éstas personas. En sujetos que han recibido por primera vez la vacuna, la mortalidad se reduce en solo el 9% mientras que en aquellos que han recibido previas vacunaciones la reducción en mortalidad fue de hasta el 75% [10]. Sin embargo, en otros estudios se han obtenido resultados menos alentadores. Falsey encontró que 61% de 200 ancianos hospitalizados por infección de influenza habían recibido previamente la vacuna actual [12]. Existen propuestas que sugieren que los niños son importantes diseminadores de influenza, catalogándolos como

el “motor de la epidemia” [13], apoyándose en una observación en la cual, la hospitalización por influenza de personas mayores de 65 años ocurría hacia el final de la epidemia y en un retraso de dos semanas después de que se alcanzaba el pico máximo [14], suponiendo que el contagio era dado después de que los niños habían padecido la enfermedad.

Respuesta inmune en Influenza

Las fases tempranas de la infección del virus de influenza son críticas en el establecimiento del virus. Asumiendo que en las primeras 12 horas de infección, cada célula infectada libera cientos de partículas virales, en menos de tres días se podrían producir suficientes virus para potencialmente infectar cada célula en el cuerpo si la infección no es controlada. Sin embargo el sistema inmune innato desarrolla una acción crucial sostenida de uno a tres días de duración en lo que el sistema inmune adaptativo (células B y T) responde a la infección. El sistema inmune innato consta: de una barrera física, en forma de piel y membranas de mucosas; de elementos humorales, en forma de sustancias con actividad antiviral; y de una respuesta celular intrínseca (macrófagos y células NK), inducida por lo menos por la presencia de ácidos nucleicos virales, que modifican las células para impedir la replicación viral y liberar sustancias para alertar al hospedero de la presencia de un patógeno. Las células NK participan tanto en la destrucción de células infectadas así como en la liberación de citocinas que ejercen actividades antivirales y anti-inflamatorias.

El recuperarse de una infección por virus de influenza involucra tanto una respuesta de tipo humoral como una mediada por células. El principal propósito de la respuesta inmune es inactivar virus libres así como eliminar células que tienen el potencial de liberar virus infecciosos. Tanto las células CD8⁺ como los anticuerpos que activan al complemento pueden lisar células infectadas. Así participan en conjunto mecanismos antivirales humorales y celulares [15]. El concepto popular que las células T CD8 son las únicas responsables del despeje viral actualmente ha sido reemplazado. Tanto las células T CD4⁺ como las células T CD8⁺ pueden mediar la depuración viral.

Las inmunoglobulinas de mucosa (IgA) y de suero (IgG) que reconocen las moléculas de HA neutralizan la infectividad viral y son las principales responsables de la respuesta contra la infección. La respuesta de las Inmunoglobulinas contra la HA es subtipo específica, pero la acumulación de mutaciones puntuales (drift antigénico) es lo que permite a los virus infecciosos escapar de la destrucción mediada por anticuerpos.

Los anticuerpos para la NA no previenen la infección, pero sí reducen la propagación del virus [16].

Las células infectadas por el virus de influenza son normalmente eliminadas por linfocitos T CD8⁺ virus específicos. Los linfocitos T CD4⁺ no eliminan el virus de influenza tan eficientemente como lo hacen los CD8⁺, sin embargo su presencia es necesaria para la producción de anticuerpos y pueden contribuir a evitar la consolidación del virus en pulmón que es característica de la neumonía por influenza. Macrófagos, células NK y linfocitos T juegan un papel importante en la anulación del virus y la liberación de interferón, que inhibe la replicación viral [16].

El INF γ puede jugar un papel importante en la recuperación y disminución de la producción del virus y algunos síntomas se deben a su presencia. La acción de los interferones (INFs) en las células infectadas por virus y tejidos que los rodean, despierta un estado antiviral caracterizado por la expresión de genes estimulados por INF con actividad antiviral. A su vez, los virus codifican mecanismos para contrarrestar la respuesta del hospedero y soportar una eficiente replicación viral, que minimiza el poder terapéutico antiviral de los INFs. Los INFs, aunque son mejor conocidos por sus propiedades antivirales, son potentes reguladores del crecimiento celular y tienen actividad inmunomodulatoria. Estas citocinas además son importantes reguladores de las respuestas inmune innata y adaptativa. Estudios recientes resaltan la importancia de la relación entre los pasos reguladores celulares que controlan la señalización de INF, apoptosis, inflamación y la respuesta al stress (Ver Apéndice IV).

Prevención y control de la influenza

El control de la influenza se ha basado en vacunas que inducen o mejoran la respuesta inmune específica hacia la infección del virus de influenza. Actualmente a nivel mundial su uso es recomendado básicamente a personas inmunosuprimidas y mayores de 65 años, individuos en alto riesgo de desarrollar influenza severa o sus complicaciones (como son las enfermedades respiratorias crónicas).

Actualmente, se utilizan dos tipos de vacunas, una basada en el virus inactivado y otra versión basada en antígenos de superficie purificados [17]. Solo las vacunas que contienen antígenos de superficie están recomendadas para niños menores de 8 años (que forman parte de uno de los grupos susceptibles) ya que el virus entero causa respuestas febriles en niños. En ensayos experimentales se ha demostrado que el uso de vacunas de influenza con virus atenuados adaptados en frío resultan ser seguras y

efectivas. Las vacunas de influenza de virus atenuados son potencialmente más inmunogénicas que las vacunas inactivadas, particularmente por su habilidad de generar una respuesta de células T CD8⁺, que no es inducida por las vacunas comunes no infecciosas. Con la introducción de nuevas tecnologías de manipulación genética del virus de influenza, ahora es factible planear la generación de vacunas de virus de influenza atenuadas. Por ejemplo, la truncación progresiva de la proteína viral NS1 resulta en una atenuación progresiva que disminuye la habilidad de los virus de combatir el sistema de INF del huésped. Así parece posible producir virus en los cuales se pueda manipular genéticamente los genes NS1, para así poder desplegar una óptima mezcla de atenuación e inmunogenicidad [18].

La clave para una vacunación efectiva es la inducción de una respuesta inmune capaz de neutralizar virus que pertenezcan a cualquiera de los subtipos de HA conocidos que existen actualmente en la naturaleza. Aunque la vacuna que induce anticuerpos contra el dominio extracelular de la proteína M2 puede proveer protección heteróloga, esta protección probablemente es incompleta [19] y, en todo caso, todavía sujeta a la variación antigénica en M2.

En la actualidad en Estados Unidos se utiliza la vacuna inactivada de virus de influenza. Para ser efectiva, la vacuna común debe contener el componente H1N1, un H3N2 y un componente de virus B. Durante los últimos años por lo menos uno de los componentes en la formulación tiene que ser cambiado debido al drift antigénico de la cepa circulante en la población humana. Para preparar la vacuna, la cepa viral es crecida en embriones de pollo y el virus es entonces purificado e inactivado posteriormente.

Vacunación contra influenza en personas mayores

Durante grandes epidemias, la tasa de hospitalización para personas consideradas de alto riesgo se duplica o hasta quintuplica, dependiendo del grupo de edad. Un incremento en la posterior mortalidad indica el impacto de las epidemias de influenza. El incremento de la mortalidad resulta no solo de la influenza y la neumonía si no también de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas que pueden ser exacerbadas por la influenza. Se estima que en Estados Unidos, más de 20 000 muertes asociadas con influenza ocurrieron durante cada una de las 10 diferentes epidemias de 1972-1973 hasta 1990-1991 y que más de 40 000 muertes asociadas a influenza ocurrieron durante cada una de estas epidemias. Más del 90% de las muertes que se atribuyen a neumonía e influenza ocurrieron entre personas de 65 años de edad.

La protección inducida por la inmunización con vacuna de influenza es principalmente conferida a la producción local o en suero de los anticuerpos IgG y en menor cantidad IgA hacia las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina y neuraminidasa [17].

Los anticuerpos anti-hemaglutinina inhiben la unión del virus de influenza a los receptores de la membrana de la célula blanco y así neutralizan la infectividad viral [20]. La protección inducida por la vacunación es de corta vida debido a las propiedades antigénicas de los antígenos de superficie del virus de influenza. Por tal motivo, es que surge la recomendación de la vacunación constante (año tras año) dirigida hacia las poblaciones de alto riesgo, utilizando la vacuna de influenza que incluye los virus aislados que si poseen predominancia en esa temporada. En algunos estudios se ha encontrado que la revacunación estimula una pequeña respuesta de anticuerpos, y la pos-vacunación siempre incrementa los niveles de anticuerpos inducidos. La infección de adultos mayores crónicos con una vacuna monovalente de virus vivo de influenza de tipo A indujo altos niveles de respuesta inmune celular después de la vacunación [21, 22]. El potenciamiento de la actividad de CTL de memoria anti-virus de influenza A después de la vacunación con vacuna monovalente viva atenuada fue mejor que la inducida después de la vacunación parenteral con vacuna monovalente de virus inactivado (vacuna que contenía subunidades del virus) en términos de altos niveles de citotoxicidad contra agentes de virus de influenza A tanto homólogos y heterólogos al tipo de virus de la vacuna [22]. En pacientes enfermos crónicos viejos, sujetos quienes hubieran recibido la vacuna atenuada viva además de la vacuna con subunidades inactivadas, mostraron una proporción de respuesta de CTL parecida a la que se observó en los pacientes que recibieron la vacuna inactivada únicamente [23] (Ver Apéndice V y VI).

Eficiencia clínica de la vacuna de influenza en adultos mayores

Los niveles de anticuerpos en respuesta a una vacuna inactivada de influenza en adultos mayores disminuyen en relación a la respuesta de adultos jóvenes [24]. La eficiencia de la vacunación en personas de edad mayor a los 60 años [25] es de 56% para la prevención de enfermedades respiratorias, 53% para la prevención de neumonías. 50% para la prevención de hospitalizaciones y 60% para la prevención de muertes. Otro estudio sugiere la eficacia de la vacunación en un rango de 32 a 45% para prevenir las hospitalizaciones por neumonía, 31-65% para prevenir la muerte en hospitales por

neumonía e influenza y un 43-50% para prevenir la muerte en hospitales por todas las condiciones respiratorias.

Potenciación de la eficiencia de vacunación a través del uso de adyuvantes

En las últimas décadas se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar nuevos adyuvantes para vacunas y se han propuesto y probado diferentes adyuvantes para uso humano [26].

El uso de nuevos adyuvantes para vacunas humanas ha sido limitado crucialmente. La seguridad que brindan los diferentes adyuvantes para ser utilizados, ha sido una de las razones que han limitado su uso, además no todos los adyuvantes se comportan de la misma manera con todas las vacunas. Otros factores que pueden limitar la adyuvancia de posibles construcciones, es la ruta de inmunización de la vacuna, la respuesta inmune a la que esta dirigida, la eficacia que alcanza en animales y humanos y de una forma muy importante, la reactogenicidad de los componentes usados como adyuvantes.

Los únicos adyuvantes utilizados para uso humano, como son la alúmina funcionan como inductores de una respuesta Th2 y solo comprometen a las células a producir $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ y otras citocinas además de promover una muy baja actividad citotóxica de las células T CD8^+ [27]. Así, continúa la búsqueda de nuevos adyuvantes intentando identificar aquellos que produzcan una respuesta de tipo Th1 [27].

El saber la patogénesis de la enfermedad beneficiaría el diseño de adyuvantes para potenciar la respuesta inmune. Alternativamente, si la patogénesis y la inmunogenicidad no son del todo conocidas, puede utilizarse un adyuvante que genere un rango de diferentes respuestas inmunes que pueden ser seleccionados para su estudio.

Este conocimiento puede ser utilizado para combinar diferentes adyuvantes para así poder potenciar diferentes efectos como se desee (Ver Apéndice VII).

Tabla 1. Algunas características de los adyuvantes

Actividad	Tipo de adyuvante	Beneficio
Inmunomodulación	Generalmente pequeñas moléculas o moléculas que modifican la red de citocinas	Sobreregulan la respuesta inmune Seleccionan entre Th1 y Th2
Presentación	Generalmente moléculas anfipáticas o complejos que interactúan con inmunógenos en su conformación nativa	Incrementan la respuesta neutralizante de los adyuvantes Mayor duración de la respuesta
Inducción CTL	<ul style="list-style-type: none"> - Partículas que pueden unir o incluir inmunógenos y que pueden fundirse o romper a la membrana celular - Emulsiones w/o que directamente unen el péptido al MHC-1 en la superficie celular 	Procesamiento citosólico de proteínas rindiendo una correcta restricción de péptidos clase I Procesamiento simple de péptidos promiscuos
Direccionalidad	<ul style="list-style-type: none"> - Partículas adyuvantes que unen inmunógenos, Adyuvantes que saturan las células de Kupffer - Adyuvantes carbohidratos que marcan receptores de lactina en macrófagos y células dendrítica 	Eficiente uso de adyuvantes e inmunógeno Pueden determinar el tipo de respuesta y seleccionar el blanco
Generación de depósito.	<ul style="list-style-type: none"> - emulsiones w/o para corto plazo. - microesferas o nanoesferas para largo plazo 	Potencialmente para una vacuna de dosis única

(Giuseppe Del Giudice, Audino Podda, Rino Rappuoli. What are the limits of adjuvanticity?, Vaccine. 2002; 20: S38-S41.)

INTRODUCCIÓN

Considerando la menor efectividad de la vacuna de influenza en los individuos de mayor riesgo, es que diferentes grupos de investigación se han abocado a la búsqueda de posibles alternativas para mejorar la eficiencia de estas vacunas en aras de conseguir la disminución de muertes y hospitalizaciones que anualmente produce la influenza. El uso de altas dosis de vacuna de influenza inactivada para tratar de inducir un consistente y duradero incremento en la respuesta de anticuerpos no ha resultado una estrategia adecuada [28]. La utilización de una combinación de vacunas de influenza inactivas y atenuadas adaptadas en frío parecen ser seguras y mejorar la efectividad de la vacunación [29]. Sin embargo, estas vacunas de influenza viva atenuada aún no tienen licencia para ser utilizadas, probablemente por el potencial riesgo de reactivación. Finalmente, la utilización de adyuvantes que potencien la respuesta inmune es una alternativa que está siendo explorada muy extensamente.

A la fecha se han explorado el uso de diferentes adyuvantes como son alúmina, saponina, emulsión MF59, drogas que potencian el sistema inmune como las citocinas y esteroides entre otros [30]. Todos en un principio han brindado resultados satisfactorios en modelos animales. [99] sin embargo, estas estrategias en su mayoría han fallado al observar su acción en proveer los efectos necesarios en humanos o cumplir los requisitos de inocuidad [31]. La excepción parece ser la emulsión MF59 misma. Este adyuvante recientemente aprobado para uso en humanos promueve una respuesta de tipo TH2, incrementando los niveles de anticuerpos específicos inducidos por vacunación tanto en animales jóvenes como en viejos. Este producto está actualmente en uso en Europa y se patentó para este propósito en el año 2000 [32]. Sin embargo, su empleo parece causar mayores efectos colaterales a los que se observan con la administración de la vacuna convencional aunque estos son claramente tolerados y al parecer la potenciación de la inmunogenicidad inducida justifica su uso [33]. MF59 induce la activación de células dendríticas en el sitio de inyección e internalización del antígeno, con la subsecuente migración hacia nódulos linfáticos [34,35].

En nuestro laboratorio se ha identificado un péptido denominado GK-1 cuya secuencia producida en forma sintética presenta propiedades que permiten suponer su potencial utilidad como adyuvante. El péptido GK-1 fue identificado a partir de un antígeno recombinante de *Taenia crassiceps* llamado KETc7 que ha demostrado ser efectivo como vacuna contra la cisticercosis experimental murina según se reporta en la patente mexicana número 211,604. Basados en la deducción de la secuencia de aminoácidos de

este polipéptido rico en prolina, se sintetizaron químicamente 3 fragmentos llamados: GK-1, GK-2 y GK-3; de los cuales, únicamente GK-1 incluye epítopes protectores en contra de la cisticercosis murina y porcina. GK-1 es una secuencia de 18 aminoácidos (G-Y-Y-Y-P-S-D-P-N-T-F-Y-A-P-P-Y-S-A) que contiene al menos un epítotope B y ha demostrado habilidad de inducir una respuesta de anticuerpos. GK-1 también contiene al menos un epítotope de células T, capaz de estimular la proliferación de CD8+ y en un menor grado de células CD4+. También se ha podido observar que el sobrenadante de células estimuladas específicamente con este péptido contiene altos niveles de IFN γ así como de IL-2 y bajos niveles de IL-4. Resultados similares se obtuvieron cuando se midió la producción de citocinas en células T por citometría de flujo, lo que señala la capacidad del péptido para promover una respuesta inflamatoria [36].

La exacerbación de la respuesta inflamatoria puede favorecer la presentación más efectiva de antígenos vacunales potenciando la respuesta inmune inducida por los mismos. Para evaluar esta posibilidad se utilizó la coinmunización de la vacuna de influenza con el péptido GK-1 con el propósito de potenciar la capacidad inmunogénica de la vacuna y aumentar la eficiencia de la vacunación en las poblaciones de mayor morbilidad y mortalidad asociado a la infección con el virus de influenza.

HIPÓTESIS

“El péptido GK-1 inmunopotencia la capacidad protectora de la vacuna de influenza en un modelo experimental de influenza murino.”

OBJETIVO

Evaluar la capacidad inmunopotenciadora de el péptido GK-1 en la vacuna de influenza utilizando un modelo murino de influenza

Objetivos Particulares

- **Evaluar los niveles de anticuerpos inducidos con la coinmunización del péptido GK-1 y la vacuna de influenza** [hemaglutinina recombinante del virus de influenza, cepas: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2) (cepa análoga A/Moscow/10/99, y B/Victoria/504/2000 (cepa análoga a B/Sichuan/379/99)]
- **Evaluar a nivel histológico el efecto del péptido GK-1 coadministrado con la vacuna de influenza ante el desafío con la cepa viral A/johanesburg/159/97 – subtipo H1N1**

MATERIALES y MÉTODOS

Estrategia Experimental

Desarrollo de un modelo murino de infección con virus de influenza

Se desarrolló un modelo murino de influenza que nos permitió evaluar el efecto protector de la vacuna y la capacidad adyuvante de GK-1 considerando diferencias asociadas a la edad. Este modelo fue seleccionado considerando los requerimientos de adyuvantes de la vacuna contra influenza en humanos y que esta vacuna es capaz de proteger en contra de la influenza en el ratón.

Definición de tratamientos

En una primera etapa, se determinó:

- dosis óptima de inmunización con vacuna de Influenza en ratones.
- dosis óptima para la co-administración de la vacuna con el péptido GK-1.

Establecidos estos parámetros se determinó el efecto de la co-administración del péptido GK-1 con la vacuna de influenza evaluando:

- niveles de anticuerpos (IgG e IgA) específicos contra los antígenos de la vacuna de influenza en sueros y lavados pleurales antes y después de la inmunización y del desafío con virus de influenza.
- la respuesta tisular microscópica ante la infección viral (histología pulmonar).

Los parámetros descritos se evaluaron en:

- Ratones jóvenes (8 a 10 semanas de nacidos) y viejos (> 18 meses de nacidos).
- Antes y después de los 21 y 45 días de inmunización
- Antes y después de los 3, 6 y 9 días de infección

Vacuna

Inmunizando por vía subcutánea, se utilizó la vacuna FLUZONE para la temporada gripal 2002–2003 que contiene 45 μ g de hemagglutininas (HA) por dosis de 0.5 ml, en la porción recomendada de 15 μ g de cada una de las tres tipos de las siguientes cepas: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2) (cepa análoga A/Moscow/10/99, y B/Victoria/504/2000 (cepa análoga a B/Sichuan/379/99).

GK-1

GK-1 es un péptido sintético de 18 aminoácidos de la siguiente secuencia: **G-Y-Y-Y-P-S-D-P-N-T-F-Y-A-P-P-Y-S-A**. El péptido fue sintetizado por la compañía Research Genetics por el método en fase sólida utilizando N-ter-butoxicarbonil derivados de L-aminoácidos en una resina fenil-acetamidometilada (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). El péptido fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de fase reversa C18 (Delta Pak; Waters), obteniéndose una pureza de 95%. La secuencia correcta de cada aminoácido fue confirmada en un secuenciador de proteínas de fase líquida (Applied Biosystems).

Virus y titulación

Adaptación y propagación del virus.

La adaptación y propagación del virus se llevó a cabo mediante pasajes sucesivos administrados por vía intranasal, partiendo de la cepa viral de influenza A/Johannesburg/159/97 –subtipo H1N1, previamente amplificada en huevos de gallina (título obtenido 2048 por hemoaglutinación).

Para cada pasaje 5 ratones fueron tranquilizados con Xilacina (10 mg/kg de peso) y anestesiados con Ketamina (100-200 mg/Kg de peso) y se inocularon 15 μ l por narina (30 μ l en total) del inóculo original o del extracto pulmonar procedente de ratones que habían recibido previos pasajes, de los cuales se obtuvo un título máximo de 1:32 por hemoaglutinación después de 4 pasajes.

Tres días después que los ratones recibieron el primer inóculo, los animales fueron anestesiados, sangrados y sacrificados para obtener sus respectivos extractos de pulmón, siendo inoculado el extracto obtenido en otros ratones, determinándose el título de anticuerpos por hemoaglutinación. Después de sangrar los ratones, los pulmones fueron removidos y lavados en PBS. Los pulmones se lavaron y se disgregaron en 5 ml de PBS para ser macerados. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. a 4° C. Cada paquete celular obtenido de la centrifugación se suspendió en 2 ml de agua destilada y se agito vigorosamente. Después se agregaron 200 μ l de PBS 1x para recuperar su tonicidad y se congelan par su almacenamiento. Los sobrenadantes se usaron para la re-inoculación de otros ratones y se continuó con los pasajes sucesivos.

La actividad aglutinante de cada sobrenadante fue determinada utilizando la técnica que a continuación se describe:

Título hemaglutinante

Considerando la capacidad de las aglutininas virales de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies, se utilizó esta propiedad para evaluar la cantidad de virus presente en diferentes preparaciones de extractos pulmonares. Se utilizaron microplacas de aglutinación diluyendo las muestras a estudiar en un volumen de 200 μ l por pozo. A cada pozo se le adicionó 10 μ l de una solución con eritrocitos de hamster (1/200). Después de mezclar la placa se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 hrs. para leer el título aglutinante. En los extractos pulmonares se encontraron títulos que iban desde 1:2 hasta 1:32.

Grupos experimentales

Se utilizaron 4 grupos de ratones hembras de la cepa BALB/cAnN de dos diferentes edades: 8 a 10 semanas de nacidos y mayores de 18 meses de nacidos (simulando adultos jóvenes y ancianos, grupos para los que la vacuna muestra diferente eficiencia en la población humana), en los cuales se evaluaron los siguientes tratamientos.

Grupos:

- Sin tratamiento (20 ratones).
- Inmunizados con vacuna influenza [cepa: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2) (cepa análoga A/Moscow/10/99, y B/Victoria/504/2000 (cepa análoga a B/Sichuan/379/99)] (20 ratones).
- Inmunizados con GK-1 (20 ratones).
- Inmunizados con GK-1 + vacuna influenza (20 ratones).

Los ratones recibieron una sola dosis de cada inmunógeno y fueron evaluados a diferentes tiempos después de la inmunización (21, y 45 días). Los grupos que recibieron los tratamientos mencionados así como el grupo que no recibió tratamiento, fueron desafiados, 45 días después de la inmunización, con virus de influenza (cepa: A/Johannesburg/159/97 – subtipo H1N1) y la infección viral también fue evaluada a los 3, 6 y 9 días posteriores al desafío.

Todos los ratones fueron sangrados antes y después de cada intervención para realizar su evaluación inmunológica.

Infección experimental de los ratones con la cepa del virus

A los 45 días posteriores a la inmunización, los ratones fueron desafiados por vía intranasal con el virus de influenza (30 μ l de la cepa del virus A/johanesburg/159/97 – subtipo H1N1), a la cual se le determinó previamente su título (1:32) por medio de hemaglutinación (arriba mencionado).

Muestras para examen histológico

De cada uno de los grupos de ratones que recibieron los diferentes tratamientos, se seleccionaron al azar 5 animales para extraer sus pulmones, a los 45 días posteriores a la inmunización (día en que se llevó a cabo el desafío) y en cada uno de los tiempos posteriores al desafío. Los pulmones fueron obtenidos para este propósito con el siguiente procedimiento:

En un principio los ratones fueron tranquilizados por vía intraperitoneal con Xilacina (10 mg/kg de peso) y una vez que estuvieron tranquilizados se anestesiaron con Ketamina (100-200 mg/Kg de peso) para obtener una muestra de sangre y posteriormente ser sacrificados con una dosis letal de anestesia. Los ratones muertos fueron colocados en decúbito dorsal sobre una base previamente diseñada que tiene un ángulo de inclinación de 45°. Las 4 extremidades se sujetaron a la base y el área en la cual se llevo acabo la incisión se limpio cuidadosamente con alcohol y se procedió a hacer la incisión de manera que la traquea quedara expuesta, se sujeto con unas pinzas y se introdujo cuidadosamente en la luz 500 μ l de paraformaldehido al 4% con una jeringa, cuidando de no perforar la traquea. La perfusión intratraqueal del fijador se hizo lentamente y al final se extrajo la aguja y se hizo un nudo con hilo de seda alrededor de la traquea para evitar que se liberara el paraformaldehido. Posteriormente se abrió la caja torácica y se procedió a realizar la extracción cuidadosa de los pulmones, los cuales se colocaron en tubos Falcon que contenían 10 ml de paraformaldehido y continuar la fijación por inmersión durante 24 h a 4 °C.

Los pulmones se procesaron con la técnica histológica ordinaria para hacer cortes en parafina y tinción con hematoxilina y eosina:

1. Los pulmones fueron cortados a 6 μ m de grosor y montados en portaobjetos SUPERFROST®.

-
2. Los cortes se desparafinaron por inmersión en xilol 90 min. o en estufa a 56° C durante 1 hora. Luego fueron rehidratados en etanol de gradación decreciente hasta agua corriente.
 3. Se tiñeron con la solución de hematoxilina de Harris por 8 minutos y se diferenciaron con alcohol ácido y en una solución saturada de carbonato de litio hasta que los cortes se observan de color azul claro.
 4. Se lavaron durante 15 minutos en agua corriente.
 5. Se colocaron en etanol al 80% durante 2 minutos.
 6. Se contratiñeron en solución de eosina durante 2 minutos.
 7. Se deshidrataron y aclararon a través de 2 cambios de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xilol, durante 2 minutos cada uno y se monta con resina sintética.

Como resultado se obtiene que los núcleos se observan de color azul, el citoplasma y la mayoría del resto de las estructuras tisulares se observan de color rosa a rojo.

Determinación de IgG e IgA sérica

Es bien conocido que la simple aplicación de la vacuna de influenza provoca el aumento en los niveles de anticuerpos IgG e IgA específicos, por lo cual, para observar el efecto causado por la presencia o ausencia del péptido GK-1, los niveles inducidos tanto en suero como en lavado bronqueal se determinaron por ELISA.

En cada uno de los diferentes tiempos, se obtuvieron las muestras de sangre de cada uno de los ratones pertenecientes a cada uno de los diferentes tratamientos, se centrifuga a 5000 rpm durante 12 min para obtener el suero y realizar alícuotas para su congelación y almacenamiento.

Se utilizó la técnica convencionalmente empleada de ELISA. La placa fue sensibilizada con 0.1 µg de antígeno diluido en Buffer de Carbonatos (pH 9.6) colocando 100 µl por pozo, se incubó a 4° C durante toda la noche; posteriormente se lavó con PBS Tween al 0.3% (solución de lavado) y se bloquea la placa con PBS Tween al 0.3% BSA al 1% durante 60 minutos a 37° C. Posteriormente se lavó de nuevo con solución de lavado y se coloca el suero diluido en PBS Tween al 0.3% BSA al 1%, dejándose incubando 60 min a 37° C. Se colocó la solución de lavado y se agrega el conjugado anti – ratón. El conjugado que se utilizó varió según el Ac que se estuviera determinando. En el caso de

la determinación de IgG, el conjugado se encuentra marcado con fosfatasa alcalina [Goat anti-Mouse IgG (H+L) AP Conjugate (ZyMax™)], se diluye en PBS Tween al 0.3% BSA al 1%, se deja incubando durante 60 min. a 37° C. Para ser revelado se mezclaron pastillas de PNPP (paranitrofenolfosfatasa) en Buffer de Dietanolamina (pH 9.8) para colocar 100 µl en cada pozo, se deja incubar a 37° C durante 10 minutos, se detuvo la reacción con 100 µl de NaOH al 2N y se leyó en el lector de ELISA a 405 nm. En el caso de la determinación de IgA, se utilizó el conjugado biotinilado [Biotin-conjugated RAT anti-Mouse IgA monoclonal Ab (BD Pharmingen)], el cual se diluyó en PBS Tween al 0.3% BSA al 1%, se deja incubando durante 60 min. a 37° C. Posteriormente se utilizó solución de lavado y se le colocó streptoavidina – peroxidasa [Streptzvidin-HRP Conjugate ZyMax™] diluida en PBS Tween al 0.3% BSA al 1% durante 60 min. a 37° C y se lavó con solución de lavado, por ultimo se colocó 100µl TMB en solución única y se incubó por aproximadamente 10 minutos. La reacción se detuvo colocando 100ul de H₂SO₄ al 0.2 N y se leyó en el lector de ELISAs a 450nm.

Análisis Estadístico

La prueba de T de student se utilizó para determinar diferencias significativas en los niveles de anticuerpos específicos inducidos con los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos.

RESULTADOS

1. Identificación de la dosis de vacuna de influenza a utilizar para evaluar la capacidad inmunopotenciadora del péptido GK-1

Grupos de 3 ratones de 8 a 10 semanas fueron inmunizados y sangrados 15 días después de una sola inmunización para determinar en el suero los niveles de anticuerpos contra los componentes antigénicos de la vacuna. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 1. Niveles de IgG específicas inducidas por dos diferentes dosis de vacuna de influenza en presencia y ausencia de GK-1

Dosis Vacuna influenza ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	GK-1 ($10\mu\text{g}/\text{ratón}$)	
	-	+
4.5	0.20 ± 0.08	0.27 ± 0.08
0.45	0.23 ± 0.11	$0.46 \pm 0.15^{**}$

Promedio (D.O 405 nm) \pm DS

****Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones coinmunizados con y sin péptido (P = 0.0091)**

Se evaluaron dos dosis de vacuna de influenza encontrándose que coadministrando GK-1 con una dosis mínima de la vacuna de influenza (dosis = $0.45 \mu\text{g}/\text{ratón}$) se observa un aumento significativo de los niveles de anticuerpos específicos respecto a los obtenidos inmunizando solo con la vacuna contra influenza.

Un grupo adicional de 3 ratones de 8 a 10 semanas fue inmunizado y sangrado 15 días después de una sola inmunización para evaluar una dosis intermedia entre las dos dosis previamente analizadas para determinar en el suero los niveles de anticuerpos contra los componentes antigénicos de la vacuna. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 2. Niveles de IgG específicas inducidas por dos distintas dosis de vacuna de influenza intermedias a las previamente analizadas en presencia y ausencia de GK-1

Dosis Vacuna Influenza ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	GK-1 ($10\mu\text{g}/\text{ratón}$)	
	-	+
4.0	0.16 ± 0.10	$0.33 \pm 0.3^{**}$
1.0	0.07 ± 0.02	$0.29 \pm 0.15^{**}$

Promedio (D.O. 405 nm.) \pm DS

*Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones coimmunizados con y sin péptido ($P = 0.0445$ y $P = 0.0117$ respectivamente).

De las dos dosis evaluadas de vacuna de influenza se encontró que coadministrando GK-1 con la vacuna de influenza en las dos dosis se observa la capacidad del péptido para potenciar la respuesta de anticuerpos.

Con el propósito de realizar los estudios posteriores se decidió utilizar la dosis de $1 \mu\text{g}/\text{ratón}$, considerando que en esta dosis se pudo observar una mayor diferencia en los niveles de anticuerpos obtenidos entre los ratones inmunizados solo con la vacuna de influenza y los inmunizados con vacuna de influenza y GK-1.

2. Identificación de la dosis de GK-1 óptima para inducir la capacidad inmunopotenciadora

Con el objeto de determinar la cantidad de GK-1 adecuada para inmunopotenciar la vacuna de influenza se decidió evaluar el péptido en 3 diferentes cantidades (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), inmunizando a los ratones con la dosis de vacuna de influenza previamente establecida (1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). Los ratones fueron sangrados a los 21 y 45 días posteriores a la inmunización. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 3. Niveles de IgG específicas inducidas por la vacuna de influenza coadministrada con tres diferentes dosis de GK-1

	Vacuna	Vacuna + GK-1 1 μg	Vacuna + GK-1 5 μg	Vacuna + GK-1 10 μg
Tiempo 0	0.03 \pm 0.0	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.031 \pm 0.01
Días posteriores a la inmunización				
21	0.78 \pm 0.02	0.75 \pm 0.27	0.65 \pm 0.27	0.87 \pm 0.19*
45	1.01 \pm 0.03	1.04 \pm 0.07	1.02 \pm 0.35	1.20 \pm 0.16*

Promedio (D.O. 405 nm.) \pm DS

*Diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de anticuerpos de ratones inmunizados con vacuna de influenza sin y con diferentes cantidades de péptidos.

Se observa que la dosis de 10 μg de GK-1 induce el mayor incremento en los niveles de anticuerpos desde los primeros 21 días posteriores a la inmunización. Con base a este experimento se decidió utilizar la dosis de 10 μg de GK-1 /ratón en los siguientes ensayos.

3. Evaluación del requerimiento de adyuvante para la inmunopotenciación inducida por GK-1 en la respuesta de anticuerpos

Considerando la posibilidad de que el uso de inmunopotenciadores adicionales amplifiquen el efecto de GK-1 en la respuesta de anticuerpos contra la vacuna de influenza se evaluó el efecto en esta respuesta de la coadministración adicional al GK-1 de saponina o alúmina (adyuvantes autorizados para uso veterinario y humano respectivamente).

Efecto de saponina

Grupos de 3 ratones fueron co-inmunizados con vacuna de influenza y GK-1 en ausencia o no de saponina (10 µg/ratón) y sangrados 15 días después de la inmunización para determinar en el suero los niveles de anticuerpos contra los componentes antigénicos de la vacuna de influenza. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 4. Niveles de IgG específicas inducidas por la coadministración de Vacuna de Influenza y GK-1 con y sin saponina

Vacuna Influenza (1 µg/ratón)	GK-1	
	-	+
Sin Saponina	0.07 ±0.02	0.37 ±0.22*
Saponina	0.28 ±0.3	0.29 ±0.15

Promedio (D.O. 405 nm.) ± DS

*Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones inmunizados con vacuna de influenza sola y coadministrada con GK-1 (P = 0.0161).

Se observó que en ausencia de saponina, GK-1 inmunopotencia la respuesta de anticuerpos.

Efecto de Alúmina

Grupos de 3 ratones fueron co-inmunizados con vacuna de influenza y GK-1 en presencia o no de alúmina (9 μ g/ratón de alúmina al 10%) y sangrados 15 días después de la inmunización para determinar en el suero los niveles de anticuerpos contra los componentes antigénicos de la vacuna de influenza. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 5. Niveles de IgG específicas inducidas por la coadministración de Vacuna de Influenza y GK-1 con y sin alúmina

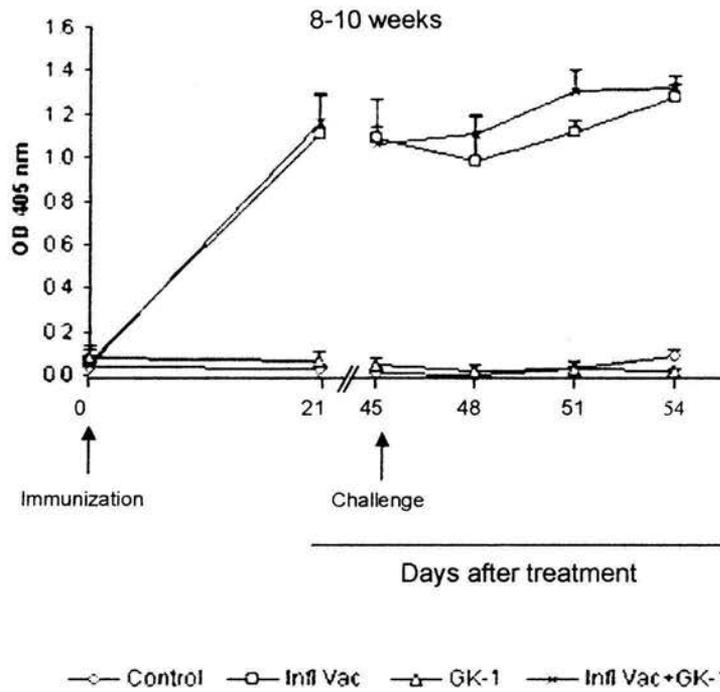
Vacuna Influenza (1 μ g/ratón)	GK-1	
	-	+
Sin Alúmina	0.23 \pm 0.09	0.42 \pm 0.04**
Alúmina	0.16 \pm 0.01	0.40 \pm 0.05***

Promedio (D.O. 405 nm.) \pm DS

**Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones inmunizados con vacuna de influenza sola y vacuna de influenza con alúmina y coadministrada con GK-1 (P = 0.0026 y P = 0.0001 respectivamente)

Se observa que la capacidad potenciadora de la respuesta de anticuerpos inducida por GK-1 no requiere ni se potencia con el uso de alúmina como adyuvante.

Gráfica 1. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos



Se observan niveles similares de IgG específicas entre los ratones del grupo inmunizado con vacuna, así como el que recibió el tratamiento de vacuna coadministrado con GK1.

Los ratones que recibieron la vacuna coadministrada con GK1 presentaron una mayor respuesta de IgG a los 6 días posteriores al desafío ($P = 0.015$).

4.- Evaluación de la capacidad de potenciar la respuesta a la vacuna de influenza en ratones jóvenes

Se utilizaron grupos de ratones BALB/cAnN hembras de 8 a 10 semanas al comienzo del experimento (20 ratones por grupo) y un nuevo lote de vacuna contra Influenza correspondiente a la producción de vacuna del año 2001-2002.

4a.- La coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza aumenta los niveles de IgG séricas específicas (Tabla 6. Gráfica 1)

Los ratones fueron inmunizados con la Vacuna de Influenza (1 μ g /ratón) en presencia o ausencia de GK-1 (10 μ g/ratón). Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 6. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos

	T 0 (Inmunización)	21 días	45 días (Desafío)	48 días	51 días	54 días
Control (Sin tratamiento)	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02
GK-1	0.08 \pm 0.05	0.07 \pm 0.04	0.06 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01
Vac Influenza	0.06 \pm 0.05	1.11 \pm 0.18	1.11 \pm 0.01	0.99 \pm 0.21	1.13 \pm 0.05	1.29 \pm 0.06
Vac Influenza + GK-1	0.05 \pm 0.03	1.16 \pm 0.12	1.08 \pm 0.07	1.13 \pm 0.09	1.32 \pm 0.09*	1.34 \pm 0.05

Promedio (D.O. 405 nm.) \pm DS

*Diferencia estadísticamente significativa a los 6 días pos-desafío entre los ratones inmunizados solo con vacuna de influenza y los ratones que recibieron la vacuna coadministrada con GK-1 (P = 0.015).

4b.- Niveles de IgA séricas específicas inducidas por la coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza (Tabla 7)

La inmunización se llevo a cabo con la Vacuna de influenza (1 μ g /ratón) + GK-1 (10 μ g /ratón) La dilución del suero para llevar a cabo la medición de IgA fue de 1:50.

Tabla 7. Niveles de IgA específicas inducidas en suero de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos

	T 0 Inmunización	21 días	45 días (Desafío)	48 días	51 días	54 días
Control (Sin tratamiento)	0.03 \pm 0.05	0.17 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.18 \pm 0.10
GK-1	0.03 \pm 0.05	0.17 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02
Vac Influenza	0.03 \pm 0.05	0.25 \pm 0.07**	0.29 \pm 0.01*	0.36 \pm 0.14	0.32 \pm 0.13	0.32 \pm 0.03
Vac Influenza + GK-1	0.03 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04	0.24 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02

Promedio (D.O. 450 nm.) \pm DS

**Diferencia estadísticamente significativa a los 21 y 45 días posteriores a la inmunización (P = 0.0023 y P = 0.0228 respectivamente) entre los ratones inmunizados únicamente con vacuna y los ratones que fueron co-inmunizados con vacuna + GK-1.

Se observan mayores niveles de IgA sericas específicas en los ratones del grupo inmunizado solo con vacuna de influenza que los niveles inducidos en los otros grupos.

4c.- Niveles de IgA específicas en el lavado bronquial de ratones jóvenes (Tabla 8)

Se recuperó el lavado bronquial de cada uno de los ratones experimentales y se utilizó en una dilución 1:50 para la medición de IgA específicas por ELISA.

Tabla 8. Niveles inducidos de IgA específicas en lavados bronquiales de ratones jóvenes inmunizados con los distintos tratamientos

Tiempo después de la inmunización				
	45 días Desafío	48 días	51 días	54 días
Control (Sin tratamiento)	0.17 ±0.05	0.18 ±0.04	0.25 ±0.13	0.22 ±0.05
GK-1	0.13 ±0.06	0.16 ±0.03	0.23 ±0.08	0.17 ±0.04
Vac Influenza	0.19 ±0.02**	0.20 ±0.03	0.29 ±0.20	0.33 ±0.14
Vac Influenza + GK-1	0.08 ±0.03	0.19 ±0.04	0.26 ±0.03	0.32 ±0.15

Promedio (D.O. 450 nm.) ± DS

**Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones inmunizados únicamente con vacuna y los ratones que fueron co-inmunizados con vacuna + GK-1 (P = 0.0052).

En general se detectan muy bajos niveles de IgA, sin embargo se observan antes del desafío mayores niveles de IgA específicas en los lavados bronquiales en los ratones del grupo inmunizado únicamente con vacuna de influenza, en comparación a los niveles observados en los demás grupos. En el último día posterior al desafío, los ratones inmunizados con vacuna de influenza así como los que fueron inmunizados con vacuna de influenza y GK-1 presentaron los mismos niveles de IgA específicas.

4d.- La coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza se asocia con una reducción más efectiva del título viral en los lavados bronquioalveolares

Tabla 9. Título viral que presentaron los lavados bronquiales de ratones jóvenes antes del desafío y en los tiempos posteriores al desafío

Sin tratamiento

dilución	Días pos- desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	+
1/16	+	-
1/32	-	-

Vacuna Influenza

dilución	Días pos- desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	-
1/16	-	-
1/32	-	-

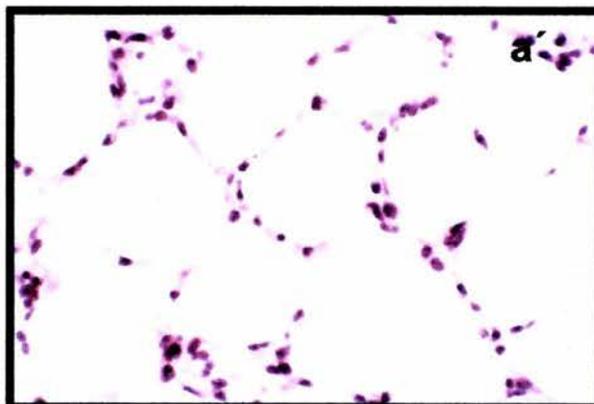
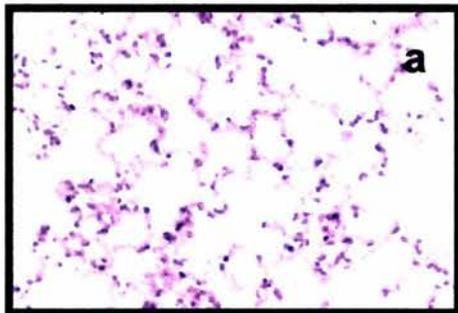
GK-1

dilución	Días pos- desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	-
1/16	-	-
1/32	-	-

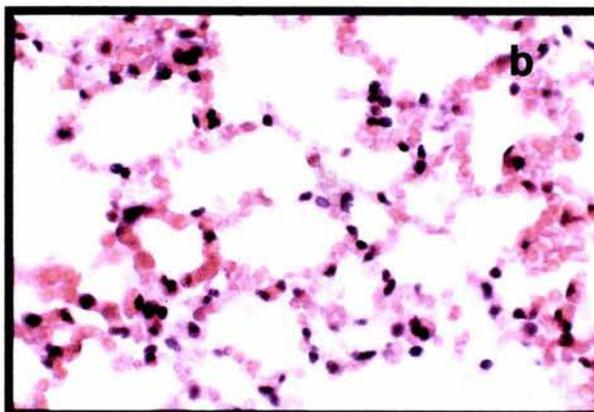
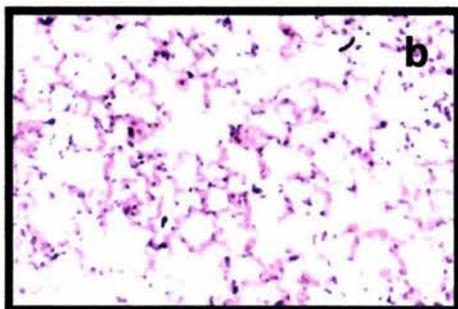
Vacuna + GK-1

dilución	Días pos- desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	-
1/8	-	-
1/16	-	-
1/32	-	-

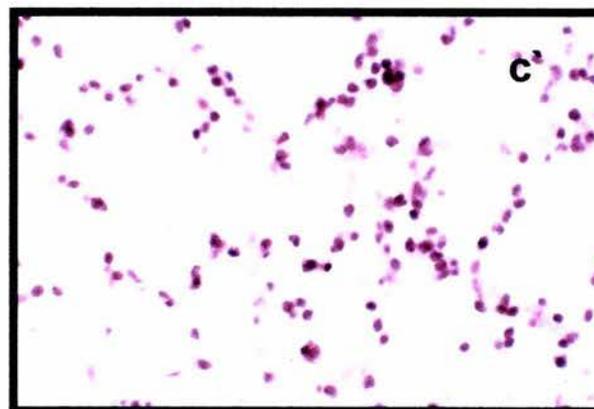
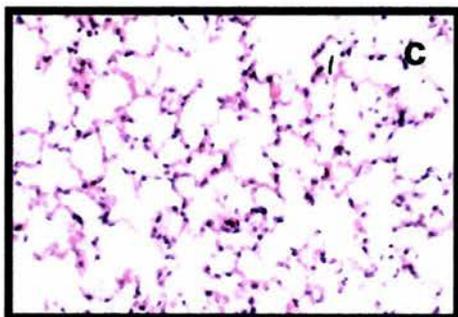
El grupo que recibió la co-inmunización de vacuna de influenza con GK-1 presentó título viral de una dilución de 1/4 y 1/2 a los 6 y 9 días respectivamente en los días posteriores al desafío, mientras que los otros grupos inmunizados presentaron un título de una dilución de 1/8 y de 1/4 en los lavados bronquioalveolares.



Grupo Control (Sin tratamiento)



Grupo inmunizado con Vacuna Influenza



Grupo inmunizado con Vacuna Influenza + GK1

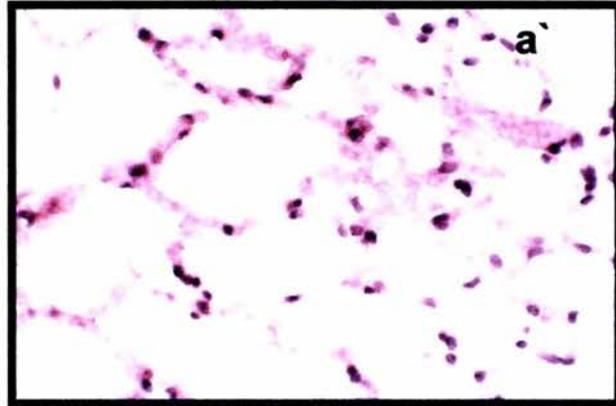
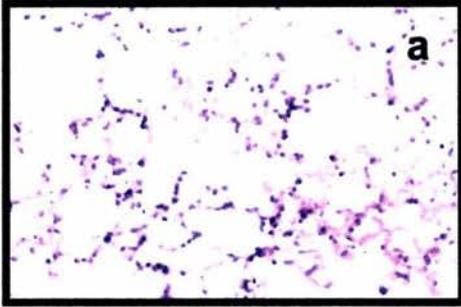
Figura 1. Fotomicrografías de pulmón 45 días pos-inmunización (a, b y c tomadas a un aumento de 200x; a', b' y c' tomadas a un aumento de 400x)

4e.- Evaluación histológica de pulmones

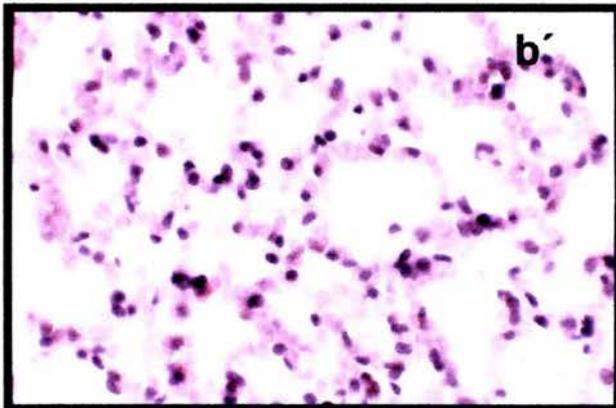
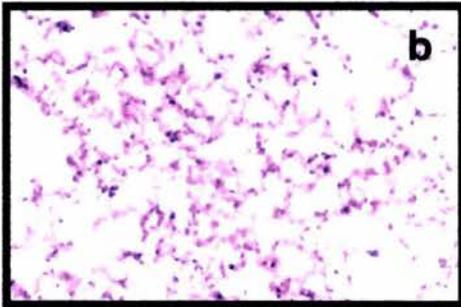
El virus de influenza afecta el tracto respiratorio estableciéndose principalmente en los pulmones del organismo hospedero. Considerando que la cepa viral utilizada en este estudio no induce mortalidad en los ratones, resultó relevante la observación histológica de los pulmones para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos.

El examen histológico consideró la integridad de las estructuras alveolares, la estructura de los bronquiolos y el grado de infiltración celular. Para la evaluación histológica de los diferentes grupos, se tomaron muestras de pulmón de cada ratón de cada uno de los grupos que recibió los diferentes tratamientos. Los pulmones fueron recuperados a partir de ratones antes del desafío (45 días después de la inmunización y a los 6 y 9 días posteriores al desafío).

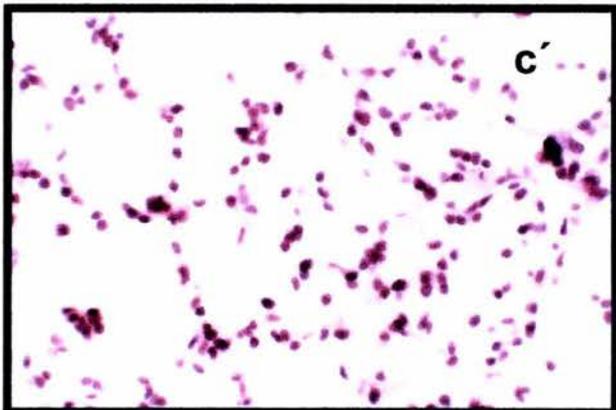
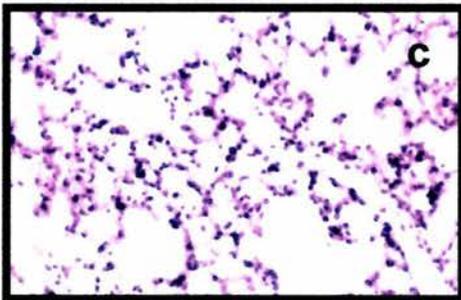
En la contrapágina se observan imágenes representativas de cada uno de los grupos analizados antes de ser desafiados. En la primera imagen (Fig 1a) se observa el estado de un corte de pulmón que no recibió ningún tratamiento. Se distinguen los alvéolos bien ventilados y con perfusión vascular normal. En los pulmones de ratones inmunizados con vacuna (Fig 1b) se observó edema y congestión vascular. La luz alveolar está disminuida y algunos alveolos aparecen colapsados, probablemente secundarios a la presencia de congestión vascular de la pared de los alvéolos y, en algunos casos, debido a hemorragias focales. En el grupo vacuna+GK-1 (Fig 1c), la mayoría de los alvéolos conservan una luz bien ventilada y otros muestran cierto grado de congestión de la pared y hemorragias discretas por lo que tienen disminuida la luz. Lo más destacable es la presencia de un infiltrado de la pared alveolar, probablemente formado por células mononucleares, es decir, por monocitos-macrófagos y linfocitos.



Grupo Control (Sin tratamiento)



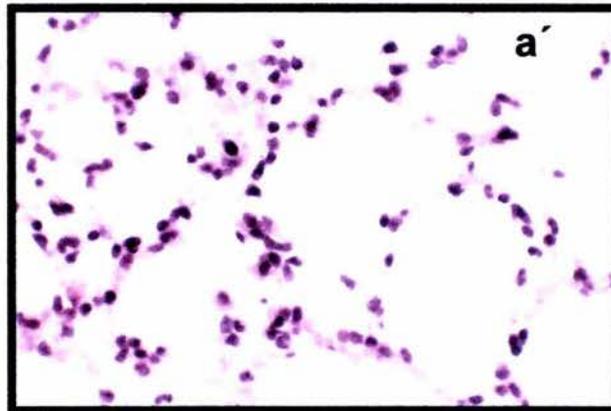
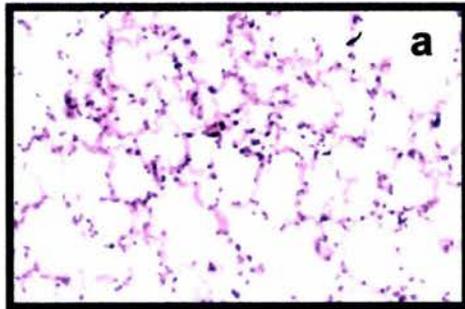
Grupo Inmunizado con Vacuna Influenza



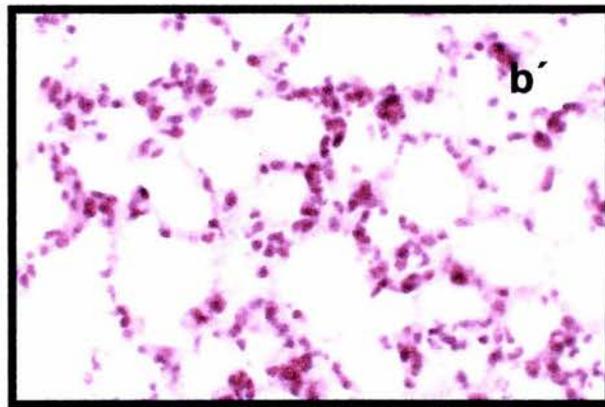
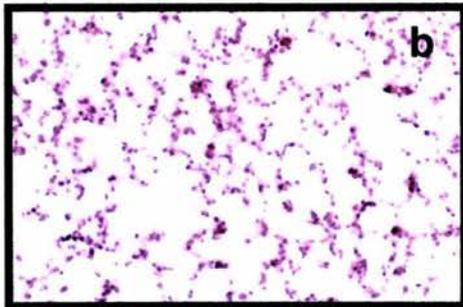
Grupo Inmunizado con Vacuna Influenza + GK1

Figura 2. Fotomicrografías de pulmón 6 días pos-desafío (a, b y c tomadas a un aumento de 200x; a', b' y c' tomadas a una aumento de 400x)

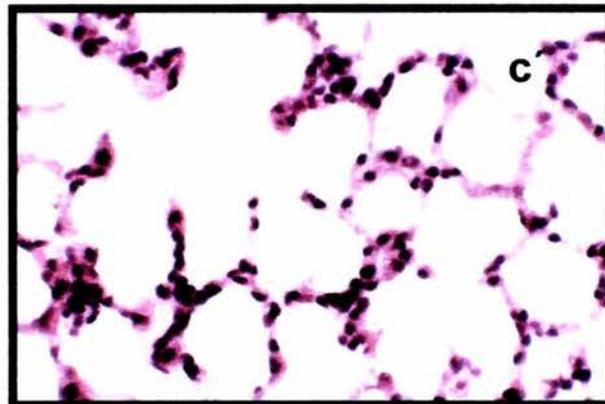
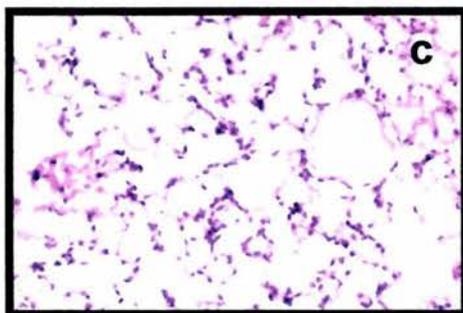
A los 6 días posdesafío, el grupo sin tratamiento (Fig 2a) mantiene numerosos alvéolos bien ventilados, aunque la pared muestra un infiltrado similar al del grupo vacuna+GK-1 anterior (a los 45 días pos-inmunización) y se observan zonas de congestión y hemorragia alveolares. El grupo de vacuna de influenza (Fig 2b), presenta numerosos alvéolos con intensa congestión vascular que disminuye la luz alveolar o están evidentemente ocluidos. Es observable un discreto infiltrado probablemente mononuclear en la pared alveolar en este grupo de animales. En el grupo vacuna+GK-1 (Fig 2c), los alvéolos han desarrollado cierto grado de congestión vascular pero, en la mayor parte del órgano, no llega a ocluir los espacios aéreos. El infiltrado mononuclear en este grupo de animales y en este tiempo post-desafío es muy prominente.



Grupo Control (Sin tratamiento)



Grupo Inmunizado con Vacuna Influenza



Grupo Inmunizado con Vacuna Influenza + GK1

Figura 3. Fotomicrografías de pulmón 9 días pos-desafío (a, b y c tomadas a un aumento de 200x; a', b' y c' tomadas a un aumento de 400x)

A los 9 días post-desafío, el grupo sin tratamiento (Fig 3a) muestra congestión vascular e infiltrado inflamatorio alveolar en ciertas zonas discretas. La mayoría de los alvéolos están bien ventilados. En el grupo de vacuna de influenza (Fig 3b) se observaron características alveolares similares a las descritas en el grupo vacuna+GK-1 a los 6 días posdesafío. El grupo vacuna+GK-1 (Fig 3c) a los 9 días de desafío se caracterizó por tener alvéolos de aspecto casi normal, con base a que están bien ventilados y prácticamente libres de congestión y hemorragia focales. El infiltrado mononuclear, aunque claramente menos prominente que a los 6 días posdesafío, se mantiene en algunos grupos de alvéolos.

Como se puede observar la estructura alveolar de los ratones co-inmunizados con vacuna y GK-1 se recupera más rápidamente que los ratones que recibieron los otros tratamientos. En este grupo de ratones se distinguieron estructuras alveolares definidas y menos modificadas con una gran presencia de infiltrado de tipo aparentemente linfoide, en comparación con la observada con los otros tratamientos en los que se observó una mayor congestión celular con disminución de los espacios intra-alveolares con engrosamiento de las paredes alveolares y mayor diversidad celular. Una diferencia clara se observa también antes del desafío, los ratones inmunizados únicamente con vacuna presentan mayor congestión pulmonar que los que recibieron vacuna y péptido.

5.- Evaluación de la capacidad de potenciar la respuesta a la vacuna de influenza en ratones viejos (> de 18 meses) (Tabla 10)

Se utilizaron grupos de ratones BALB/cAnN hembras de más de 18 meses de edad (20 ratones por grupos) al comienzo del experimento.

Se puede observar que en los ratones viejos se detectan en las mismas condiciones experimentales niveles de anticuerpos significativamente inferiores que en los ratones jóvenes. En los ratones viejos se observó además mayor variación individual en los niveles de anticuerpos detectados.

Tabla 10. Comparación entre los niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones adultos y viejos

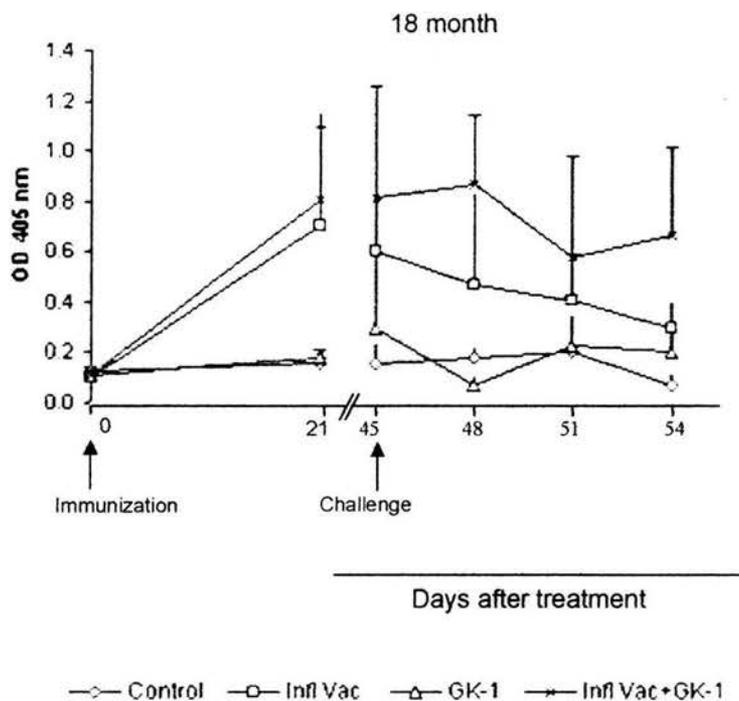
	T 0 Inmunización	21 días	45 días (Desafío)	48 días	51 días	54 días
Vac Influenza 8-10 sem	0.06 ±0.05	1.11 ±0.18***	1.11 ±0.01	0.99 ±0.21	1.13 ±0.05*	1.29 ±0.06***
Vac Influenza 18 meses	0.10 ±0.04	0.70 ±0.39	0.71 ±0.65	0.56 ±0.42	0.48 ±0.2	0.35 ±0.13
Vac Influenza + GK-1 8-10 sem	0.05 ± 0.03	1.16 ±0.12***	1.08 ±0.07	1.13 ±0.09	1.32 ±0.09*	1.34 ±0.05*
Vac influenza + GK-1 18 meses	0.11 ±0.04	0.81 ±0.35	0.94 ±0.51	1.08 ±0.32	0.68 ±0.45	0.78 ±0.40

Promedio (D.O. 405 nm.) ± DS

**Diferencia estadísticamente significativa a los 21 días pos-inmunización (P = 0.0002) y a los 6 y 9 días pos-desafío (P = 0.0128 y P = 0.0001 respectivamente) entre los ratones jóvenes y viejos inmunizados con vacuna de influenza.

***Diferencia estadísticamente significativa a los 21 días pos-inmunización (P = 0.0002) y a los 6 y 9 días post-desafío (P = 0.0312 y P = 0.0132 respectivamente) entre los ratones jóvenes y viejos co-inmunizados con vacuna de influenza y GK-1.

Gráfica 2. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos



Se puede observar que el grupo que fue inmunizado con vacuna coadministrada con GK1, indujo mayores niveles de IgG comparada con los otros grupos, comportamiento que se mantuvo incluso en los tiempos posteriores al desafío; diferencia estadísticamente significativa sobre todo a los 3 días posteriores al desafío ($P = 0.0492$), a pesar que la respuesta inducida disminuyó a los 6 días después de haber sido desafiados (día 51), sin embargo esta se incremento 3 días después (día 54).

5a- La coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza aumenta los niveles de IgG séricas específicas en ratones >18 meses de edad (Tabla 11. Gráfica 2)

Los ratones fueron inmunizados con la Vacuna de Influenza (1µg /ratón) en presencia o ausencia de GK-1 (10µg/ratón). Los anticuerpos se evaluaron por ELISA utilizando el suero a una dilución 1:100 para la determinación de niveles de IgG específicos.

Tabla 11. Niveles de IgG específicas inducidas en suero de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos

	T 0 Inmunización	21 días	45 días (Desafío)	48 días	51 días	54 días
Control (sin tratamiento)	0.12 ±0.04	0.16 ±0.06	0.20 ±0.1	0.23 ±0.05	0.25 ±0.17	0.10 ±0.05
GK-1	0.11±0.04	0.18 ±0.18	0.36 ±0.46	0.10 ±0.04	0.28 ±0.04	0.25 ±0.15
Vac Influenza	0.10 ±0.04	0.70 ±0.39	0.71 ±0.65	0.56 ±0.42	0.48 ±0.2	0.35 ±0.13
Vac Influenza + GK-1	0.11 ±0.04	0.81 ±0.35	0.94 ±0.51	1.08 ±0.32*	0.68 ±0.45	0.78 ±0.40

Promedio (D.O. 405 nm.) ± DS

*Diferencia estadísticamente significativa a los 3 días post-desafío (P = 0.0492) entre los ratones inmunizados con vacuna de influenza y los ratones en que la vacuna fue coadministrada con vacuna + GK-1.

Porcentaje de ratones respondedores y no respondedores (Tabla 12)

Considerando las importantes diferencias individuales entre los ratones dentro de cada tratamiento se compararon los porcentajes de ratones respondedores y no respondedores para cada tratamiento, considerando como ratón respondedor aquel que presentara una D.O. mayor a la que presentó el promedio + 2 D.S. de los ratones control (no inmunizados).

Tabla 12. La co-administración de la vacuna de influenza con GK-1 aumento el porcentaje de individuos respondedores en ratones viejos

	Días después de la inmunización		Días después del desafío		
	21	45	3	6	9
GK-1	2/20 10%	2/19* 10.52%	0/5 0%	0/4 0%	1/4 25%
Vacuna Influenza	17/19* 89.47%**	11/18 61.11%	2/5 40%	2/4 50%	3/5 60%
Vacuna Influenza +GK-1	20/20 100%	15/18 83.33%	5/5 100%	2/4 50%	4/5 80%

*Numero de ratones que presentaron niveles de anticuerpos superiores al umbral/ número total de ratones por grupo

**Porcentaje de ratones respondedores

5b- La coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza no modifica los niveles de IgA séricas específicas en ratones >18 meses de edad (Tabla 13)

La inmunización se llevó a cabo con la Vacuna de influenza (1µg/ratón) + GK-1 (10µg/ratón).

La dilución del suero para llevar a cabo la medición de IgA fue de 1:50.

Tabla 13. Niveles de IgA específicas inducidas en suero de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos

	T 0 Inmunización	21 días	45 días Desafío	48 días	51 días	54 días
Control (Sin tratamiento)	0.08 ±0.05	0.09 ±0.05	0.12 ±0.06	0.14 ±0.04	0.19 ±0.04	0.19 ±0.04
GK-1	0.08 ±0.05	0.07 ±0.04	0.08 ±0.05	0.13 ±0.02	0.15 ±0.01	0.16 ±0.03
Vac Influenza	0.08 ±0.05	0.10 ±0.08*	0.13 ±0.09	0.14 ±0.02	0.16 ±0.02	0.17±0.03
Vac Influenza + GK-1	0.08 ±0.05	0.06 ±0.04	0.09 ±0.06	0.13 ±0.01	0.17 ±0.04	0.17 ±0.05

Promedio (D.O. 450 nm.) ± DS

*Diferencia estadísticamente significativa a los 21 días post-desafío (P = 0.048) entre los ratones inmunizados con vacuna de influenza y los ratones en que la vacuna fue coadministrada con vacuna + GK-1.

5c.- Medición de IgA específicas en lavado bronquial (Tabla 14)

La inmunización se llevo a cabo con la Vacuna de influenza (1 μ g/ ratón) + GK-1 (10 μ g/ratón).

La dilución del lavado bronquial para llevar a cabo la medición de IgA fue de 1:50.

Tabla 14. Niveles inducidos de IgA específicas en lavados bronquiales de ratones viejos inmunizados con los distintos tratamientos

Tiempo después de la inmunización				
	45 días Desafío	48 días	51 días	54 días
Control (Sin tratamiento)	0.29 \pm 0.1	0.46 \pm 0.20	0.50 \pm 0.22	0.20 \pm 0.07
GK-1	0.20 \pm 0.08	0.25 \pm 0.09	0.50 \pm 0.08	0.21 \pm 0.09
Vac Influenza	0.21 \pm 0.11	0.45 \pm 0.13	0.52 \pm 0.12	0.26 \pm 0.08
Vac Influenza + GK-1	0.34 \pm 0.04	0.42 \pm 0.06	0.41 \pm 0.06	0.35 \pm 0.17

Promedio (D.O. 450 nm.) \pm DS

No se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos.

5d.- La coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza se asocia con una reducción más efectiva del título viral en lavados bronquioalveolares

Tabla 15. Título viral que presentaron los lavados bronquiales de ratones viejos antes del desafío y en los tiempos posteriores al desafío

Sin tratamiento

dilución	Días pos-desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	+
1/16	-	-
1/32	-	-

Vacuna

dilución	Días pos-desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	-	-
1/16	-	-
1/32	-	-

GK-1

dilución	Días pos-desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	-
1/16	-	-
1/32	-	-

Vacuna + GK-1

dilución	Días pos-desafío	
	6	9
1/2	+	+
1/4	+	-
1/8	-	-
1/16	-	-
1/32	-	-

El grupo que recibió la co-inmunización de la vacuna de influenza con GK-1 obtuvo a los 9 días posteriores al desafío un título de una dilución de de 1/2, mientras que el grupo que solo recibió la vacuna se detecto un título de 1/4.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

En este trabajo se presentan evidencias experimentales que sustentan la capacidad adyuvante del péptido para potenciar la respuesta contra la vacuna de influenza.

La capacidad adyuvante fue evaluada con base a tres criterios, niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación, eliminación del virus en pulmones medido en términos de título viral en los extractos pulmonares obtenidos después del desafío y el aspecto histológico de los tejidos pulmonares antes y después de la vacunación y del desafío.

La determinación de los niveles de anticuerpos específicos inducidos es pertinente considerando que se ha establecido extensamente que los anticuerpos participan críticamente en la capacidad protectora contra la infección viral [37, 38]. Como se observa en esta tesis, la coinmunización con GK-1 incrementó los niveles de anticuerpos contra los antígenos vacunales de influenza. Este aumento se observó más claramente en el grupo de ratones viejos, en los se detectaron menores niveles de anticuerpos específicos en los ratones que no recibieron GK-1, que aumentan cuando son coinmunizados con GK-1. El aumento de anticuerpos se detecta tanto antes como después del desafío. La observación de que la vejez tanto en ratones como en humanos se asocia a menor efectividad de la vacuna y menor capacidad de producir anticuerpos contra ella se ha establecido en estudios previos. En este estudio resulta de interés señalar además la mayor dispersión de los datos obtenida en ratones viejos versus adultos jóvenes. Esta señala que aún en este modelo murino y utilizando ratones singénicos el proceso de envejecimiento genera heterogeneidad en el comportamiento de la población [39]. Aún con este comportamiento heterogéneo al respecto de los niveles de anticuerpos observamos que el porcentaje de ratones respondedores es más alto tanto en los tiempos previos como posteriores al desafío en el grupo de ratones que recibieron la coadministración con GK-1. Mientras tanto, en ratones adultos jóvenes observamos diferente comportamiento según el lote de vacuna. Utilizando el lote del 2001-2002 observamos un claro incremento de anticuerpos inducido por GK-1. Mientras tanto, una vez empleado el lote 2002-2003 no se observaron incrementos significativos en los niveles de anticuerpos en ratones jóvenes. Es factible que estas diferencias se deban a la diferente capacidad inmunogénica entre lotes de vacuna. Para evaluar esta posibilidad se realizó un experimento adicional de dosis respuesta utilizando dosis de vacuna de influenza de 0.1µg/ratón, 0.5µg/ratón y 1.0 µg/ratón e inmunizando en presencia y

ausencia de GK-1 (10µg/ratón). Utilizando las tres dosis señaladas no se observó la capacidad inmunopotenciadora de GK-1 en incrementar los niveles de anticuerpos obtenidos con la aplicación de solo la vacuna de influenza. Probablemente esto se deba a que la propia vacuna indujo muy altos niveles de anticuerpos independientemente de la dosis utilizada y el efecto adyuvante solo pueda ser visualizado cuando las condiciones de inmunización inducen menores niveles de anticuerpos. Esta posibilidad se está actualmente explorando utilizando dosis más bajas de vacuna para la inmunización y determinando los niveles de anticuerpos en tiempos más prolongados después de la inmunización.

Si bien ha sido bien establecida la asociación entre niveles de anticuerpos y protección contra influenza, no se han establecido los mecanismos que median las diferencias en la capacidad de producción de anticuerpos con la edad. Se sabe que los niveles de citocinas endógenas afectan la producción de anticuerpos y el desarrollo de una inmunidad protectora [40]. Las citocinas pueden activar tanto a las células presentadoras de antígenos como a los linfocitos, y el balance de citocinas Th1 y Th2 determina el tipo de respuesta del hospedero a la vacunación. Con el propósito de clarificar el papel que juegan las citocinas en despertar la producción de anticuerpos a la vacunación contra influenza, en otros estudios se han analizado en suero de personas mayores respondedoras y no respondedoras a la vacuna los niveles de $INF\gamma$, IL-6 (citocina que es un potente estimulador de crecimiento y diferenciación de células B y, que por lo tanto, tiene un papel fundamental en la producción de anticuerpos), e IL-10, citocina anti-inflamatoria que desregula la función de las células presentadoras de antígeno y suprime la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, $TNF-\alpha$ e $INF\gamma$) teniendo como principal efecto *in vivo* inhibir una respuesta celular Th1 [41]. Sin embargo, no se ha encontrado relación alguna entre los niveles en suero de IL-6, IL-10 e $INF\gamma$ y la producción de anticuerpos a la vacuna de influenza. Además se asume que la vacuna viral inactivada puede no ser dependiente de IL-6, ya que se ha encontrado niveles similares de esta citocina tanto en personas mayores como en personas jóvenes.

Con respecto a los niveles de IgA séricas específicas inducidas en los ratones de 8 a 10 semanas de nacidos, se observa que la coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza reduce los niveles de IgA específicas con respecto a las inducidas con la inmunización de la vacuna sola, observándose diferencias estadísticamente significativas en los días 21 y 45 posteriores a la inmunización. Al observar el comportamiento de los ratones mayores de 18 meses al respecto, se pueden observar resultados similares a los

21 días después de la inmunización, sin embargo en los tiempos posteriores, prácticamente se induce la misma respuesta con ambos tratamientos. Las diferencias significativas encontradas deben considerarse con reservas porque corresponden a niveles muy bajos de IgA específicas. En este sentido es bien sabido que la inmunización con vacuna de influenza induce una pobre respuesta sérica de anticuerpos tipo IgA, comparada con la respuesta de IgG que se estimula, por lo cual, no es de extrañar los bajos niveles de estos anticuerpos inducidos después de ser administrados ambos tratamientos.

Con el propósito de valorar el efecto en la inmunidad de mucosas se determinaron los niveles de IgA específicas inducidas *in situ* (pulmón). Los resultados obtenidos muestran cambios claros inducidos por el péptido. En ratones jóvenes los niveles de IgA parecen disminuir en presencia de GK-1 aunque estas diferencias desaparecen después de la infección. En los ratones de más de 18 meses no se observaron diferencias significativas entre los inmunizados con o sin el GK-1 y la vacuna de influenza. Nuevamente, aún en la respuesta local se detectaron niveles bajos de IgA lo que no permite sostener gran relevancia biológica de las diferencias observadas.

Al examinar los extractos de pulmón y medir la carga viral que presentaban, los grupos que recibieron la coadministración de la vacuna de influenza con GK-1 mostraron una reducción más efectiva del título viral en los extractos pulmonares. La carga viral disminuyó más efectivamente con la coadministración de GK-1 tanto en los ratones jóvenes como en ratones viejos según el título viral determinado en los extractos pulmonares. Aunque consistente en diferentes experimentos, debe señalarse que la disminución más eficiente de la carga viral se reflejó en solo una dilución por hemaglutinación. Este efecto podría entonces ser cuestionable considerando las variaciones en sensibilidad de este procedimiento. Así, se requiere desarrollar un método que con mayor precisión determine la carga viral para confirmar o descartar esta observación.

El virus de influenza afecta el tracto respiratorio estableciéndose principalmente en los pulmones del organismo hospedero. Considerando que la cepa viral utilizada en este estudio no induce mortalidad en los ratones, resultó relevante la observación histológica de los pulmones para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos. Las evidencias más claras al respecto de la capacidad inmunopotenciadora de GK-1 se establecieron en la evaluación histológica de los pulmones. En este sentido, cabe señalar que fue necesario evaluar experimentalmente diferentes condiciones para la fijación adecuada de los

pulmones. Esto es especialmente importante porque estos tejidos son altamente susceptibles a las intervenciones para el sacrificio de los ratones. Así, el procedimiento optimizado nos permitió obtener pulmones con los tejidos altamente conservados en los ratones controles que no habían recibido ningún tratamiento.

En esta fase de la evaluación se observaron diferencias asociadas a la co-inmunización con GK-1 tanto antes como después del desafío. En el grupo de ratones que solo recibió la vacuna de influenza se observaron evidencias de cierto grado de daño en el pulmón. Es posible que este grado de daño aún después de 45 días de recibir la vacuna se deba a la propia respuesta al virus atenuado. Interesantemente, en los ratones que recibieron además de la vacuna, GK-1 no se observó ningún grado de daño. Es factible que la potenciación de la respuesta inmune inducida por el péptido sea la responsable de este fenómeno. Si bien son pocos los casos de efectos colaterales, en especial respiratorios asociados a la vacunación [42], esta observación es de especial interés considerando la amplia cobertura de vacunación con influenza y que esta vacuna se aplica en individuos sanos. También es clara la potenciación del efecto de la vacunación utilizando GK-1 después de la infección. Es aparente que se promueve la llegada de células de aspecto linfocítico más tempranamente y el daño pulmonar se resuelve más eficientemente en el grupo que recibió GK-1 además de la vacuna. Este fenómeno se observó tanto en ratones adultos jóvenes como en viejos. Este efecto es especialmente importante en términos prácticos y nos permite suponer que podríamos mejorar la respuesta protectora de la propia vacuna de influenza, en especial en personas de la tercera edad, grupo considerado de alto riesgo a padecer esta enfermedad. Si bien aún no hemos caracterizado las poblaciones linfocíticas que tempranamente llegan a pulmón como respuesta a la coadministración de GK-1, resulta de interés su caracterización que además de permitirnos ahondar en el mecanismo que media la capacidad adyuvante de GK-1 podría permitirnos predecir si esta respuesta se reproducirá si se aplicara en humanos. En experimentos preliminares indican que estas poblaciones no son al menos CD4 ni CD8.

Al respecto del mecanismo que media el efecto adyuvante, es factible que GK-1 promueva un fenómeno inflamatorio que permita una presentación de los antígenos vacunales más eficiente. Diferentes datos previos sustentan esta posibilidad, la inmunización con GK-1 promueve una respuesta específica aumentando los niveles de IFN γ y de IL-2 [36]. Aunque preliminares, también se ha observado que el tratamiento *in vitro* con GK-1 de células dendríticas diferenciadas en cultivos a partir de células de

médula ósea aumenta la expresión de CD80 y CD86, marcadores de activación de su superficie así como los niveles de IL-12 detectados en los sobrenadantes de las células tratadas [43]. Aunque estas observaciones requieren ser confirmadas, los datos obtenidos permiten suponer que GK-1 tiene capacidad para inducir una activación de la inmunidad innata. Esta posibilidad será necesaria evaluarla en condiciones estrictamente controladas a fin de proponer los mecanismos que pudieran mediar la capacidad adyuvante observada.

APENDICE I

Proteínas del virus de Influenza

PB1-F2

Es esencial la identificación de todas las proteínas que el virus de influenza produce en las células infectadas (**Figura 4**) para comprender los mecanismos de patogenicidad que el virus produce. Dentro de uno de los marcos de lectura abiertos para una de las subunidades de la polimerasa viral, la subunidad básica de la polimerasa 1 (PB1), se deriva un péptido noamérico, este péptido está codificado por un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 87 aminoácidos. La proteína (previamente llamada PB1-F2) contiene muchas características inusuales, entre las que destacan gran variabilidad de expresión en células infectadas individualmente que otras proteínas virales; rápida degradación por proteosomas y posiblemente otras proteasas; además de estar localizada en mitocondria. PB1-F2 aparentemente se encuentra acelerando la apoptosis en monocitos, pero no en fibroblastos o en células de línea epitelial. Una simple noción es que esta proteína potencia la capacidad para desactivar monocitos y por lo tanto otras células inmunes. PB1-F2 es solo uno de los productos de los genes del virus de influenza que pueden influenciar la apoptosis. Dos reportes demostraron muy bien la complejidad de la interacción de los virus con la vía celular de apoptosis [44, 45]. Ambos demuestran que la proteína viral no estructural más abundante, la proteína no estructural 1 (NS1) influye apoptosis.

NP y NEP

Hasta hace poco tiempo, era muy poco lo que se sabía de cómo las RNPs, que contienen el RNA viral, viajan hacia y desde el núcleo. Se han descrito señales en nucleoproteínas (**NP**) y en proteínas de exportación nuclear (NEP; formalmente llamada la proteína 2 no estructural, o NS2) del virus de influenza que interactúan con la maquinaria celular de importación y exportación nuclear, llevando a proponer modelos de tráfico de RNP [46, 47]. Las NP, que cubren el RNA viral, parecen estar mediando la importación nuclear de RNPs. NEP media la exportación nuclear de RNP en un tiempo tardío del ciclo de infección, probablemente por la unión a RNPs cubiertas con la proteína viral M1.

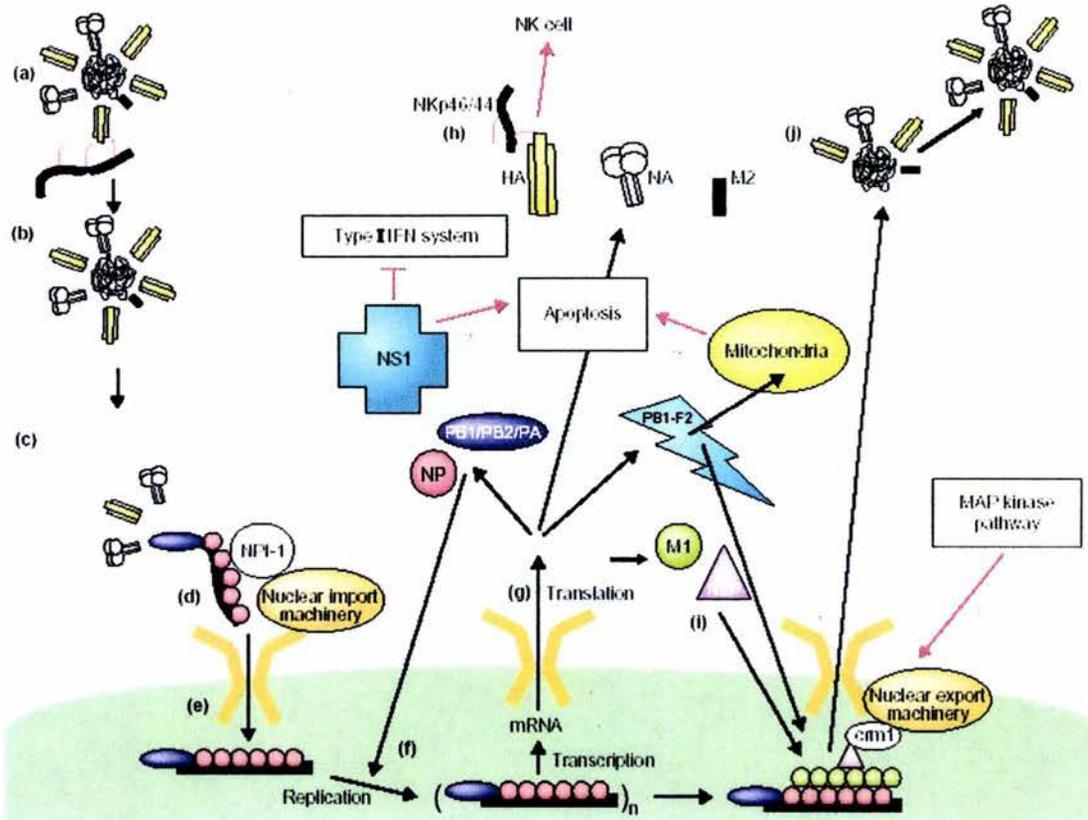


Figura 4. Esquema en el que se ilustra los mecanismos de infección del virus de influenza. (Yewdell J, Garcia A. Current Opinion in Microbiology 2002, 5; 414-418)

NKp46.

El uso de factores celulares por parte del virus de influenza para coordinar el transporte de RNA viral entre los órganos celulares ejemplifica como los virus han evolucionado debido a una eficiente maquinaria de infección.

Las células NK pueden reconocer células infectadas por virus de influenza pero el mecanismo posterior aun se mantiene inexplicable. Se ha demostrado que los receptores humanos activos NKp46 y NKp44 interactúan con el virus de influenza así como con la HA y la NA de los *paramyxovirus* [48, 49]. Parece ser que la base de esta interacción es la asociación de las proteínas virales asociadas al ácido siálico presente en las NKp46 y NKp44. Una posibilidad intrigante es que los receptores NKp46 y NKp44 activan el reconocimiento de células NK de múltiples y distintos virus liberados que expresan proteínas de unión al ácido siálico.

NS1

El virus de influenza, como la mayoría de los virus, debe de neutralizar las acciones del sistema de interferón para sobrevivir. La proteína del virus de influenza que es crucial en contra de los INFs es la proteína NS1, que previene la activación de factores transcripcionales pro-INF [50, 51] y previene la activación de la enzima protein cinasa R (PKR) que induce INF. De manera

interesantemente, NS1 del virus de influenza B también parece inhibir específicamente la activación de ISG15, otra proteína inducible de INF [52]. NS1 ha probado ser un prototipo para los virus de RNA de polaridad negativa, algunos de los cuales han demostrado codificar proteínas que subvierten el sistema de INF a diferentes niveles.

Dado que su potencial codificante es limitado, los virus, particularmente pequeños como el virus de influenza, deben de producir la mayoría de sus proteínas. Además de sus efectos en el sistema de INF, la proteína NS1 regula la expresión del mRNA viral y de otras células a través de diversos mecanismos [53, 54].

APENDICE II

Pandemias de influenza.

Las variabilidades antigénicas pueden haber sido las responsables de las grandes pandemias ocasionadas. La primera epidemia que fue claramente descrita fue la ocurrida en Italia y Francia en 1173 [55]. Figuran posteriores pandemias en 1414, 1557 y 1675-1676, así como las epidemias ocurridas en Francia entre 1788-1790, en 1789-1790 y 1830-1832 [55]. La primera verdadera epidemia global (pandemia) de influenza documentada, fue la ocurrida en 1847. Los síntomas variaron, pero las víctimas comúnmente experimentaron súbitas fiebres que duraban de 3-5 días, fríos, dolores musculares, estornudos, tos seca postrada hasta por quince días, pérdida de apetito y fotofobia [55]. Dolor de cabeza y melancolía también fueron reportados. En 1891, 125 000 personas murieron por influenza y en 1892, fueron 250 000 muertos por gripe en Gran Bretaña. Entre 1918-1919 ocurrió la mayor pandemia de influenza antes registrada. La "gripe Española" que mató a más de 20 millones de personas en el mundo. El porque este virus fue tan virulento sigue siendo una pregunta sin poder ser claramente resuelta. Actualmente se han secuenciado los genes de la HA, NA y proteínas no estructurales del virus de 1918 [56]. Sin embargo no ha sido obvia la existencia en su secuencia de cambios genéticos que sugieran la causa de la alta patogenicidad del virus. Un novedoso examen filogenético [57] ha sugerido que el gene de la HA de 1918 fue recombinante y que el evento de recombinación fue el responsable de la virulencia.

El virus de influenza tipo A puede ser subdividido dentro de subtipos con antígenos de superficie hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) serológicamente distintas. Así, tenemos que existen 15 subtipos de HA y 9 subtipos de NA descubiertos en la naturaleza. El virus de la gripe Española de 1918 fue un virus tipo A, subtipo H1N1. En 1957, aparece súbitamente un nuevo virus de influenza en el sudeste de China. Este virus de influenza tipo A fue del subtipo H2N2, causando lo que se conoció como la pandemia de la "gripe Asiática" durante la cual, la cepa H1N1 desapareció completamente de la población humana. La influenza Asiática (H2N2) persistió hasta 1968, cuando otro virus apareció de repente en China. Este virus, subtipo H3N2 tenía una nueva hemaglutinina y fue la causante de la pandemia de "Hong Kong" durante la cual, el virus H2N2 desapareció completamente de las personas. En 1977 el virus H1N1 reapareció aparentemente en el norte de China. Hoy en día, existen variantes de los virus subtipos H3N2 y H1N1 que se encuentran recirculando (Figura 5), junto con el virus de influenza tipo B. Recientemente se ha reportado que cepas del subtipo H1N2 pueden también infectar a las personas [58].

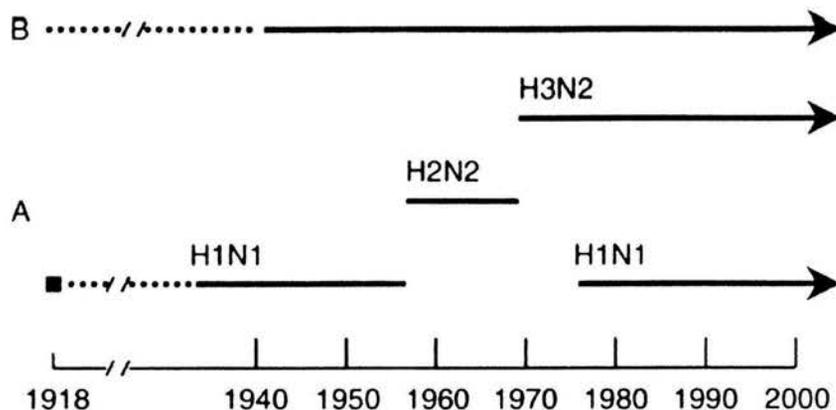


Figura 5. Figura que ilustra las modificaciones del virus de influenza A y B humano en el tiempo. Tres diferentes subtipos de hemaglutinina (H1, H2 y H3) de virus de influenza A humano y dos de neuraminidasa (N1 y N2) han sido identificados en humanos en el último siglo. Aunque actualmente no se dispone con virus "vivo" de 1918 (encuadrado sólido), los RNAs virales han sido secuenciados seguidos de RT-PCR a partir de muestras de tejidos de víctimas de 1918 fijados en formalida o frozen [59]. El rescate de contenido viral reconstruido de genes de 1918 lleva al estudio de características virulentas de esta gran estirpe.

Se estima que puede tomar de 3-5 años para que un virus dado pueda acumular suficientes mutaciones que sean capaces de generar enfermedad cuando son reinfectados en personas previamente expuestas.

Los virus de Asia [H2N2] y Hong Kong [H3N2] se reclasificaron con respecto a sus antecesores, la hemaglutinina H2 y la neuraminidasa N2, así como una de las proteínas polimerasas (PBI) aparentemente provinieron de un virus de influenza de ave, mientras que otras proteínas provenían del antiguo virus H1N1 de humano [60]. Con respecto a la nueva hemaglutinina H3 [61] del virus de Hong Kong de 1968, se encontró que lo más probable es que proviniese de un virus de influenza de ave [62], como lo hizo la proteína polimerasa PBI [60], así como otras proteínas que se encontraron en el anterior virus de gripe humano de Asia H2N2.

Se cree que nuevos subtipos emergen cuando genes de virus de influenza animal son capturados por el virus humano vía re-ordenamiento, que ocurre cuando un huésped ha sido simultáneamente infectado por ambos tipos de virus [63].

Los cerdos pueden ser infectados con virus de influenza A tanto de humano como de ave, lo cual a llegado a sugerir que los cerdos pueden ser el reservorio donde puede llegar a ocurrir los eventos de recombinación de los virus [64], aunque esto es solo un hipótesis.

Un caso particular lo constituye el virus de influenza Ruso, ya que la forma de ¿Cómo? él re-emergió es un verdadero misterio. Todos los genes del virus de 1977 fueron virtualmente idénticos al virus H1N1 que circuló en 1950.

En 1997 un virus de influenza de aves H5N1 mató pollos en el comercio de aves vivas de Hong Kong, el virus llego a infectar personas con desastrosos resultados. De 18 personas infectadas con virus de influenza H5N1 confirmado, seis murieron. Después de matar a todos los

pollos en Hong Kong, no se identificaron más casos de humanos infectados. Todos los genes del virus H5N1 fueron de origen aviario y el cambio genético que facultó al virus para infectar humanos no ha sido identificado.

Desde que el virus de influenza B circula casi exclusivamente en humanos, estos virus parecen sufrir modificaciones esencialmente por "drift" antigénico.

APENDICE III

Senescencia inmunológica

El término inmunosenescencia se refiere al deterioro de la función inmune vista en los ancianos y se cree que es la responsable de incrementar la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, cáncer y fenómenos autoinmunes

El incremento en la susceptibilidad a las infecciones puede resultar por un trastorno en el sistema inmune envejecido, y una inapropiada función inmunológica asociada con la vejez pudiendo determinar una inapropiada respuesta a las vacunas.

Muchos estudios han sugerido la existencia de una correlación entre función inmune y riesgos relacionados con la edad, con la morbilidad y mortalidad [65].

Existen evidencias que nos indican que conforme avanza la edad, una respuesta inmune en contra de antígenos recurrentes aun puede ser conservada, pero la habilidad de montar una respuesta inmune primaria en contra de un antígeno nuevo disminuye de manera significativa [66].

Uno de los problemas de las infecciones en los ancianos es que frecuentemente se presentan con signos y síntomas no específicos y los indicios de la infección focal a menudo están ausentes u oscurecidos por debajo de las condiciones crónicas.

Cambios en la respuesta inmune pueden ser clínicamente relevantes para la reactividad de los ancianos hacia la vacunación en contra de microorganismos, en especial considerando que, la respuesta hacia las vacunas requiere una óptima inmunidad mediada por células para poder dirigir una respuesta humoral. En particular, una respuesta alterada hacia una infección por virus de influenza, disminuye la respuesta de anticuerpos por vacunación por influenza, y frecuentemente la enfermedad atacara a estas personas ancianas que han sufrido este tipo de profilaxis [67]. Si las respuestas primaria y secundaria de anticuerpos hacia la vacunación han sido dañadas, el grado de deterioro puede ser mayor cuando la célula T involucrada es requerida para dirigir la respuesta de anticuerpo.

El envejecimiento del sistema inmune involucra tanto una inmunidad mediada por células como inmunidad humoral; la inmunidad innata ancestral también es ampliamente modificada con la edad. Los principales cambios en la inmunidad celular durante la vejez son: disminución en el número absoluto de células CD3, CD4 y CD8, así como un incremento de las células T periféricas activadas (HLA-DR⁺) [68]; disminución en los linfocitos T "naive" (VD45RA⁺); alteraciones en la traducción de señales a través del TCR; daño en la proliferación de linfocitos inducidos por la fitohemaglutinina (PHA); cambio en la producción de citocinas Th1 a Th2 e incremento en la expresión de varias moléculas de adhesión celular (CAMs) [68].

Los cambios en la inmunidad humoral que se dan con la edad incluyen: incremento de los niveles de inmunoglobulinas en suero (particularmente IgA e IgG, excepto la subclase IgG4) [39], disminución en el número total de linfocitos B; disminución de autoanticuerpos órgano- específicos;

incremento en autoanticuerpos no órgano-específicos y disminución en la respuesta de anticuerpos protectivos altamente afines.

Los cambios en la inmunidad innata producidos con la vejez son los siguientes: incremento de las células NK, disminución en la función de las células NK, alteración funcional en la neutrofilia, defectos órgano-específicos en macrófagos, disminución en el requerimiento de macrófagos para una óptima respuesta de células T e incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias por células mononucleares como son la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α [69].

Inmunidad celular y vejez

Se sabe que el timo sufre una rápida involución con la edad y así la función tímica y la producción de células T se ve severamente comprometida en individuos de edad avanzada. Existen factores intrínsecos y extrínsecos relacionados con la involución tímica. Los factores intrínsecos son cambios asociados con la edad no solo del microambiente tímico que falla al promover la diferenciación de células T sino también de los timocitos o sus precursores en la médula ósea. En cambio, los factores extrínsecos son principalmente los cambios relacionados con la edad del sistema neuroendocrino. Como una consecuencia de la vejez, tanto las células del microambiente tímico y los linfocitos precursores sufren profundos cambios morfológicos y funcionales. La involución tímica se debe principalmente a cambios cuantitativos más que a cambios cualitativos.

La expansión tímica independiente de una población de células T maduras puede representar el paso primario para que las células T se regeneren. Durante la vejez, cuando la habilidad de llenar el pool "naive" vía timopoiesis esta reducida, el sistema inmune ensaya para compensar la progresiva pérdida de células T "naive" mediante el incremento de las vías timo independientes, estos cambios dependientes de la edad en las subpoblaciones de células T, son una condición caracterizada por la pérdida de la respuesta inmune adaptativa hacia nuevos patógenos intracelulares.

Las células "naive" permanecen inmóviles, pero la mayoría mantiene activo su metabolismo, para protegerse contra factores intrínsecos que resultan de su metabolismo, así como de factores extrínsecos como son agresiones de fondo químico o por irradiación. Se ha observado que éstos mecanismos protectivos disminuyen su efectividad con la edad pudiendo resultar en la muerte de las células por la acumulación de daños. Las células somáticas normales tienen un número limitado de rondas de divisiones celulares antes de que ocurra la cesación de su crecimiento. Las células T del sistema inmune son particularmente sensitivas a esta llamada "senescencia replicativa" debido a la naturaleza intrínseca del sistema inmune.

Una característica bien conocida de las células T en los ancianos es el alto porcentaje de células T con características fenotípicas de células de memoria. Un desequilibrio relacionado con la edad de células virgen y células de memoria se encuentra en una subpoblación de células CD4 y

CD8 [66, 70]. La alteración de la función y de la respuesta proliferativa de las células T de memoria y "naive" también se ve alterada durante la senescencia [71], lo que sugiere que las estrategias de vacunación dirigidas a los ancianos deben tomar en cuenta la disminución en el número de células T "naive" y la disminución de su sensibilidad [72].

Existe un estudio que demuestra una disminución de linfocitos T "naive" dentro de la subpoblación de células T CD8⁺ en personas ancianas [66]. Éste agotamiento de células T puede responder a la reducida competencia por enfrentar nuevos patógenos intracelulares que ocurren durante la senescencia. Las células T CD8 que expresan moléculas del MHC clase I juegan un papel muy importante en enfermedades infecciosas causadas por patógenos que viven dentro de las células. Por lo tanto las células T CD8⁺ "naive" constituyen un importante reservorio, y su escasez podría predecir la falta de protección contra nuevos antígenos clase I restringidos. Basándose en la pérdida de células T "naive" CD8⁺ que se presenta durante la vejez se entiende la presencia de una alta susceptibilidad a las infecciones virales y la baja expectativa de vida en estas personas.

Se ha observado además que una disminución en la producción de IL-2 ocurre con la edad, ésta disminución puede ser interpretada como resultado de los cambios en el número total de células T o en el cambio de una o más subpoblaciones de células T. Es posible que la disminución en el número de células T "naive" durante la vejez sea la responsable, al menos parcialmente, de la disminución en la producción de IL-2 [73].

Con respecto a la red de citocinas, el principal hallazgo en los ancianos es un cambio en la producción de citocinas Th1 a Th2, particularmente, la producción de INF- γ es reducida y la producción de IL-4 es aumentada, acompañados con la disminución de la respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos, como por ejemplo los producidos específicamente en contra del virus de influenza. La reducida producción de INF- γ puede ser consecuencia de una disminución en las células T CD45RO⁺ que son productores de ésta citocina.

En personas de edad avanzada se pueden observar otro tipo de alteraciones como las que se presentan en la traducción de señales a través del complejo de receptores de las células T (TCR) que se ha asociado con la hipersensibilidad relacionada con la edad tanto de las células T "naive" como a las de memoria [67]. También se ha visto que la expresión en la membrana de ciertas moléculas en la superficie de los linfocitos involucradas en el proceso de "homing", y de distintas moléculas de adhesión celular, cambian con la edad las cuales pudiera estar involucradas en el incremento en los ancianos de la susceptibilidad a infecciones [68].

Un resultado común en diferentes células que sufren senescencia replicativa es el acortamiento de los telómeros. La mayoría de las células somáticas normales pierden la actividad de la telomerasa y gradualmente pierden DNA telomérico durante el envejecimiento. Así, análisis del ciclo celular de linfocitos T activados de humanos viejos, muestran un incremento en la proporción de células no cíclicas con la edad. Una significativa disminución en la actividad de cdk6,

una ciclin-cinasa que controla la transición G0/G1 y G1/S, ha sido observada en linfocitos T de donadores ancianos [74].

Mutaciones o daños en el DNA de genes que controlan el crecimiento y división celular puede ocurrir en células T envejecidas y pueden ser responsables, o al menos en partes, de proliferación defectiva, apoptosis o arresto de ciclo celular, llevando a alteraciones en células T mediando la respuesta inmune [74]. También se ha propuesto una teoría llamada teoría de la oxidación mitocondrial de acuerdo con la cual la vejez se encuentra unida a una lesión del genoma mitocondrial (mtDNA) por el anión superóxido y otras especies de oxígenos reactivos (ROS) formados en la cadena de transporte de electrones, resultando en la disminución bioenergética y fisiológica. ROS puede dirigir tanto el stress oxidativo causando la muerte apoptótica y genuina senescencia dependiente de mitocondria en linfocitos.

Inmunidad humoral

La marcada susceptibilidad de los ancianos hacia las enfermedades infecciosas y la pobre respuesta a las vacunas [67] parte el resultado de la alteración de su respuesta mediada por anticuerpos. La reducida sensibilidad humoral y los alterados mecanismos de defensa mediados por los anticuerpos, observados durante la vejez, se deben no solo a la disminución de la función de las células T helper si no también a un intrínseco déficit de células B primarias [39]

En los ancianos, los niveles de inmunoglobulinas en suero se observan aumentados [75] particularmente, se observa un significativo aumento en los niveles de IgA e IgG; en personas mayores y centenarios saludables, estos dos tipos de anticuerpos pueden conferir gran protección contra las infecciones virales y bacterianas. De forma interesante, se han encontrado muy pocas deficiencias en las subclases de IgGs en los ancianos, a excepción de IgG4 [39]. También se observa la ausencia de anticuerpos órgano-específicos en el plasma de personas ancianas y centenarias sanas quienes despliegan complejos cambios en la función de la tiroides.

Además se han observado cambios relacionados con la edad en los niveles de autoanticuerpos y células B, lo cual puede ser explicado por diferentes causas: a) un mayor incremento en el número de células B y plasmáticas en otros órganos que en sangre periférica; b) un incremento en el lapso de vida de las células B y plasmáticas en los centros germinales; c) un incremento en la producción de IgG por célula [73]. Sin embargo se ha observado una disminuida habilidad para generar una respuesta que sea protectora mediada por anticuerpos de alta afinidad en contra de antígenos infecciosos. Existen evidencias que sugieren que diferentes genes que codifican para la región variable de inmunoglobulinas pueden codificar estos anticuerpos y que los mecanismos de hipermutación somática en estos genes es ineficiente. La hipermutación somática en las células B es el principal evento en el proceso de afinidad en la maduración de los anticuerpos.

Durante la vejez la disminución de la inmunidad humoral y la activación de las células B puede estar relacionada con la disminución en la expresión de CD40L; se ha demostrado que es

necesaria la presencia de esta molécula en la superficie de células T de ratones viejos para que se lleve a cabo una efectiva entrega de las señales mediadas por contacto a las células B en reposo [74].

La disminución en la producción de IL-2 con la vejez puede contribuir a disminuir la ayuda de las células T a producir anticuerpos y, de hecho, *in vitro* IL-2 puede en algunos casos corregir la pérdida en la producción de anticuerpos relacionada con la edad [65, 76].

Inmunidad innata

La función de los macrófagos y los granulocitos en los ancianos se ve dañada, causando que las infecciones virales y bacterianas sean la causa más común de enfermedad y muerte entre los ancianos, y cuando la infección es establecida, los ancianos también ven disminuida la capacidad de prevenir su propagación.

Se ha demostrado una disminución en la actividad funcional de los neutrófilos polimorfonucleares, observándose una fagocitosis anormal o dañada, quimiotaxis, desgranulación y una relativamente preservada o ligera disminución de la actividad asesina intracelular en los neutrófilos polimorfonucleares [72]. También durante la vejez se han encontrados defectos órgano-específicos en la función de fagocitos mononucleares

El número absoluto de fagocitos mononucleares no se ve disminuido con la vejez, sin embargo se necesita un mayor número de macrófagos para generar una respuesta óptima de células T; por lo tanto, la capacidad de las células mononucleares de personas viejas sanas, así como de centenarios, para producir citocinas proinflamatorias como son la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α , se debe de incrementar con la edad [69].

Con respecto a la actividad de las células NK, se ha demostrado un incremento relacionado con la edad en la proporción de células NK y células T CD56⁺ y/o CD57⁺ (posiblemente de origen extratímico) [77, 78]. La expansión de las células NK puede explicarse como un mecanismo compensatorio como resultado de su función disminuida. Esta puede ser la explicación de el por que personas centenarias pueden ser capaces de protegerse contra agentes infecciosos y no mostrando un incremento en la susceptibilidad hacia enfermedades infecciosas; y cuando los ancianos tienen un incremento en la frecuencia a infecciones como influenza, tuberculosis y otras, este incremento es producido por la presencia de cambios patológicos en la respuesta inmune. Recientes datos sugieren que una persistente baja en la actividad de células NK es un predecesor de la morbilidad [75, 77].

Estado nutricional

La importancia del estatus nutricional en la integridad de la respuesta inmune generalmente es reconocida y puede ser tomada dentro de las consideraciones en el caso de los

sujetos ancianos [78]. Se ha demostrado un vínculo muy estrecho entre el estatus nutricional y la respuesta a la vacunación con influenza [78].

Existen distintos ensayos con suplementaciones experimentales de dietas que han demostrado un mejoramiento en distintos parámetros inmunes, como es el incremento en células T "helper" [79, 78, 80] o en la inmunidad humoral [78, 80].

APENDICE IV

Los Interferones

Dos son los principales tipos de interferones. El tipo I o INF viral incluye INF- α , INF- β , INF- ω e INF- τ ; los interferones tipo II son los INF- γ . La mayoría de los tipos celulares producen INF- α e INF- β , que son los INF del tipo I más caracterizados, mientras que el INF- γ es producido solo por ciertas células del sistema inmune incluyendo las células NK, las células T helper CD4⁺ (T_H1) y las células T CD8⁺ citotóxicas. Los interferones median su efecto a través de interacciones con receptores tipo específicos, que son diferentes y no redundantes para los INFs tipo I y tipo II. Los receptores de INF no tienen actividad enzimática, pero ponen en movimiento una compleja vía de señalización que resulta en la transcripción de cientos de genes estimulados por INF (ISGs), los cuales pueden efectuar distintas funciones como las de la protein cinasa R (PKR) que activado negativamente puede afectar las vías de regularización celular, principalmente por la traducción de mRNA y por eventos transcripcionales, inhibiendo la replicación del virus y la producción de progenie viral

Generalidades de las vías de INF

Los INF tipo I son un grupo de citocinas antivirales que son inducidas durante la infección por productos de replicación viral, como son los RNA de doble cadena (dsRNA). Los INF ejercen su función biológica por unión a receptores específicos de la superficie celular. A su vez, desencadenan la vía de señalización de INF – principalmente la vía JAK-STAT – que eventualmente induce la expresión de un gran número de genes estimulados por INF (ISGs). Los ISGs son los caballos de batalla de la respuesta de INF, preparan un estado antiviral, antiproliferativo e inmunoregulatorio en la célula huésped.

Como ya se mencionó antes, los INFs tienen una potente propiedad inmunomoduladora. Es muy probable que una completa respuesta de INF involucre tanto una respuesta inmune innata como una adaptativa [81, 82]. Las moléculas del MHC clase I y II presentan péptidos antigénicos, que se derivan de la degradación de proteínas virales, a células T CD8⁺ y células T CD4⁺, respectivamente. Ambas clases de células T tanto CD8⁺ como CD4⁺ restringidas son activadas durante la infección viral [83]. Por tal, no es sorprendente que los INF también regulen la sobreexpresión de moléculas del MHC tanto clase I como clase II, y por lo tanto, potencien la respuesta inmune celular en contra de una infección por virus *in vivo*. Este puede ser un evento posterior en el repertorio de la respuesta del huésped que, contribuya principalmente a recuperarse de una infección.

El virus de influenza cumple un importante rol en la historia de los INF. El INF tipo I fue descubierto utilizando virus de influenza inactivado por calor. Además, la proteína antiviral Mx

inhibe la replicación del virus de influenza en muchos niveles, y es uno de los sistemas prototipos iniciales para estudiar los efectos antivirales del INF [84].

APENDICE V

El control de la influenza, antivirales adjuntos a la vacuna

Los agentes antivirales que atacan la NA se muestran efectivos contra virus de influenza tipo A y B y sus pruebas clínicas parecen ser promisorias [16].

Recientemente se comenzó a desarrollar una nueva generación de agentes antivirales contra influenza, basados en la inhibición de la neuraminidasa viral. Los inhibidores de neuraminidasa son agentes activos del virus influenza A así como de influenza B, y su previa aplicación causa poco o mínimo efecto lateral. Parecen ser efectivos utilizados como terapia profiláctica y que administrados tan pronto aparecen los primeros síntomas clínicos, reducen considerablemente la duración y la severidad de la enfermedad [85].

Actualmente, en Estados Unidos se han autorizado cuatro drogas: la Amantadina y la Rimantidina, las cuales son inhibidores químicamente relacionados con el canal de iones (proteína M2) que presenta la envoltura viral [86]; zamivir y oseltamivir son inhibidores de NA [87] y previenen la apropiada liberación de las partículas de virus de influenza de la membrana citoplasmática. Aunque estas drogas generalmente son efectivas, su uso extendido es limitado debido a los efectos colaterales y a la posible emergencia de resistencia a la droga.

APENDICE VI

Desarrollo de nuevas alternativas de vacunas

Vacunas de virus de influenza vivas atenuadas adaptadas en frío. En Rusia, la vacuna de influenza viva adaptada en frío, ha sido administrada a diez millones de niños con una efectividad protectora y sin evidencia de deterioro o de efectos colaterales [88]. Como las vacunas vivas atenuadas pueden ser administradas por spray nasal. Los virus vivos también pueden inducir inmunidad neutralizante local y una respuesta inmune mediada por células que puede ser asociada con una inmunidad más larga y duradera, además de una mayor protección cruzada, que la obtenida por las preparaciones de virus inactivadas químicamente. Finalmente, en ciertos grupos de edades (niños de 6 meses a 9 años) se puede observar la protección total, y también hay evidencia de una drástica reducción en infecciones bacterianas secundarias y por ende en el requerimiento de antibióticos [89].

Diseño genético de las vacunas de influenza de virus vivos. Es posible hacer cepas de virus a la medida con las únicas propiedades que llevan a su atenuación. Por ejemplo, intercambiando la región promotora del gen de la NA de un virus de influenza A con el de un gen de virus de influenza para ratón [90].

Vacunas de virus de influenza vivo que expresan genes alterados NS1. Estos sistemas rescatan un plásmido haciendo posible el diseño de deleciones en el genoma de virus de influenza para mejorar la estabilidad. En el caso del virus de influenza, cambios en la proteína NS1 pueden resultar en la alteración de las características virulentas. Específicamente, truncando la proteína NS1 se incrementa la atenuación tanto del virus de influenza A como del virus de influenza B en ratones [91]. En humanos, un virus carente del gen NS1 puede ser también atenuado siendo conveniente su uso para vacunas. Generalmente se realizan diseños que posean óptimas características fenotípicas para estimular una robusta respuesta inmune en el humano, al mismo tiempo siendo atenuados con seguridad debido a que ellos no pueden superar completamente la respuesta de INF por parte del huésped. Los humanos –incluso cuando se encuentran inmuno comprometidos– pueden responder eficientemente a un virus que tienen una reducida actividad anti-INF y así no enfermarse. El hecho de que la respuesta de INF pueda ser más alta en humanos infectados con mutantes NS1 que en aquellos infectados con virus de tipo silvestre, puede llevar a una vigorosa (potenciada) respuesta inmune humoral. Esto se basa en la creencia de que el INF tipo 1 puede potencialmente aumentar la respuesta de anticuerpos primaria contra proteínas y que puede actuar como adyuvantes en ratones [92].

Uso de virus de influenza defectuosos en su capacidad replicativa como candidatos a vacunas. Otra alternativa promisoría para el desarrollo de vacunas de influenza con virus “vivos” es la construcción de partículas virales que sufran solo un ciclo de replicación. Así, esta preparación induce una respuesta protectora de anticuerpos y también estimula una fuerte respuesta inmune mediada por células sin que permita la replicación del virus infeccioso [93]. Otro

camino para atenuar virus y generar una cepa defectuosa en su replicación es mediante la eliminación del gen M2 [94].

Vacunas de DNA. Este tipo de vacuna involucra la administración - ya sea por inyección o por administración tópica - de un plásmido de DNA que codifique una o más de las proteínas del virus de influenza [95].

Novedoso aprovechamiento de adyuvantes. Las vacunas de virus de influenza muerto o inactivado actualmente en uso son administradas por inyección intramuscular. Para mejorar su inmunogenicidad, se han utilizado preparaciones como liposomas que contienen colesterol y partículas virales (ISCOMS [complejos inmuno-estimulantes]). Estas preparaciones han sido altamente eficientes en ratones cuando son aplicadas tanto subcutáneamente o por vía intranasal [96].

Una vacuna universal contra la influenza. La posibilidad de una vacuna universal en contra de la influenza ha llamado la atención de un gran número de investigadores, ya que los continuos cambios antigénicos del virus de influenza hacen necesaria la formulación anual de la vacuna de influenza. Se ha intentado generar una vacuna universal en contra del virus de influenza A mediante la fusión de los dominios extracelulares de la proteína conservada M2 de un virus de influenza A con el core de proteínas del virus de hepatitis B [97]. Se encontró que la administración intraperitoneal o intranasal en ratones produjo un alto grado de protección contra el desafío viral. Parece observarse que una respuesta inmune contra un antígeno menor de la superficie como la proteína M2 podría ser suficiente para proveer una completa protección contra influenza en la población humana a la larga.

Como una alternativa dirigida solo a los antígenos menores que son los más conservados, puede ser posible la construcción de una HA "genérica" que pueda ser usada como un inmunógeno en las vacunas, basado en el armazón de aminoácidos conservados, prediciendo la evolución del virus de influenza humano [98] o identificando por lo menos una tendencia de variación del antígeno. Esta estrategia podría ser de gran beneficio en la determinación de las cepas más apropiadas para su uso en la vacuna de influenza. Si esto fuera posible se podría utilizar el desarrollo genético para construir cepas sintéticas que anticipen la evolución de las tendencias y éstas podrían ser usadas en la futura formulación de vacunas.

APENDICE VII

Modos de acción de los adyuvantes

- Inmunomodulación

Se refiere a la habilidad de algunos adyuvantes de modificar la red de citocinas, resultando en la sobreregulación de ciertas citocinas acompañada de la desregulación de otras.

- Presentación

Se refiere a la habilidad de un adyuvante a preservar la integridad conformacional de un antígeno y presentarlo a su propia célula efectora inmune. Esto ocurre cuando un adyuvante es capaz de interactuar con un antígeno de forma que la conformación del epítope se mantiene efectiva.

Tres grandes conjuntos de interacciones son requeridas para lograr una efectiva respuesta de anticuerpos. La **primera interacción** es con las células profesionales presentadoras de antígeno (APC), típicamente células dendríticas y células de Langerhans (LC), y posiblemente los macrófagos [99]. La **segunda interacción** involucra antígenos y células B, y el reconocimiento es principalmente entre la superficie de la inmunoglobulina y el Ag [10]. La **tercera interacción** esta soportada por evidencias [101, 102] que sugieren que las células dendríticas foliculares (FDC) pueden proveer por largos periodos un reservorio de Ag nativos que son esenciales tanto para la efectiva maduración de la respuesta inmune como para aumentar la persistencia de la producción de anticuerpos biológicamente pertinentes. Así la presentación de Ag puede conferir tres grandes beneficios; primero, puede maximizar la cantidad de anticuerpos conformacionalmente relevantes (ejemplo neutralización); segundo, puede influenciar la afinidad de los anticuerpo y finalmente puede influenciar la duración de la respuesta inmune.

- Inducción de la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺

La inducción de la respuesta CTL generalmente requiere que el Ag sea procesado dentro del citosol celular (paso endógeno), donde los péptidos llegan a ser incorporados dentro del surco de la molécula MHC I y entonces ser expresados en la superficie celular.

Para que un adyuvante pueda ser utilizado para inducir CTL, debe facilitar la incorporación o persistencia de un péptido apropiado dentro del MHC-I. La forma en que un adyuvante pueda lograr esto es que interactúe de alguna manera con la membrana celular para que el Ag. asociado con el adyuvante se deposite dentro del citosol en una forma conveniente para su normal procesamiento en el proteosoma.

Esto puede ocurrir por fusión con la membrana externa o por endocitosis / pinocitosis seguido por fusión de la membrana del endosoma o por ruptura (escape endosomal).

La incorporación de un inmunomodulador dentro de esta formulación de adyuvante, especialmente uno que induzca la producción de $INF\gamma$ puede esperarse que incremente relevantemente la expresión de péptidos MHC-I.

- Direccionalidad “Targeting”

Esto define la habilidad de un adyuvante para presentar un inmunógeno a una célula inmune efectora, generalmente vía células presentadoras de Antígeno (APCs). Esta tipo de actividad de adyuvante puede no modificar el tipo de respuesta inmune, mas bien puede afectar la cantidad de inmunógeno requerido para lograr a dar un efecto, por ejemplo la eficiencia de generación de respuesta inmune.

REFERENCIAS

- [1] Murpy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, et al., editor. Fields Virology. New York: Raven Press, 1998; 1397-447.
- [2] Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res.* 1989; 36: 107-51.
- [3] Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell.* 1992; 69: 577-578.
- [4] Yewdell J, Garcia A: Influenza virus still surprises. *Current Opinion in Microbiology.* 2002; 5: 414-8.
- [5] Lamb R A, Zebedes S L. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell.* 1958; 40: 627-33.
- [6] Pinto L H. Holsinger L J, Lamb R A. Influenza M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 1992; 69: 517-28.
- [7] Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into nucleus. *J. Virol.* 1991; 65: 232-44.
- [8] Phair J, Kauffman C A, Bjorson A, Abams L and Linnemain C. Jr. Failure respond to influenza vaccine in the aged: correlation with B-cell number and function. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1978; 92: 822-28.
- [9]. A.D.M.E. Osterhaus, J. C. de Jong, The control of influenza: antivirals as an adjunct to vaccines, *Vaccine*, 18 (2000): 779-80.
- [10] Ahmed AH, Nicholson KG, Nguyen Van Tam. Reduction in mortality associated with influenza vaccine during 1989-1990 epidemic. *Lancet.* 1995; 346: 591-5.
- [11] Goveaert TME, Thijis CTMCN, Masurel N, Spreger MJW, The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals; a randomized double-blind placebo-controlled trial. *JAMA.* 1994; 272: 1661-5.
- [12] Falsey AR, Barker WH, et. Al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis.* 1995; 172: 389-94.
- [13] Glezen WP. Emerging infections: pandemic influenza. *Epid Rev.* 1996; 18: 64-76.
- [14] Glezen WP, Decker M Joseph SW. Acute respiratory disease associated with influenza epidemics in Houston, 1981-1983. *J Infect Dis.* 1978; 155: 1119-26.
- [15] Hay A J, Zmbom M S. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 1985; 4: 3021-4.
- [16]. Robert G. Webster. Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine.* 2000; 18: 1686-89.
- [17] Glück R., Wegmann A., Influenza vaccination in the elderly, *Developmental and Comparative Immunology*, Vol 21; 1997: 6: 501-7,
- [18] Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, Nakaya Y, Zheng H, Muster T, García-Sastre A, Palese P: Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 4309-14.
- [19] Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W: A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med.* 1999; 5: 1157-63.

-
- [20] Ada, G. L., Jones, P. D. The immune response to influenza infection. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* 1986; 128: 1-54.
- [21] Gorse, G. J.; Belsher, R. B. Enhanced lymphoproliferation to influenza A virus following vaccination of older, chronically ill adults with live-attenuated viruses. *Scand. J. Infect. Dis.* 1991; 23: 7-17.
- [22] Gorse, G.J.; Belshe, R. B. Enhancement of anti-influenza A virus cytotoxicity following influenza A virus vaccination in older chronically ill adults. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 2539-50.
- [23] Gorse G., et al., Increased anti-influenza A virus cytotoxic T cell activity following vaccination of the chronically ill elderly with live attenuated or inactivated influenza virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 1995; 172: 1-10,
- [24] Beyer, W., et al., Antibody induction by influenza vaccines in the elderly: a review of the literature. *Vaccine.* 1989; 7: 385-94.
- [25] Gross, P.A. et al., The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A metaanalysis and review of the literature. *Ann. Intern. Med.* 1995; 123: 518-257.
- [26] Edelman R. An overview of adjuvant use, In :O' Hagan D, editor *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols.* Totowa (NJ): Human Press, 2000: 1-27.
- [27] Giuseppe Del Giudice, Audino Podda, Rino Rappuoli. What are the limits of adjuvanticity?. *Vaccine.* 2002; 20: S38-S41
- [28] Jacqueline M K, Xuhua L, Charles W, Mark J N. A nonionic block co-polymer adjuvant (CRL1005) enhances the immunogenicity and protective efficacy of inactivated influenza vaccine in young and aged mice. *Vaccine* 2000; 18: 2177 - 87
- [29] Treanor JJ, Mattison HR, Dumyati G, Yinnin A, Erb S, O'Brien D, Dolin R, Betts RF. Protective efficacy of combined live intranasal and inactivated influenza A virus vaccines in the elderly. *Ann Int Med* 1992; 117: 625 - 32
- [30] John C. Cox and Alan, R. Coulter, Adjuvants – a classification and review of their modes of action, *Review. Vaccine.* 1997; 15, (3): 248 – 256
- [31] Krisel JD, Spruance J. Calcitriol (1,2,5-dihydroxy-vitamin D3) coadministered with influenza vaccine does not enhance humoral immunity in human volunteers. *Vaccine* 1997; 17: 1883 - 8
- [32] R. Fasparini, T. Pozzi, E. Montomoli, E. Fracapane, F. Senatore, M. Minutello & A. Podda. Increased immunogenicity of the MF59-adjuvanted influenza vaccine compared to a conventional subunit vaccine in elderly subjects. *European Journal of Epidemiology* 2001, 17: 135 - 140
- [33] Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001; 19: 2673 - 2680
- [34] Dupuis M, Murphy T.J., Higgins, D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, et al., Dendritic cells internalize vaccine adjuvants after intramuscular injection. *Cell Immunol* 1988; 186: 18 – 27.
- [35] Dupuis M, McDonald DM, Ott G, Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine* 2000; 18: 434 -9. Higgins DA, Carlson JR, van Nest G. MF59 adjuvants enhances the immunogenicity of influenza vaccine in both young and old mice. *Vaccine* 1996; 14: 478 - 84

-
- [36] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Kubli-Garfias C, Vazquez R, Terrazas X, and E. Sciotto. Towards *Taenia solium* Cysticercosis vaccine: an epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infet. Immun.* 1999; 67 (5): 2522-30.
- [37] Clemens ML, Betts RF, Tierney EL, Murphy BR. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type. *J. Clin Microbiol.* 1986; 24: 157-60.
- [38] Clemens ML, Murphy BR. Development and persistence of local and systemic antibody response in adults given attenuated or inactivated influenza A vaccine. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 66-72.
- [39] Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto M.F., Corsi M.P., Quaglino D., The immune system in the elderly I. Specific humoral immunity, *Immunol. Res.* 1999; 20: 101-8.
- [40] Taylor, C. E., Cytokines as adjuvants for vaccines: antigen-specific responses differ from polyclonal responses, *Infect. Immun*, 1995; 63: 3241.
- [41] Krakauer T., Russo C., Serum cytokine levels and antibody response to influenza vaccine in the elderly, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2001; 23 (1): 35-41.
- [42] Audino Podda. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine.* 2001; 19: 2673-80.
- [43] Ontiveros Fernando. Tesis de Licenciatura "Activación de células dendríticas murinas con tres epitopes protectores contra la cisticercosis" Facultad de Ciencias, UNAM. Agosto 2001.
- [44] Zhimov OP, Konakova TE, Wolff T, Klenk HD: NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol.* 2002; 76: 1617-25.
- [45] Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS: Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol.* 2001; 75: 7875-81.
- [46] O'Neill RE, Talon J, Palese P: The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 1998; 17:288-96.
- [47] Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y: Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* 2000; 19: 6751-8.
- [48] Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Amon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 2001; 409: 1055-60.
- [49] Amon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O: Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol.* 2001; 31:2680-9.
- [50] Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, García Sastre A: Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 2000; 74: 7989-96.
- [51] Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, García-Sastre A: Influenza A virus NS1 protein prevents the activation of NF- κ B and induction of type I IFN. *J Virol.* 2000; 74: 11566-73.
- [52] Yuan W, Krug RM: Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J.* 2001; 20: 362-71.

-
- [53] Aragón T, de La Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortín J, Nieto A: Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 6259-68.
- [54] Chen Z, Li Y, Krug RM: Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 1999; 18:2273-83.
- [55] F.B. Smith, *The Russian Influenza in the United Kingdom, 1889-1894, Social History of Medicine.* 1995; 8: 55-73.
- [56] J.K. Taubenberger, A.H. Reid, T.A. Jancewski, T.G. Fanning, Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus, *Phil. Trans.R. Soc. Lond.* 2001; B356: 1829-38.
- [57] M.J. Gibbs, J.S. Armstrong, A.J. Gibbs, Recombination in the haemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu" *Science, J. Recombination* 2001; 293: 1842.
- [58] Center for Disease Control, Mortality and Morbidity Weekly Report. Update: Influenza activity - United States, April 5, 2002; 2001-02 Season..
- [59] Reid, A., Fanning, T., Hultin, J., and Taubenberger, J. 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1651-6.
- [60] Y. Kawaoka, S. Krauss, R.G. Webster, Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics, *J. Virol.* 1989; 63: 4603-8.
- [61] R.G. Webster, W.G. Laver, Studies on the origin of pandemic influenza 1. Antigenic analysis of A2 influenza viruses isolated before and after the appearance of Hong Kong influenza using antisera to the isolated hemagglutinin subunits. *Virology.* 1972; 48: 433-44.
- [62] W.G. Laver, R.G. Webster, Studies on the origin of pandemic influenza 3. Evidence implicating duck and equine influenza viruses as possible progenitors of the Hong Kong strain of human influenza, *Virology.* 1973; 51: 383-91.
- [63] Palese P and García-Sastre A, Influenza vaccines: present and future, *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 9-13.
- [64] T. Ito, J. Nelson, S.S. Couceiro, S. Kelm, L.G. Baum, S. Krauss, M.R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, K.C. Paulson, R.G. Webster, Y. Kawaoka, Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential, *J. Virol.* 1998; 72: 7367-73.
- [65] Pawelec G., Solana R., Immunosenescence, *Immunol. Today.* 1997; 18: 514-6.
- [66] Fagnoni F.F., Vescovini R., Passeri G., Bologna G., Pedrazzoni M., Lavagetto G., Casti A., Franceschi C., Passeri M., Sansoni P., Shortage of circulating naive CD8+ T cells provide new insights on immunodeficiency in aging, *Blood.* 2000; 95: 2860-8.
- [67] Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto M.F., Quaglino D., Immunological changes in the elderly, *Aging Clin. Exp. Res.* 1999; 11: 281-6.
- [68] Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto F., Modesti M., Quaglino D., Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: a quantitative flow cytometric analysis, *Am. J. Hematol.* 2001; 67: 63-72.

-
- [69] Rich E., Mincek M., Armitage K., Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen, *Gerontology*. 1993; 39: 93–108.
- [70] Okumura M., Fujii Y., Takeuchi Y., Inada K., Nakahara K., Matsuda H., Both CD45RA+ and CD45RA– subpopulations of CD8+ T cells contain cells with high levels of lymphocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells, *J. Immunol.* 1993; 150: 429–37.
- [71] Ginaldi L., De Martinis M., Modesti M., Loreto F., Corsi M.P., Quaglino D., Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly, *Gerontology*. 2000; 46: 242–248.
- [72] Linton P.J., Haynes L., Tsui L., Zhang X., Swain S., From naive to effector-alterations with aging, *Immunol. Rev.* 1997; 160: 9–18.
- [73] Ginaldi L., De Martinis M., D’Ostilio A., Marini L., Loreto M.F., Quaglino D., The immune system in the elderly III. Innate immunity, *Immunol. Res.* 1999; 20: 117–26.
- [74] Solana R., Pawelec G., Molecular and cellular basis of immunosenescence, *Mechanisms of Ageing and Development*. 1998; 102: 115–29.
- [75] Cossarizza A., Ortolani C., Monti D., Franceschi C., Cytometric analysis of Immunosenescence, *Cytometry*. 1997; 27: 297–313.
- [76] Li S.P., Verma S., Miller R.A., Age-related defects in T cell expression of CD40 ligand and induction of in vitro B cell activation, *Aging Immunol. Infect. Dis* 1995; 6: 79–93.
- [77] Franceschi C., Monti D., Sansoni P., Cossarizza A., The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians, *Immunol. Today*. 1995; 16: 12–16.
- [78] Fulop T., Wagner R., Abdelouhed K., Weber J., Trottier L., Payette E., Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects, *J. Gerontol.* 1999; 54: M59–64.
- [79] Chandra R.K., Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infections in the elderly subjects, *Lancet*. 1992; 340: 1124–1127.
- [80] Hollingsworth J.W., Otre R.G., Boss G.R., Fryberger M.F., Strause L.G., Saltman F., Immunodeficiency and lymphocyte ecto-5’ nucleotidase activity in the elderly: a comparison of the effect of a trace mineral supplement (1 URSDA) with high zinc (6,7 X URDA), *Nutr. Res.* 7: 801–11.
- [81] Biron, C. A. Interferons- α and - β as immune regulators — a new look. *Immunity*. 2001; 14, 661–4.
- [82] Biron, C. A. Role of early cytokines, including α - and β - interferons (IFN- α/β), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin. Immunol.* 1998; 10, 383–90.
- [83] Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19, 65–91.
- [84] Haller, O., Frese, M. & Kochs, G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* 1998; 17, 220–30.
- [85] Hayden FG, Osterhaus ADME, Bohnen AM. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor Zanamivir in the Treatment of Influenza virus infections. *N Engl J. Med* 1997; 37; 874-81.

-
- [86] Hay, A., Wolstenholme, A., Skehel, J., and Smith, M. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 4:3021–4.
- [87] Palese, P., and Compans, R.W. 1976. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J. Gen. Virol.* 33:159–163.
- [88] Wareing, M., and Tannock, G. 2001. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine.* 19: 3320–30.
- [89] Nichol, K. 2001. Live attenuated influenza virus vaccines: new options for the prevention of influenza. *Vaccine.* 19: 4373–7.
- [90] Muster, T., Subbarao, E.K., Enami, M., Murphy, B.R., and Palese, P. 1991. An influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' noncoding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5177–81.
- [91] Talon, J., et al. 2000. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4309–14.
- [92] Bon, A., et al. 2001. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells *in vivo*. *Immunity.* 14: 461–70.
- [93] Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., Kida, H., and Kawaoka, Y. 2002. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 76: 767–73.
- [94] Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. 2001. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J. Virol.* 75: 5656–62.
- [95] Donnelly, J., et al. 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat. Med.* 1: 583–7.
- [96] Sambhara, S., et al. 2001. Heterosubtypic immunity against human influenza A viruses, including recently emerged avian H5 and H9 viruses, induced by FLU-ISCOM vaccine in mice requires both cytotoxic T-lymphocyte and macrophage function. *Cell. Immunol.* 211: 143–53.
- [97] Neiryck, S., et al. 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 5: 1157–63.
- [98] Bush, R., Bender, C., Subbarao, K., Cox, N., and Fitch, W. 1999. Predicting the evolution of human influenza A. *Science.* 286: 1866–7.
- [99] Brewer, J. M., Richmond, J. and Alexander, J. The demonstration of an essential role for macrophages in the *in vivo* generation of IgG2a antibodies. *Clin. Exp. Immun.* 1994; 97, 164-71.
- [100] Cambier, J. C., Pleiman, C. M. and Clark, M. R. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptor. *A. Rev Immun.* 1994; 12, 457-86.
- [101] Caux, C., Liu, Y. –J. And Banchereau, J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immun. Today.* 1995; 16: 2-4.
- [102] Ada, G. L. The next steps. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82: 251-6.